

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

*Departamento de Biología Funcional*

*Área de Genética*

***“Loci microsatélites como marcadores genéticos  
para la mejora del rendimiento en acuicultura  
de especies marinas”.***

*Memoria que  
para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Oviedo  
presenta*

***Yaisel Juan Borrell Pichs.***

***Oviedo, Octubre de 2002.***



Universidad  
de Oviedo

Reservados todos los derechos  
© El autor

Edita: Universidad de Oviedo  
Biblioteca Universitaria, 2009  
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 42

ISBN 978-84-691-7820-1  
D.L.: AS.05360-2008





# UNIVERSIDAD DE OVIEDO

*Departamento de Biología Funcional*

*Área de Genética*

*MARÍA DE LOS ANGELES MENÉNDEZ PATTERSON, Directora del*

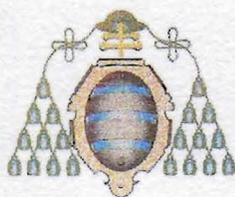
*Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.*

*AUTORIZA la presentación a la Comisión de Doctorado de la Tesis titulada “Loci microsatélites como marcadores genéticos para la mejora del rendimiento en acuicultura de especies marinas” presentada por Don Yaisel Juan Borrell Pichs, y dirigida por los Doctores Doña Gloria Blanco Lizana, Don José Antonio Sánchez Prado y Doña Emilia Vázquez Menéndez*



*Fdo: María de los Angeles Patterson  
Directora del Departamento de Biología Funcional*

*Oviedo, Octubre de 2002.*



# UNIVERSIDAD DE OVIEDO

*Departamento de Biología Funcional*

*Área de Genética*

*GLORIA BLANCO LIZANA, JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ PRADO Y EMILIA VÁZQUEZ MENÉNDEZ, Doctores en Biología y Profesores adscritos al Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo,*

*CERTIFICAN: Que la memoria de Investigación titulada "Loci microsatélites como marcadores genéticos para la mejora del rendimiento en acuicultura de especies marinas" presentada por Yaisel Juan Borrell Pichs, ha sido realizada bajo nuestra dirección en este Departamento y reúne las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Oviedo.*

*Para que así conste, expedimos el presente certificado en Oviedo, Octubre de 2002.*

*Fdo: Dra. Gloria Blanco Lizana*

*Fdo:Dr. José Antonio-Sánchez Prado*

*Fdo: Dra. Emilia Vázquez Menéndez*

### **Tesis Doctoral:**

Loci microsatélites como marcadores genéticos para la mejora del rendimiento en acuicultura de especies marinas.

### **Autor:**

Yaisel Juan Borrell Pichs.

### **Tutores:**

Dra. Gloria Blanco Lizana

Dr José Antonio Sánchez Prado

Dra Emilia Vázquez Menéndez

### **RESUMEN.**

Esta tesis se propone como objetivo general comprobar la utilidad de la variación microsatélite en el manejo de poblaciones de tres especies con gran interés económico: el salmón atlántico *Salmo salar L.*, el rodaballo *Scophthalmus maximus*, y el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. Los resultados obtenidos demuestran que los loci microsatélites son útiles para el manejo de reproductores en las estaciones de cultivo a través del establecimiento de pedigríes si se tienen en cuenta: un análisis previo de variabilidad en los reproductores, la posibilidad de mutaciones y alelos nulos y las relaciones genéticas existentes entre los reproductores. No se encuentra una relación alelos-caracteres de interés comercial en el cultivo, aunque si asociación entre la heterocigosidad enzimática y estos últimos, mientras parece no existir ninguna relación con la heterocigosidad microsatélite. Nuestros resultados apoyan la idea de que las enzimas, a través del control del metabolismo, juegan un papel fundamental en el incremento de la eficacia biológica de los individuos. Finalmente, los loci microsatélites muestran mayores niveles de variabilidad que las enzimas en poblaciones naturales, aunque el reparto de esa variabilidad genética es similar para ambos marcadores en camarón. No obstante, la mayor variabilidad de los microsatélites permite asignar los individuos a sus poblaciones de origen, lo cual sería de gran utilidad en el manejo poblaciones naturales y cultivadas.

### **SUMMARY.**

The main purpose of this thesis is to validate the utility of the microsatellite variation on the population management in three species with economic interest: the atlantic salmon *Salmo salar L.*, the turbot *Scophthalmus maximus*, and the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. Our results show that microsatellites are useful tools to the broodstocks management through the establishment of individual pedigrees if the previous analysis of genetic variation in stocks, the possibility of appearance of mutation and null alleles and the genetic relatedness among broodstocks are taken into account. Markers alleles related to economic traits in *Salmo salar L* were not found although enzymatic heterozygosity is indeed related to them while microsatellite variation exhibited lacks of correlations. Results support the idea that enzymes through higher metabolic efficiency enhance the individual fitness. Finally, microsatellites show higher levels of genetic variation than enzymes in natural populations of the white shrimp, but both markers show the same genetic variation distribution. However, the higher microsatellite variation led to the assignment of individuals to their origin population, this could be very useful to the management of cultivated and natural populations of this specie in Cuba.

*Para may ...para los viejos..*

## ***Agradecimientos.***

*Deseo expresar mi agradecimiento formal (el informal no cabe en esta tesis), a los doctores Gloria Blanco, José Antonio Sánchez y Emilia Vázquez por dirigir esta tesis, por compartir algo de lo mucho que saben con este servidor y tener paciencia...y sobre todo agradecerles por su AMISTAD (al final lo más importante).....*

*A la doctora Georgina Espinosa por su confianza y su apoyo...*

*A las siguientes entidades: Servicio de Recursos Naturales y Protección Ambiental de la Consejería de Medio Ambiente del Principado de Asturias, al Instituto Español de Oceanografía y al grupo de Biotecnología Marina de la Universidad de la Habana, que aportaron muestras para este trabajo y además su colaboración...*

*A la Agencia Española de Cooperación Iberoamericana que me otorgó la beca, a la Universidad de Oviedo por las múltiples ayudas, a Vivian que empezó todo.....*

*A los muchachos y profesores del área de Genética del Departamento de Biología Funcional que siempre colaboran en lo que pueden y son tan “cubanos” a la hora de compartir.....En especial un abrazo desde aquí al Agustín, al Miguelito, a Jorge, al Mauro, a Cris, a Elena y a Loli..*

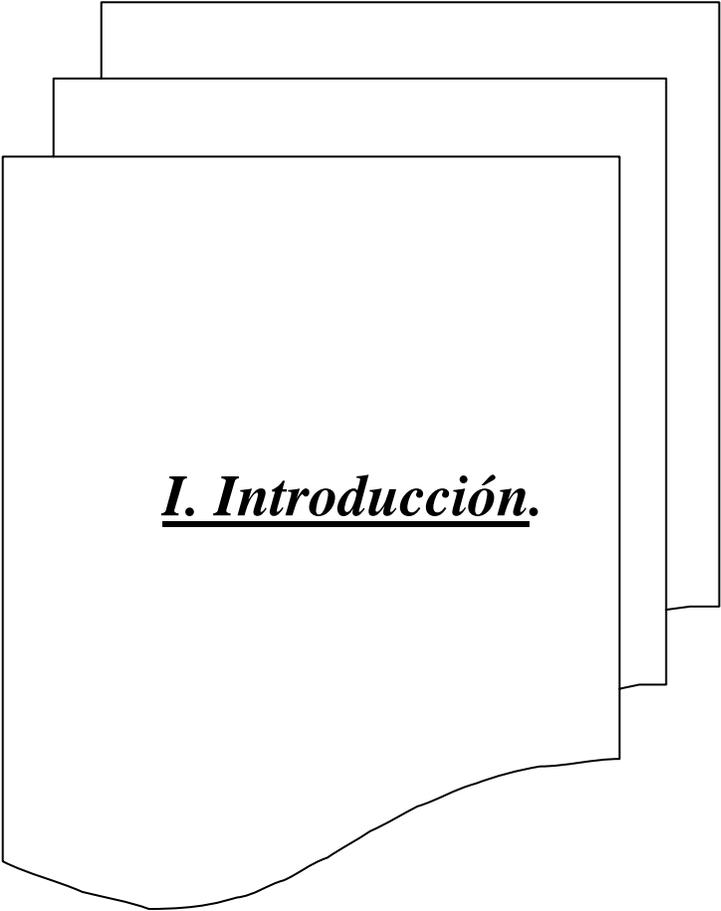
*A Emilito Vallin (y Ledys), al Fuachet, a la Zuani (donde esté) ... y a Javier (en la memoria)... les debo bastante, aunque ellos no lo sepan.....les agradezco andar siempre cerca..y las muchas descargas con Silvio, y con Varela de telón de fondo para hablar de lo que no se puede y hacer lo que no se debe....*

*A Mamá y a Papá, y al resto de mi familia, y a mi hermanito trovador, y ahora a Bea y a Alejandrino..les debo el muchas veces haberme sentido un tipo feliz ..gracias por todo..*

*y especialmente a ti May.....que eres mi isla,.... y mi brújula.... y mi voz.....(siempre que esta ciudad se derrumba).....*

<b>I. Introducción.</b>	<b>1</b>
I.1-La situación actual de los recursos pesqueros y la acuicultura como necesidad.	3
I.2- La genética aplicada a la problemática del manejo y conservación de los recursos pesqueros.	6
I.3 - La genética aplicada a la acuicultura.	9
I.4 -Los loci microsatélites.	13
<b>II. Objetivos.</b>	<b>19</b>
<b>III. El uso de microsatélites en estudios de parentesco aplicados al manejo de poblaciones cultivadas.</b>	<b>23</b>
III.1 –Estudio de parentesco en el rodaballo <i>Scophthalmus maximus</i> .	25
III.1.1. Antecedentes.	25
III.1.2. Materiales y Métodos	27
III.1.3. Resultados.	31
III.1.4. Discusión.	36
III.1.5. Tablas.	42
III.1.6. Figuras.	48
III.2- Estudio de parentesco en el salmón atlántico ( <i>Salmo salar</i> (L)).	54
III.2.1. Antecedentes.	55
III.2.2. Materiales y Métodos.	57
III.2.3. Resultados y Discusión.	60
III.2.5. Tablas.	66
III.2.5. Figuras.	69
<b>IV. Eficacia biológica y variabilidad genética en el salmón atlántico (<i>Salmo salar</i> (L)).</b>	<b>71</b>
IV.1.- Variabilidad genética, momento de la primera alimentación activa y clases fisiológicas en el salmón atlántico en cultivo.	73
IV.1.1. Antecedentes.	73
IV.1.2. Materiales y Métodos.	74
IV.1.3. Resultados.	77
IV.1.4. Discusión.	78
IV.1.5. Tablas.	82
IV.2. - Heterocigosidad y caracteres asociados a la eficacia biológica (el caso del salmón atlántico).	86
IV.2.1. Antecedentes.	86
IV.2.2. Materiales y Métodos.	88
IV.2.3. Resultados.	90
IV.2.4. Discusión.	92
IV.2.5. Tablas.	96
IV.2.6. Figuras.	102
<b>V. Variabilidad microsatélite en poblaciones naturales del camarón blanco <i>Litopenaeus schmitti</i> en Cuba.</b>	<b>103</b>
V.1. Antecedentes.	105
V.2. Materiales y Métodos.	107

V.3. Resultados.	109
V.4. Discusión.	111
V.5. Tablas.-	117
V.6. Figuras.	120
<b>VII. Conclusiones.</b>	<b>121</b>
<b>VIII. Referencias.</b>	<b>125</b>
<i>Anexo 1. Descripción de los loci microsatélites utilizados en esta Tesis de Doctorado.</i>	<b>143</b>
<i>Anexo 2. Estudios publicados, ó en vías de publicación, relacionados con esta Tesis de Doctorado.</i>	<b>145</b>
<i>Anexo 3. Fotografías de las especies utilizadas para los análisis genéticos en esta Tesis de Doctorado.</i>	<b>147</b>



**I. Introducción.**



## ***1.1-La situación actual de los recursos pesqueros y la acuicultura como necesidad.***

***(Informes de la FAO, 1998(a), 2000).***

Históricamente se consideró que los océanos constituían un depósito infinito de recursos y que serían capaces de garantizar la alimentación de la siempre creciente población en el planeta. Hoy en día, después de constatadas las desapariciones de muchos de los principales bancos de peces, se sabe que esa creencia y el tipo de manejo que de ella se derivaba, constituían un error de incalculables consecuencias. A pesar de ello, las pesquerías constituyen todavía una importante fuente de alimentos, empleo y renta para muchos países y comunidades, más allá de las fluctuaciones que han ocurrido entre oferta y demanda, y de los cambios económicos y ambientales de los últimos años.

Las pesquerías a escala mundial experimentaron un significativo incremento a partir del año 1950. Las capturas en ese momento ascendían a 18 millones de toneladas y se incrementaron hasta 56 en el año 1969. En los años 70 y 80 el crecimiento de la actividad comenzó a decaer (sólo un 2% de incremento anual, comparado con un 6% desde 1950 a 1970), hasta ser cero en el año 1990. Esta tendencia decreciente en las capturas parece coincidir con el agotamiento de las principales áreas de pesca del mundo, las cuales han alcanzado su potencial máximo.

Los datos globales de capturas publicados por la FAO (que incluyen pesquerías y acuicultura), disminuyeron de 122 millones de toneladas en 1997, a 117 millones de toneladas en 1998. Esta disminución fue atribuida principalmente al fenómeno climático del Niño que afectó considerablemente las pesquerías a nivel mundial. China, Japón, Estados Unidos, la Federación Rusa, Indonesia, Chile y la India (en ese orden) obtuvieron los máximos rendimientos a nivel mundial en ese año y en conjunto acumulaban más de la mitad del total de capturas. En 1999 las capturas globales alcanzaron 125 millones de toneladas, no obstante, el incremento de 20 millones de toneladas que se observa en la última década se debe principalmente a la acuicultura, pues las pesquerías se mantienen relativamente estables (aproximadamente 100 millones de toneladas en los 90).

Los recursos pesqueros pueden clasificarse de acuerdo a su estado de explotación. Así, en el último informe de la FAO (2000), se ha descrito que aproximadamente un 26% del total de stocks se encuentran en fase de sub-explotación ó explotación moderada, cifra que ha decrecido a medida que se ha incrementado el esfuerzo pesquero y que constituye el único potencial para el incremento de la actividad pesquera en los próximos años. El número de

stocks completamente explotados se mantiene relativamente estable (48%), y el número de stocks en sobre-explotación (16%), ó seriamente afectados y en recuperación (10%), se ha incrementado moderadamente en los últimos años.

Las capturas en las distintas pesquerías en los océanos Atlántico y Pacífico, y en los mares Mediterráneo y Negro ó han disminuido considerablemente ó se mantienen relativamente estables, luego de haber alcanzado sus máximos potenciales, observándose sólo tendencias al crecimiento (y por lo tanto potencialidad de crecimientos en las capturas) en el océano Índico. Esta área presenta menores incidencias de stocks en estado de máxima explotación ó sobre-explotación, aunque también mayor porcentaje de stocks sobre los cuales el estado de explotación es desconocido y por lo tanto los datos son menos fiables.

Los recursos pesqueros en tierra (lagos, ríos, etc.) (que significaron un 22% del total de 125 millones de toneladas capturados en el año 1999), no constituyen hoy en día una alternativa, en cuanto a sostenidas contribuciones en el futuro al monto total de capturas a nivel global. La explicación tiene que ver con el hecho de que los peces de agua dulce constituyen el grupo más amenazado de los vertebrados de los cuales se alimenta el hombre y se enfrentan a otras dificultades además de la sobre-pesca, como son la pérdida y/ó degradación de los hábitat naturales, la introducción de especies exóticas, las enfermedades, entre otros.

Según la FAO (1998a), se preveía que la demanda para el consumo de peces en el 2010 sería de 105 a 110 millones de toneladas y que la oferta rondaría los 105 millones de toneladas, con una cantidad adicional de 30 millones de toneladas que serían convertidas en comida para animales. Estas previsiones no obstante, parecen estar por debajo de la demanda real que existirá en el futuro para el consumo de pescado (FAO, 2000) y además incluían un incremento en la oferta de las capturas como resultado de una potenciación en el mejor manejo de los recursos pesqueros. Ese manejo responsable, cuya principal preocupación debería ser la restauración y conservación de las especies y poblaciones, es aún insuficiente y compromete por lo tanto, el futuro de las comunidades y países que dependen de las pesquerías. Por este motivo se ha planteado la necesidad de sustituir la aportación de especies marinas en el consumo de pescado por especies en cultivo.

La acuicultura se desarrolla fundamentalmente en agua dulce con una producción global estimada de 18,1 millones de toneladas, 10,8 millones de toneladas en el maricultivo y 1,9 millones de toneladas de producción en agua salobre. Es dominada por Asia (un 84% de la producción mundial), fundamentalmente China, país que ha reportado incrementos en la producción de 0,7 millones de toneladas por año hasta 1992 y de 2,6 millones de toneladas en

adelante. China centra su producción acuícola en el cultivo de carpas, con un escaso valor de mercado, aunque también hay una producción importante de camarones y de algas. En Europa (8,5% de la producción global), la acuicultura se caracteriza por el cultivo de especies de alto valor añadido (lo cual no soluciona los problemas de abastecimiento) y además sistemas tecnológicamente avanzados. No obstante, sigue existiendo un fuerte componente de la acuicultura más tradicional, que supone un porcentaje importante del total de la producción, y que logra que Francia y España ocupen los primeros puestos de la acuicultura europea, en el primer caso gracias a la ostricultura, y en el segundo debido al cultivo del mejillón. En ambos casos se trata de formas de cultivo muy artesanales. Cabe destacar los ejemplos de algunos países que han experimentado un espectacular despegue, como Noruega, que pasó de producir 8.600 toneladas de salmón en 1981 a 350.000 toneladas en 1998. Grecia ha experimentado en los últimos años un crecimiento considerable en la producción de dorada y lubina, pasando de una producción total de 4.000 toneladas en 1988 a más de 44.000 en 1997. En América se ha observado también un incremento de las producciones acuícolas en los últimos años, destacándose el cultivo del salmón en Chile, así como el cultivo más tradicional de camarones en Ecuador, Perú, México y otros. En América del Norte es notable la gran producción de salmón en Canadá, y en menor proporción, de trucha, bagre, camarón, ostra y salmón en Estados Unidos. África, sin embargo, mantiene un ritmo de crecimiento por debajo del esperado para su potencial.

La mayoría de las políticas que se han desarrollado para potenciar la acuicultura aparecen a menudo integradas en los planes globales que incluyen el manejo de las capturas en las pesquerías. A pesar de ello, se considera que la acuicultura tiene mayor potencialidad que las pesquerías, y constituye además un instrumento importante en el aumento de la seguridad alimenticia para muchos países, los cuales han destinado mayores recursos para el desarrollo de la acuicultura como vía de mantener la oferta de pescado, en vez de la importación de los cada vez más escasos productos de las pesquerías. No obstante, la acuicultura tiene ante sí grandes retos como el acceso a la tecnología y a los recursos financieros para los países menos desarrollados y los peligros que implica en cuanto a impacto ambiental y diseminación de enfermedades, además del limitado número de especies para el que se ha conseguido adecuar una técnica de cultivo (especies seleccionadas casi siempre bajo un punto de vista estrictamente comercial).

El manejo adecuado de los recursos pesqueros y la acuicultura, como necesidad y alternativa para el mantenimiento y desarrollo de las economías nacionales, y para la producción global

de alimentos necesitarán en los próximos años, de nuevas inversiones en la educación y entrenamiento de personas y comunidades, de inversiones en la investigación y el desarrollo, de la potenciación de las comunicaciones y el intercambio de información, y de la aplicación correcta de directrices que garanticen la sostenibilidad de la actividad y la preservación del medio ambiente (FAO, 1998a; 2000).

## ***1.2- La genética aplicada a la problemática del manejo y conservación de los***

### ***recursos pesqueros.***

El manejo adecuado de las pesquerías es considerado como una necesidad para asegurar que estas puedan continuar siendo explotadas y a la vez, ayudar a la recuperación de los stocks de peces que hoy aparecen en peligro de extinción. Este debe tener en cuenta factores científicos, económicos, sociales e incluso políticos debido a las implicaciones que tiene para las comunidades que dependen específicamente de las pesquerías. La genética puede jugar un papel importante en el manejo de las pesquerías a través de dos elementos: una mejor definición de los stocks de pesca y además, la identificación correcta de las especies en las capturas.

Los datos de capturas son utilizados para la estimación de biomásas y para el control de pesca en aquellas especies para las cuales se han establecido cuotas de capturas. Sin embargo, debido a la similitud morfológica entre algunas de ellas, son habituales los errores en la identificación de especies en las pesquerías. Lo mismo ocurre en la identificación de huevos y larvas, ya sea para el consumo ó para estudios de monitoreo y/ó ecológicos. Sea de forma intencionada ó no, en los mercados se venden unas especies (con menor valor comercial) como otras, lo cual afecta a la confianza de los consumidores; y en algunas ocasiones se ha llegado incluso a encubrir mediante fraude la pesca de especies en peligro de extinción (Ward, 2000).

Los marcadores genéticos (fundamentalmente las enzimas) han ayudado considerablemente en la identificación correcta de las especies. Las enzimas han identificado el origen de filetes (Shaklee y Keenan, 1986), huevos (Mork y col., 1983) y larvas disponibles en el mercado (Seeb y Kendall, 1991; Hu y col., 1992). Actualmente los patrones enzimáticos de 450 especies de peces e invertebrados aparecen en una guía que recoge las principales especies que

se comercializan en Australia (Yearsley y col., 1999). Estos resultados han sido utilizados en cortes de justicia de los Estados Unidos (Harvey, 1990) y Australia (Ward, 2000).

En los casos en que las especies son tan similares que no pueden ser identificadas mediante las electrofóresis enzimáticas, ó cuando no hay suficiente material disponible para llevarlas a cabo, ó forma de conservar los tejidos (se necesitan tejidos frescos ó conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ ); los análisis de ADN han resuelto la problemática. Los RFLPs de ADN mitocondrial han sido utilizados en túnidos (Ward y col., 1995), incluso en muestras conservadas (Quinteiro y col., 1998); y en muchas otras especies incluyendo copépodos (Bucklin y Kann, 1991), larvas de pepinos de mar (Olson y col., 1991), entre otros. También el ADN nuclear ha sido utilizado en la identificación de especies. En la tilapia, Bardakci y Skibinski (1994) llevaron a cabo RAPDs; y Cipriano y Palumbi (1999) combinando ADN mitocondrial y microsatélites han reportado exitosas identificaciones de ballenas sobre las cuales había disputas en cuanto al área y época en la cual se pescaron.

Los datos científicos que se necesitan para el manejo adecuado de una pesquería incluyen también la identificación correcta de los stock de peces y la estimación precisa de abundancia, productividad y dinámica de cada uno de ellos. Sin embargo, entre los responsables de las pesquerías y los biólogos existen distintos criterios sobre la definición de stock (revisado por Hauser y Ward, 1998, y Ward, 2000). En las pesquerías, un stock es un grupo de peces que habitan en un área determinada en un momento dado, ó que se pescan con un determinado método (Smith y col., 1990). Sin embargo, Ihssen y col. (1981) lo definen como un grupo intraespecífico de individuos con integridad temporal y espacial y que se aparean al azar. Otra definición (genética) de stock, considera como tal a una unidad reproductivamente aislada y genéticamente diferente de las otras (Jamieson, 1973; Ovenden, 1990). Identificar genéticamente cada stock constituye una prioridad para garantizar la subsistencia del mismo, sobre todo para mantener niveles de capturas que este pueda resistir sin perder su capacidad de evolucionar como población (Kapuscinski y Lannan, 1984, 1986).

Determinar si dos muestras pertenecen a una única población donde hay panmixia ó a dos stocks diferentes es una tarea compleja. Este análisis se realiza estimando el parámetro  $F_{ST}$  (Wright, 1943) a través de los datos de frecuencias alélicas, ó haplotípicas, de los marcadores genéticos. Cuando se encuentra diferenciación genética entre muestras de un área y se asume que esas diferencias son producto fundamentalmente de restricciones al flujo génico entre ambos stocks (aislamiento reproductivo) y no debido a selección, entonces se confirma la idea de dos stocks diferentes (Ward, 2000). Si no existen diferencias genéticas entre las muestras

no se puede concluir que estemos en presencia de un solo stock. La homogeneidad genética entre muestras no equivale a homogeneidad poblacional. Esto se debe a que la homogeneidad en marcadores supuestamente neutrales puede no implicar el que exista también esa homogeneidad en otros loci sometidos a selección (Chakraborty y Leimar, 1987; Ryman, 1991).

En el mar se encuentran bajos valores de diferenciación genética entre los stocks de peces ( $F_{ST\ Media} = 0,062$ , Ward y col., 1994a). Esto se debe a la ausencia de barreras para la dispersión y a los largos periodos larvales de muchas especies marinas y además a que los adultos de especies longevas exhiben una conducta migratoria significativa. Por estos motivos en el mar aumentan las posibilidades de grandes flujos génicos entre las poblaciones, mientras que en lagos y ríos se encuentra por lo general, aislamiento entre las poblaciones ( $F_{ST\ Media} = 0,222$ , Ward y col., 1994a). Actualmente se considera que hasta un 10% de intercambio de individuos entre dos poblaciones (como límite) justifica el tratamiento de estas como dos stocks independientes (Hauser y Ward, 1998). Las estimas de diferenciación genética a partir de marcadores moleculares son un elemento que sin embargo, deben conjugarse con todas las informaciones disponibles sobre las poblaciones (estudios fenotípicos, morfométricos, conductuales, ecológicos, demográficos y oceanográficos) (Ryman, 1991; Hauser y Ward, 1998), pues en conjunto permiten identificar aún pequeños grados de diferenciación entre los stocks.

Las enzimas han sido utilizadas habitualmente en la identificación de stocks para las pesquerías desde los años 60 (Sick, 1961; Frydenberg y col., 1965). En la actualidad aún se utilizan en bacalao atlántico (Pogson y col., 1995), en túnidos (Ward y col., 1994b), en macarela (Gold y col., 1997), entre otros. Sin embargo, los requerimientos en cuanto a disponibilidad de tejidos frescos ó congelados para abordar su análisis, los bajos niveles de variabilidad enzimática encontrada en algunas de las especies, y la selección direccional reflejada por algunos locus enzimáticos particulares han influido en el creciente interés de los genéticos que estudian poblaciones, hacia la utilización de marcadores genéticos tipo ADN con mayor variabilidad y supuesta neutralidad (Park y Moran, 1994; Ward y col., 1997; Ward, 2000). A pesar de ello las enzimas han demostrado ser más útiles en detectar diferencias genéticas entre stocks que los RFLP mitocondriales en peces pelágicos (Hauser y Ward, 1998). Esto se debe quizás al hecho de que el ADN mitocondrial se hereda como una unidad y por lo tanto se considera como un locus único en este tipo de análisis, lo cual es una desventaja en comparación con la multiplicidad de locus disponible con las enzimas. Además

en aquellas especies con poblaciones grandes y amplia diversidad genética, los haplotipos se encuentran una ó dos veces en el conjunto de datos lo que reduce considerablemente la capacidad de discriminación al utilizar estadísticos que utilizan como base las tablas de contingencia (Bowen y Grant, 1997). Los loci microsátélites debido a características como su alta variabilidad, codominancia, y neutralidad (Mitton, 1998; Lemaire y col., 2000; Thelen y Allendorf, 2001) parecen ser las mejores herramientas dentro de los distintos marcadores genéticos utilizados actualmente para detectar y cuantificar las diferencias genéticas entre muestras ó poblaciones (Park y Moran, 1994; Estoup y Angers, 1998; Hauser y Ward, 1998). Hoy en día se utilizan ampliamente en casi todas las especies marinas, de agua dulce, ó anádromas con interés económico, ej.: bacalao (Bentzen y col., 1996; Ruzzante y col., 1997), arenque (Shaw y col., 1999), túnidos (Grewe y Hampton, 1998), salmón atlántico (Nielsen y col., 1999; Sánchez y col., 2000), róbalo (Lemaire y col., 2000), trucha (Estoup y Angers, 1998; Cagigas y col., 1999), camarones peneidos (revisado por Benzie, 2000), entre otros.

### ***1.3 - La genética aplicada a la acuicultura.***

Aunque la acuicultura es una actividad que comenzó hace miles de años con el cultivo de la carpa común en China, la aplicación de los principios genéticos en esta actividad es un fenómeno reciente comparado con lo que ha ocurrido en el cultivo de ganado y vegetales. Quizás por esa razón, su desarrollo ha sido lento (muy inferior al alcanzado por la ganadería). La oferta de pescado para el consumo ha dependido casi por completo de las pesquerías en una mera recolección del producto en el medio natural. Sin embargo en la última década, ante la necesidad de potenciar y acelerar la acuicultura por el estado casi crítico de muchos bancos de peces, se ha retomado el interés global por aplicar las técnicas genéticas en el cultivo de organismos acuáticos. De esta forma, en la declaración final de la reunión para el desarrollo de la acuicultura celebrada en Bangkok (2000), se establecieron como prioritarias varias líneas de acción que incluían el desarrollo y utilización de mejores prácticas para la domesticación y manejo de los bancos de reproductores a través de la aplicación de técnicas genéticas. Además se insistió en una mayor aplicación de las tecnologías genéticas a la conservación de la biodiversidad acuática.

El hecho comprobado es que la genética puede ser una herramienta relevante para el incremento de la productividad y sostenibilidad de la acuicultura como industria, a través de su incidencia en aspectos como una mayor supervivencia, mejor utilización de los recursos, reducción de los costos y mayor protección ambiental (Knibb, 2000). Por otro lado, sólo un pequeño porcentaje de la producción por acuicultura proviene de especies sobre las que se hayan aplicado técnicas genéticas (selección, manipulación cromosómica, hibridación, producción de lotes mono-sexo, y transferencia genética), por lo tanto las potencialidades para el desarrollo de la actividad son considerables (Dunham, 1995; Gjedrem, 1997).

Los resultados publicados de los programas de selección genética son relevantes en cuanto a las ganancias genéticas. El programa noruego de selección en la trucha (*Salmo gairdnerii*) y en el salmón atlántico (*Salmo salar L.*), ha obtenido un 13% y 14% de ganancia en la tasa de crecimiento, respectivamente (Gjerde, 1986). En el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), Hershberger y col. (1990) obtuvieron un 10,1% de ganancia genética en cuatro generaciones para el incremento en tasas de crecimiento. Ilyassov (1987) obtuvo también considerables ganancias genéticas en la resistencia a enfermedades en la carpa *Cyprinus carpio*, y Gjedrem y col. (1991) encontraron significativas variaciones genéticas en la resistencia a la furunculosis en el salmón atlántico. En la tilapia (*Tilapia niloticus*) se han podido obtener incrementos en peso de hasta un 23% y 16% en la primera y segunda generación, respectivamente (Eknath y col., 1991). En general, las ganancias genéticas obtenidas en peces son mayores que en la propia agricultura. La razón principal para ello es que se pueden aplicar mayores intensidades de selección y que existe una amplia variación genética (Gjedrem y Fimland, 1995).

Los beneficios de un programa de selección genética han sido estimados en el salmón atlántico (Gjerde y Olsen, 1990). El valor económico de una ganancia genética en peso equivalente a un 10% y a un 8% en la disminución de las frecuencias de maduración precoz equivale a 0,20\$ US por kilogramo producido por generación en el salmón atlántico. Asumiendo una producción de 100 000 toneladas la ganancia económica estaría en el orden de 20 millones de dólares por año mientras que poner en práctica el programa de selección genética costaría aproximadamente 5 millones. Evidentemente los beneficios de este tipo de programas son altos y además la ganancia genética obtenida en una generación es transferible a la próxima, por lo tanto se mantendría e incrementaría la ganancia genética por generación.

Al inicio los programas de selección genética se desarrollaron con el objetivo único de incrementar la producción cuantitativamente, sin embargo a medida que se satura la demanda de los productos, debido a la producción acuícola, el precio sufre grandes decrecimientos. Un

ejemplo de ello ha sido el caso del salmón atlántico producido en Noruega con un valor por tonelada de producción disminuido en un 29% en 1995, comparado con el valor que ostentaba en 1984 (Bartley, 1998). Hoy en día los programas de mejoramiento genético buscan además mejorar el valor del producto que se ofrece a través de caracteres como la calidad de la carne, la forma del cuerpo, y la coloración. Estos caracteres están directamente relacionados con la calidad económica del producto y actualmente se incorporan a los programas genéticos (ej: proyecto de selección para la coloración rojiza en la tilapia en Venezuela, Informe de la FAO y programa genético del salmón atlántico en Noruega, Gjedrem, 1997).

Las técnicas moleculares de análisis del ADN han potenciado los programas de selección genética en muchas especies a través de dos elementos: la selección asistida por marcadores moleculares (M.A.S) (impensable con la generación anterior de marcadores genéticos) y el establecimiento de pedigrís que eviten la endogamia en los procesos de selección. De esta forma, los loci microsatélites, codominantes y con alta variabilidad, han facilitado el marcaje genético en las estaciones de cultivo de peces (Norris y col., 2000) y con ello han permitido evitar procesos de depresión endogámica que ocurren frecuentemente en las estaciones al utilizar como reproductores a individuos muy emparentados (Gjerde y col., 1983; Kincaid, 1983; Su y col., 1996). El marcaje genético permite además la cría en los mismos estanques de familias diferentes (desde edades tempranas), disminuyendo los gastos en el cultivo y la variación ambiental en los programas de selección genética (Herbinger y col., 1999; Norris y col., 2000).

Por otro lado, los microsatélites y otros marcadores de ADN como RFLPs, AFLPs, y RAPDS, están siendo utilizados también en el mapeo genético de los genomas de muchas especies (salmón atlántico, carpa, pez gato, trucha arcoiris, trucha común, y ostras). Estos resultados son de importancia capital en la búsqueda y utilización de QTL's (Quantitative Traits Loci) que faciliten la selección asistida por marcadores moleculares y potencien de este modo la acuicultura (Danzmann y col., 1997; Lie y col., 1997; Jackson y col., 1998). Los resultados del proyecto europeo SALMAP, que tiene el objetivo de aislar y caracterizar marcadores microsatélites en 3 especies de salmónidos y establecer mapas de ligamiento genético, ya contribuyen en la gestión efectiva de los stocks de reproductores de salmónidos. En sólo 36 meses se han realizado 1080 ensayos microsatélites para el salmón Atlántico, trucha arco iris y trucha común. En el salmón se han identificado 639 loci microsatélites y se han mapeado 282 marcadores, permitiendo identificar 30 grupos de ligamiento. Para la trucha arco iris, se han descrito 390 loci microsatélites de los cuales 274 se mapearon identificándose 29 grupos de

ligamiento; finalmente, para la trucha común se lograron caracterizar completamente 215 loci (Informe de AQUAFLOW, Unión Europea).

La hibridación entre especies ó la producción de lotes mono-sexo en las estaciones, son otras de las estrategias que actualmente están siendo aplicadas para el incremento de la producción en la acuicultura. En Venezuela casi el 80% de la acuicultura de la cachama (*Colossoma macropomum*) y el morocoto (*Piaractus brachypoma*) es del híbrido entre estas dos especies (Bartley, 1998). En Filipinas, se aprovecha la manipulación del sexo en la tilapia para producir fundamentalmente machos, lo cual permite rentabilizar las ventajas de este sexo en cuanto a sus tasas de crecimiento (Mair y col., 1995).

Otra de las técnicas que actualmente está recibiendo gran atención es la transgénesis, bien mediante la transferencia de genes entre especies ó la adición de copias de genes propios en la misma especie. Los genes transferidos abarcan desde la hormona del crecimiento, hasta proteínas anticongelantes, lisozima, ó la hormona prolactina, entre otras. Los ejemplos son variados e incluyen diversas especies como la tilapia, el pez gato, el salmón coho, trucha, ostras y el salmón atlántico (con demostrada potenciación en el crecimiento y actualmente en pruebas para su comercialización) (Entis, 1997; FAO, 2000). A pesar de ello existen una serie de preocupaciones por parte de la opinión pública sobre el uso de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM). La posibilidad del escape de los transgénicos a la naturaleza y con ello la afectación de las poblaciones nativas (Hedrick, 2001), la negativa por parte de los consumidores de aceptar los OGM, posibles afecciones alérgicas en humanos, y el debate sobre si ética y moralmente es correcto ó no la creación de organismos transgénicos son algunas de ellas (FAO, 1998a, 2000).

Las manipulaciones cromosómicas (fundamentalmente la triploidia) han sido también muy utilizadas en moluscos (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea Virginica*, *Saccostrea glomerata* y *Ostrea edulis*) (Nell, 2002). Desde el primer estudio (Stanley y col., 1981), el objetivo principal ha sido evitar la maduración sexual de estas ostras (debido a la esterilidad de los triploides) con lo cual se logra que no se detenga el crecimiento en esa época y se mejora la calidad de la carne. Los triploides exhiben tasas de crecimiento superiores a los diploides (Allen y Downing, 1986; Akashige y Fushimi, 1992; Chao y col., 1999) e incluso mayor resistencia a las enfermedades propias de la especie (parásitos, etc) (Allen y Downing, 1986); sin embargo, se han encontrado variaciones en cuanto a las mejoras en tasas de crecimiento y resistencia a enfermedades dependiendo del tipo de cultivo, especie, y tipos de experimentos

llevados a cabo (Nell, 2002). Actualmente sólo se está utilizando comercialmente a los triploides en *Crassostrea gigas*.

Las manipulaciones cromosómicas también se han utilizado en peces en cultivo para evitar hibridaciones con los individuos naturales en casos de escapes a la naturaleza (ej.: salmón atlántico; Entis, 1997), ó con el objetivo de incrementar las tasas de crecimiento de los stocks. Los resultados en peces, no obstante, no son alentadores. En el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) los diploides y triploides no se diferencian en sus tasas de crecimiento (Vázquez, Comunicación personal) y lo mismo ocurre en el cultivo de la lubina (Kerby y col., 2002).

La acuicultura, en resumen, debe protagonizar en los próximos años un papel importante en el empeño de satisfacer las necesidades crecientes de alimento de la población. Para ello, la aplicación de los principios y técnicas genéticas tiene reservado un papel fundamental en la potenciación de su desarrollo y eficacia; no obstante, su instrumentación deberá ser apoyada por gobiernos y organizaciones supranacionales, y por el concurso de muchos grupos de investigación en el planeta (FAO, 2000).

#### ***1.4 -Los loci microsatélites.***

Microsatélites es el término común utilizado para describir repeticiones en tandem de motivos compuestos por secuencias cortas de nucleótidos que aparecen en todos los genomas analizados hasta el momento. A pesar de ello, también han sido utilizadas otras denominaciones como secuencias simples (Tautz, 1989) ó repeticiones cortas en tandem (STR) (Edwards y col., 1991) para nombrar a estas secuencias repetidas. Los motivos, de no más de 6 bases de longitud, fueron descritos como repeticiones de CA exentos de interrupciones por ninguna otra base ó motivo (Litt y Luty, 1989; Weber y May, 1989). En ellos se han detectado altos niveles de polimorfismo, sobre todo cuando las secuencias repetidas son largas y sin interrupciones (Weber, 1990). No obstante, la mayoría de los loci microsatélites no son “puros”, contienen interrupciones (a veces desconocidas) y pueden incluso ser compuestos, es decir contener dos motivos repetidos diferentes.

En la literatura sobre microsatélites aparece con frecuencia el término simplicidad críptica (Tautz y col., 1986). Los loci microsatélites pueden adquirir mutaciones puntuales y degradarse a secuencias no repetitivas no obstante es posible el estado intermedio, en el cual

aparecen mezclas de motivos en tandem. Este estado (simplicidad críptica) es común en el genoma de todos los organismos, sobre todo en el genoma de eucariontes (Tautz y col., 1986; Hancock, 1996a).

En el genoma humano las repeticiones de adenina son las secuencias repetidas más frecuentes (Beckmann y Weber, 1992). No obstante, son de poca utilidad en estudios genéticos debido a su inestabilidad durante la PCR y a las dificultades que esto acarrea en la lectura de las tallas de los fragmentos amplificados (Hancock, 1996b). En cuanto a dinucleótidos, Beckmann y Weber (1992) encontraron hace una década que CA es el más frecuente en humanos (dos veces más frecuente que AT, y tres veces más frecuente que AG). Por otra parte, Stallings (1994) ha encontrado que los trinucleótidos, CAG y AAT son los más comunes en esta especie.

En otras especies aparecen otros patrones en cuanto a las frecuencias de los distintos tipos de secuencias repetidas encontradas. Así en levaduras el dinucleótido AT es el más común (Valle, 1993), en plantas GA y AT son los dinucleótidos más frecuentes (Stallings, 1992), mientras que en *Drosophila melanogaster*, CA es el microsatélite más frecuente (Schug y col., 1998). En el genoma de salmón atlántico se ha estimado la presencia de un dinucleótido GT cada 90 kb, en esta especie este microsatélite aparece como uno de los más frecuentes (Slettan y col., 1993). En el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) el dinucleótido GT también aparece como el más frecuente (Estoup y col., 1998; Coughlan y col., 1998; Iyengar y col., 2000)

Los loci microsatélites se han convertido en los marcadores genéticos elegidos en la última década para infinidad de estudios sobre diversidad y conservación genética de poblaciones naturales y de cultivo (revisado por Estoup y Angers, 1998 y por Goldstein y Schlotterer, 1999). Varias son las razones que justifican esta explosión de trabajos en los cuales son las herramientas genéticas utilizadas: (1) en muchas especies son fáciles de obtener a partir de librerías genómicas enriquecidas ó debido a que se conservan entre especies relacionadas (ej.; FitzSimmons y col., 1995; Rico y col., 1996; Hammond y col., 1998), (2) son marcadores codominantes y se heredan en forma mendeliana (Tautz, 1989; Weber, 1990), (3) diferentes loci exhiben niveles de variación que van desde los bajos niveles encontrados con las alozimas hasta la gran variación descrita para los minisatélites (ej.: De Woody y Avise, 2000), (4) la lectura de los genotipos es sencilla y puede automatizarse permitiendo amplificaciones múltiples de hasta 5 loci en una misma PCR y hasta 15 loci analizados a la vez en una línea de un gel ó sistema electroforético (Gill y col., 1997), y (5) se amplifican mediante PCR, lo cual garantiza que mínimas muestras de tejido ó incluso tejidos conservados, pelos, plumas,

secreciones, heces, etc, pueden utilizarse para el estudio genético (Estoup y Angers, 1998; Balding, 1999).

No obstante, en algunas especies de plantas, invertebrados, y aves se han presentado dificultades a la hora de aislar loci microsatélites, este hecho parece no estar relacionado con las capacidades de los laboratorios, sino más bien con las diferencias en cuanto a la presencia de secuencias repetidas en los genomas de diferentes especies (Rothuizen y col., 1994). La presencia de alelos nulos (Pemberton y col., 1995) y los residuos que origina la *Taq*-polimerasa en la amplificación de dinucleótidos (Gill y col., 1997; Pongsomboon y col., 2000), son por otra parte, dificultades que pueden complicar la lectura correcta de los genotipos.

#### Distribución genómica y evolución de los loci microsatélites.

La distribución de los microsatélites en los genomas es mejor conocida en humanos y ratones, esto se debe a que en estos organismos los proyectos de secuenciación completa del genoma están muy avanzados ó concluidos. Los loci microsatélites parecen estar distribuidos por todo el genoma (Dib y col., 1996; Dietrich y col., 1996), aunque los mapas genéticos denotan áreas de baja densidad de secuencias repetidas cerca de los telómeros ó en el cromosoma X de ratón (en *D.melanogaster* y *Anopheles gambiae* se han encontrado mayores concentraciones de microsatélites en el cromosoma X (Huijser y col., 1987; Zheng y col., 1993)).

En algunos estudios los microsatélites aparecen en bajas densidades en las zonas codificantes del genoma (Hancock, 1995), en particular esto es cierto para los microsatélites que pueden alterar los marcos de lectura (aquellos que no son trinucleótidos). No obstante, se han detectado microsatélites dentro de exones en el genoma de los ratones (Jurka y Pethiyagoda, 1995) y los mapas genéticos de salmónidos publicados hasta el momento aportan evidencias de localizaciones ubicuas de los microsatélites por todo el genoma (Lie y col., 1997; Sakamoto y col., 2000; Lindner y col., 2000). A pesar de ello, actualmente se acepta que podrían existir ciertas restricciones para la localización de loci microsatélites en algunas zonas, sobre todo allí donde afecten los marcos de lectura de algunos genes, en sitios reguladores donde se unan proteínas (factores de transcripción, etc) ó en sitios importantes para el plegamiento de las cadenas de ADN (Hancock, 1999).

Las secuencias de ADN evolucionan a través de mutaciones, seguidas por la acción de otras fuerzas como la deriva génica (neutral) y la selección natural, las cuales determinan si las nuevas variantes se expanden ó no, y cuán rápido lo hacen dentro y entre las poblaciones. Para

los loci microsatélites se han estimado tasas de mutación que varían desde  $10^{-6}$  en *Drosophila* (Schug y col., 1997),  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  en levaduras (Strand y col., 1992),  $10^{-4}$ - $10^{-3}$  en ratones y humanos (Dallas, 1992; Weber y Wong, 1993), hasta  $10^{-2}$  en *E.coli* (Levinson y Gutman, 1987a). Estas altas tasas de mutación (se estima que las mutaciones puntuales ocurren con tasas de  $10^{-9}$ - $10^{-10}$ ), han sido explicadas fundamentalmente a través de dos mecanismos: los errores de la polimerasa durante la replicación, debidos a hibridaciones erróneas entre las secuencias repetidas en la cadena que está siendo copiada ó en la que se está formando (Streisinger y col., 1966; Levinson y Gutman, 1987b); y la recombinación, a través de cruzamientos desiguales ó procesos de conversión génica (Smith, 1976; Jeffreys y col., 1994). El primero de los mecanismos mencionados parece tener un papel principal en la generación de nuevas variantes alélicas en los microsatélites. Los alineamientos incorrectos durante la replicación justifican por sí solos la inestabilidad en cuanto a longitud de los microsatélites en cepas mutantes de levadura en las cuales las frecuencias de recombinación están muy disminuidas (Levinson y Gutman, 1987a, Henderson y Petes, 1992). Por otra parte, las tasas de mutación microsatélite son iguales en células mitóticas y meióticas de levadura, a pesar de que existen mayores tasas de recombinación durante la meiosis (Strand y col., 1993). Existen otras evidencias que justifican un papel secundario para la recombinación en la generación de la variabilidad microsatélite. Así, la mayoría de las nuevas variantes microsatélites son resultado de ganancias ó pérdidas de una unidad repetitiva y por recombinación se esperarían un rango mucho más amplio de variantes (Levinson y Gutman, 1987a; Hancock, 1999). Por otro lado se ha observado cierto agrupamiento alrededor de la talla “parental” de los microsatélites en familias humanas afectadas por la enfermedad de Huntington (expansión de los trinucleótidos TAG) (Goldberg y col., 1995). No obstante, algunas evidencias todavía soportan la idea de cierto papel de la recombinación en la generación de variabilidad microsatélite, este es el caso de las grandes deleciones que ocurren en repeticiones microsatélites largas en levadura ó la expansión catastrófica de tripletes en enfermedades neurodegenerativas (Rubinsztein y col., 1994a; Wierdl y col., 1997; Rubinsztein, 1999).

En el estudio de la evolución de los loci microsatélites se han detectado varios fenómenos que despiertan un creciente interés y que hay que tener en cuenta para valorar e interpretar los resultados de los trabajos que los utilizan. Por lo general ocurren mayores ganancias, que pérdidas, en la variación en número de las unidades repetitivas (asimetría), existiendo a la vez inestabilidad heterocigótica (mayor probabilidad de variación en aquellos loci heterocigotos). Estas dos características han sido confirmadas en humanos (Weber y Wong, 1993; Amos y

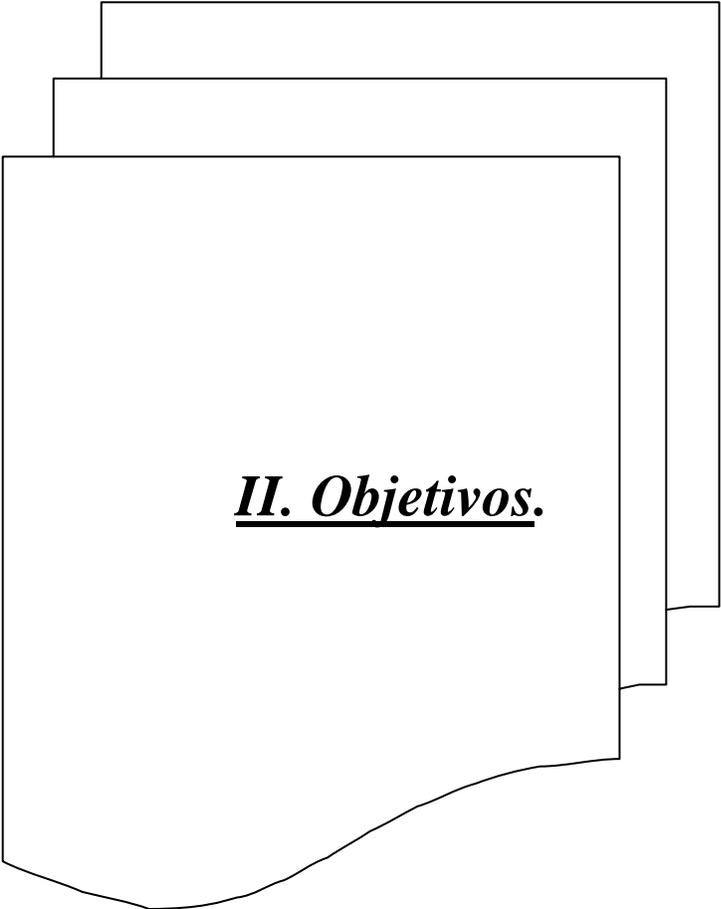
col., 1996), en aves (Primmer y col., 1996), y en ovejas (Crawford y Cuthbertson, 1996). Además se ha descrito que existe restricción en las tallas máximas que pueden alcanzar los alelos de los loci microsatélites (Bowcock y col., 1994; Garza y col., 1995; Nauta y Weissing, 1996). De esta forma los alelos microsatélites “ muy largos” son raros, y al parecer se vuelven inestables, desapareciendo ó degenerándose (generalmente a través de mutaciones puntuales) en secuencias aleatorias de alta cripticidad (modelo de la talla límite absorbente) (Garza y col., 1995; Zhivotovsky y col., 1997; Amos, 1999).

La existencia de un locus microsatélite debe seguir entonces un curso conformado por su aparición fuera de las regiones de alta cripticidad y su expansión bajo la influencia de mutaciones sesgadas. Al inicio la tasa de mutación será pequeña, pero a medida que la heterocigosidad aumente, aumentará también la tasa de mutación, lo que conllevará a un proceso en el cual aumentarán cada vez más rápido las tallas de los alelos y la heterocigosidad hasta el límite en tamaño de ese microsatélite, momento en el cual el alelo desaparece ó degenera. De esta forma, en poblaciones con gran número de individuos este proceso comenzará primero y se encontrarán microsatélites con menores promedios en cuanto a tiempos de vida media y a la vez, menores periodos de tiempo en los cuales los loci exhiban alelos “largos” (Amos, 1999).

En la mayoría de los estudios donde se han utilizado loci microsatélites, estos han sido considerados como marcadores neutrales en los cuales las frecuencias de las diferentes variantes son consecuencia de procesos aleatorios ó direccionales, como la migración entre poblaciones y la deriva genética. Este criterio se mantiene en todas las revisiones que sobre microsatélites se han llevado a cabo hasta ahora (Mitton, 1998; Estoup y Angers, 1998; Schlotterer y Wiehe, 1999; Estoup y Cournet, 1999). Por otra parte, el modelo de evolución que considera la mutación por pasos (SMM), ha permitido hasta ahora, “aceptables” predicciones de la variabilidad microsatélite dentro del equilibrio mutación-deriva, aunque de hecho exista un gran debate sobre que modelo representa realmente la variación en los loci microsatélites (Schlotterer y Wiehe, 1999; Estoup y Cournet, 1999). En los próximos años esta última problemática requerirá un esfuerzo significativo para lograr establecer un modelo evolutivo que pueda ser aplicado universalmente a todo el conjunto de marcadores microsatélites que hoy se utilizan. De esto depende el que sean correctas las inferencias que se hacen sobre las poblaciones a partir de las frecuencias alélicas encontradas, que podamos con exactitud detectar y cuantificar las diferencias genéticas entre poblaciones, y que comprendamos las causas que originan las diferencias entre especies en cuanto a tallas de los

alelos y variabilidad genética (Takezaki y Nei, 1996; Estoup y Angers, 1998; Feldman y col., 1999; Estoup y Courmet, 1999; Chakraborty y Kimmel, 1999).

Finalmente es necesario mencionar que existen algunas evidencias de funcionalidad en ciertos loci microsatélites particulares (revisado por Kashi y Soller, 1999). Algunos loci microsatélites aparecen en las zonas promotoras de los genes y parecen tener alguna función en la regulación de la expresión de los mismos. Por otra parte, secuencias repetidas encontradas en regiones promotoras son capaces de unir proteínas reguladoras de la transcripción (Ptashne, 1988; Lue y col., 1989; Suen y Hung, 1990) También se ha encontrado que en los productos de algunos genes (ej.: receptores para andrógenos en varias especies) aparecen homopolímeros con segmentos de poliglutamina ó poliprolina y que la variación en el número de repeticiones afecta a la expresión de estos genes y a su función (Chamberlain y col., 1994), además se ha comprobado que la expansión incontrolada de trinucleótidos provoca un número significativo de enfermedades neurodegenerativas (Rubinsztein, 1994a; 1994b, 1999). Estas evidencias de funcionalidad en algunos loci, unidas al hecho de que la variación microsatélite está relacionada con la expresión de prolactina y el crecimiento en la tilapia (Streelman y Kocher, 2002), hacen pensar que algunos loci microsatélites en particular, pueden estar sometidos a selección y no ser precisamente neutrales. Este debate parece ser uno de los temas que en los próximos años adquirirá relevancia, tal y como antes sucedió con el debate neutralismo-seleccionismo en las enzimas.



**II. Objetivos.**



Los loci microsatélites han despertado grandes expectativas y se han aplicado de forma casi inmediata para superar las limitaciones que revelaron las enzimas en el manejo de especies marinas en el cultivo. A partir de este hecho en este trabajo se pretende comprobar si estas expectativas realmente se cumplen en los siguientes objetivos concretos:

1. Utilizar los loci microsatélites para, a través de estudios de parentesco, diseñar el manejo de los lotes de reproductores en los programas de cultivo.
2. Determinar la relación existente entre caracteres de interés comercial y la composición genética de los individuos.
3. Contribuir al debate existente sobre las causas y consecuencias de las correlaciones entre heterocigosidad genética y eficacia biológica.
4. Evaluar la utilidad de la variación microsatélite en el estudio y caracterización de poblaciones naturales.

Se han utilizado tres especies: el salmón atlántico (*Salmo salar L.*), posiblemente entre los peces más estudiados genéticamente por su productividad en el cultivo y con grandes problemas de conservación en el medio natural; el rodaballo *Scophthalmus maximus*, con un alto interés económico en Europa y cuyos estándares de cultivo son ya rutinarios por lo que las mejoras en el mismo han de proceder de la aplicación de las técnicas genéticas; y finalmente, el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, en peligro de desaparición del medio natural, pero que constituye aún la principal especie en cultivo en Cuba y con gran importancia económica para el país.

Para la presentación de los resultados se ha adoptado un diseño por capítulos independientes para cada uno de los objetivos particulares.



**III. El uso de microsatélites en estudios de parentesco aplicados al manejo de poblaciones cultivadas.**



### ***III.1 –Estudio de parentesco en el rodaballo *Scophthalmus maximus*.***

#### ***III.1.1. Antecedentes.***

El rodaballo *Scophthalmus maximus* es uno de los peces planos con mayor importancia en Europa y posee una amplia distribución que abarca el Atlántico Noreste y el mar Mediterráneo. La demanda de esta especie en el mercado y el significativo descenso de las capturas por pesquerías en la última década, han contribuido al auge de su cultivo en los países europeos (Josupeí, 1996; Coughland y col., 1998). España contribuyó con el 70,3% (3650 tm) al total de la producción de rodaballo en la acuicultura europea en el año 2000, pero otros países como Francia y Noruega están incrementando rápidamente sus producciones. Una vez que el cultivo de la especie ha sido logrado con éxito, y como consecuencia de este interés económico, se comienzan ahora a aplicar las herramientas moleculares a la mejora de la producción del rodaballo.

Aunque los objetivos de los programas genéticos pueden variar de una especie a otra, la mayoría persigue producir animales más eficientes a través de programas de selección genética. La ganancia genética depende, entre otros factores, de la intensidad de selección (proporción de individuos seleccionados como reproductores) y de la heredabilidad (proporción de la varianza fenotípica que es atribuible a los genes). En los peces es posible obtener grandes cantidades de huevos y espermatozoides a partir de un pequeño grupo seleccionado de individuos y aplicar altas intensidades de selección a nivel familiar ó individual, sin embargo la endogamia se debe mantener bajo mínimos evitando cruzar a individuos emparentados (Kincaid, 1983; Gjerde y col., 1983; Su y col., 1996).

Hasta ahora, los diseños experimentales de mejora genética exigían el mantenimiento por separado, de las distintas familias durante toda su vida, ó bien hasta que los peces alcanzaran tallas mínimas en las que se les pudiese individualizar a través del marcaje físico. Este procedimiento implica la disponibilidad de tanques especiales para mantener aisladas las familias en las estaciones de cultivo, lo cual no refleja las verdaderas condiciones en el cultivo e introduce diferencias ambientales ó de manejo entre los tanques que pueden ser interpretadas como diferencias genéticas entre las familias (Herbinger y col., 1999). Estos procedimientos

son por lo tanto costosos en cuanto a espacio, recursos y esfuerzos, y no demasiado rigurosos en cuanto a resultados.

Recientemente varios autores han propuesto las asignaciones de parentesco utilizando marcadores genéticos por para su uso en acuicultura (Estoup y col., 1998; García de León y col., 1998; Pérez-Enriquez y col., 1999; Norris y col., 2000). Los nuevos marcadores moleculares incluyen entre otros a: RFLPs, AFLPs, minisatélites, RAPDs y loci microsatélites. Todos son marcadores de ADN que exhiben como característica común altos niveles de polimorfismo, necesarios para abordar este tipo de estudios. En rodaballo los loci enzimáticos no revelan casi polimorfismo (Bouza y col., 1997), y en particular es muy bajo en los lotes de reproductores que se utilizaron en este estudio (Blanco, comunicación personal).

Los loci microsatélites, debido a sus elevados niveles de polimorfismo y codominancia parecen “a priori” herramientas muy útiles para la asignación retrospectiva a sus parentales de individuos cultivados en un mismo estanque. Con ellos se garantiza reproducir en los programas experimentales de mejora genética las condiciones del cultivo en cuanto a número real de individuos por tanques, competencia entre genotipos y homogeneidad de condiciones ambientales (alimento, iluminación, etc).

La utilidad de los loci microsatélites como marcadores genéticos en programas de selección basados en familias, en los cuales los descendientes son cultivados en los mismos estanques está siendo demostrada en varias estudios. Así, García de León y col. (1998), utilizando sólo dos loci microsatélites, asignaron correctamente a sus parentales a 300 individuos en lubina (*Dicentrarchus labrax*). Pérez-Enriquez y col. (1999) utilizando 4 loci microsatélites en el pargo japonés (*Pagrus major*), lograron aclarar el pedigrí de más del 73% de la progenie de 91 reproductores. En *Salmo salar L.*, Norris y col., (2000) utilizando 8 loci microsatélites lograron una asignación correcta de un 95% de los descendientes a más de 100 parentales, en 10 familias de hermanos completos y 2 familias de medios hermanos.

Los loci microsatélites también pueden ser utilizados para estimar las relaciones de parentesco entre pares de individuos con origen desconocido, a través de la estima de coeficientes de relación genética. Este tipo de análisis tiene gran importancia en el caso de lotes de reproductores ya establecidos en las piscifactorías y en ausencia de información sobre el origen de los mismos. Norris y col. (2000), utilizando 8 loci clasifican correctamente como emparentados a prácticamente todos los individuos hermanos completos y medios hermanos en salmón atlántico. De igual manera, Doyle y col. (2001), aplicando una metodología similar en el pargo japonés (*Pagrus major*), han propuesto el uso de estos análisis de parentesco en las

estaciones para aconsejar el manejo de los stocks evitando endogamia entre los reproductores. En especies terrestres los ejemplos son más numerosos, y se ha demostrado correlación entre datos de pedigrís de hasta 300 años, y las estimas de parentesco que sugieren los coeficientes de relación genética utilizando microsatélites (ver Cunningham, y col., 2001 y citas incluidas). Otra de las aplicaciones inmediatas que pueden tener los loci microsatélites como marcadores genéticos en la acuicultura, es la que se refiere a la estimación de la aportación de cada reproductor a la próxima generación, y la viabilidad de la progenie de determinados cruzamientos en una estación de cultivo donde las descendencias se cultiven en estanques comunes (Selvamani, y col. 2001; Boudry, y col. 2002); este elemento es imprescindible para optimizar la producción.

En este trabajo se utiliza una estación para el cultivo del rodaballo (Estación 1) como centro experimental, en ella pretendemos averiguar la funcionalidad de ocho loci microsatélites aislados en rodaballo y publicados en la literatura, en dos objetivos fundamentales: 1) asignación retrospectiva de descendientes obtenidos en esa estación a sus parentales y 2) inferencia correcta de las relaciones de parentesco existentes entre individuos con origen desconocido. Se pretende también determinar si los resultados obtenidos en esta situación concreta se pueden extrapolar a otras estaciones de cultivo.

### ***III.1.2. Materiales y Métodos***

#### Muestras

Se utilizó un lote de reproductores establecido en la Estación 1 compuesto por 15 hembras y 19 machos. Este grupo de reproductores, según las informaciones disponibles, es bastante heterogéneo debido a que los individuos que lo componen tienen orígenes diferentes. Se utilizaron 5♂ y 5♀, para obtener 5 familias de hermanos completos (Figura 1). De cada una de estas familias se recogieron larvas que fueron mantenidas en etanol 100% hasta su análisis.

En la Estación 2 (una estación comercial para la producción de rodaballo en España), se utilizaron 4 lotes de reproductores establecidos a partir de varios ciclos de cultivo en esa estación. Los mismos estaban compuestos por: lote A, 28 reproductores (19 hembras y 9 machos); lote B, 25 reproductores (12 hembras y 13 machos); lote C, 26 reproductores (16 hembras y 10 machos) y lote D, 60 reproductores (31 hembras y 29 machos).

Se utilizaron 6♂ y 6♀ provenientes del primer lote de reproductores (2A), que se cruzaron para obtener 11 familias (hermanos completos y medios hermanos) según muestra la Figura 2. Las larvas provenientes de cada una de las familias se mantuvieron en etanol 100% hasta su análisis.

#### PCR, Condiciones de amplificación y electrofóresis.

El ADN se extrajo utilizando la resina *Chelex*<sup>R</sup> 100 (Walsh y col., 1991), a partir de una pequeña muestra obtenida de la aleta caudal en los reproductores, y utilizando la larva completa en el caso de los descendientes. El ADN se conservó a 4°C.

En la Estación 1 se analizaron todos los reproductores y 25 descendientes por familia para 5 loci microsatélites que exhiben alta variabilidad en estudios previamente publicados (heterocigosidad observada,  $H_o \geq 0,700$ , límite recomendado para estudios de parentesco según Blouin y col., 1996): Smax-01 (Coughlan y col., 1998), Sma3-8, Sma3-12, y Sma3-129 (Estoup y col., 1998) y F1OCA19 (Iyengar y col., 2000). Posteriormente se analizaron todos los reproductores de esta estación y 10 descendientes por cada familia para 3 nuevos loci microsatélites que exhiben también alta variabilidad en los trabajos en los que aparecen: Smax-02 y Smax-03 (Coughlan y col., 1998) y Sma3-125 (Estoup y col., 1998). En la Estación 2 se analizaron todos los reproductores y 10 descendientes por familia para los 8 loci microsatélites anteriormente mencionados, utilizando las mismas condiciones.

Los loci microsatélites se amplificaron mediante PCR utilizando las siguientes condiciones generales: 25 µl de una mezcla compuesta por 10ng de ADN por muestra, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada desoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2ng/µl de cada iniciador (uno de los oligonucleótidos marcado con Cy5), tampón de reacción 10X y 1 unidad de *Taq*-polimerasa. Los programas empleados para amplificar cada locus (temperaturas de hibridación y ciclos de amplificación) son concordantes con los propuestos en los trabajos donde estos loci han sido descritos (Anexo 1). Posteriormente se procedió a la electrofóresis y lectura de tallas de los fragmentos en el secuenciador automático OpenGene Automated DNA Sequencing System.

#### Asignaciones de paternidad.

Para las asignaciones de paternidad se utilizó el programa Cervus (Marshall y col., 1998). Este programa diseñado para marcadores codominantes, calcula las frecuencias alélicas,

heterocigosidades observadas y esperadas, y contenidos de información polimórfica (PIC) para cada locus. Cervus también estima las frecuencias de posibles alelos nulos a partir de un algoritmo propuesto por Summers y Amos (1997) que tiene en cuenta las diferencias entre las frecuencias observadas y esperadas de los homocigotos.

El PIC (Botstein y col. 1980) es un elemento que caracteriza cuan informativo es un marcador genético. Fue definido como una medida de la utilidad de un marcador genético codominante para identificar el alelo transmitido por un padre heterocigoto afectado por una enfermedad genética de la cual es responsable un alelo dominante. PIC es siempre menor que la heterocigosidad ya que determinados cruzamientos entre individuos heterocigotos pueden no ser informativos. Se calcula a partir de:

$$PIC = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k p_i p_j (1 - p_i p_j)$$

donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo y  $k$  es el número de alelos.

Utilizando Cervus es posible realizar simulaciones de asignaciones de paternidad mediante procedimientos de máxima probabilidad a parentales generados a partir de las frecuencias alélicas del conjunto de individuos del que se introducen sus genotipos. De la misma forma cuando se trabaja con datos reales (descendientes y parentales), los parentales son asignados a cada descendiente, como parental ó parentales más probables (mayor LOD), dentro del conjunto de posibles reproductores.

En este trabajo se investigaron varios “niveles” en la asignación de paternidades:

- a) Predicciones teóricas de asignaciones correctas de paternidad, utilizando las frecuencias alélicas de los loci microsatélites seleccionados (simulaciones de 10 000 ciclos de asignación).
- b) Asignación correcta a sus padres, de los descendientes obtenidos en los cruzamientos que se realizaron en cada estación.
- c) Asignación correcta de descendientes “virtuales” a sus padres.

Esto último surge dadas las limitaciones que existe en el trabajo con descendencias reales en cuanto al número de individuos a analizar por familia (objetivamente no se pueden analizar a todos los descendientes que podrían originar una pareja de peces), y además en cuanto al número de familias reales de las que se dispone, que pueden no representar todas las situaciones posibles que se originarían (combinación de genotipos, etc) si en el experimento estuvieran representados los descendientes de todos los cruzamientos entre los reproductores

de cada lote. Por este motivo se acudió al programa estadístico Probmax 1.02 (Danzmann., 1997). Este programa a partir de parentales de los cuales se conoce su genotipo para marcadores codominantes, es capaz de generar al azar tantos descendientes como se desee para cada uno de los cruces que se le indiquen.

### Relaciones genéticas entre individuos.

Se utilizó el programa Relatedness 5.0.6 (Queller y Goodnight, 1989) para evaluar la eficiencia de los loci microsátélites en la identificación del grado de parentesco existente entre individuos con origen desconocido. A partir de los genotipos de marcadores codominantes este programa calcula los coeficientes de relación genética ( $r$ ) por pares de individuos. 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  $x$  es individuos,  $k$  loci y  $l$  posiciones alélicas (Ej.:  $l=1$  para individuos haploides y 2 para individuos diploides). Las variables en la ecuación son:

$P_x$ : frecuencia encontrada en el individuo  $x$ , locus  $k$  y posición alélica  $l$ . Este valor en un individuo diploide debe ser 0, 0,5 ó 1,0.

$P_y$ : frecuencia del mismo alelo en el grupo de individuos con el que se compara  $x$  (aquellos con respecto a los cuales se quiere medir la relación genética).

$P^*$ : frecuencia de ese alelo en toda la población excluyendo a todos los posibles parientes de  $x$ .

Se estudió el comportamiento de los coeficientes de relación genética en las descendencias de ambas estaciones cuando:

- a) Se analizan individuos emparentados (hermanos completos y medios hermanos).
- b) Se analizan individuos no emparentados.

Teóricamente,  $r$  entre individuos ó grupos de individuos que comparten ambos parentales (hermanos completos) debe ser como media  $r=0,5$ , mientras que medios hermanos que sólo comparten un 25% de su genoma, deben exhibir medias de  $r=0,25$  e individuos no relacionados deben exhibir medias situadas en los valores  $r \leq 0$  (ver Queller y Goodnight, 1989). En este trabajo se comprueba si estos planteamientos teóricos se ajustan a la realidad y si por lo tanto ( $r$ ) puede ser utilizado para inferir el grado de parentesco existente entre dos individuos de estas estaciones de los cuales se desconozca su origen.

### Procedimiento estadístico

Se utilizaron los análisis de regresión lineal y estimación de curvas de regresión incluidos en el paquete estadístico SPSS (versión 10) para discernir la influencia de varios parámetros (número de individuos analizados por familia, número de cruzamientos llevados a cabo para obtener las descendencias, PIC, número de alelos presentes, etc) sobre los porcentajes de asignación correcta encontrados. Para la comparación de medias se utilizó un ANOVA simple incluido en el mismo paquete estadístico.

### ***III.1.3. Resultados.***

#### Asignaciones de paternidad.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de los niveles de variabilidad genética encontrados en los reproductores de la Estación 1 en el análisis con 5 loci microsatélites. Como se observa, algunos de los loci muestran bajos niveles de variabilidad, así los loci Sma3-12 y F1-OCA19 sólo alcanzan un PIC de aproximadamente 0,500. Los loci Smax-01 y Sma3-129 mantienen altos valores en cuanto a número de alelos encontrados, heterocigosidad observada y PIC. La media en cuanto a PIC de estos cinco loci microsatélites es de 0,639. Con los valores de las frecuencias alélicas encontradas en estos parentales, la simulación predice que sólo en un 46,5% de los casos se obtendrían asignaciones correctas de los descendientes a sus parentales (Tabla 1).

Una vez conocido el genotipo de todos los descendientes de la Estación 1 (125) para estos 5 loci microsatélites, se procedió a la asignación de paternidades considerando el total de reproductores (34) como posibles padres, observándose que un 72% de los descendientes fue correctamente asignado a sus dos parentales (Tabla 2a). Con el objetivo de determinar si el número de individuos analizados tiene influencia en los porcentajes de asignación correcta encontrados, se realizaron 3 muestreos aleatorios dentro de los grupos de descendientes (8, 10 y 14 individuos seleccionados al azar en cada familia) y se procedió a repetir el proceso de asignación utilizando estos “subconjuntos” de descendientes (Tabla 2a). Los resultados obtenidos exhiben medias similares a las obtenidas al analizar a 25 descendientes por familia, no encontrándose relación entre los porcentajes de asignación correcta obtenidos en cada caso

y el número de individuos analizados por familia (regresión lineal,  $b=0,1443$   $p=0,328$ ) (Tabla 2a, Figura 3a). A partir del programa Probmax, se crearon 100 descendientes virtuales por cada una de las familias y se repitió el análisis llevado a cabo con los descendientes reales. En este caso tampoco se encontró relación entre los porcentajes de asignación correcta obtenidos y el número de individuos analizados por familia (regresión lineal,  $b=-0,0240$   $p=0,498$ ) (Tabla 2b, Figura 3b). No obstante, se obtienen menores porcentajes de asignación correcta al utilizar a los individuos virtuales generados (media, 62,2%) que cuando se trabaja con los descendientes reales (media, 70,3%) ( $F=93,4460$   $p=0,000$ ).

En la Tabla 3 se describen los niveles de variabilidad encontrados en los reproductores de la Estación 1 al analizar tres nuevos loci microsátélites (Smax-02, Smax-03 y Sma3-125). En este caso los 3 loci exhiben PIC por encima de 0,700, lo que contribuye a que en general la media de PIC de los 8 loci microsátélites analizados en estos reproductores aumente a 0,681 y la predicción de asignaciones correctas después de los 10 000 ciclos de asignación sea del 76,2% (Tabla 3). Dado que no se observó una variación significativa entre el número de individuos analizados por familias y los porcentajes de asignación correcta obtenidos, se procedió a analizar estos tres nuevos loci microsátélites en 10 individuos de cada familia y llevar a cabo la asignación de descendencias reales a sus parentales. Tras este análisis un 81,2% de los descendientes se asignó correctamente a sus dos parentales (Tabla 4a).

Con el objetivo de averiguar que influencia tienen sobre la asignación correcta a parentales en esta estación, a) el número de cruzamientos que originan las familias (representatividad en los descendientes), y b) el tipo de parentesco que existe entre ellos; se generaron mediante Probmax descendencias de todos los cruzamientos posibles en la Estación 1 (15 hembras x 19 machos) y se llevaron a cabo asignaciones de paternidad. En primer lugar, los resultados de asignaciones correctas obtenidos con las descendencias reales (81,2%) y las generadas con Probmax en condiciones similares (5 familias de hermanos completos seleccionadas al azar 9 veces, media= 82,5%) no son significativamente diferentes ( $F=0,018$   $p=0,897$ ; Tabla 4b). Por otra parte, las asignaciones correctas de paternidad no varían cuando se incluyen entre los descendientes a individuos que son producto de un número mayor de cruzamientos dentro de los hermanos completos (el tipo de parentesco que tienen entre si los descendientes reales obtenidos en la Estación 1) ( $b=0,0002$   $p=0,909$ ) (Tabla 4b, Figura 4a), ni al considerar para este análisis a todos los posibles tipos de parentesco entre los descendientes “virtuales” ( $b=0,0006$   $p=0,668$ ) (Tabla 4b, Figura 4b). Al comparar los resultados de asignación correcta obtenidos entre descendientes de familias de sólo hermanos completos (media de

asignaciones correctas, 82,4%) y los obtenidos con los descendientes entre los cuales existen todos los tipos posibles de parentesco (media de asignaciones correctas, 80,8%) se encontraron diferencias significativas ( $F=155,909$   $p=0,000$ ).

Con el objetivo de verificar si los resultados obtenidos en la Estación 1 son extrapolables a la Estación 2 se analizaron los 8 loci microsátélites en todos los reproductores (140) de esta estación. En la Tabla 5 se presentan los niveles de variabilidad genética encontradas en los lotes de reproductores de la misma. Como se observa, alguno de los loci microsátélites que en la Estación 1 presentan altos niveles de variabilidad revelan en este caso niveles de variabilidad inferiores (ej.: locus Sma3-125 PIC=0,723 en la Estación 1 y PIC=0,409 en el lote D de la Estación 2). En general en los 4 lotes de reproductores de la Estación 2 se encontraron PIC promedios inferiores a los de la Estación 1, siendo los lotes B y D los que presentan las mayores diferencias con la Estación 1 (Tablas 1, 3 y 5). Las predicciones teóricas sobre asignaciones correctas que mediante simulación se obtienen con Cervus varían desde un 75,1% para el lote C, a un 38,9% para el lote D (Tabla 5).

En la asignación de paternidades de las 11 familias obtenidas a partir de 12 reproductores del lote A de la Estación 2, solamente un 38,7% de asignaciones fueron correctas y un 45,8% si se consideran sólo 4 familias de hermanos completos para la asignación (ej.: familias 3, 6, 10, 11 de la Estación 2) (Figura 2, Tabla 6a). Utilizando Probmax se generaron 8 descendientes para 25 familias en cada uno de los lotes de reproductores de la Estación 2 (5 hembras x 5 machos) y se procedió a la asignación de descendientes a sus parentales. Se encontraron asignaciones correctas de descendientes a sus parentales que oscilan de un 70,5% en el lote A a sólo un 6,5% en el lote D (Tabla 6b).

Entre los descendientes reales analizados (tanto de la Estación 1, como de la Estación 2) se cumplió de forma cualitativa la segregación mendeliana de los alelos de los padres a sus hijos, sin embargo en las familias 3 y 8 de la Estación 2 se detectó la aparición de genotipos en los descendientes no explicables a partir de los genotipos parentales y difícilmente atribuibles a un error de manejo dadas las características de las muestras (larvas en los primeros estadios). En el caso de la familia 3, se detectó lo que puede ser una mutación de los alelos 88 ó 102 del locus F1-OCA19 presentes en el macho (Tabla 7). En la familia 8 de la misma estación, se obtiene en los descendientes una distribución genotípica para el locus Sma3-129 sólo explicable a partir de la presencia de un alelo nulo en la hembra, que exhibe sin embargo, un genotipo aparentemente homocigoto 189/189 (Tabla 8). Al eliminar a la familia 8 y el

individuo supuestamente mutante de la familia 3 en los descendientes a asignar en la Estación 2 se obtiene tan sólo una mejoría de un 1,4% en las asignaciones correctas (40,1%) (Tabla 6a). En la Tabla 9 se presenta un resumen de la variabilidad genética encontrada en los 5 lotes de reproductores analizados para cada uno de los sexos y los resultados de asignación obtenidos tanto al utilizar las descendencias reales como las generadas mediante el programa Probmax. Se encontró una asociación positiva y significativa entre los valores de PIC que exhiben los lotes de reproductores y las asignaciones de paternidad representadas por los porcentajes de asignación correcta al utilizar 25 familias en cada caso (Probmax) ( $b=319,65$   $p=0,021$ ), así como también con los PIC que exhiben las hembras ( $b=285,35$   $p=0,063$ ) y los machos ( $b=275,13$   $p=0,027$ ) (Figura 5). También se observó una relación positiva y significativa entre el número medio de alelos encontrados en cada uno de los lotes y las asignaciones correctas de paternidad ( $b=24,12$   $p=0,010$ ) y este tipo de relación se mantiene en cada uno de los sexos: hembras ( $b=22,08$   $p=0,014$ ), machos ( $b=23,29$   $p=0,004$ ) (Figura 6).

#### Relaciones genéticas entre individuos con origen desconocido.

En la Figura 7 se muestran las medias y el tipo de distribución de los coeficientes de relación genética encontrados entre las descendencias reales de cada una de las estaciones para cada tipo de parentesco existente (individuos relacionados (hermanos completos y medios hermanos) y no relacionados). La Figura 8, muestra este mismo tipo de información cuando se analizan los coeficientes de relación genética en ambas estaciones entre las descendencias “virtuales” generadas con Probmax (25 familias). Con la excepción de los individuos medios hermanos en la Estación 2 (A), las medias de los coeficientes de relación genética en los distintos tipos de parentesco, concuerdan con las teóricamente esperadas en el caso de las descendencias reales analizadas (Estación 1,  $r$  media (hermanos completos) = 0,4858,  $r$  media (no relacionados) = -0,0782) (Estación 2(A),  $r$  media (hermanos completos) = 0,4898,  $r$  media (medios hermanos) = 0,0220, y  $r$  media (no relacionados) = -0,0824) (Figura 7).

Cuando se analiza el comportamiento de los coeficientes de relación genética por tipo de parentesco, entre las descendencias “virtuales” utilizadas, se observan mayores discrepancias con las medias teóricamente esperadas para cada tipo de parentesco (Estación 1,  $r$  media (hermanos completos) = 0,3630,  $r$  media (medios hermanos) = 0,1368,  $r$  media (no relacionados) = -0,0848) (Estación 2(A),  $r$  media (hermanos completos) = 0,4686,  $r$  media (medios hermanos) = 0,1738, y  $r$  media (no relacionados) = -0,1176) (Figura 8).

Si con un sentido de aplicación a la gestión, se utiliza como criterio  $r \leq 0$ , para la selección de pares de individuos que por no estar relacionados al cruzarse no provocarían endogamia en estas estaciones, observamos que el 100% en la Estación 1 y el 71% en la Estación 2, serían en realidad individuos no relacionados (Figura 7). Por otra parte cuando se aumenta el número de familias en el análisis (trabajando con los descendientes generados con Probmax), se encuentra un 81% en la Estación 1 y un 87% en la Estación 2 de pares de individuos correctamente seleccionados como no relacionados (Figura 8).

Si el criterio de selección para los potenciales cruzamientos se adecua a cada stock y se establece en las medias de coeficientes de relación genética que se encontraron para los individuos no relacionados, en vez del valor  $r \leq 0$ , los porcentajes de individuos correctamente seleccionados como no emparentados aumenta (Figuras 7 y 8).

El análisis de los coeficientes de relación genética entre los reproductores (de los cuales no se conoce su origen), muestra que un 19,4% de los posibles cruzamientos en la Estación 1 estaría seriamente comprometido en cuanto a potenciales daños por endogamia, debido a los altos coeficientes de relación genética encontrados entre ellos ( $r \geq 0,25$ ). En los lotes de reproductores de la Estación 2 los riesgos se incrementan (28,3% en el lote A, 21,8% en B, 24,1% en C, y 21,6% en D) (Tabla 10). Aplicando el criterio de selección propuesto ( $r \leq 0$ ), y comprobado en las descendencias en las cuales se conoce el tipo de relación existente entre los individuos, observamos que el lote de reproductores de la Estación 1 y el lote C de la Estación 2, son los que revelan un mayor número de posibles parejas con poco riesgo de parentesco estimado entre los reproductores (Estación 1, 55,2%; Estación 2(C), 55,1%) (Tabla 10).

Cuando se analizan cada uno de los lotes de reproductores por sexos, se observa que las hembras son siempre los parentales más relacionados (en los 5 lotes exhiben menores porcentajes de individuos con relación genética entre ellos menor que cero de tal forma que son las que condicionan el  $N_e$  del diseño de gestión), siendo significativo el caso del lote D de la Estación 2 donde sólo un 34,1% de los coeficientes de relación genética entre hembras se encuentra por debajo de cero (Tabla 11).

No se encontró ningún tipo de relación entre el porcentaje de reproductores exhibiendo entre ellos coeficientes de relación genética menores que cero en cada uno de los lotes, y las asignaciones correctas de paternidad al analizar 25 familias en cada caso ( $b=4,35$   $p=0,419$ ). No obstante, si este análisis se lleva a cabo dentro de los sexos se encuentra que las asignaciones correctas de paternidades tienen una relación positiva y significativa con el

porcentaje de hembras que en cada lote aparecen con  $r \leq 0$  entre ellas ( $b=6,42$   $p=0,041$ ) y no se encuentra relación con en este mismo valor estimado en los machos ( $b=-1,29$   $p=0,596$ ) (Figura 9).

#### **III.1.4. Discusión.**

Debido a la dinámica actual de la acuicultura los cultivadores para iniciar ó renovar sus cultivos en cualquier especie necesitan a menudo incorporar nuevos reproductores que provienen de diferentes fuentes, por lo tanto la heterogeneidad, al menos inicial, es una de las características más importantes de los lotes de reproductores utilizados para el cultivo de cualquier especie en un país ó región. En este estudio se han analizado, para el mismo conjunto de loci microsátélites, muestras de dos estaciones españolas de cultivo de rodaballo, *Scophthalmus maximus*, y varios lotes de reproductores en ellas.

Tal y como era esperado, se ha encontrado una gran heterogeneidad en cuanto a niveles de variabilidad de los marcadores microsátélites utilizados en los estudios previamente publicados, y en cada uno de los lotes de reproductores utilizados en este estudio. Por ejemplo, Estoup y col. (1998) en un estudio de 45 individuos de origen natural, seleccionados como reproductores en una estación de cultivo en Francia, encuentran que los loci Sma1-125 (PIC=0,795), Sma3-8 (PIC=0,855), Sma3-12 (PIC=0,775) y Sma3-129 (PIC=0,886) presentan niveles superiores de variabilidad a los encontrados en este trabajo. De la misma forma, Iyengar y col. (2000) encuentran una heterocigosidad observada de 0,880 para el locus F1-OCA19 en individuos salvajes. Es conocido que para mantener en una estación de cultivo niveles de variabilidad comparables a los que exhiben individuos de origen salvaje, se necesita un manejo adecuado en las piscifactorías en términos de números adecuados de padres efectivos para crear los lotes, evitando reducciones significativas de variabilidad genética (Estoup y col., 1998). Los reproductores analizados en este estudio exhiben una reducción de polimorfismo genético no pudiendo excluirse la posibilidad de que este hecho se deba a una ó varias generaciones de domesticación, sobre todo en los grupos pertenecientes a la Estación 2. Así pues los datos tomados de la bibliografía pueden servir como una referencia para seleccionar una batería amplia de marcadores, presuntamente con alta variabilidad, y llevar a cabo un estudio previo de la composición genética de los lotes de reproductores, evaluando en

ellos la adecuación de los loci microsatélites ensayados para un programa de estas características y seleccionando los mejores loci para cada caso concreto.

En este trabajo se encuentra correlación entre el PIC promedio que se calcula en cada uno de los stocks de reproductores y el porcentaje de aciertos en las asignaciones de paternidad tanto cuando se analizan descendientes reales como virtuales (Figura 5). Por otra parte, no parece existir dependencia entre los porcentajes de asignación correcta y el número de descendientes analizados por familia ó el número de cruzamientos que da lugar a las descendencias (Figuras 3 y 4), lo que valida las previsiones que puedan hacerse con el programa Cervus a partir de los PIC que exhiben los loci microsatélites en una situación real en la cual incluso no todos los reproductores dejan descendientes, ni lo hacen en igual número.

Varios elementos pueden no obstante, influir significativamente en que las asignaciones correctas en situaciones reales se desvien de las predicciones teóricas que proporciona el programa Cervus. Las simulaciones de asignación llevadas a cabo mediante el programa, se realizan a partir de las frecuencias alélicas encontradas en todos los genitores y considerando todos los posibles cruces entre ellos. Obviamente en el proceso de asignación real, los cruzamientos entre machos ó entre hembras no son posibles; al asignar primero un genitor y luego buscar al de mayor probabilidad en el sexo contrario. Se justifica así, que se encuentren algunas diferencias entre los resultados previstos en la simulación y las asignaciones correctas encontradas. No obstante, a medida que se utiliza un número mayor de loci las diferencias entre los resultados obtenidos con ambos métodos no se diferencian (con 5 loci, Cervus predice un 46% de asignaciones correctas y se obtiene un 72% en la situación real, mientras que con 8 loci microsatélites la predicción es de un 76% y se obtiene un 82% en la situación real, Tablas 2 y 9).

Las mutaciones y/ó alelos nulos (Pemberton y col., 1995, McGoldrick y col., 2000) pueden contribuir también a que las predicciones teóricas de asignación mediante simulación ó utilizando descendientes virtuales, no se ajusten a los resultados obtenidos en las asignaciones de descendientes reales. En los loci microsatélites se han encontrado tasas de mutación que van desde  $10^{-6}$  en *Drosophila* (Schug y col., 1997) hasta  $10^{-2}$  en *E.coli* (Levinson y Gutman, 1987a). En este trabajo se encontró 1 mutación en las 1264 meiosis estudiadas, lo que significa una tasa de mutación de  $7,9 \times 10^{-4}$ . Esa frecuencia, en el rango de las esperadas para los microsatélites, no influiría significativamente en las asignaciones pues solo 8 de cada 10000 individuos podría ser mal asignado por esta causa.

En el caso de los alelos nulos, un individuo (reproductor) “heterocigoto” sería mal clasificado como homocigoto, y el 50% de sus descendientes (heterocigotos portando ese alelo nulo) también estarían mal identificados genotípicamente y por lo tanto podrían ser mal asignados. Este efecto representaría un porcentaje mayor de errores que el de la mutación, de hecho en este trabajo encontramos solo 1 mutante pero 7 “heterocigotos nulos” mal genotipados (Tablas 7 y 8). El problema para cuantificar la influencia de los alelos nulos en una situación real es complejo pues la detección inequívoca de este tipo de alelos requeriría analizar descendencias de todos los reproductores (Pemberton y col., 1995). No obstante, puede llevarse a cabo una estima de la presencia y frecuencias de los alelos nulos a través de un algoritmo propuesto por Summers y Amos (1997) disponible también en el programa Cervus. Cuando en el análisis para un determinado locus en una población natural ó de cultivo, el programa estima que puede existir un alelo nulo con una frecuencia mayor de 0,02, debe considerarse la posibilidad real de que existan estos alelos con una alta probabilidad en los grupos de reproductores analizados. En el lote A de la Estación 2 los loci Sma3-129 y F1-OCA19 muestran estimados de frecuencias para alelos nulos de 0,1262 y 0,0749, respectivamente. En el lote C el locus Sma3-125 muestra una frecuencia de un posible alelo nulo de 0,0647. No obstante, el algoritmo funciona a partir de las diferencias entre frecuencias esperadas y observadas de homocigotos y esas diferencias pueden originarse también debido a que la muestra con la que se trabaja es una mezcla de individuos procedentes de diferentes poblaciones (subdivisión genética) (efecto Wahlund), a que exista selección sobre ese locus ó genes ligados a ese locus, ó debido a un efecto de muestreo (Error tipo I). No obstante en el primero de los casos se espera que varios de los loci en el análisis de la población ó lote muestren el mismo patrón. El caso de los alelos nulos se complica más cuando el individuo problema participa en la creación de más de una familia. En nuestro caso se describe un alelo nulo en una hembra que participó en la formación de una sola familia (8) (Figura 2), si hubiese participado en la formación de muchas familias los errores en la asignación serían considerables. Por lo tanto es recomendable luego del análisis previo de variabilidad en los lotes de reproductores añadir el elemento “posibilidad de alelos nulos”, a los criterios de selección de loci microsatélites a utilizar en cada uno de ellos.

Otra de las causas que pueden provocar diferencias entre los porcentajes de asignaciones correctas de paternidad obtenidas en situaciones reales y los previstos, es el tipo de parentesco que existe entre las descendencias. La inclusión de medios hermanos en los análisis de paternidades conlleva a una reducción en las asignaciones correctas. En la Figura 2 se muestra

la complejidad con la cual se realizaron los cruzamientos para generar descendencias en la Estación 2. Imaginemos una situación “hipotética” en la cual la hembra número 1 de la Estación 2 (implicada en la formación de cinco de las familias), tenga una composición genotípica idéntica ó muy similar a la hembra número 3 de la misma estación (madre de 2 familias). En este caso a la hora de la asignación, individuos procedentes de 7 familias podrían aparecer con un parental erróneo ó aparecer como individuos no asignados. Este ejemplo sólo pretende llamar la atención sobre la importancia de cómo se manejan en una estación los cruzamientos (este caso es por sí mismo una representación de lo que ocurre realmente en las estaciones comerciales para el cultivo de peces). Casi todos los descendientes están relacionados de algún modo, lo cual conlleva a grandes reducciones del polimorfismo genético en los lotes de individuos cultivados y por lo tanto se genera endogamia, fenómeno que conlleva a afectaciones en la eficacia biológica (fertilidad, tasas de crecimiento, mortalidad, aberraciones morfológicas, etc) (Kincaid, 1983; Gjerde y col., 1983; Su y col., 1996). Si además como parece ser posible, ya de por sí los parentales pueden no ser una generación “cero”, es decir pueden ser individuos con relaciones de parentesco entre ellos, la situación se vuelve más compleja. De aquí que las relaciones genéticas existentes entre los parentales, el manejo para crear las descendencias en esta estación, unidos al fenómeno de mutaciones ó alelos nulos encontrados explican, en nuestra opinión, las bajas asignaciones correctas encontradas con los descendientes reales en algunos de los lotes de reproductores de la Estación 2.

Utilizando los mismos 8 loci microsatélites y seleccionando entre los 139 reproductores existentes en la Estación 2, los 23 individuos menos relacionados genéticamente para formar un lote de reproductores “hipotético” (ver Figura 10), se obtendrían un 85% de asignaciones correctas de los descendientes a sus parentales luego de 10 000 ciclos de asignación en ese lote, valor que es un 10% superior a los previstos por los ciclos de simulación en los lotes de reproductores utilizados aquí (Tabla 9). Por lo tanto, obtener un 100% de asignaciones correctas de los descendientes a sus parentales en cada lote de reproductores dependerá, de una composición adecuada del lote de reproductores en cuanto a variabilidad genética (PIC, número de alelos, en general y por sexos), de un buen diseño de los cruzamientos para la obtención de las descendencias, y por supuesto del uso del mayor número posible de loci microsatélites variables en el experimento. En rodaballo esto es posible pues el manejo habitual en esta especie utiliza cruzamientos individualizados y dirigidos entre los reproductores y además existen en la bibliografía reciente gran número de secuencias

microsatélites aisladas en la especie y con altos niveles de variabilidad en sus primeras descripciones (Iyengar y col., 2000).

El uso de los coeficientes de relación genética como herramienta para la selección adecuada de parejas de reproductores en las estaciones cuando se desconoce el origen (pedigrí) de los mismos, es un método que contribuiría a evitar la endogamia en las estaciones de cultivo. Doyle y col. (2001) han demostrado que un número mínimo de los reproductores utilizados en una estación, pueden acumular casi toda la diversidad alélica y heterocigosidad del conjunto de genes de los parentales.

En este estudio comprobamos que se pueden establecer ciertos “valores de corte” para los coeficientes de relación genética (ej.:  $r \leq 0$ ), que demuestran tener niveles aceptables de confianza a la hora de identificar a individuos no relacionados. Los niveles de certeza con que se puede concluir que dos individuos no están relacionados (valor de corte las  $r \leq 0$ ), alcanzan al menos un 71% en ambas estaciones cuando se trabaja con un número pequeño de familias, y más de un 81% en ambas estaciones, cuando se eleva el número de familias en el análisis (mejor representación de la composición genética de los reproductores en las descendencias, menor sesgo) (Figuras 7 y 8). Estos resultados indican que las estimas de las relaciones de parentesco mediante este método serían recomendables para evitar endogamia en las estaciones de cultivo cuando no se conoce el origen de los reproductores.

En cada lote de reproductores existe siempre un número posible, y limitado, de combinaciones (parejas) para generar las descendencias, que dependen del número de individuos que integran el lote y el sexo de los mismos. Por ejemplo en la Estación 1, el lote de reproductores estaba compuesto por 15 hembras y 19 machos, lo cual permitiría realizar 285 cruzamientos distintos. De ellos, aplicando el criterio de seleccionar como parejas individuos con  $r \leq 0$ , sólo 157 (55,2%) están razonablemente fuera del riesgo de endogamia, número suficiente para el manejo de un programa genético en una estación, y dada la enorme fecundidad de los peces, para cubrir el aspecto productivo.

No obstante, cuando se proponen cruces entre 2 individuos con  $r \leq 0$  entre ellos pretendemos evitar endogamia en ese cruzamiento, lo cual no implicaría de por sí que se obtuvieran mejores resultados (mayores % de asignación) cuando se pretendiese esclarecer paternidades en las descendencias obtenidas en el conjunto de cruzamientos dentro del lote. De hecho si entre el lote de reproductores existen 2 hembras (ó 2 machos) con igual genotipo las descendencias de esas familias entre sí pueden presentar genotipos muy parecidos y se verían afectados los

porcentajes de asignaciones correctas de paternidad. Por lo tanto es necesario analizar también las relaciones genéticas (composiciones genotípicas) que existen entre los reproductores de los mismos sexos, a la hora de seleccionarlos como parentales para crear una próxima generación en el cultivo, en términos de evitar endogamia en las descendencias y asegurar a la vez una buena asignación a parentales, lo que estaría garantizado con reproductores que en general tengan poca similitud genética ( $r \leq 0$ ). De hecho en este trabajo las relaciones genéticas entre los individuos del mismo sexo estimadas a través de los coeficientes  $r \leq 0$  (en este caso de las hembras, que son los parentales mas relacionados en cada lote de reproductores), guardan relación con la capacidad para obtener asignaciones correctas de paternidad en cada uno de los lotes utilizados (Figura 9).

Resumiendo, los loci microsatélites serían útiles para diseñar el manejo de los lotes de reproductores en las estaciones de cultivo a través de estudios de parentesco si se tienen en cuenta al aplicarlos varios elementos como son: el análisis previo en cuanto a variabilidad (PIC y número de alelos, en general y por sexos) de los reproductores, la posibilidad de mutaciones y presencia de alelos nulos en los individuos, las relaciones genéticas existentes entre los reproductores y finalmente el manejo que se realiza para obtener las descendencias.

### III.1.5. Tablas.

Tabla 1. Variabilidad genética en los 34 reproductores de rodaballo de la Estación 1 (5 loci microsatélites).

<b>Locus</b>	<b>Na</b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>PIC</b>
Smax-01	8	0,886	0,718
Sma3-8	6	0,800	0,647
Sma3-12	5	0,543	0,516
Sma3-129	8	0,914	0,779
F1-OCA19	4	0,686	0,537
“valores medios”	6,20	0,765	0,639

**Na:** Número de alelos. **H<sub>o</sub>:** Heterocigosidad observada.

**PIC:** Contenido de Información Polimórfica.

Tabla 2. Asignaciones correctas a ambos parentales de los descendientes en la Estación 1 (%), utilizando 5 loci microsatélites considerando diferentes números de individuos analizados por familia.

<b>n</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
<b>a)</b>	80,0	64,0	71,4	72,0	-
	60,0	74,5	72,8		
	72,5	68,0	65,7		
“valores medios”	<b>70,8</b>	<b>68,6</b>	<b>70,0</b>	<b>72,0</b>	-
<b>b)</b>	50,0	-	64,2	65,6	64,6
	77,7		61,4	63,2	58,8
	87,5		58,5	59,2	
“valores medios”	<b>63,3</b>	-	<b>61,4</b>	<b>62,6</b>	<b>61,6</b>

**n:** número de individuos utilizados por familia para la asignación.

**a)** descendientes reales.

**b)** descendientes generados con Probmax.

Tabla 3. Variabilidad genética en los 34 reproductores de rodaballo de la Estación 1 (3 nuevos loci microsatélites).

<b>Locus</b>	<b>Na</b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>PIC</b>
Smax-02	12	0,943	0,723
Smax-03	7	0,765	0,807
Sma3-125	5	0,943	0,723
“valores medios”	8,00	0,883	0,751
“valores medios” (8loci)	6,88	0,810	0,681

**Na:** Número de alelos. **H<sub>o</sub>:** Heterocigosidad observada.

**PIC:** Contenido de Información Polimórfica.

Tabla 4. Asignaciones correctas a ambos parentales en la Estación 1 (%), utilizando diferentes números de cruzamientos entre los parentales (hembras x machos) y analizando diferentes tipos de parentesco entre los descendientes (8 loci microsatélites, al menos 8 descendientes por familia).

	<b>5 x 5</b>	<b>10 x 10</b>	<b>15x15</b>	<b>15x19</b>
<b>a) hc</b>	<b>81,2</b>	-	-	-
<b>b) hc</b>	70,0 75,0 77,5 90,0 75,0 90,0 77,5 95,0 92,5	77,5 79,3 84,3 88,1	82,5	-
total	<b>82,5</b>	<b>82,3</b>	<b>82,5</b>	-
<b>todos</b>	73,0 75,7 73,0 75,0 78,5 86,5 86,0 88,0 93,0	75,5 78,3 81,8 86,1	80,9	80,9
total	<b>80,9</b>	<b>80,5</b>	<b>80,9</b>	<b>80,9</b>

**a)** Descendientes reales. **b)** Descendientes generados con Probmax.

**hc:** sólo hermanos completos.

**todos:** todos los tipos de parentesco incluidos.

Tabla 5. Variabilidad genética en los lotes de reproductores de rodaballo de la Estación 2 (8 loci microsatélites).

Locus	A			B			C			D		
	Na	H <sub>o</sub>	PIC									
Smax-01	6	0,714	0,639	4	0,760	0,582	8	0,731	0,700	3	0,700	0,583
Sma3-8	7	0,607	0,532	5	0,480	0,350	8	0,615	0,553	3	0,433	0,297
Sma3-12	6	0,607	0,532	5	0,400	0,362	6	0,577	0,527	3	0,517	0,332
Sma3-129	8	0,536	0,625	6	0,720	0,596	8	0,808	0,724	5	0,783	0,590
F1-OCA19	5	0,607	0,601	5	0,600	0,457	5	0,654	0,593	5	0,617	0,405
Smax-02	8	0,929	0,700	6	0,800	0,633	8	0,846	0,740	7	0,767	0,600
Smax-03	4	0,714	0,614	4	0,720	0,570	5	0,923	0,650	4	0,833	0,583
Sma3-125	5	0,679	0,606	5	0,720	0,526	6	0,615	0,648	3	0,483	0,409
“valores medios”	<b>6,13</b>	<b>0,665</b>	<b>0,600</b>	<b>5,00</b>	<b>0,650</b>	<b>0,509</b>	<b>6,75</b>	<b>0,721</b>	<b>0,642</b>	<b>4,13</b>	<b>0,641</b>	<b>0,475</b>
*		<b>69,5%</b>			<b>59,0%</b>			<b>75,1%</b>			<b>38,9%</b>	

Na: Número de alelos. H<sub>o</sub>: Heterocigosidad observada.

PIC: Contenido de Información Polimórfica.

\*: Asignaciones correctas luego de 10 000 ciclos de asignación (Cervus).

Tabla 6. Asignaciones correctas a ambos parentales en los lotes de reproductores de la Estación 2 (%) (8 loci microsatélites, al menos 8 individuos por familia).

	A	B	C	D
<b>a) hc</b> (4 familias)	<b>45,8</b>	-	-	-
<b>todos</b> (11 familias)	<b>38,7</b>	-	-	-
<b>todos*</b> (10 familias)	<b>40,1</b>	-	-	-
<b>b) todos</b> (25 familias)	<b>70,5</b>	<b>40,5</b>	<b>65,5</b>	<b>6,5</b>

a) Descendientes reales. b) Descendientes generados con Probmax.

hc: sólo hermanos completos.

todos: todos los tipos de parentesco incluidos.

\* Se eliminan la familia 8 y un individuo de la familia 3 para la asignación.

Tabla 7. Genotipos del locus F1-OCA19 en la familia nº 3, Estación 2.

<u>Parentales : hembra 96/96 x macho 88/102</u>			
<u>Genotipo</u>	<u>10 descendientes</u>	<u>observados</u>	<u>esperados</u>
88/96	5	5	
102/96	4	5	
96/98*	1	0	

\* El alelo 98 puede ser una mutación de alguno de los alelos presentes en el padre.

Tabla 8. Genotipos del locus Sma3-129 en la familia nº 8, Estación 2.

<u>Parentales : hembra 189/189* x macho 165/171.</u>			
<u>Genotipo</u>	<u>10 descendientes</u>	<u>observados</u>	<u>esperados</u>
189/165	1	5	
189/171	2	5	
165/165	5	0	
171/171	2	0	

\* El verdadero genotipo de la hembra sería: 189/ nulo.

Tabla 9. Variabilidad genética por sexos en los lotes de reproductores de rodaballo de las estaciones 1 y 2 y asignación correcta a parentales (8 loci microsatélites).

	Estación 1			Estación 2											
	total	- h.	m.	total	A h. m.		total	B h. m.		total	C h. m.		total	D h. m.	
<b>Na</b>	6,75	5,75	6,25	6,13	4,63	5,63	5,00	3,13	4,63	6,75	4,38	6,13	4,13	2,50	3,25
<b>H<sub>o</sub></b>	0,810	0,824	0,798	0,665	0,666	0,662	0,650	0,583	0,711	0,721	0,687	0,775	0,641	0,625	0,664
<b>PIC</b>	0,680	0,662	0,676	0,600	0,544	0,650	0,509	0,450	0,545	0,642	0,533	0,718	0,475	0,439	0,476
Predicción Teórica Asignaciones correctas *	<b>76,2%</b>			<b>69,5%</b>			<b>59,0%</b>			<b>75,1%</b>			<b>38,9%</b>		
<b>a)</b> hc	<b>81,2%</b>			<b>45,8%</b>			-			-			-		
todos	-			<b>38,7%</b>			-			-			-		
<b>b)</b> 25 familias	<b>80,9%</b>			<b>70,5%</b>			<b>40,5%</b>			<b>65,5%</b>			<b>6,5%</b>		

**Na:** Número de alelos. **H<sub>o</sub>:** Heterocigosidad observada.

**PIC:** Contenido de Información Polimórfica.

**\*:** Asignaciones correctas luego de 10 000 ciclos de asignación (Cervus).

**a)** Descendientes reales. **b)** Descendientes generados con Probmax.

**hc:** sólo hermanos completos. **todos:** todos los tipos de parentesco incluidos.

Tabla 10. Distribución por rangos de los coeficientes de relación genética entre pares de individuos, dentro de cada lote de reproductores en dos estaciones para el cultivo del rodaballo utilizando 8 loci microsatélites (%).

Rangos	Estación <u>1</u>		Estación <u>2</u>			
	-	A	B	C	D	
$r \leq 0$	55,2	49,5	48,1	55,1	50,9	
$0 < r \leq 0,25$	25,4	22,2	30,3	20,6	27,4	
$0,25 < r \leq 0,50$	15,5	19	16,4	19,6	16,0	
$r > 0,50$	3,9	9,3	5,4	4,5	5,6	
$r$ media	-0,0052	+0,0058	-0.0110	-0.0041	-0.0075	
n*	35(15-19)	28(19-9)	25(12-13)	26(16-10)	60(31-29)	

n: número de reproductores analizados (\* en paréntesis número de hembras y machos).

Tabla 11. Distribución por rangos de los coeficientes de relación genética entre pares de individuos según el sexo, dentro de cada lote de reproductores en dos estaciones para el cultivo del rodaballo utilizando 8 loci microsatélites (%).

Rangos	Estación <u>1</u>		Estación <u>2</u>			
	-	A	B	C	D	
hembras $r \leq 0$	42,8	39,8	36,3	43,8	34,1	
$r > 0$	57,2	60,2	63,7	56,2	65,9	
machos $r \leq 0$	58,5	68,8	57,7	50,3	66,6	
$r > 0$	41,5	31,2	42,3	49,7	33,4	

### III.1.6. Figuras.

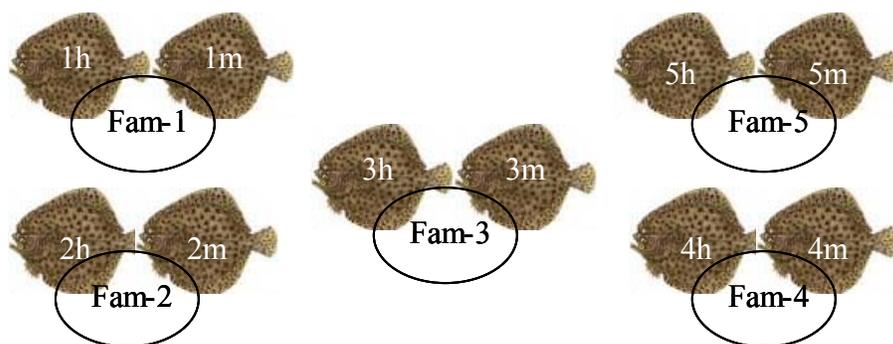


Figura 1. Representación esquemática del procedimiento para crear 5 familias de descendientes con los reproductores de la Estación 1 compuesto por 15 hembras y 19 machos.

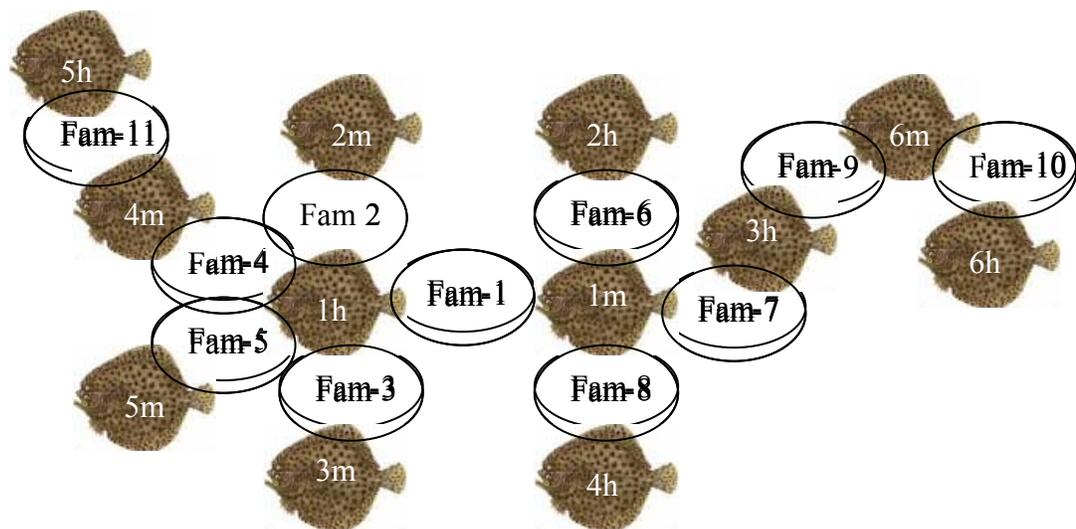


Figura 2. Representación esquemática del procedimiento para crear 11 familias de descendientes con los reproductores de la Estación 2, lote A compuesto por 19 hembras y 9 machos.

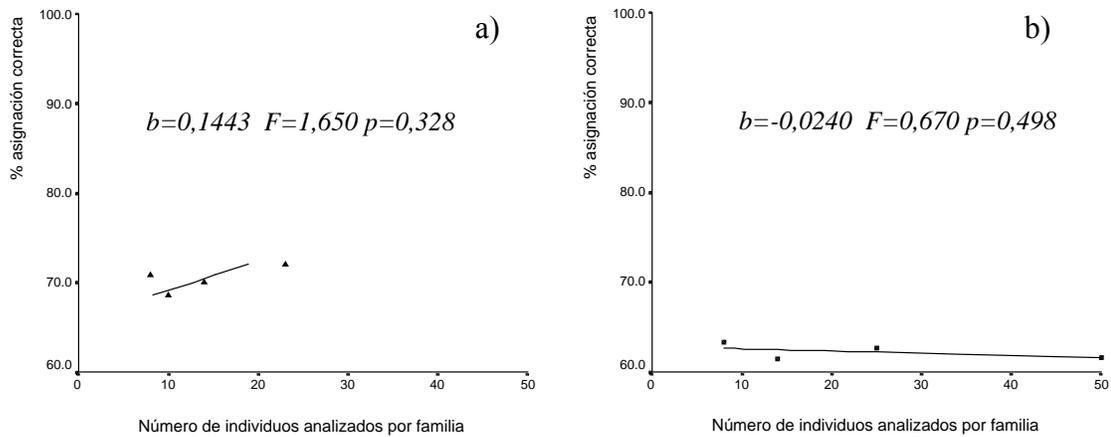


Figura 3. Regresión lineal entre la asignación correcta a parentales y la cantidad de individuos analizados por familia considerando 5 loci microsatélites en la Estación 1.  
a) Descendientes reales. b) Descendientes simulados generados con el programa Probmax.

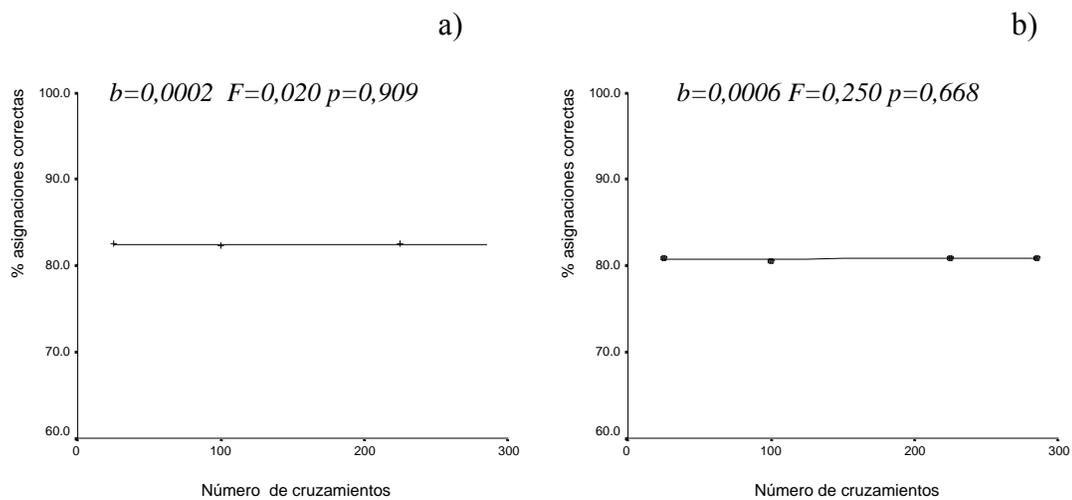


Figura 4. Regresión lineal entre la asignación correcta a parentales y diferentes números de cruzamientos en la Estación 1 (8 descendientes por familia generados con Probmax y analizados para 5 loci microsatélites).  
a) hermanos completos. b) todos los tipos de parentesco en estudio.

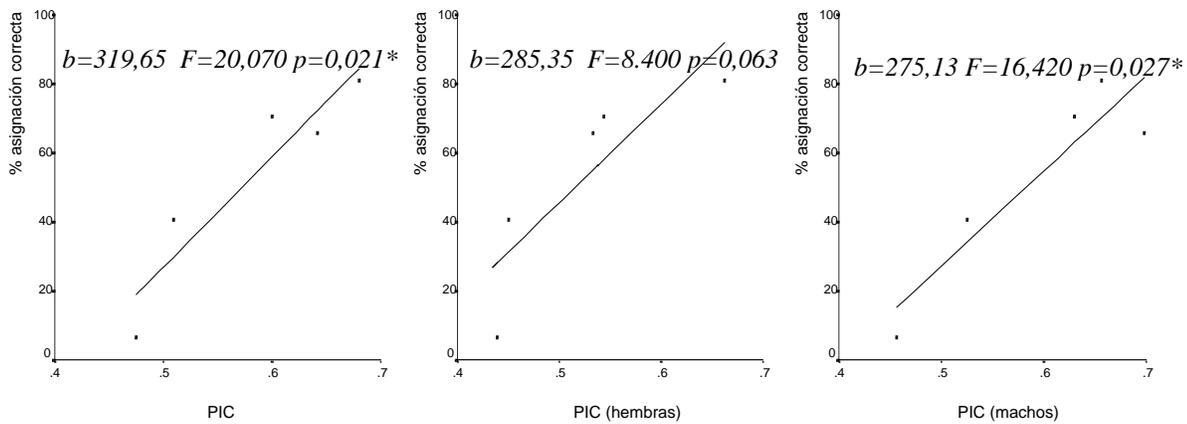


Figura 5. Regresión lineal entre la asignación correcta a parentales y el PIC de los reproductores luego del análisis con 8 loci microsatélites en 5 lotes de reproductores (Estaciones para el cultivo del rodaballo 1 y 2).

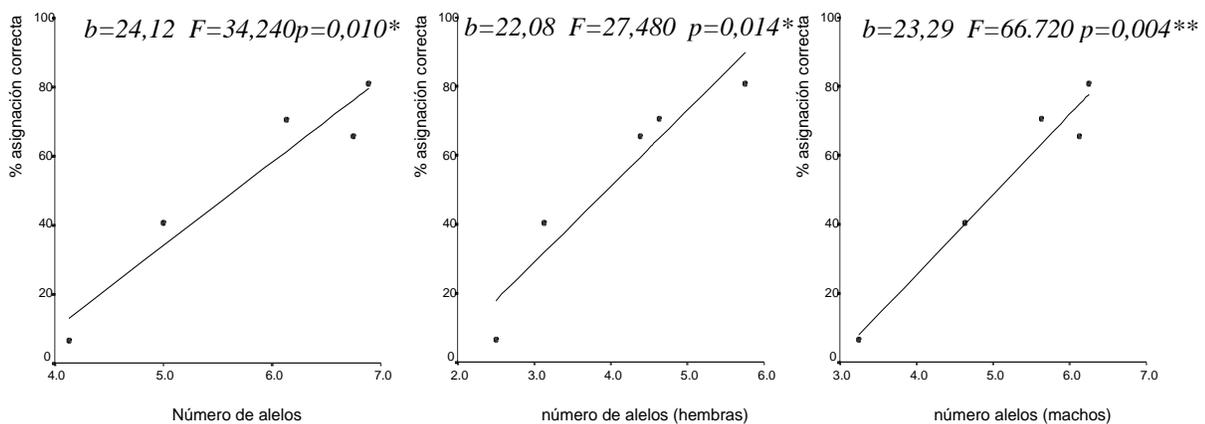


Figura 6. Regresión lineal entre la asignación correcta a parentales y los valores medios de números de alelos presentes en los reproductores luego del análisis con 8 loci microsatélites en 5 lotes de reproductores (Estaciones para el cultivo del rodaballo 1 y 2).

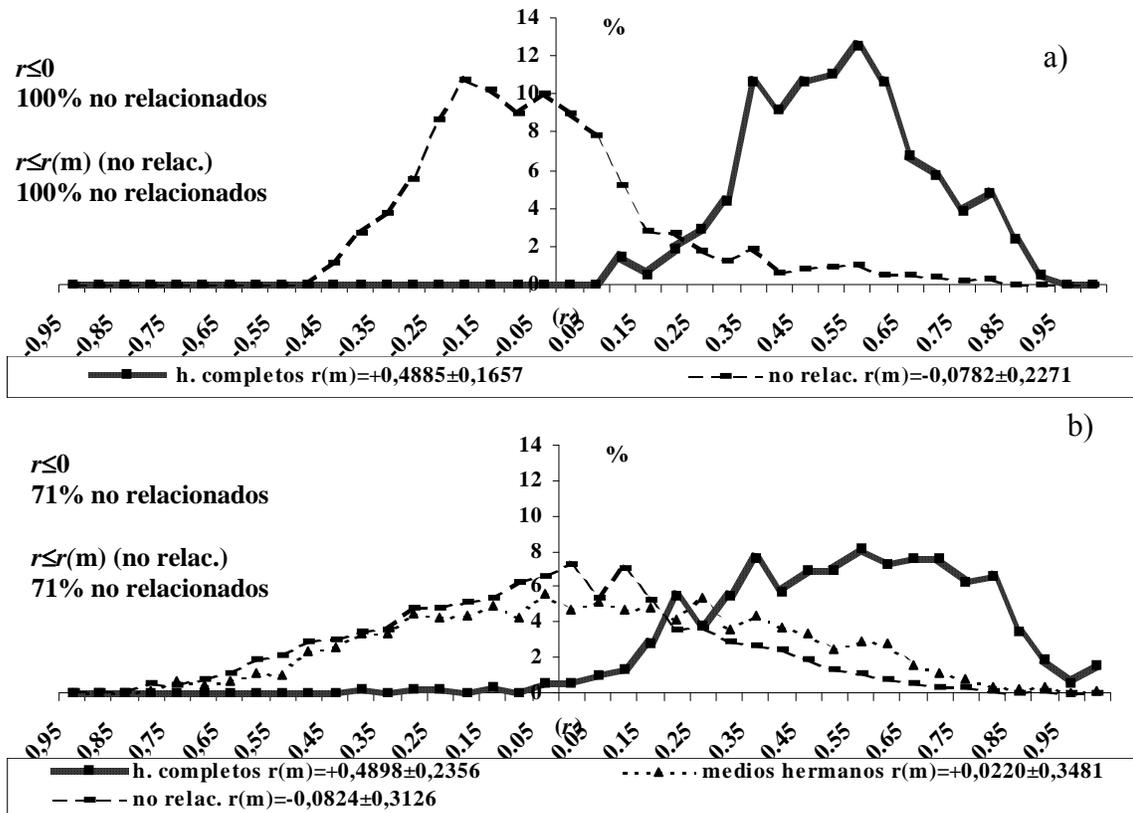


Figura 7. Distribución de coeficientes de relación genética y medias ( $\pm$  D.E) por tipo de parentesco en descendientes reales de dos estaciones para el cultivo del rodaballo (8 loci microsatélites). a) Estación 1. b) Estación 2 (lote A). Se muestran los porcentajes de individuos no relacionados encontrados cuando  $r \leq 0$  ó  $r < r(m)$  (no relac.).

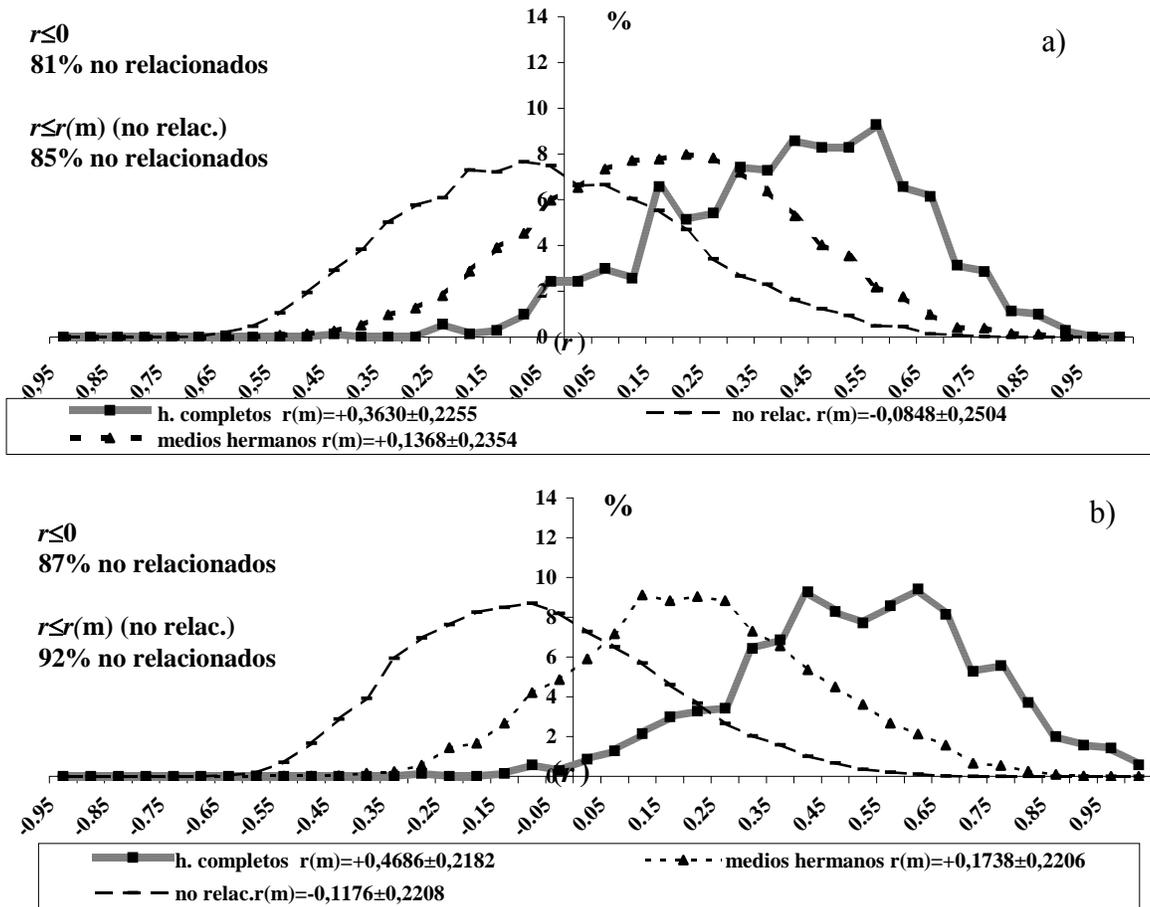


Figura 8. Distribución de coeficientes de relación genética y medias ( $\pm$  D. E) por tipo de parentesco en descendientes generados con Probmax de dos estaciones para el cultivo del rodaballo (8 loci microsatélites). a) Estación 1. b) Estación 2 (lote A). Se muestran los porcentajes de individuos no relacionados encontrados cuando  $r \leq 0$  ó  $r < r(m)$  (no relac.).

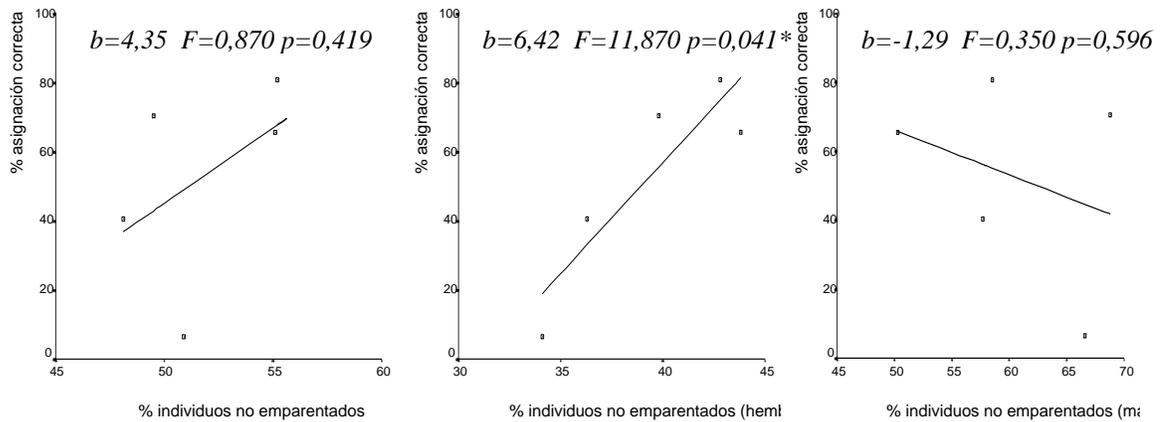


Figura 9. Regresión lineal entre la asignación correcta a parentales y los porcentajes de individuos no emparentados según  $r \leq 0$  en los reproductores luego del análisis con 8 loci microsatélites en 5 lotes de reproductores (Estaciones para el cultivo del rodaballo 1 y 2).

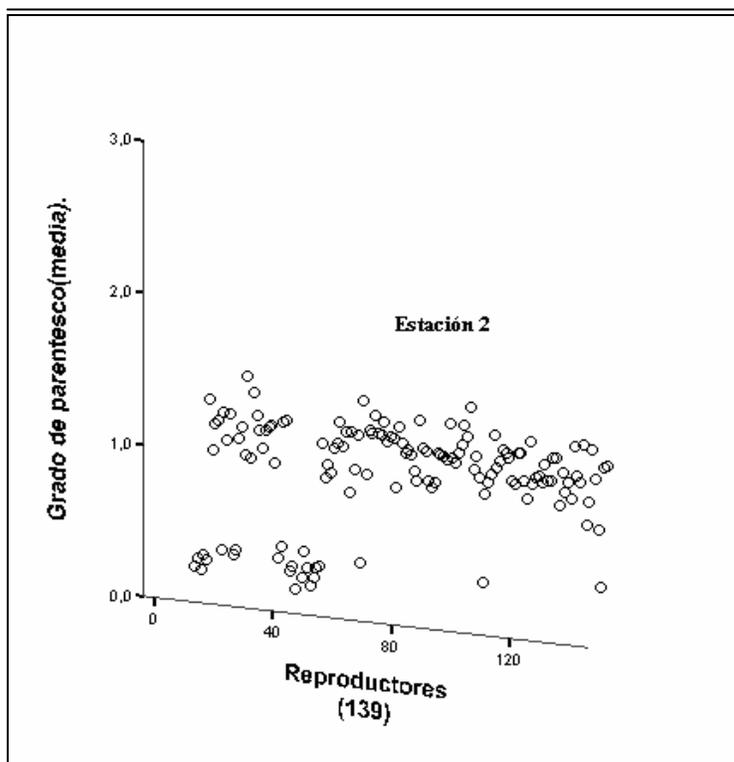


Figura 10. Grado de parentesco entre todos los reproductores de la Estación 2 considerando  $r < 0$  (0),  $0 \leq r < 0,25$  (1),  $0,25 \leq r < 0,5$  (2) y  $r \geq 0,5$  (3) después de utilizar 8 loci microsatélites. (23 individuos están menos relacionados genéticamente con el resto).

### **III.2- Estudio de parentesco en el salmón atlántico (*Salmo salar* (L)).**

#### **ESCLARECIMIENTO DE RELACIONES DE PARENTESCO EN *Salmo salar* L., 1758 UTILIZANDO LOCI MICROSATÉLITES.**

*Y. Borrell, E. Vázquez, J. A. Sánchez y G. Blanco.*

*Boletín del Instituto Español de Oceanografía. (en prensa). Aceptado: 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 below zero were only a 4 % (Narcea), 6 % (Sella) and 12.5 % (Cares) of each samples.

**Key words:** *Relatedness, paternity inferences, conservation, aquaculture, genetics.*

### ***III.2.1. Antecedentes.***

El salmón atlántico *Salmo salar* L., 1758 no sólo está afectado por los mismos factores que inciden negativamente sobre otras especies de interés económico 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 la FAO (1998b) evidencian un claro descenso del volumen total de capturas en los últimos 15 años. En 1998 se pescaron de manera global 5 178 toneladas métricas de salmón atlántico: el 49 % del total reportado 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 ó 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 ó reintroducir salmones en aquellas zonas donde ya han desaparecido ó 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 ó menos aisladas reproductivamente (Stahl, 1987; Verspoor, 1988; Blanco y col., 1992; Sánchez y col., 1991; 1996; Ramos, 1998). La diferenciación genética entre ellas aumenta, además, con la distancia geográfica (Blanco y col., 1992). Las adaptaciones locales que revelan estos estudios son una importante característica que contribuye a la diversidad genética, estabilidad y persistencia de poblaciones autóctonas, sin embargo aun no han sido suficientemente valoradas 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 y col., 1989; Blanco y col., 1990; Sánchez y col., 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, microsátélites, SNP's y otros) y cada uno posee, potencialmente, la ventaja sobre las enzimas de presentar una mayor variabilidad.

Los marcadores microsátélites 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 microsátélites, 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 y col., 1997; 1999).

La alta variabilidad de los loci microsátélites permite realizar estudios individualizados, con la posibilidad de encontrar combinaciones genotípicas únicas para cada individuo y/ó familia con muy pocos loci (Estoup y Anger, 1998). Este hecho ha potenciado en los últimos años los estudios que utilizan loci microsátélites 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 y col., 1997; García de León y col., 1998; Estoup y col., 1998; Pérez-Enríquez y col., 1999; Norris y col., 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), ó 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 y col., 1999; Sánchez y col., 1996; 2000) para su utilización en estudios de parentesco con los salmones de los ríos asturianos Cares, Sella y Narcea.

### ***III.2.2. Materiales 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<sup>®</sup> 100 (Walsh y col., 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 ó alevines vesiculados de cada familia).

#### PCR, Condiciones de amplificación y electroforesis.

Se analizaron siete loci microsatélites: SsaF43, Ssa20-19, Ssa13-37 (Sánchez y col., 1996), SSOSL1.14, SSOSL311, SSOSL417 (Slettan y col., 1993, 1995), y Str15 (Presa y Guyomard, 1996). Estos loci se amplificaron mediante PCR utilizando condiciones de amplificación,

ciclos y temperaturas de hibridación para cada locus que coinciden con las referidas en los trabajos donde han sido descritos (Anexo 1). 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 y col., 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 y col., 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 ó 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 ó 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 a sus parentales de los descendientes de cada población analizada.

Relatedness 5.0.6 (Queller y Goodnight, 1989) calcula el promedio de relación genética ( $r$ ) entre individuos ó 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 (por ejemplo,  $l = 1$  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  $x$  (aquéllos 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 ó grupos de individuos que comparten ambos parentales (hermanos completos) debe ser como media  $r = 0,5$ , mientras que los medios hermanos que sólo comparten el 25 % de su genoma, deben exhibir, como media 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.

### ***III.2.3. 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 y col., 1999; Sánchez y col., 1996; 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 variabilidad alta ( $H_e > 0,700$ ) (SSOSL311 y SSOSL417) (Tabla 1a,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 1.

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 y col. (1999) utilizaron, además, los loci Str15 y Ssa13-37 y analizaron dos muestras del río Sella (años 1993 y 1994) encontrando heterocigosidades medias de  $H_o = 0,395$  y  $H_o = 0,382$ , respectivamente. 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 y col., 2000). En estos estudios los valores de variabilidad reportados, 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 y col., 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 en ninguna de las poblaciones (Tabla 1a,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 y col., 1988).

García de León y col. (1998), utilizando sólo dos loci microsatélites, asignaron correctamente a sus parentales a 300 individuos de lubina *Dicentrarchus labrax* y demostraron la utilidad de los microsatélites en los programas de selección basados en familias en las que los descendientes son cultivados en los mismos estanques. Pérez-Enríquez y col. (1999) utilizaron 4 loci microsatélites muy variables ( $H_e = 0,86$ ) en *Pagrus major* y lograron aclarar el pedigrí de más del 73 % de la progenie de 91 reproductores. Norris y col. (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 1a,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 2).

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 2). 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 ó 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 ( $H_o$ ) con respecto a la teóricamente esperada ( $H_e$ ) (Tabla 1).

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 2 y 3).

Marshall y col. (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 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.

#### Coefficientes de relación genética entre individuos con relaciones de parentesco conocidas

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 y col., 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, medios hermanos ó 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 4). Este tipo de distribución sugiere límites ó 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 hermanos completos erróneamente clasificados como no relacionados, lógicamente, disminuye (Tabla 4).

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 serían erróneamente clasificados como no relacionados (Tabla 5).

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 medios hermanos ó 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 salmónes en la naturaleza, pueden, sin saberlo, estar utilizando animales muy emparentados ó 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 y col., 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 y col. (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 heterocigosidad en los loci microsatélites encontrada en ese estudio: Sella, 1993 ( $H_o = 0,395$ ) y Sella, 1994 ( $H_o = 0,382$ ) (Pineda y col., 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.

### III.2.5. Tablas.

Tabla 1. 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 <sub>e</sub>	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 <sub>0</sub> )				0,580	
Media heterocigosidad esperada (H <sub>e</sub> )				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 <sub>e</sub>	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 <sub>0</sub> )				0,556	
Media heterocigosidad esperada (H <sub>e</sub> )				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	

Tabla 1. continuación.

c): río Sella						
Locus	Na	H <sub>e</sub>	PIC	EXC(1)	EXC(2)	
Str15	1	0,000	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 <sub>o</sub> )				0,509		
Media heterocigosidad esperada (H <sub>e</sub> )				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		

Tabla 2. 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 3. Porcentajes de asignación de descendientes a sus verdaderos parentales utilizando sólo 2 loci microsatélites (H<sub>e</sub> > 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

Tabla 4. 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	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

Tabla 5. 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	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

### III.2.5. Figuras.

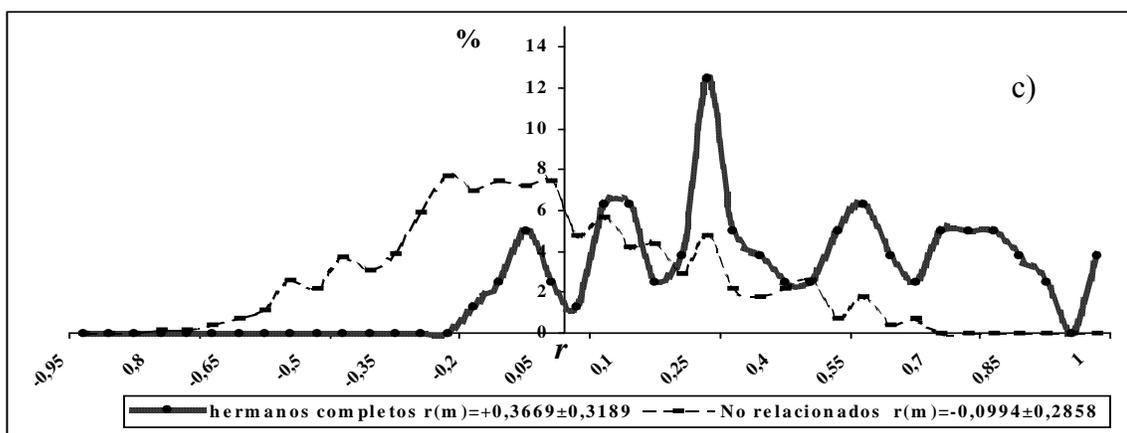
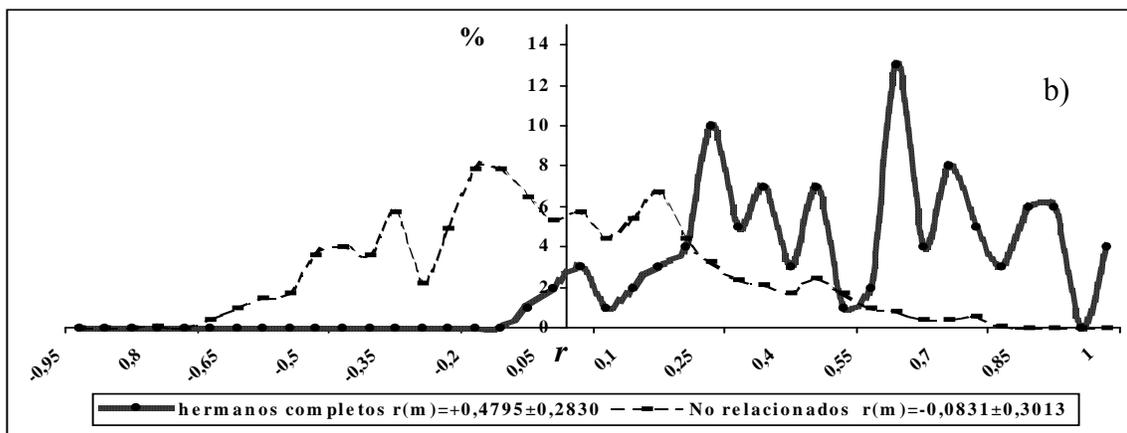
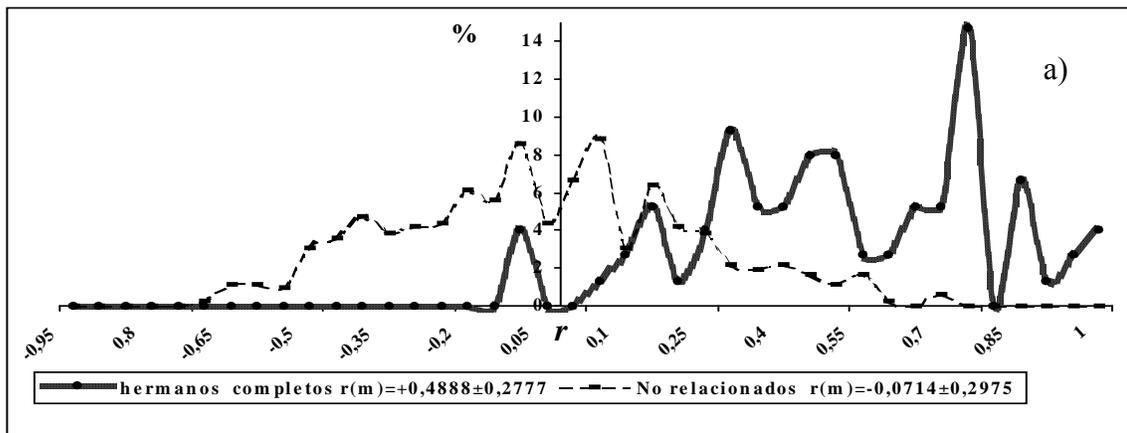


Figura 1. Distribución de coeficientes de relación genética y medias ( $\pm$  D.E) por tipo de parentesco en salmón atlántico (7 loci microsatélites). a) Narcea b) Sella c) Cares.

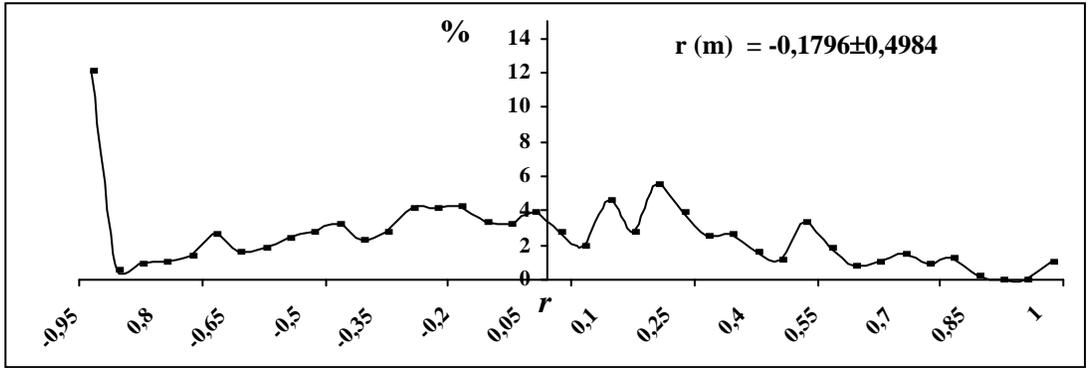


Figura 2. Coeficientes de relación genética entre 44 individuos procedentes de un muestreo en el río Sella en el año 1993 (5 loci microsatélites, Str15, Ssa13-37, SsaD30, Ssa20-19, y SsaF43) (datos de Pineda y col., 1999).

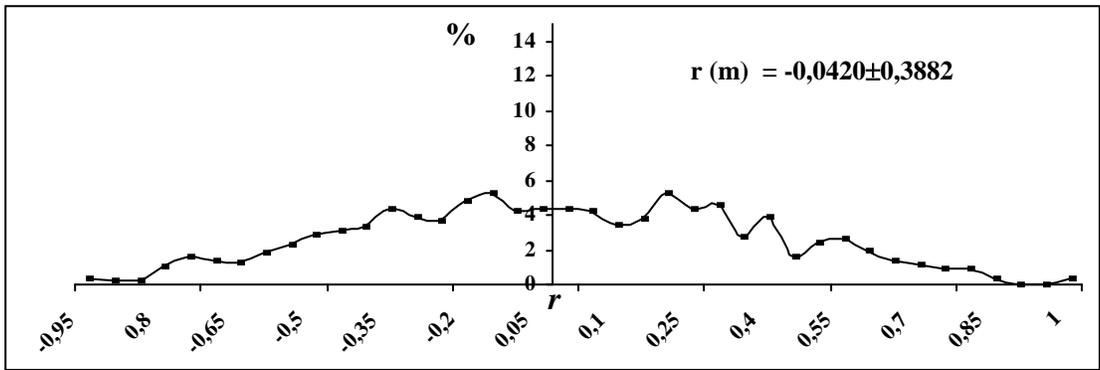


Figura 3. Coeficientes de relación genética entre 46 individuos procedentes de un muestreo en el río Sella en el año 1994 (5 loci microsatélites, Str15, Ssa13-37, SsaD30, Ssa20-19, y SsaF43) (datos de Pineda y col., 1999).

**IV. Eficacia biológica y variabilidad  
genética en el salmón atlántico  
Salmo salar (L).**



## ***IV.1.- Variabilidad genética, momento de la primera alimentación activa y clases fisiológicas en el salmón atlántico en cultivo.***

### ***IV.1.1. Antecedentes.***

En las poblaciones naturales y cultivadas de salmón atlántico se observa un cambio significativo en cuanto a la distribución de tallas de los individuos durante el crecimiento. A partir de una distribución inicial normal, ocurre un cambio hacia una distribución bimodal de las tallas que constituye un factor importante que influye en el proceso de esguinado (cambios fisiológicos que ocurren en el pez y que permiten su adaptación al agua de mar), y en la posterior migración al mar de los juveniles de poblaciones naturales. Los individuos con tallas mayores esguinan ese año, mientras que los más pequeños continúan un año más en el río (Bailey y col., 1980; Metcalfe y col., 1989; Bailey y Friars, 1994).

Las causas que provocan la aparición de los morfotipos debido a la bimodalidad en las poblaciones de salmón atlántico han despertado siempre un gran interés. Aunque todos los factores que influyen en este fenómeno no se conocen, se sabe que el estado fisiológico, la talla, y las tasas de crecimiento de un individuo determinan su posterior conducta en cuanto al esguinado y migración al mar, ó maduración precoz. Thorpe y col. (1992) señalan que existe una “talla mínima” que permite que el esguinado ocurra en una determinada población. Por otra parte la maduración precoz, se reconoce como un mecanismo importante que potencia la variabilidad genética en poblaciones naturales (Martínez, 2000), pero constituye un elemento perjudicial en el cultivo debido entre otros factores, a que estos individuos no alcanzan las tallas comerciales deseadas (Blanco y col., 1997).

El momento de la primera alimentación activa en los alevines también influye significativamente en la posterior estrategia de desarrollo que seguirán los mismos (Metcalfe y Thorpe, 1992). Se han detectado variaciones de hasta 2 semanas en cuanto a los momentos de la primera alimentación activa entre grupos de individuos pertenecientes a las mismas puestas en poblaciones naturales de salmón atlántico (Gustavson-Marjanen y Dowse, 1983; Beall y col., 1994) y en cultivos experimentales (Metcalfe y Thorpe, 1992; Brannas, 1995). Metcalfe y Thorpe (1992) y McCarthy y col. (1996) han encontrado que aquellos peces que completan primero su fase de alevinaje y que fueron “tempranos” en cuanto al momento de

alimentación activa, son dominantes sobre sus congéneres tardíos, crecen más rápido y esguinan con mayor probabilidad al año de vida. En estos fenómenos existe al parecer un efecto “familia” (Thorpe y Morgan, 1978; Beachman y col., 1985; De March, 1995), con evidencias de diferencias genéticas (loci enzimáticos) entre los grupos de individuos que asumen diferentes estrategias de desarrollo (Carl y Healey, 1984; Sánchez y col., 1994; Blanco y col., 1998).

En las poblaciones de salmón atlántico se encuentran bajos niveles de variabilidad alozímica; de aproximadamente 50 loci enzimáticos analizados hasta el presente, sólo 12 de ellos muestran variabilidad y 6 (*MDH-3,4\**, *mMEP-2\**, *IDHP-3\**, *sAAT-4\**, *IDDH-1\** y *IDDH-2\**) acumulan más del 95% de variación en la especie exhibiendo bajos niveles de heterocigosidad (Cross y Ward, 1980; Sthal, 1987; Davidson y col., 1989; Bourke y col., 1997). Debido a esta situación, marcadores moleculares más variables parecen ser necesarios para estudios sobre composición genética diferencial entre grupos de individuos que asumen diferentes estrategias de desarrollo durante su vida. Los loci microsatélites por su abundancia, altos niveles de variabilidad, codominancia y con requerimientos mínimos de tejido para analizarlos, parecen ser excelentes candidatos.

En este trabajo nos proponemos caracterizar genéticamente (utilizando alozimas y microsatélites) individuos tempranos y tardíos en cuanto al momento de primera alimentación activa, y posterior estrategia de desarrollo (esguines, juveniles, y machos maduros precoces). Se pretende además buscar marcadores moleculares asociados a algunas de estas características fisiológicas por la importancia que tendrían a la hora de aplicar selección asistida por marcadores (MAS) en la acuicultura de la especie.

#### ***IV.1.2. Materiales y Métodos.***

##### Muestras.

Se obtuvieron huevos de 400 familias provenientes de cruces entre salmones adultos (20 machos y 20 hembras) que retornaron en la época de reproducción al río Shin (Escocia) en 1994. Los huevos fertilizados se cultivaron en la estación de Almondbank, Perthshire; perteneciente a la Oficina para el Desarrollo de la Agricultura y Departamento de Pesquerías de Escocia, hasta que 1000 de ellos fueron seleccionados al azar y transportados al

Departamento de Zoología de la Universidad de Aberdeen, Escocia, donde eclosionaron. Los alevines se examinaron diariamente para comprobar la absorción del saco vitelino y eliminar los individuos muertos. La tasa de mortalidad de los alevines alcanzó el 12% (121 alevines).

En mayo de 1994, los peces se dividieron en tres grupos utilizando la clasificación propuesta por Metcalfe y Torpe (1992) de acuerdo a la absorción del saco vitelino: peces de alimentación temprana (PTE) (n=243), intermedia (PIN) (n=543) y tardía (PTA) (n=160). Se eligieron 150 individuos tempranos (25 de Mayo de 1994), que prácticamente habían agotado su saco vitelino, y se colocaron en un tanque común donde se les comenzó a alimentar. El mismo procedimiento se utilizó con los peces tardíos (4 de Junio de 1994). Se eligieron 150 de ellos y luego de anestésarlos (MS 222, 0,1g l<sup>-1</sup>) se les cortó cuidadosamente su aleta anal y se incluyeron en el mismo tanque que los individuos tempranos. No se produjeron muertes en este proceso de marcaje.

Los peces se cultivaron conjuntamente hasta abril de 1995 (320 días) y se alimentaron diariamente en exceso con una dieta comercial (BP Nutrition UK Ltd) durante las horas de luz. Para ello se utilizó un alimentador automático y se fue variando el tamaño de los gránulos, como recomiendan los productores, a medida que se incrementaron las tallas de los peces. Hacia el final del experimento se utilizó una mezcla de diferentes tamaños de gránulos para asegurar que todos los peces se alimentaran, independientemente de su talla. Los peces, expuestos a las variaciones naturales del fotoperiodo en la estación, experimentaron también variaciones en cuanto a la temperatura del agua desde Mayo a Noviembre de 1994 (Mayo 14±0,9°C, Agosto 17,4±0,5°C, Noviembre 11,5±0,8°C). A partir del invierno el agua se calentó y permaneció con una temperatura de aproximadamente 10,5°C. En Abril de 1995 los peces se sacrificaron y se identificaron como esguines (S1) ó juveniles (S2); además se clasificaron cómo machos inmaduros, machos maduros precoces (MP) y hembras inmaduras. Se tomaron muestras de hígado y de tejido muscular de cada uno de ellos, que fueron congeladas en nitrógeno líquido. Todas las disecciones se completaron luego de 2 minutos después de la muerte y las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta que se enviaron a la Universidad de Oviedo para los análisis genéticos.

#### Análisis de proteínas.

Las muestras de hígado y tejido muscular se analizaron por electroforesis horizontal en geles de almidón. Se analizaron 6 loci enzimáticos previamente descritos como polimórficos (*MDH-*

3,4\*, *mMEP-2\**, *IDHP-3\**, *sAAT-4\**, *IDDH-1\** y *IDDH-2\**) siguiendo los procedimientos de tinción e identificación propuestos por Blanco y col. (1990) y Sánchez y col. (1991).

#### Análisis de la variación microsatélite.

El ADN se extrajo utilizando la resina *Chelex*<sup>R</sup> 100 (Walsh y col., 1991) en todos los individuos. Se analizaron ocho loci microsatélites: *SsaF43*, *Ssa20-19*, *Ssa13-37*, *SsaD30* (Sánchez y col., 1996), *SSOSL311*, *SSOSL417* (Slettan y col., 1995), *Str543* y *Str15* (Presa y Guyomard, 1996). Los loci microsatélites se amplificaron siguiendo las mismas condiciones generales de PCR descritas en los trabajos previos de esta tesis, las temperaturas de hibridación particulares de cada locus y los ciclos de amplificación utilizados para cada uno de ellos están descritos en los trabajos donde han sido utilizados (Anexo 1). 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<sup>TM</sup> DNA Staining)

#### Análisis estadísticos.

Para comprobar si existían diferencias en cuanto a la composición por clases fisiológicas entre los grupos de peces tempranos (PTE) y tardíos (PTA) se utilizó un análisis  $\chi^2$  incluido en el programa estadístico SPSS (versión 10). Las diferencias en cuanto a heterocigosidad entre los grupos se estimaron a partir de un ANOVA simple incluido en el mismo programa estadístico. Las frecuencias alélicas, la heterocigosidad observada y esperada, el porcentaje de loci polimórficos ( $P_{0,95}$ ) y el número medio de alelos por locus fueron calculados utilizando el programa Byosis-1 (Swofford y Selander, 1989). Los niveles de diferenciación génica ( $pG_{alelos}$ ) y genotípica ( $pG_{genotipos}$ ) entre grupos se estimaron a partir del valor insesgado ( $p$ ) del coeficiente G (log-probabilidad) de Goudet y col. (1996) incluido en el programa Genepop (Raymond y Rousset, 1995).

### ***IV.1.3. Resultados.***

La tasa de mortalidad durante el experimento alcanzó el 14%. En Abril de 1995 la composición por clases en el experimento era la siguiente: 161 esguines (62%), 59 juveniles (23%) y 38 machos maduros precoces (15%). La composición por clases fue significativamente diferente entre los grupos de individuos tempranos (PTE) y tardíos (PTA) ( $\chi^2=35,39$   $p=0,000$ ). El grupo PTE estaba compuesto por 105 esguines (74%), 12 juveniles (8%) y 24 machos maduros maduros (17%). En el grupo PTA la composición encontrada fue de 56 esguines (48%), 47 juveniles (40%) y 14 machos maduros precoces (12%).

Los individuos se agruparon como machos (136) y hembras (112). En la hembras se detectaron 10 alelos exclusivos (*IDDH-2-28*, *SsaF43-109*, *Ssa2019-84*, *SSOSL417-177*, *SSOSL417-199*, *SSOSL417-209*, *SSOS311-136*, *SSOS311-158*, *SSOS311-170*, *SSOS311-174*) y 1 alelo exclusivo para los machos (*SSOS311-160*) (Tabla 1). Sin embargo las frecuencias de estos alelos fueron extremadamente bajas (la suma de sus frecuencias sólo alcanza 0,098 en las hembras y 0,009 en los machos), lo que indica que no son relevantes en las diferencias entre sexos.

Utilizando el conjunto de loci enzimáticos no se encontraron diferencias genéticas significativas entre sexos, salvo para el locus *IDDH-2\**, debido a la ausencia del alelo *IDDH-2\*-28* en los machos (Tabla1). Los loci microsatélites tampoco reflejaron, en conjunto, diferencias genéticas entre hembras y machos, aunque el locus *SSOSL311* en particular, exhibe diferencias significativas entre sexos en cuanto a distribución alélica ( $p=0,048$ ), pero no en cuanto a distribuciones genotípicas ( $p=0,267$ ) (Tabla 1). En base a estos resultados hembras y machos se reunieron para los análisis posteriores.

Las frecuencias alélicas y niveles de heterocigosidad para los 6 loci enzimáticos y los 8 loci microsatélites ensayados en los grupos PTE y PTA se muestran en las Tablas 2 y 3. Entre ambos grupos se encontraron diferencias significativas tanto a nivel de frecuencias génicas ( $p=0,015$ ), como genotípicas ( $p=0,0295$ ) en el análisis de la variabilidad enzimática, debidas fundamentalmente al locus *MEP-2\** (Tabla 2). También se encontraron diferencias en cuanto a niveles medios de heterocigosidad enzimática; los PTE exhiben una media de heterocigosidad observada ( $H_o=0,189$ ) significativamente mayor que la encontrada en los PTA ( $H_o=0,145$ ) ( $F=6,107$   $p=0,018$ ) (Tabla 2).

Los loci microsatélites también revelaron diferencias significativas en cuanto a distribuciones génicas y genotípicas entre los grupos PTE y PTA ( $p < 0,001$ ) (Tabla 3). Estas diferencias se deben a los loci SsaF43, Ssa2019, SOSS311 y SSOS417 ( $p < 0,05$  en todos los casos). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a las medias de heterocigosidad microsatélite ( $F = 0,142$   $p = 0,706$ ) (Tabla 3). En el grupo PTE, se encontraron nueve alelos exclusivos pero en tan baja frecuencia que no pueden ser utilizados como marcadores de grupo (Tabla 3).

No se encontraron diferencias significativas, en cuanto a distribuciones alélicas ó genotípicas, en los dos tipos de marcadores utilizados entre clases fisiológicas dentro de ninguno de los dos grupos de peces utilizados (PTE y PTA) (Tablas 4 y 5). Dentro de los dos grupos, los juveniles (S2), mostraron las menores medias de heterocigosidad enzimática de las tres clases en estudio, mientras que no aparecen diferencias entre los S1 y MP en cuanto a heterocigosidad enzimática, no obstante no se encontraron valores significativos en estas comparaciones ( $p > 0,05$  en todos los casos) (Tablas 4 y 5). En los PTE y PTA, los individuos S1 presentan los menores valores de heterocigosidad microsatélite observada de las tres clases analizadas (Tablas 4 y 5), siendo las diferencias de heterocigosidad microsatélite entre S1 y S2 significativas dentro de los PTA ( $F = 2,301$   $p = 0,024$ ) (Tablas 4 y 5). Se identificaron seis alelos específicos para los individuos S1 en este estudio, pero nuevamente, por sus bajas frecuencias, parecen no ser útiles como marcadores fisiológicos (Tabla 6).

#### ***IV.1.4. Discusión.***

En este estudio se han utilizado loci enzimáticos y microsatélites para estudiar la composición genética diferencial entre grupos de individuos que asumen diferentes estrategias de desarrollo durante su vida. A pesar de los altos niveles de variabilidad encontrados al utilizar los loci microsatélites, no se encontraron marcadores ni enzimáticos, ni microsatélites (alelos ó combinaciones genotípicas) de clase fisiológica, ó de grupos para la primera alimentación activa (PTE y PTA). Todos los alelos específicos de grupo (en PTE 9 alelos) ó de clases fisiológicas (6 alelos en los S1) están presentes en muy bajas frecuencias y no son por lo tanto útiles para el objetivo de utilizarlos en una selección asistida por marcadores moleculares (MAS). En la literatura sobre el uso de loci microsatélites en peces para el objetivo de

encontrar QTLs relacionados con caracteres favorables, Danzmann y col. (1997) y Jackson y col. (1998) y además Streelman y Kocher (2002) han encontrado marcadores relacionados con la tolerancia a la temperatura en familias de trucha común y con la expresión de prolactina en tilapia, respectivamente. No obstante se necesitan probar muchos marcadores moleculares y un esfuerzo común de varios equipos de investigación (tal y como ocurre en los proyectos sobre mapas genéticos de algunas especies (Lie y col., 1997)) para obtener resultados satisfactorios en este objetivo.

A pesar de ello entre los grupos PTE y PTA, con diferencias significativas en cuanto a la talla de los individuos que los componen, si se observan diferencias significativas en cuanto a los patrones de heterocigosidad enzimática que exhiben. Los PTA, con menor longitud, muestran menor heterocigosidad enzimática que los PTE. Por otro lado, y a pesar de que cuando se comparan los niveles de heterocigosidad y tallas entre individuos de la misma clase fisiológica entre los grupos PTE y PTA (S1, S2, PM) no se observan diferencias significativas entre individuos, si se observan diferencias en cuanto a la proporción que representan cada una de estas clases fisiológicas dentro de cada grupo. Mientras los S1 representan un 74% del total de individuos dentro del grupo PTE, en los PTA esta clase representa solamente un 48%. Los S2 por su parte, representan sólo un 8% en los PTE, pero un 40% dentro de los PTA

Las diferencias encontradas entre los grupos PTE y PTA en cuanto a heterocigosidad enzimática pueden explicar porque los peces tempranos exhiben mayor longitud y mayor proporción de individuos S1 que sus congéneres tardíos. Blanco y col. (1998), en un experimento con peces marcados, han encontrado que los individuos más heterocigotos son más grandes, tienen mayor peso y exhiben mayores tasas de crecimiento. De esta forma los individuos más heterocigotos comenzarían primero su alimentación activa y crecerían más rápido, completando primero su fase de alevines y alcanzando antes la talla mínima para esguinar luego de su primer año de vida en agua dulce. Así en los PTE, con mayor heterocigosidad enzimática que los tardíos, un mayor número de peces alcanza la talla “mínima” necesaria para esguinar en su primer año en agua dulce.

Al comparar la variabilidad genética de los MP con los S1 dentro de cada grupo (PTE y PTA) no se observaron diferencias entre ellos. No obstante, los MP son intermedios en cuanto a tallas. Estas diferencias entre individuos con heterocigosidades enzimáticas similares (MP y S1), se deben a las diferentes estrategias de desarrollo propias de cada clase fisiológica. Los machos maduros precoces comienzan a madurar a finales del verano y emplean gran parte de su energía en el desarrollo de gónadas y en la producción de gametos, y no en el desarrollo y

crecimiento de tejidos somáticos, por lo tanto crecen menos que los esguines (Mc Carthy y col., 1996; Blanco y col., 1998).

Estos resultados sugieren una relación significativa entre los niveles de heterocigosidad enzimática y ambos caracteres: el momento de primera alimentación activa y el estadio fisiológico, en el salmón atlántico. Un gran número de estudios han encontrado correlaciones positivas entre la heterocigosidad enzimática y elementos ó caracteres, que indican mayor eficacia biológica en varias especies de animales y plantas (Mitton y Grant, 1984, Zouros y Folts, 1987; Liskauskas y Ferguson, 1990; 1991; Zouros y Pogson, 1994; Mitton, 1997; 1998; Thelen y Allendorf, 2001). En salmón atlántico estas correlaciones se han encontrado con caracteres como la talla, peso, crecimiento y tasas de desarrollo (Jordan y col., 1990; Jordan y Yougson, 1991; Torrinsen, 1991; Pollard y col., 1994, Sánchez y col., 1994; Blanco y col., 1998). Esta asociación puede deberse a que la heterocigosidad enzimática favorece, a través del control de las reacciones metabólicas, la eficacia fisiológica de los individuos disminuyendo el costo energético de su metabolismo (Mitton y Koehn, 1985; Koehn y col., 1988).

En este estudio el nivel de heterocigosidad microsatélite observado en los PTE y PTA es similar, no obstante dentro de los grupos, los peces S1 muestran los menores valores de heterocigosidad microsatélite. Estos resultados podrían interpretarse como una correlación negativa entre la talla y el nivel de heterocigosidad microsatélite, es decir que aquellos individuos con mayor heterocigosidad microsatélite crezcan menos que sus congéneres menos heterocigotos.

Hasta el momento se han publicado muy pocos trabajos en los que se haya estudiado la relación entre la heterocigosidad microsatélite y caracteres implicados en la eficacia biológica, y sus resultados parecen ser contradictorios. De esta forma Zouros y Pogson (1994) trabajando con juveniles de *Placopecten magellanicus* que exhiben correlaciones positivas y significativas entre la heterocigosidad enzimática (7 loci) y la tasa de crecimiento, no encuentran correlación alguna con la heterocigosidad de marcadores de ADN (RFLPs (2 loci) ó microsatélites (5 loci)). Sin embargo en ese estudio los loci microsatélites exhiben una correlación negativa aunque no significativa, entre heterocigosidad y las tasas de crecimiento. Coltman y col. (1998) trabajando con focas canadienses (*Phoca vitulina*), Coulson y col. (1998; 1999) en el ciervo rojo escocés (*Cervus elaphus*), ó Coltman y col. (1999) y Pemberton y col. (1999) trabajando con ovejas (*Ovis aries*), no encuentran correlación entre la heterocigosidad microsatélite y el peso al nacer, la supervivencia neonatal, ó la susceptibilidad

a parásitos gastrointestinales. Tampoco Thelen y Allendorf (2001) encuentran correlación entre la heterocigosidad microsatélite (10 loci) y la eficacia biológica en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), aunque esta sí aparece con la heterocigosidad enzimática (10 loci).

En nuestro trabajo la correlación negativa entre heterocigosidad microsatélite y eficacia biológica no es concluyente, al final del invierno lo MP alcanzan las mismas tasas de crecimiento que los S1 (con menor heterocigosidad microsatélite) y alrededor de un 80% de ellos llega a la talla mínima para esguinar en la próxima primavera (Blanco y col., 1998). Por otra parte, los PTE y PTA claramente adoptan estrategias de desarrollo diferentes (demostrado en las proporciones en cuanto a clases fisiológicas que se encuentran en ambos grupos), pero ambos grupos muestran niveles similares de heterocigosidad microsatélite. Finalmente, tampoco existe correlación entre el número de loci heterocigotos de cada individuo para enzimas y microsatélites, dentro de los dos grupos formados, en cuanto a momento de primera alimentación activa (PTE-Coeficiente de Spearman=0,24 p=0,786; PTA-Coeficiente de Spearman=-0,085 p=0,376).

En resumen, estos resultados confirman los estudios previos en los que se ha encontrado asociación entre la heterocigosidad enzimática y caracteres asociados a la eficacia biológica, y parecen indicar que no existe relación entre esta última y la heterocigosidad microsatélite. No obstante, será necesario abordar en otros estudios esta cuestión para clarificar si existen y como, asociaciones entre la heterocigosidad microsatélite y la eficacia biológica.

#### IV.1.5. Tablas.

Tabla 1. Frecuencias de los alelos específicos para sexo en un locus enzimático y 4 loci microsatélites en familias provenientes de un cruce 20x20 de salmón atlántico del río Shin (Escocia).

	Hembras (n=136)	Machos (n=112)
<i>IDDH-2-28</i>	0,023	0,000
SsaF43-109	0,007	0,000
Ssa2019-84	0,004	0,000
SSOSL417-177	0,004	0,000
SSOSL417-199	0,012	0,000
SSOSL417-209	0,004	0,000
SSOS311-136	0,004	0,000
SSOS311-158	0,012	0,000
SSOS311-170	0,012	0,000
SSOS311-174	0,016	0,000
SSOS311-160	0,000	0,009

Tabla 2. Frecuencias alélicas en los 6 loci enzimáticos examinados en peces tempranos (PTE, n=141) y tardíos (PTA, n=116) provenientes de un cruce 20x20 de salmón atlántico del río Shin (Escocia).

<i>Locus/alelos</i>	PTE	PTA
<i>MDH-3,4</i>		
87	0,029	0,004
100	0,964	0,982
104	0,007	0,013
<i>mMEP-2</i>		
100	0,296	0,190
125	0,704	0,810
<i>p (G alelos)</i>		<b>0,0055**</b>
<i>p (G genotipos)</i>		<b>0,0050**</b>
<i>IDHP-3</i>		
100	0,982	0,996
115	0,018	0,004
<i>sAAT-4</i>		
50	0,182	0,208
100	0,818	0,792
<i>IDDH-1</i>		
72	0,289	0,226
100	0,711	0,774
<i>IDDH-2</i>		
28	0,018	0,009
100	0,982	0,991
<b>Total p (G alelos)</b>		<b>0,0150*</b>
<b>Total p (G genotipos)</b>		<b>0,0295*</b>
<b>H<sub>o</sub>/H<sub>e</sub></b>	<b>0,189/0,212</b>	<b>0,145/0,175</b>
<b>P<sub>0,95</sub></b>	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>Na</b>	<b>2,17</b>	<b>2,17</b>

Notas: *p (G alelos)* y *p (G genotipos)* representan los valores de probabilidad en aquellos loci donde las frecuencias alélicas ó genotípicas son significativamente diferentes entre grupos.

**H<sub>o</sub>/H<sub>e</sub>** : Heterocigosidad media observada/esperada por locus.

**P<sub>0,95</sub>** : Porcentaje de loci polimórficos (0,95)

**Na** : número medio de alelos por locus.

\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Tabla 3. Frecuencias alélicas en los 8 loci microsatélites examinados en PTE ( n=141) y PTA (n=116) provenientes de un cruce 20x20 de salmón atlántico del río Shin (Escocia). Los alelos específicos para cualquiera de los dos grupos aparecen en negritas.

<i>Locus/alelos</i>	PTE	PTA	<i>Locus/alelos</i>	PTE	PTA	<i>Locus/alelos</i>	PTE	PTA	<i>Locus/alelos</i>	PTE	PTA
<u>SsaD30</u>			<u>SSOSL417</u>			<u>SSOS311</u>			<b>H<sub>o</sub></b>	<b>0,488</b>	<b>0,497</b>
234	0,833	0,759	161	0,076	0,056	130	0,023	0,074	<b>H<sub>e</sub></b>	<b>0,569</b>	<b>0,575</b>
236	0,018	0,026	173	0,019	0,009	132	0,094	0,125	<b>P<sub>0,95</sub></b>	<b>100</b>	<b>100</b>
240	0,149	0,216	177	<b>0,004</b>	0,000	134	0,068	0,097	<b>Na</b>	<b>7,75</b>	<b>7,63</b>
<u>SsaF43</u>			179	0,008	0,019	136	0,000	<b>0,005</b>			
103	0,216	0,332	181	0,072	0,065	138	0,019	0,014			
109	0,004	0,004	183	0,189	0,148	140	0,011	0,014			
115	0,319	0,237	185	0,019	0,134	142	0,026	0,014			
119	0,007	0,004	187	0,045	0,009	144	<b>0,026</b>	0,000			
121	0,344	0,362	189	<b>0,011</b>	0,000	146	0,004	0,014			
123	0,110	0,060	191	0,015	0,023	148	0,023	0,023			
<b>p (G<sub>alelos</sub>)</b>	<b>0,0133*</b>		193	0,155	0,130	150	0,038	0,005			
<b>p (G<sub>genotipos</sub>)</b>	<b>0,0219*</b>		195	0,246	0,273	152	0,026	0,032			
<u>Str15</u>			197	0,030	0,037	154	0,004	0,005			
212	0,025	0,030	199	0,008	0,005	156	0,113	0,060			
216	0,794	0,841	201	0,027	0,019	158	0,008	0,005			
218	0,181	0,129	203	0,038	0,051	160	<b>0,008</b>	0,000			
<u>Ssa1337</u>			205	0,034	0,014	162	0,023	0,014			
112	0,780	0,767	209	<b>0,004</b>	0,000	164	0,086	0,056			
116	0,220	0,233	213	0,000	<b>0,009</b>	166	0,244	0,227			
<u>Ssa2019</u>			<b>p (G<sub>alelos</sub>)</b>	<b>0,0001***</b>		168	0,068	0,079			
84	0,000	<b>0,004</b>	<b>p (G<sub>genotipos</sub>)</b>	<b>0,0054**</b>		170	0,000	<b>0,019</b>			
96	0,539	0,478				172	0,034	0,046			
98	0,106	0,233				174	0,008	0,019			
100	0,053	0,017				176	0,008	0,005			
102	0,301	0,267				178	0,034	0,046			
<b>p (G<sub>alelos</sub>)</b>	<b>0,0000***</b>					182	0,008	0,005			
<b>p (G<sub>genotipos</sub>)</b>	<b>0,0022**</b>					<b>p (G<sub>alelos</sub>)</b>	<b>0,0115*</b>				
<u>Str543</u>						<b>p (G<sub>genotipos</sub>)</b>	<b>0,1355</b>				
118	0,565	0,621				<b>Total p (G<sub>alelos</sub>)</b>	<b>0,0000***</b>				
120	0,435	0,379				<b>Total p (G<sub>genotipos</sub>)</b>	<b>0,0000***</b>				

Notas: **p (G<sub>alelos</sub>)** y **p (G<sub>genotipos</sub>)** representan los valores de probabilidad en aquellos loci donde las frecuencias alélicas ó genotípicas son significativamente diferentes entre grupos.

**H<sub>o</sub>/H<sub>e</sub>** : Heterocigosidad media observada/esperada por locus.

**P<sub>0,95</sub>** : Porcentaje de loci polimórficos (0,95)

**Na** : número medio de alelos por locus.

\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Tabla 4. Variabilidad genética en las clases fisiológicas dentro de los individuos PTE provenientes de un cruce 20x20 de salmón atlántico del río Shin (Escocia) : Esguines (S1, n=105), juveniles (S2, n=12) y machos maduros precoces (MP, n=24).

	Enzimas			Microsatélites		
	S1	S2	MP	S1	S2	MP
<b>H<sub>o</sub>/H<sub>e</sub></b>	0,194/0,212	0,136/0,223	0,194/0,210	0,495/0,567	0,528/0,561	0,532/0,572
<b>P<sub>0,95</sub></b>	50	66,67	50	100	100	100
<b>Na</b>	2,17	1,67	2,00	7,75	4,50	5,25

**H<sub>o</sub>/H<sub>e</sub>**: Heterocigosidad media observada/esperada por locus.

**P<sub>0,95</sub>** : Porcentaje de loci polimórficos (0,95)

**Na** : Media de número de alelos por locus.

Tabla 5. Variabilidad genética en las clases fisiológicas dentro de individuos PTA provenientes de un cruce 20x20 de salmón atlántico del río Shin (Escocia): Esguines (S1, n=56), juveniles (S2, n=46) y machos maduros precoces (MP, n=14).

	Enzimas			Microsatélites		
	S1	S2	MP	S1	S2	MP
<b>H<sub>o</sub>/H<sub>e</sub></b>	0,155/0,174	0,117/0,166	0,190/0,211	0,464/0,563	0,546/0,585	0,549/0,594
<b>P<sub>0,95</sub></b>	50	50	50	100	100	100
<b>Na</b>	2,00	2,00	2,00	6,75	6,38	4,50

**H<sub>o</sub>/H<sub>e</sub>**: Heterocigosidad media observada/esperada por locus.

**P<sub>0,95</sub>** : Porcentaje de loci polimórficos (0,95)

**Na** : Media de número de alelos por locus.

Tabla 6. Frecuencias de alelos exclusivos para clases fisiológicas dentro de los grupos de individuos PTE y PTA provenientes de un cruce 20x20 de salmón atlántico del río Shin (Escocia) : Esguines (S1), juveniles (S2) y machos maduros precoces (PM).

	PTE			PTA		
	S1	S2	MP	S1	S2	MP
SSOSL417-191	0,020	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000
SSOSL417-199	0,010	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000
SSOS311-140	0,015	0,000	0,000	0,029	0,000	0,000
SSOS311-154	0,005	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000
SSOS311-158	0,010	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000
SSOS311-176	0,010	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000

## ***IV.2. - Heterocigosidad y caracteres asociados a la eficacia biológica (el caso del salmón atlántico).***

### ***IV.2.1. Antecedentes.***

El que la variabilidad morfológica y la asimetría disminuyen cuando la heterocigosidad enzimática aumenta, es un hecho comprobado en un gran número de estudios en animales y plantas (Mitton, 1978; Eanes, 1978; Knowles y Mitton, 1980; Leary y col., 1984; Mitton y Grant, 1984; Blanco y Sánchez, 1986; Zouros y Foltz, 1987; Blanco y col., 1988; 1990; Vázquez y col., 1988). A pesar de que en algunos estudios esta correlación no aparece (Handford, 1980; McAndrew y col., 1982; Houle, 1989; Clarke, 1998), la mayoría de ellos han confirmado la hipótesis de Lerner (1954), según la cual, individuos ó poblaciones con mayor heterocigosidad enzimática exhiben una mayor homeostásis ó estabilidad del desarrollo, reflejada en un menor grado de asimetría bilateral y menores varianzas fenotípicas en caracteres biométricos. Según Clarke (1995) y Moller (1997, 1999) la estabilidad del desarrollo, también está relacionada positivamente con la eficacia biológica estimada a través de multitud de caracteres asociados con ella. Por otro lado, en muchas especies también han sido encontradas correlaciones significativas y positivas, entre heterocigosidad enzimática y eficacia biológica (tasas de crecimiento, viabilidad, fecundidad) (revisado por Mitton, 1998).

El origen de las correlaciones heterocigosidad-eficacia biológica está profundamente relacionado con la disputa neutralismo/seleccionismo, y diferentes hipótesis se han elaborado para explicarlas (Zouros, 1993; Savolainen y Hedrick, 1995; David, 1997; Zouros y Pogson, 1994; Mitton, 1998). Una de ellas es la hipótesis de la sobredominancia asociativa, la que asume que las enzimas son marcadores neutrales y que las asociaciones son una consecuencia de desequilibrios de ligamiento entre los loci enzimáticos y otros loci deletéreos recesivos, mientras que la hipótesis denominada “sobredominancia directa”, implica a las alozimas con un papel “per se” fundamental en las correlaciones, detectándose ventajas selectivas de los individuos heterocigotos frente a los homocigotos.

Se ha sugerido que los loci enzimáticos, a través del control de las reacciones metabólicas, tienen una influencia directa sobre la eficacia biológica y que estas asociaciones existen debido a que la heterocigosidad enzimática disminuye el gasto energético del metabolismo, a

través de la potenciación de la eficacia fisiológica de los animales. Estos individuos, heterocigotos para múltiples loci enzimáticos, poseen una mayor proporción de energía disponible que les permite afectarse menos en su desarrollo en condiciones ambientales adversas ó en condiciones de stress, exhibiendo de este modo mayor estabilidad del desarrollo y utilizando esta energía en el crecimiento, reproducción u otras actividades (Mitton y Koehn, 1985; Koehn y col., 1988).

La asociación entre heterocigosidad y eficacia biológica puede estar causada también por endogamia, y aunque se espera que algunos de estos desequilibrios se mantengan por un número limitado de generaciones en una población, estos se estarían constantemente generando con otros alelos ó loci a lo largo del tiempo (Mitton, 1998). De esta forma y agrupando a los individuos en clases de heterocigotos, independientemente de los loci ó alelos, se encontrarían asociaciones positivas entre heterocigosidad y eficacia biológica (David, y col., 1997).

Se han diseñado diferentes estudios para comprobar la hipótesis de la sobredominancia asociativa (Zouros y Pogson, 1994; David y col., 1997; Pogson y Fevolden, 1998; Thelen y Allendorf, 2001). Una de las estrategias se relaciona con el hecho de que bajo los preceptos de esta hipótesis, las correlaciones entre heterocigosidad y eficacia biológica no se limitarían a un tipo de marcador genético en particular (enzimas ó marcadores de ADN); en principio, todos tendrían la misma posibilidad de reflejar endogamia y estar en desequilibrio con genes deletéreos recesivos.

Zouros y Pogson (1994) han encontrado correlaciones positivas y significativas entre la heterocigosidad enzimática (7 loci) y la tasa de crecimiento en *Placopecten magellanicus*, pero no encuentran correlación alguna con la heterocigosidad de marcadores de ADN (RFLPs (2 loci) ó microsatélites (5 loci)). Por su parte Pogson y Fevolden (1998), encontraron correlaciones positivas entre el grado de heterocigosidad individual de marcadores RFLPs, la tasa de crecimiento y la longitud de los individuos en una población natural de bacalao atlántico (Bolsjord), pero no en otra población natural en estudio (mar de Barents). Thelen y Allendorf (2001) no encuentran correlación entre la heterocigosidad microsatélite (10 loci) y la eficacia biológica en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), aunque esta si aparece con la heterocigosidad enzimática (10 loci).

En un conjunto interesante de estudios genéticos con *Phoca vitulina*, *Cervus elaphus*, y *Ovis aries*; Coltman y col. (1998; 1999), Coulson y col. (1998; 1999), y Pemberton y col. (1999) han argumentado que, a pesar de que no exista correlación entre la heterocigosidad

microsatélite individual y caracteres de eficacia biológica como el peso al nacer, la supervivencia neonatal ó la susceptibilidad a parásitos gastrointestinales, si se encuentran correlaciones entre estos parámetros y  $d^2$  (una medida de la diferencia en número de repeticiones entre dos alelos en un locus microsatélite). Estos autores comentan que  $d^2$  es una medida más sensible al grado de endogamia que la heterocigosidad microsatélite individual. Debido a la actualidad del debate sobre las bases genéticas que determinan las correlaciones entre heterocigosidad y eficacia biológica, se necesitan nuevos trabajos en multitud de especies que aclaren un fenómeno tan importante. En salmón atlántico (*Salmo salar L*) se han demostrado correlaciones significativas entre la heterocigosidad enzimática y caracteres relacionados con la eficacia biológica como son estabilidad del desarrollo, longitud, peso ó tasas de crecimiento (Jordan y col., 1990; Blanco y col. 1990; Jordan y Yougson, 1991; Torrinsen, 1991; Pollard y col., 1994; Sánchez y col., 1994; Blanco y col., 1998), no obstante, no existen datos sobre como se relacionan estos caracteres y la heterocigosidad de marcadores de ADN. En este estudio se establece como hipótesis nula el que la heterocigosidad enzimática, y microsatélite, se relacionan de la misma forma con caracteres asociados a la eficacia biológica (asimetría, longitud y peso), en dos muestras de salmón atlántico cultivadas en un ambiente común. Se persigue de esta forma comprobar como válida la hipótesis de la sobredominancia asociativa.

#### ***IV.2.2. Materiales y Métodos.***

##### Muestras.

A partir de las muestras del experimento anterior (Apartado IV.1.2), se consideraron como dos conjuntos diferentes a los individuos tempranos en cuanto al momento de primera alimentación activa (PTE n=141) y sus congéneres tardíos (PTA n=116).

##### Caracteres asociados a la eficacia biológica.

Se utilizaron los datos de longitud (cm), y peso (g) medidos en cada individuo, así como datos sobre tres caracteres merísticos bilaterales también analizados individualmente (número de radios en las aletas pectorales, número de radios en las aletas pélvicas, y número de branquiespinas en el primer arco branquial) en los lados derecho e izquierdo de los peces.

Estos caracteres presentan simetría fluctuante no direccional (Blanco y col. 1990 y citas incluidas), están muy canalizados y se determinan tempranamente en el desarrollo, lo que facilita la comparación entre individuos de distintas edades y/o tamaños. Las medidas fueron realizadas por el mismo observador en tres días diferentes. Los datos que no concordaban fueron eliminados (11 casos).

Para cada carácter se calculó:

- a) Promedio de asimetría (A): Estimada como la media, en el conjunto de peces, del valor absoluto para cada individuo de  $|\text{Número de radios en el lado derecho} - \text{Número de radios en el lado izquierdo}|$ .
- b) Magnitud de asimetría (D): reflejando valores mínimos y máximos de desviación bilateral encontradas en el conjunto de peces.
- c) Magnitud global de asimetría (MGA): Calculada como la suma de los valores de asimetría (A) de cada carácter en cada individuo corregida mediante normalización, al dividir por la media de cada carácter en cada población.  $MGA = (A_1/\text{media población} + A_2/\text{media población} + A_3/\text{media población})/3$  (Blanco y col. 1990 y citas incluidas).

#### Variabilidad genética.

Se analizaron para cada individuo 6 sistemas enzimáticos (*MDH-3,4\**, *mMEP-2\**, *IDHP-3\**, *sAAT-4\**, *IDDH-1\** y *IDDH-2\**) y 8 loci microsatélites (SsaF43, Ssa20-19, Ssa13-37, SsaD30, SSOSL311, SSOSL417, Str543 y Str15). Se estimaron: (1) La heterocigosidad enzimática y microsatélite individual, como el número de loci heterocigotos del total de loci analizados en cada individuo; (2)  $d^2$  media, de acuerdo a Coulson y col. (1999), como el promedio del cuadrado de las diferencias, en número de repeticiones, entre los alelos de los loci microsatélites analizados para cada individuo; y  $d^2$  exogámico (Coulson y col., 1999), como  $d^2$  media pero teniendo en cuenta sólo los loci heterocigotos para calcular el promedio por individuo (esta medida debe estar correlacionada con el grado de exogamia de cada individuo según Coulson y col. (1999)).

#### Procesamiento estadístico

Se utilizaron los análisis de comparación de medias (ANOVA simple) incluidos en el paquete estadístico SPSS (versión 10) para comparar la asimetría, heterocigosidad enzimática y microsatélite, y los  $d^2$  calculados, entre los grupos de individuos analizados. Los análisis de

regresión y estimación de curvas de regresión incluidos en el mismo paquete estadístico se utilizaron para corroborar si existían correlaciones entre heterocigosidad (enzimas, microsatélites),  $d^2$  y asimetría. Para el caso de los análisis entre número de caracteres asimétricos y proporción de loci heterocigotos por individuo se utilizó una transformación arcoseno antes de llevar a cabo los análisis de regresión. Se utilizó además la prueba de correlación por rangos de Kendall (SPSS, versión 10) para investigar las relaciones entre longitud y peso de los individuos con la heterocigosidad y  $d^2$ . En este último caso se agruparon a los individuos en las distintas clases de heterocigotos encontrados y se calculó una media de longitud y de peso para cada una de ellas para llevar a cabo las correlaciones. En todos los casos en los que se se formaron grupos de individuos de acuerdo al número de loci heterocigotos que exhibían se siguió el criterio de un mínimo de 5 individuos por grupos.

#### ***IV.2.3. Resultados.***

En la Tabla 1 se presentan los valores medios en cuanto a caracteres asociados con la eficacia biológica en los individuos (asimetría, longitud y peso), de cada uno de los grupos en estudio en este trabajo (PTE y PTA). Al comparar ambos grupos se observa que los PTA muestran mayores valores de asimetría que los PTE en todos los caracteres, así como una mayor magnitud global de asimetría, aunque estas diferencias solamente son significativas en el caso del número medio de caracteres por individuo ( $F=3,971$   $p=0,047$ ). También se observan diferencias significativas para el peso y la longitud entre los dos grupos, siendo los PTE significativamente más grandes y con mayor peso que los PTA (Tabla 1).

Los PTE muestran una mayor heterocigosidad enzimática que los PTA ( $F=6,107$   $p=0,018$ ) (Tabla 2), mientras que en cuanto a heterocigosidad microsatélite ambos grupos no se diferencian significativamente ( $F=0,142$   $p=0,706$ ) (Tabla 2). El parámetro  $d^2$  media, que está relacionado de forma positiva y significativa con la heterocigosidad microsatélite en los dos grupos de peces ( $p<0,001$ ) (Figura 1), tampoco exhibe diferencias significativas entre grupos ( $F=0,570$   $p=0,451$ ) (Tabla 2), y lo mismo ocurre con  $d^2$  exogámico ( $F=2,049$   $p=0,154$ ) (Tabla 2). En este caso,  $d^2$  exogámico no mostró ningún tipo de relación con la heterocigosidad microsatélite en ninguno de los grupos de peces estudiados ( $p>0,05$ ) (Figura 1).

Dentro de cada grupo (PTE, PTA) se reunieron los individuos en función del número de loci enzimáticos para los que son heterocigotos y en cada uno de ellos se calcularon las distintas estimas de asimetría (D, A, magnitud global de asimetría (MGA) y media del número total de caracteres asimétricos (NC)) (Tabla 3). El análisis de estos datos muestra diferencias significativas entre los distintos grupos establecidos. Los individuos homocigotos muestran los mayores valores de asimetría dentro de los dos grupos de peces (14 de 20 comparaciones con significación estadística). Los niveles de asimetría disminuyen al aumentar el número de loci heterocigotos por individuo en ambas muestras, observándose una correlación negativa y significativa en todos los casos analizados en los PTA, y para la asimetría en el número de branquiespinas y la magnitud global de asimetría en los PTE (Tabla 3).

Para conocer si algún locus enzimático particular tenía un efecto significativo en las correlaciones encontradas, los individuos se agruparon en dos clases: homocigotos y heterocigotos, considerando cada locus de forma independiente y calculándose en esos grupos la magnitud global de asimetría (MGA) cuando en ellos había al menos 5 individuos por grupo. En los casos en que se pudieron hacer estas comparaciones, los individuos heterocigotos tienen menores valores de asimetría que los individuos homocigotos, aunque estas diferencias sólo son significativas para los loci *mMEP-2\** (PTE  $F=2,765$   $p=0,006$ , PTA  $F=3,831$   $p=0,000$ ) y *sAAT-4\** (PTE  $F=2,610$   $p=0,011$ , PTA  $F=4,356$   $p=0,000$ ). Si estos dos loci son eliminados sigue observándose una correlación negativa entre heterocigosidad enzimática y magnitud global de asimetría aunque los niveles de significación disminuyen siendo significativos sólo en los PTA ( $b=-0,3535$   $p=0,010$ ). En las dos muestras utilizadas existe también una correlación negativa y significativa entre el número de caracteres asimétricos y la proporción de loci enzimáticos heterocigotos por individuo (Tabla 3).

Cuando dentro de cada una de las clases de heterocigotos establecidas se estiman los valores medios de talla y peso, se observa una correlación positiva entre heterocigosidad enzimática y talla ó peso en las dos muestras analizadas, siendo significativamente diferente de cero 3 de los 4 coeficientes de Kendall calculados (Tabla 4).

En la Tabla 5 se muestran los niveles de asimetría (A), magnitud de asimetría (D), magnitud global de asimetría (MGA) y número de caracteres asimétricos (NC), en relación con la heterocigosidad microsatélite en las dos muestras analizadas (PTE y PTA). Al agrupar nuevamente a los individuos en función del número de loci microsatélites heterocigotos no se encontraron diferencias, en cuanto a asimetría, entre ellos en ninguno de los grupos analizados (36 comparaciones,  $p>0,05$ ). Siete de las ocho correlaciones estimadas entre heterocigosidad

microsatélite y asimetría fueron positivas, no obstante, los coeficientes de correlación son bajos, y sólo la correlación entre heterocigosidad y asimetría en el número de radios en las aletas pectorales en los peces PTA es significativa ( $b=0,0713$   $p=0,044$ ) (Tabla 5). Tampoco se encontraron correlaciones significativas entre la proporción de loci microsatélites heterocigotos y el número de caracteres asimétricos por individuo (Tabla 5).

Cuando se correlacionan la longitud y peso de los peces con el número de loci microsatélites heterocigotos que exhiben los individuos se obtienen resultados diferentes en los dos grupos analizados. (Tabla 6). Mientras en los PTE se observa una correlación positiva aunque no significativa, tanto con la longitud ( $\tau = 0,200$ ), como con el peso ( $\tau = 0,467$ ); en los PTA aparecen correlaciones negativas y significativas (longitud,  $\tau = -0,810$   $p<0,05$ ; peso,  $\tau = -0,905$   $p<0,01$ ) (Tabla 6).

Cuando los valores de asimetría de cada carácter, la magnitud global de asimetría y el número de caracteres asimétricos por individuo se comparan con los valores de  $d^2$  media y  $d^2$  exogámico no se observa ninguna asociación, la mayoría de los coeficientes de regresión obtenidos fueron valores cero ó muy próximos a cero (Tabla 7). Para comparar los parámetros de  $d^2$  media y  $d^2$  exogámico con los caracteres talla y peso, se agruparon los valores de  $d^2$  en distintas clases y se estimaron los valores medios de la talla y peso en cada una de ellas (Tabla 8). De nuevo se observan distintos tipos de asociación en los dos grupos de peces estudiados, así mientras que en el grupo PTE se observa una correlación negativa entre los valores de  $d^2$  media y ambos caracteres, en el grupo PTA la correlación es positiva (Tabla 8). Resultados similares se observan cuando se comparan los valores de  $d^2$  exogámico con el peso y la talla, observándose una correlación negativa en el grupo PTA y positiva en el grupo PTE (Tabla 8). No obstante, ninguna de estas correlaciones es significativa (Tabla 8).

#### **IV.2.4. Discusión.**

En este estudio, se ha analizado la relación existente entre la variabilidad de 2 tipos de marcadores genéticos (6 loci enzimáticos y 8 loci microsatélites) y caracteres asociados a la eficacia biológica en dos muestras (PTE y PTA), en salmón atlántico *Salmo salar* (L). Tal y como se ha descrito, los PTE comienzan a alimentarse al menos 10 días antes que sus congéneres PTA y se ha señalado que tienen ventajas significativas en parámetros como la

competencia por colonizar sitios con alimentos suficientes en el río (Metcalf y Thorpe, 1992, Brannas, 1995). Los PTE, adoptan además estrategias de desarrollo alternativas con respecto a los PTA, crecen más rápido, completan primero su fase de alevines y esguinan al final del primer año de vida en agua dulce (McCarthy, y col. 1996); exhibiendo también tasas metabólicas mayores que estos últimos (Metcalf y col., 1995, Cutts y col., 1999).

En concordancia con los resultados previos mencionados, en este trabajo se ha encontrado que los PTE son significativamente mayores en longitud y peso que los PTA, y además muestran menores valores de asimetría que estos últimos (otro elemento muy relacionado con la eficacia biológica, Clarke, 1995; Moller, 1997; 1999). De la misma forma se ha encontrado que los PTE exhiben mayor nivel de heterocigosidad media para los loci enzimáticos analizados que los PTA, lo que indica una relación positiva entre heterocigosidad enzimática y eficacia biológica.

Dentro de cada uno de los grupos de peces, la relación encontrada entre heterocigosidad enzimática y asimetría, longitud y peso, es la misma. Los individuos más heterocigotos son significativamente más grandes, tienen mayor peso, y además muestran menos asimetría en cuanto a caracteres morfológicos bilaterales. Estas correlaciones positivas entre heterocigosidad enzimática y eficacia biológica, concuerdan con numerosos trabajos en los cuales se han encontrado resultados semejantes (ver antecedentes).

Según la hipótesis de la sobredominancia asociativa, la heterocigosidad enzimática, y microsatélite, deberían tener una relación similar con la eficacia biológica, ya que ambos marcadores genéticos tendrían las mismas probabilidades de encontrarse en desequilibrios de ligamiento con genes deletéreos (Zouros y Pogson, 1994, Pogson y Fevolden, 1998, Thelen y Allendorf, 2001). En nuestro trabajo no encontramos diferencias para la heterocigosidad microsatélite, entre los grupos PTE y PTA. Tampoco relación entre los niveles de asimetría de caracteres morfológicos y la heterocigosidad microsatélite individual. Las relaciones encontradas entre longitud y peso, y la heterocigosidad microsatélite son sin embargo contradictorias pues en los PTE existen correlaciones positivas aunque no significativas, mientras que en los PTA las correlaciones observadas son negativas y significativas.

En principio, nuestros resultados no concuerdan con las predicciones de la hipótesis de sobredominancia asociativa, ya que ambas muestras proceden del mismo grupo de reproductores y fueron cultivadas en condiciones ambientales idénticas, es poco probable que exista en alguna de ellas desequilibrios de ligamiento entre loci enzimáticos y genes deletéreos, y no ocurra este mismo fenómeno con los loci microsatélites. Thelen y Allendorf

(2001) en un estudio de *Oncorhynchus mykiss* utilizando 10 loci enzimáticos y 10 loci microsatélites obtienen resultados similares y llegan a la misma conclusión.

Hedgecock (comunicación personal) indica que tal vez una de las suposiciones utilizadas para la comprobación de la sobredominancia asociativa: la ubicación en las mismas zonas de los marcadores genéticos enzimáticos y microsatélites, puede ser errónea, existiendo una mayor probabilidad de que los loci enzimáticos estén ligados a genes deletorios recesivos. Sugiere por lo tanto, como una necesidad, el escoger para este tipo de estudios, loci microsatélites con ubicación comprobada en zonas codificantes del genoma, tal y como están ubicadas las enzimas. Sin embargo, los loci microsatélites han sido descritos en el genoma humano y en el de ratón, con localizaciones ubicuas en los cromosomas (Dietrich y col., 1996; Dib y col., 1996). Estos aparecen incluso dentro de exones en el genoma de los ratones sin alterar los marcos de lectura de estos exones (Jurka y Pethiyagoda, 1995). En los mapas genéticos de salmónidos publicados hasta el momento, no existen tampoco evidencias de diferencias en cuanto a localización entre alozimas y microsatélites (Sakamoto y col., 2000; Lindner y col., 2000). Estos datos apuntan hacia la idea de que los genes deletéreos tendrían la misma posibilidad de encontrarse en desequilibrios de ligamiento con los loci enzimáticos y con los loci microsatélites.

David y col. (1997) y Mitton (1998) han comentado que los individuos más endogámicos serían aquellos con menores niveles de heterocigosidad y que la depresión endogámica podría provocar las asociaciones positivas entre heterocigosidad y eficacia biológica. Coltman y col. (1998; 1999), Coulson y col. (1998; 1999) y Pemberton y col. (1999) han propuesto que en el caso de los loci microsatélites, otras medidas tales como  $d^2$  reflejarían mejor la depresión endogámica en los individuos que la heterocigosidad microsatélite individual. Estos autores proponen que la diferencia en talla entre los alelos en los individuos, puede ser utilizada para estimar una distancia genética que representa el promedio en cuanto a tiempo de coalescencia entre los alelos. Esta medida ( $d^2$ ) está más relacionada con eventos distantes en el linaje de las poblaciones, mientras que la heterocigosidad microsatélite individual mide fundamentalmente las consecuencias de patrones más recientes en cuanto a endogamia. Coltman y col. (1998; 1999), Coulson y col. (1998; 1999) y Pemberton y col. (1999) han encontrado correlaciones entre  $d^2$  y algunos parámetros que reflejan eficacia biológica en *Phoca vitulina*, *Cervus elaphus* y *Ovis aries*; Sin embargo otros autores (Rowe y col., 1999; Rowe y Beebe, 2001), no han encontrado ningún tipo de asociación entre  $d^2$  y parámetros importantes (QTLs) en la eficacia biológica de *Bufo calamita* y *Rana temporaria*.

En este estudio los valores de  $d^2$  no son diferentes entre las muestras analizadas (PTE y PTA). Por otra parte no aparecen correlaciones entre  $d^2$  y los parámetros utilizados aquí como indicadores de eficacia biológica. Las correlaciones no son significativas y cambian de signo entre muestras.

En resumen, estos resultados (correlaciones positivas entre el grado de heterocigosidad enzimática y la eficacia biológica y la ausencia de ellas entre heterocigosidad microsatélite y eficacia biológica) contradicen las predicciones de la hipótesis de la sobredominancia asociativa; por el contrario, apoyan la idea de que las enzimas y los microsatélites son diferencialmente afectados por la selección natural y que posiblemente los loci enzimáticos, a través del control de las reacciones metabólicas, juegan un papel fundamental en el incremento de la eficacia biológica de un individuo.

#### IV.2.5. Tablas.

Tabla 1.- Valores medios de longitud (cm), peso (g) y asimetría ( $\pm$ DE) en dos muestras de salmón atlántico.

Cáncer	PTE	PTA	F	p
Radios aletas pectorales	0,2071 (0,49)	0,2724 (0,57)	0,863	0,354
Radios aletas pélvicas	0,0979 (0,35)	0,1683 (0,48)	1,600	0,207
Branquiespinas	0,5042 (0,79)	0,6405 (0,80)	1,791	0,182
MGA	0,8481 (1,38)	1,1849 (1,68)	3,011	0,084
NC	0,6424 (0,77)	0,8451 (0,82)	3,971	0,047*
Peso	41,5886 (18,0)	26,5234 (15,1)	39,949	0,001***
Longitud	15,2185 (2,3)	12,5072 (2,1)	34,185	0,001***

p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001

MGA= magnitud global de asimetría. NC= número medio de caracteres asimétricos.

Tabla 2.- Heterocigosidad observada en enzimas (Henz), loci microsatélites (H $\mu$ ) y valores de d<sup>2</sup> estimados para los loci microsatélites en dos muestras de salmón atlántico.

	PTE	PTA	F	p
Henz	0,189	0,145	6,107	0,018*
H $\mu$	0,488	0,497	0,142	0,706
d <sup>2</sup> <sub>media</sub>	0,979	1,033	0,570	0,451
d <sup>2</sup> <sub>exogámico</sub>	41,07	49,13	2,049	0,154

\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001

Tabla 3.- Relación entre asimetría y nivel de heterocigosidad enzimática en dos muestras en salmon atlántico.

a) PTE

Cáncer		Grupo de heterocigotos				Regresión		
		Hom(31)	Het-1(62)	Het-2(35)	Het-3(7)	b	F	P
Radios aletas pectorales.	D	0-1	0-2	0-3	0-0			
	A	0,35	0,18	0,17	0,00	-0,0953	3,531	0,062
Radios aletas pélvicas.	D	0-2	0-1	0-1	0-0			
	A	0,19	0,09	0,05	0,00	-0,640	3,090	0,081
Branquiespinas.	D	0-4	0-4	0-1	0-0			
	A	1,19	0,39	0,20	0,00	-0,4265	33,03	0,000***
MGA		1,68	0,72	0,50	0,00	-0,546	15,750	0,000***
NC		1,26	0,56	0,37	0,00	-0,4105	34,521	0,000***

b) PTA

Cáncer		Grupo de heterocigotos			Regresión		
		Hom(42)	Het-1(42)	Het-2+3(27)	b	F	p
Radios aletas pectorales.	D	0-3	0-1	0-0			
	A	0,60	0,12	0,00	-0,2924	23,130	0,000***
Radios aletas pélvicas.	D	0-3	0-1	0-1			
	A	0,38	0,02	0,07	-0,1603	8,620	0,004**
Branquiespinas.	D	0-4	0-2	0-1			
	A	1,02	0,48	0,30	-0,3496	16,150	0,000***
MGA		2,40	0,50	0,36	-1,0215	35,520	0,000***
NC		1,45	0,52	0,41	-0,0544	37,650	0,000***

\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001

Entre paréntesis número de muestras.

Hom= individuos homocigotos para todos los loci;

Het= individuos heterocigotos para 1, 2 ó 3 loci.

D= magnitud de asimetría; A= promedio de asimetría. MGA= magnitud global de asimetría. NC= número medio de caracteres asimétricos.

Tabla 4. –Relación entre el número de loci enzimáticos, longitud y peso en dos muestras de salmón atlántico.

Loci heterocigotos	PTE		PTA	
	Longitud (cm)	Peso (g)	Longitud (cm)	Peso (g)
0	15,0290	41,1226	11,8667	23,7524
1	15,1380	41,2585	12,8442	27,8372
2 (+ 3 en PTA)	15,3143	40,9486	12,9846	28,8269
3	16,2857	49,7757		
$\tau$	1,000***	0,333	1,000***	1,000***

$\tau$  (Tau): coeficiente de correlación por rangos de Kendall. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Tabla 5:- Relación entre la asimetría y el nivel de heterocigosidad microsatélite en dos muestras de salmón atlántico.

a) PTE.

Cáriter		Grupo de heterocigos						Regresión		
		Hom +Het1 (6)	Het-2 (12)	Het-3 (37)	Het-4 (36)	Het-5 (22)	Het-6+7+8 (22)	b	F	P
Radio	D	0-0	0-1	0-2	0-1	0-1	0-3			
aletas pectorales	A	0,00	0,08	0,19	0,25	0,14	0,36	0,471	2,48	0,118
Radio	D	0-0	0-0	0-2	0-1	0-0	0-2			
aletas pélvicas.	A	0,00	0,00	0,16	0,11	0,00	0,18	0,012	0,32	0,572
Branquiespinas.	D	0-1	0-1	0-2	0-3	0-4	0-4			
	A	0,33	0,17	0,49	0,58	0,55	0,59	0,060	1,56	0,214
MGA		0,19	0,21	0,96	0,97	0,50	1,31	0,323	2,43	0,121
NC		0,33	0,25	0,68	0,81	0,50	0,77	0,058	1,58	0,210

b) PTA.

Cáriter		Grupo de heterocigos							Regresión		
		Hom+ (7)	Het-1 (11)	Het-2 (24)	Het-3 (27)	Het-4 (27)	Het-5 (8)	Het7+8 (7)	b	F	P
Radio	D	0-0	0-1	0-1	0-2	0-2	0-3	0-0			
aletas pectorales	A	0,00	0,09	0,13	0,37	0,33	0,87	0,00	0,0713	4,17	0,044*
Radio	D	0-1	0-1	0-1	0-3	0-2	0-1	0-1			
aletas pélvicas	A	0,14	0,09	0,04	0,19	0,30	0,25	0,14	0,0359	1,44	0,233
Branquiespinas	D	0-1	0-3	0-2	0-4	0-2	0-2	0-1			
	A	0,43	0,82	0,33	1,10	0,56	0,63	0,14	-0,0220	0,20	0,658
MGA		0,61	0,83	0,47	1,63	1,54	2,22	0,44	0,1783	2,97	0,088
NC		0,57	0,73	0,50	1,11	1,07	0,25	1,29	0,0841	2,74	0,163

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , entre paréntesis número de muestras.

Hom= individuos homocigos para todos los loci; Het= individuos heterocigos.

D= magnitud de asimetría; A= promedio de asimetría. MGA= magnitud global de asimetría. NC= número medio de caracteres asimétricos.

Tabla 6.- Relación entre el número de loci microsatélites heterocigotos, longitud y peso en dos muestras de salmón atlántico.

Loci heterocigotos	PTE		PTA	
	Longitud (cm)	Peso (g)	Longitud (cm)	Peso (g)
0 + 1	14,7909	37,7877	13,6414	30,7429
2	15,5417	45,1692	13,0182	29,2000
3	15,4919	42,0405	13,1870	29,1792
4	14,7083	39,1389	12,6630	27,0074
5	15,6773	45,6409	12,2037	26,2296
6 (ó mas loci en PTE)	15,8330	45,4167	9,6714	12,5571
7 + 8			11,7250	22,7625
$\tau$	0,200	0,467	-0,810*	-0,905**

$\tau$  (Tau): Coeficiente de correlación por rangos de Kendall.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Tabla 7.- Relación entre los valores de  $d^2$  calculados a partir de los loci microsatélites y la asimetría en en salmón atlántico.

		$d^2_{media}$			$d^2_{exogámico}$		
		b	F	p	b	F	P
Radios aletas pectorales	PTE	0,1283	2,682	0,1039	0,0001	0,028	0,8682
	PTA	0,1367	2,225	0,1387	-0,0005	0,190	0,6641
Radios aletas pélvicas	PTE	0,0174	0,094	0,7592	-0,0004	0,295	0,5881
	PTA	0,0527	0,454	0,5020	0,00048	0,237	0,6274
Branquiespinas	PTE	0,0900	0,449	0,4810	0,0009	0,248	0,6190
	PTA	0,0451	0,123	0,7270	0,0031	3,845	0,0524
MGA	PTE	0,2751	1,530	0,2183	-0,0003	0,011	0,9168
	PTA	0,3514	1,680	0,1973	0,0023	0,472	0,4935
NC	PTE	0,2081	2,884	0,0918	0,0012	0,462	0,4981
	PTA	0,1211	0,832	0,3637	0,0016	0,917	0,3404

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Tabla 8.- -Relación entre longitud, peso y valores de  $d^2$  calculados a partir de los loci microsatélites en salmón atlántico.

$d^2_{media}$	PTE		PTA	
	Longitud (cm)	Peso (g)	Longitud (cm)	Peso (g)
0 - 0,5	15,9450	45,3950	13,0684	28,1632
0,5 - 1,0	14,7750	38,6595	12,4641	26,0718
1,0 - 1	15,5895	44,2631	11,9306	23,7657
1,5 - 2,0	15,2308	42,6515	12,7778	28,4556
> 2,0	14,6333	37,2666	13,6625	35,0875
$\tau$	-0,600	-0,600	0,200	0,400

$d^2_{exogámico}$	PTE		PTA	
	Longitud (cm)	Peso (g)	Longitud (cm)	Peso (g)
0 - 10	15,4621	41,1379	12,7222	25,5556
10 - 20	15,2087	41,4913	12,4440	26,2440
20 - 30	14,2417	34,7667	14,5250	36,9917
30 - 40	15,1133	39,8000	12,9111	29,8556
40 - 50	15,6462	44,0000	13,2992	31,1857
50 - 60	14,4308	36,8715	10,8556	16,9333
60 - 70	14,5040	45,0400	10,9800	16,6125
70 - 80	14,6000	34,9333	10,8000	18,9444
80 - 90	16,4600	55,0778	11,3663	20,8000
90 - 100	16,5333	27,2667	10,3500	10,4500
> 100	12,6000	49,4130	13,5000	36,6091
$\tau$	0,018	0,127	-0,273	-0,200

$\tau$  (Tau): Coeficiente de correlación por rangos de Kendall.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

#### IV.2.6. Figuras.

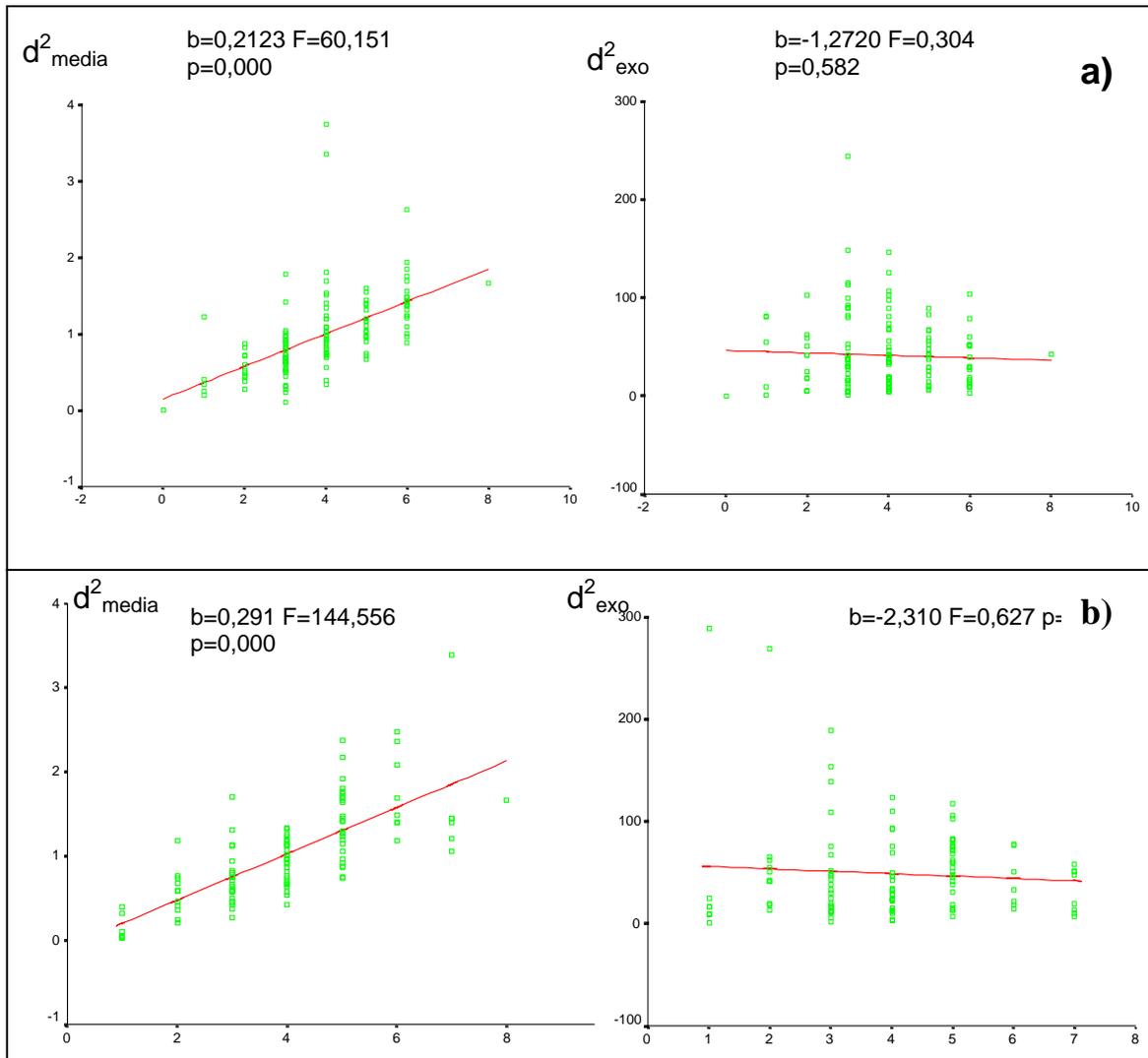


Figura 1.- Relación entre la heterocigosidad individual microsatélite y los valores de  $d^2$   
a) PTE b) PTA  
( $d^2$  exo=  $d^2$  exogámico)

**V. Variabilidad microsatélite en**  
**poblaciones naturales del camarón blanco**  
***Litopenaeus schmitti* en Cuba.**



## ***V.I. Antecedentes.***

Cuba estuvo entre los primeros países de Latinoamérica que desarrolló una pesquería comercial de camarones peneidos (1953), las capturas alcanzaron niveles máximos de 6000 tm anuales entre los años 1976-1980 y se convirtieron rápidamente en una de las principales fuentes de ingresos para el país. A principios de los años 80, el gran esfuerzo pesquero aplicado al recurso camarón se reflejó en una disminución de las capturas cubanas (4600 tm como promedio en el periodo 1981-1985) y provocó el que se tomaran las primeras medidas para evitar la sobreexplotación (Sosa, M. Informe Ministerio de la Pesca de Cuba). Este factor sumado a los daños a los ecosistemas de camarón producidos por factores antropogénicos y naturales han reducido los niveles de capturas del camarón en Cuba hasta 2000 tm como promedio en la última década (Paez, J. Informe Ministerio de la Pesca de Cuba). No obstante, el recurso camarón constituye aún el segundo producto exportable del Ministerio de la Pesca con ingresos de 15 millones de dólares anuales al país.

El género *Penaeus* se divide en cinco subgéneros: *Litopenaeus*, *Penaeus*, *Fenneropenaeus*, *Farfantepenaeus*, y *Melicertus* (Pérez-Farfante, 1969; Pérez-Farfante y Kensley, 1997). En Cuba habitan dos especies, una de ellas es el camarón blanco *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936), especie que junto a *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *L. occidentalis* y *L. setiferus* exhiben como característica común un télico abierto. El télico, es la estructura reproductiva externa de las hembras y su morfología tiene gran importancia en la estrategia reproductiva de la especie (Pérez-Farfante, 1969; Maggioni y col., 2001). La otra especie que habita aguas cubanas, *Farfantepenaeus notialis* (Pérez-Farfante, 1969), exhibe un télico cerrado y es en la actualidad prácticamente la única especie que se pesca comercialmente en Cuba. El camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, que constituía la especie principal de las pesquerías de camarón a finales de los años 60, representó sólo el 20% de las capturas cubanas en 1980, y el 1% en 1998 (Sosa, M., Informe del Ministerio de la Pesca de Cuba). No obstante, *Lschmitti* es la única especie en cultivo en Cuba, con producciones de hasta 2005 tm en 1997 (Formoso y col., 1990; FAO, 1998b).

La distribución del camarón blanco *Litopenaeus schmitti* abarca desde las Antillas Mayores (Islas Vírgenes hasta Cuba), la costa caribeña y atlántica de América Central (Belice) y hasta el sur de la costa brasileña (Santa Catarina). Se encuentra entre 2 y 45 metros de profundidad, aunque es más abundante entre los 15 y 30 metros. Los juveniles viven en los estuarios, pero

los adultos buscan ambientes marinos con suelos fangosos ó arcillosos, algunas veces con arena. La talla máxima es 175 mm para los machos y 235 mm para las hembras. En Cuba la especie se encuentra fundamentalmente en las cuencas de los ríos Tunas de Zaza en el Golfo de Ana María, y Cauto en el Golfo de Guacanayabo. No obstante, existen otras poblaciones en los golfos de Batabanó y Cienfuegos (Figura 1) (Guitart y col., 1985).

La mayoría de las publicaciones con estudios genéticos en poblaciones naturales de peneidos han sido llevados a cabo con el objetivo de determinar la estructura genética de los stocks en las pesquerías (Benzie, 2000). Sin embargo esta información es crucial también para la acuicultura de estas especies. Las poblaciones naturales permanecen como la fuente principal de reproductores para casi todas las especies en cultivo y por lo tanto su manejo adecuado es vital para su supervivencia y también para la acuicultura como industria (Hedgecock y Malecha, 1991). Por este motivo los estudios genéticos en el caso de *L.schmitti* pueden proporcionar útiles informaciones sobre la diversidad aún existente en las poblaciones naturales y además para la planificación sobre futuras fuentes de reproductores para los programas con ciclos cerrados en la acuicultura de esta especie.

Lester (1979) utilizando alozimas en poblaciones de *F.aztecus*, *F. duorarum* y *L.setiferus* del Golfo de México, y debido a la ausencia de diferencias en cuanto a frecuencias alélicas entre estas poblaciones, concluyó que las especies de peneidos en el área están representadas por un conjunto único de genes debido al alto flujo génico que se establece a través de la dispersión de las larvas y los movimientos de juveniles y adultos. Sin embargo, muchos autores han sugerido que las alozimas, las cuales estan conservadas evolutivamente y bajo los efectos de selección balanceada, tienden a producir subestimados de la variación genética (Lester y Pante, 1992; Mitton, 1997; 1998; Ruzzante y col., 1998; Shaw y col., 1999; Aubert y Lightner, 2000; Ward, 2000). Tal y como ocurre en otras especies de peneidos (ver Benzie, 2000), las alozimas en *L.schmitti* han mostrado bajos niveles de variabilidad genética, pero también inesperados niveles (significativos) de heterogeneidad alélica entre muestras de las principales poblaciones de la plataforma cubana (Espinosa y col., en prensa).

Los loci microsatélites (marcadores de ADN cuya neutralidad es ampliamente aceptada y con altos niveles de variabilidad) han sido utilizados con éxito en los estudios relacionados con pesquerías y acuicultura, permiten una mejor detección y cuantificación de las diferencias genéticas entre poblaciones (Estoup y Angers, 1998; Estoup y col., 1998) y han sido aislados en una gran cantidad de especies de peneidos (García y col., 1996; Wolfus y col., 1997; Ball y col., 1998; Moore y col., 1999; Tassanakajon y col., 1998a; 1998b; Xu y col., 1999; 2001;

Brooker y col., (referido por Benzie, 2000); Pongsomboon y col., 2000; Bierne y col., 2000; Espinosa y col., 2001). En este trabajo pretendemos comprobar si efectivamente estas nuevas herramientas moleculares corroboran los resultados previamente obtenidos con enzimas en la especie y si permiten una mejor caracterización de las poblaciones naturales de *L.schmitti* en Cuba, lo cual es fundamental para la conservación de la variabilidad genética aún existente en estas poblaciones naturales y el futuro manejo de los bancos de reproductores para la acuicultura de la especie.

## ***V.2. Materiales y Métodos.***

### Muestras.

Se colectaron 165 individuos adultos de camarón blanco *L.schmitti* en el periodo comprendido entre Noviembre de 1999 a Marzo del 2000, en las proximidades de la costa de cada una de las principales localidades cubanas con poblaciones de la especie: Golfo de Batábano (Batábano n=42), Bahía de Cienfuegos (Cienfuegos n=39), Golfo de Ana María (Tunas de Zaza n=45) y Golfo de Guacanayabo (Manzanillo n=39) (Figura 1). Se almacenaron en etanol (99%) dos pleópodos de cada individuo para los análisis de ADN.

### Loci microsatélites, condiciones de amplificación y electrofóresis.

El ADN se extrajo utilizando la resina *Chelex*<sup>R</sup> 100 (Walsh y col., 1991) a partir de muestras de músculo de los pleópodos de los individuos. Se analizaron ocho loci microsatélites: 3 de ellos aislados a partir de una librería genómica de *L.schmitti*, Lsch-1, Lsch-2, (Espinosa y col., 2001) y Lsch-3 (O1: GTCTCACCCATTTAGAACCAG, O2: GTATATCAAGATGGCGACTTCC, temperatura de hibridación 58<sup>0</sup>C); Pse002, Pse004, Pse028 y Pse036, aislados en *L.setiferus* por Ball y col. (1998); y M-1 aislado en *L.vannamei* (Wolfus y col., 1997).

Los loci microsatélites se amplificaron mediante PCR utilizando una mezcla de 25 µl compuesta por 10ng de ADN por muestra, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada desoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2ng/µl de cada iniciador, tampón de reacción 10X y 1 unidad de *Taq*-polimerasa. Los programas empleados para amplificar cada locus (temperaturas de hibridación y ciclos de amplificación) son concordantes con los propuestos en los trabajos donde estos loci han sido descritos (Anexo 1). Los productos de las

amplificaciones positivas (5 loci: Lsch-1, Lsch-2, Lsch-3, Pse028, Pse036) se aplicaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (6%) y se revelaron mediante tinción con plata (Promega Silver sequence<sup>TM</sup> DNA Staining). Se estimaron las tallas de estos productos de amplificación por comparación con reacciones de secuencias con tallas conocidas del vector PGem-3ZF+ (Promega Sequencing Kit).

### Análisis de Diversidad Genética.

El número de alelos en cada loci microsatélite ( $N_a$ ), los porcentajes de loci polimórficos ( $P_{0,95}$ ), las heterocigosidades observadas ( $H_o$ ), y esperada ( $H_e$ ) y las distancias genéticas ( $D$ ) entre muestras (Nei, 1978), se calcularon utilizando una versión modificada, que acepta más de 20 alelos por locus en los cálculos, del programa estadístico Biosys-1 (Swofford y Selander, 1981). La construcción de dendogramas consenso se llevó a cabo utilizando “bootstrap” de las frecuencias génicas (1000 dendogramas) y el algoritmo UPGMA incluido en el paquete estadístico Phylip 3.5 (Felsenstein, 1993), los dendogramas se visualizaron utilizando el programa TreeView (Page, 1996).

El programa Fstat 2.9.3 (Goudet, 2001; actualizado a partir de Goudet, 1995) se utilizó para llevar a cabo los análisis de desequilibrio de ligamiento entre los loci utilizando el estadístico  $G$ . El mismo programa se utilizó para estimar las desviaciones de equilibrio de Hardy Weinberg en las poblaciones a partir de la significación de los valores de  $F_{IS}$  encontrados. Fstat 2.9.3 también se utilizó para llevar a cabo pruebas globales que a través de aleatorizaciones determinan si existe ó no diferenciación genética entre muestras y además para calcular los valores de  $F_{ST}$  entre pares de muestras, y sus valores de  $p$  asociados, antes y después de la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

El programa Negst (Chakraborty y col., 1982) se utilizó para calcular la diversidad genética total ( $H_T$ ) y sus componentes dentro ( $H_S$ ) y entre muestras ( $D_{ST}$ ) según Nei (1978). Mientras que la prueba de Mantel (Mantel, 1967), disponible en la rutina Isolde que aparece incluida en Genepop 3.2a (Raymond y Rousset, 1995), se utilizó para comprobar si existe aislamiento por distancia entre las muestras. Esta prueba utiliza permutaciones (2000) para determinar el estadístico y su distribución, además de definir las zonas de rechazo utilizando coeficientes de correlación por rangos.

El programa GeneClass (Cornuet y col., 1999) se utilizó para las pruebas de asignación correcta de individuos a sus poblaciones de origen. Para este procedimiento se crea una mezcla hipotética con todos los individuos, y se lleva a cabo la asignación de cada uno de

ellos a una de las poblaciones en estudio. Se utilizaron simulaciones (10 000 individuos por población) y una probabilidad mínima de 0,01 para rechazar individuos en la asignación a una población concreta. La probabilidad de un individuo de pertenecer ó no a una población determinada se calcula a partir de las frecuencias alélicas, cada individuo es asignado a aquella población para la cual revela una mayor probabilidad de pertenencia (método Bayesiano, opción directa).

### ***V.3. Resultados.***

En la Tabla 1 se presentan las frecuencias génicas y parámetros de variabilidad genética estimados para las poblaciones en estudio. Como se observa se identificó un número alto de alelos “exclusivos” (13), 5 de ellos en la población Batabanó, 4 en Cienfuegos, 1 en Tunas de Zaza y 3 alelos exclusivos en Manzanillo; no obstante, todos exhiben frecuencias por debajo de 0,030 (Tabla 1).

Para los loci heterólogos (Pse028 y Pse036), que exhiben un número alto de alelos (36 y 22 alelos, respectivamente) no se observan claramente, alelos más frecuentes, ni tampoco alguna tendencia a que exista preferentemente un grupo de alelos en una población (Tabla 1). En los loci Lsch-2 y Lsch-3, con pocos alelos por locus (9 y 7 alelos respectivamente), aparecen claramente definidos los mismos alelos mayoritarios en cuanto a frecuencias en todas las poblaciones (Lsch-2-214 y Lsch-3-137; frecuencias mayores a 0,600) (Tabla 1). Por el contrario, para el locus Lsch-1 se observa que mientras que en las poblaciones Batabanó y Manzanillo el alelo Lsch-1-136 aparece como el más frecuente (aproximadamente 0,500), seguido por el alelo Lsch-1-176 (0,300), en las poblaciones Cienfuegos y Tunas de Zaza aparece una inversión de frecuencias significativa: el alelo más frecuente es el Lsch-1-176 (frecuencia mayor de 0,500), seguido por el alelo Lsch-1-136 (0,250) (Tabla 1). No se observó desequilibrio de ligamiento entre los loci microsatélites utilizados.

Cienfuegos, es la población en la que se encontraron los mayores valores de heterocigosidad media observada ( $H_o=0,653$ ), seguida por Manzanillo ( $H_o=0,612$ ), Batabanó ( $H_o=0,609$ ) y Tunas de Zaza ( $H_o=0,605$ ) (Tabla 1). No obstante, no aparecen diferencias significativas en cuanto a este parámetro entre las poblaciones (prueba T,  $p<0,05$ ), ni tampoco en cuanto a las

medias de número de alelos por locus (desde 11 a 11,6 alelos por locus en las poblaciones) (Tabla 1).

Se encontró una diferenciación genética entre muestras estadísticamente significativa cuando a partir de las frecuencias génicas se analizan todos los loci y poblaciones ( $F_{ST}=0,012$ ,  $p<0,001$ ). Los loci Lsch-1 ( $p<0,001$ ) y Pse028 ( $p<0,01$ ) son los principales responsables de esta diferenciación. Cuando se analizan los valores de  $F_{ST}$  estimados entre pares de muestras se encuentran valores significativos entre las poblaciones Batabanó y Cienfuegos ( $F_{ST}=0,024$ ,  $p<0,01$ ) y entre Batabanó y Manzanillo ( $F_{ST}=0,004$ ,  $p<0,05$ ). En el resto de comparaciones no existe una diferenciación genética significativa luego de aplicar la corrección de Bonferroni. No se encontró correlación entre las distancias geográficas y los valores de  $F_{ST}$  entre poblaciones (prueba de Mantel,  $b=0,0017$ ,  $p>0,05$ ).

Las frecuencias genotípicas observadas se ajustan en general a las esperadas en el equilibrio de Hardy Weinberg excepto para el locus Pse028, en el que es evidente un déficit significativo de heterocigotos en todas las poblaciones ( $p<0,001$ ) (Tabla 2). Para el resto de loci los  $F_{IS}$  no reflejan una tendencia clara hacia el desequilibrio (no son significativos ó cambian de signo entre las poblaciones) (Tabla 2).

La diversidad genética total ( $H_T=0,693$ ) y su distribución dentro ( $H_S=0,678$ ) y entre poblaciones ( $D_{ST}=0,014$ ) se muestran en la Tabla 3. Como se observa un 98% de la variación genética encontrada está localizada dentro de las poblaciones, con sólo un 2% de variación genética entre ellas. A esa variación entre poblaciones el locus que más contribuye es Lsch-1 (5,5%), seguido por el locus Pse028 (2,0%) (Tabla 3).

Las distancias genéticas estimadas entre las poblaciones son pequeñas ( $D$  media=0,030) (Tabla 4) y los dendogramas consenso reflejan dos nodos claramente definidos: uno que agrupa a las poblaciones Tunas de Zaza y Cienfuegos (693/1000), y otro agrupando a las poblaciones Batabanó y Manzanillo (691/1000) (Figura 2a).

Las pruebas de asignación llevadas a cabo en este trabajo, revelaron que un 74,5% (123/165) de los individuos fueron correctamente asignados a su población de origen (mayor probabilidad) (Tabla 5). En Cienfuegos se encontró la mayor proporción de individuos correctamente asignados (0,795), seguida por Batabanó (0,739), Tunas de Zaza (0,733) y Manzanillo (0,718) (Tabla 5). La mayoría de los individuos incorrectamente asignados en Cienfuegos procedían de Tunas de Zaza, y viceversa; mientras que los individuos mal asignados de Batabanó se ubicaron fundamentalmente en Manzanillo, aunque los individuos

de esta última se ubicaron incorrectamente en Batabanó y Tunas de Zaza en igual proporción (Tabla 5). El análisis de los individuos rechazados (debido a que portaban genotipos ubicados entre el 1% de los genotipos más improbables en cada población) denota que casi nunca se detectó “rechazo” de individuos en sus poblaciones de origen (sólo un caso en Tunas de Zaza, 0,022) (Tabla 5).

#### ***V.4. Discusión.***

##### Variabilidad genética.

Este trabajo constituye el primer estudio comparativo, en cuanto a variabilidad microsatélite, entre poblaciones naturales del camarón blanco *L. schmitti* en Cuba. Tal y como se esperaba, se encontraron altos niveles de polimorfismo (100% de los loci polimórficos) al utilizar los loci microsatélites como marcadores genéticos. Todas las poblaciones muestran más de 11 alelos por locus como media (desde 11,0 a 11,6 alelos) y exhiben, en cuanto a heterocigosidades medias observadas, valores que van desde  $H_o=0,605$  en Tunas de Zaza hasta  $H_o=0,653$  en Cienfuegos. Se detectaron además un número alto de alelos que son exclusivos de alguna población aunque no son útiles como marcadores genéticos debido a las bajas frecuencias génicas en que aparecen.

En la literatura no aparecen muchos datos sobre variabilidad microsatélite de poblaciones naturales de peneidos y la mayoría de los trabajos han sido llevados a cabo en una especie de otro subgénero de *Penaeus*: la especie *Penaeus monodom*. Brooker y col. (referido por Benzie, 2000) utilizaron 3 loci microsatélites para caracterizar 5 poblaciones de *P. monodom* australianas con distancias geográficas entre ellas que van desde 400km hasta 5000km (nivel macro-geográfico) y encontraron de 24 a 46 alelos por locus y heterocigosidades en el rango  $H_o=0,870$  hasta  $H_o=0,988$ . En otros dos estudios de variabilidad genética en esa especie y en un nivel geográfico comparable con el de este trabajo (100-600km), se encontraron 26,3 alelos por locus como media (3 loci microsatélites) y heterocigosidades en el rango  $H_o=0,657$ -  $H_o=0,803$  en 5 poblaciones de Tailandia (Tassanakajon y col., 1998b), mientras que Xu y col. (2001) analizando 4 poblaciones naturales en Filipinas (6 loci microsatélites), encontraron de 21 a 25 alelos por locus y heterocigosidades observadas en los rangos  $H_o=0,749$ -  $H_o=0,791$ . En *L. schmitti* se encuentra el mismo porcentaje de loci polimórficos que en esos estudios (100% en todos los casos), y heterocigosidades medias observadas ligeramente inferiores, No

obstante el número de alelos detectados por locus si es sensiblemente inferior en *L. schmitti* en comparación con *P. monodom*.

En las especies de peneidos del área geográfica en que habita *L. schmitti*, no se han llevado a cabo estudios en los que utilizando los loci microsátélites se haya caracterizado genéticamente a más de una población. No obstante se han descrito niveles de variabilidad microsátélite también inferiores a los encontrados en *P. monodom*: *Litopenaeus setiferus*, 6 loci microsátélites, 1 población, 40 individuos,  $H_o=0,531$ ; *Farfantepenaeus aztecus*, 3 loci microsátélites, 1 población, 10 individuos,  $H_o=0,573$ ; *Farfantepenaeus duorarum*, en las mismas condiciones que *F. aztecus*,  $H_o=0,483$  (Ball y col., 1998). Por otra parte, el locus M1, analizado en 29 individuos de una población natural de *Litopenaeus vannamei*, exhibe una heterocigosidad de  $H_o=1$  y 22 alelos (Wolfus y col., 1997).

Utilizando enzimas se habían descrito bajos niveles de variabilidad en las poblaciones cubanas de *L. schmitti* (Espinosa y col., en prensa). Sólo un 38% de los 21 loci ensayados resultó ser polimórfico en ese trabajo y la media de alelos por locus fue  $N_a=1,5$ . Estos autores encontraron que la población que exhibía mayor heterocigosidad era Tunas de Zaza ( $H_e=0,132$ ), mientras que Manzanillo fue la menos variable de todas las analizadas ( $H_e=0,078$  y  $H_e=0,087$ , dos muestras). No se detectaron en ese estudio alelos marcadores de población. Como se observa, trabajando con loci microsátélites se encuentran niveles de variabilidad significativamente superiores a los encontrados con enzimas, aunque no diferencias en cuanto a niveles de heterocigosidad entre las poblaciones.

### Estructura de poblaciones.

Los estudios llevados a cabo en poblaciones naturales de *L. schmitti* utilizando alozimas han encontrado que estas poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Espinosa y col., en prensa). En este trabajo si se analizan sólo los loci Lsch-1, Lsch-2, Lsch-3 y Pse036 se encuentra el mismo resultado. Sin embargo el locus Pse028 exhibe un déficit de heterocigotos tan significativo que provoca que al incluirlo en el análisis todas las poblaciones aparezcan en desequilibrio. Las causas que habitualmente se han aceptado en la literatura para justificar este tipo de hallazgo están relacionadas con la utilización de muestras pequeñas (Pongsomboon y col., 2000), errores en la lectura e interpretación de los alelos (incluyendo la aparición de alelos nulos) (Pemberton y col., 1995; Pongsomboon y col., 2000); y además selección a favor, ó en contra, de algunas de las clases genotípicas encontradas, poblaciones subestructuradas ó la ausencia de panmixia (Nei, 1987).

En los estudios llevados a cabo utilizando como marcadores genéticos las alozimas se ha considerado que 50 individuos es una muestra aceptable en poblaciones naturales de peneidos (Pongsomboon y col., 2000). No obstante cuando se trabaja con marcadores genéticos con alta variabilidad como el locus Pse028 (36 alelos) podrían existir deficiencias de muestreo al no ser este representativo de toda la variabilidad existente en la población. A pesar de ello, todas las pruebas utilizadas en Fstat (y programas similares) se basan en aleatorizaciones; es decir aleatoriamente se seleccionan alelos y genotipos para generar conjuntos de datos que satisfacen la hipótesis nula y se comparan los estadísticos así obtenidos, con los calculados a partir de los datos observados (Goudet, 1995, 2001). Este proceso trata de esta forma, de evitar la necesidad de muestras extremadamente grandes cuando se utilizan marcadores genéticos con alta variabilidad.

La existencia de alelos nulos puede ser una posible explicación a las desviaciones de los equilibrios genéticos encontrados para el locus Pse028 en todas las poblaciones analizadas en este trabajo. Ya se había comentado que con el programa Cervus se pueden hacer estimas de la presencia y frecuencias de los alelos nulos a partir de las diferencias entre las frecuencias esperadas y observadas de homocigotos en una población (Summers y Amos, 1997, Marshall y col., 1998). Este programa estima para este locus una frecuencia de alelos nulos de 0,2209 en la Población Batabanó, 0,2690 en Cienfuegos, 0,1992, en Tunas de zaza, y 0,1748 en Manzanillo, todos son valores significativamente altos de frecuencias de posibles alelos nulos. Siendo un locus heterólogo además, no sería nada raro que pequeñas diferencias en las secuencias del locus en los genomas de las dos especies (*L. schmitti* y *L. setiferus*) provocaran amplificaciones nulas en algunos individuos. No obstante, también existe la posibilidad de que estemos trabajando con poblaciones subestructuradas ó de que en ellas no exista panmixia, ya que no se espera selección cuando se trabaja con marcadores presuntamente neutrales (Mitton, 1998 y referencias incluidas, Thelen y Allendorf, 2001).

#### Distancias genéticas y UPGMA.

Utilizando enzimas se había encontrado una media de distancias genéticas entre las poblaciones de *L. schmitti* de  $D=0,019$  (Espinosa y col., en prensa). Por otro lado el dendograma consenso reflejaba como poblaciones más cercanas a Batabanó y Manzanillo, las poblaciones con menor heterocigosidad enzimática, agrupándolas en un nodo muy consistente luego del “bootstrap” de frecuencias alélicas (864/1000) (Figura 2b). De la misma forma, la población Tunas de Zaza aparecía como la población genéticamente más alejada del resto de

poblaciones. Los loci microsatélites (con una media de distancias genéticas ligeramente superior ( $D=0,030$ )) agrupan también a las poblaciones Batabanó y Manzanillo en un nodo (691/1000) (Figura 2a), aunque Tunas de Zaza y Cienfuegos aparecen como las poblaciones con mayor similitud genética y agrupadas en otro nodo bien definido (693/1000) (Figura 2a).

#### Diferenciación genética entre poblaciones.

Los primeros estudios genéticos en peneidos demostraron que no existía diferenciación genética en muestras separadas incluso por miles de kilómetros en peneidos de los subgéneros *Litopenaeus* y *Farfantepeneaeus* (Lester, 1979); ó en los subgéneros *Metapeneaeus* y *Peneaeus* (Mulley y Alter, 1980). Una de las razones que se esgrimieron para justificar esta ausencia de diferenciación genética fue la habilidad de los peneidos para desplazarse grandes distancias ayudados por las corrientes marinas (Dall y col., 1990). No obstante, después ha aparecido diferenciación genética no sólo con respecto a la identidad de genotipos, sino también con respecto a niveles de variabilidad genética, en poblaciones de *P. monodom* separadas a veces por sólo cientos de kilómetros, incluyendo casos en los cuales no existían barreras geográficas u oceanográficas para el flujo génico (Benzie y col. (1992) y Forbes y col. (1999) utilizando alozimas; Klibunga y col. (1998) utilizando ADN mitocondrial; y Tassanakajon y col. (1998b), Brooker y col. (referido por Benzie, 2000), y Xu y col. (2001) utilizando microsatélites). García-Machado y col. (2001) también encontraron diferenciación genética en poblaciones de *Farfantepeneaeus notialis* del golfo de Ana María en Cuba (nivel microgeográfico) utilizando alozimas, sin embargo esta diferenciación no existe cuando se analiza la variación del ADN mitocondrial.

La diversidad microsatélite encontrada en este estudio en la especie *L. schmitti* se reparte en un 98% dentro de las poblaciones analizadas y sólo en un 2% entre ellas. En el estudio previo llevado a cabo con muestras de las poblaciones cubanas de *L. schmitti* utilizando enzimas la diversidad genética se reparte de la misma forma: Un 97,9% de la diversidad genética total encontrada ( $H_T=0,099$ ) se reparte dentro de poblaciones (Espinosa y col., en prensa) . Por lo tanto los resultados obtenidos con enzimas y los de este trabajo (utilizando loci microsatélites), indican cierta “homogeneidad” entre las poblaciones cubanas, en términos de alelos y de heterocigosidad.

A pesar de ello, según el estudio de Espinosa y col. (en prensa) existe heterogeneidad significativa de frecuencias génicas enzimáticas entre el conjunto de poblaciones analizadas de *L. schmitti*. Teniendo en cuenta la duda previamente mencionada, sobre la no-neutralidad de

algunos loci enzimáticos, el análisis con marcadores genéticos “neutrales” como pueden serlo los loci microsatélites es imprescindible. La utilización de los microsatélites en este caso, revela también valores de  $F_{ST}$  significativos (diferenciación genética) tanto en las pruebas globales, como en los análisis por pares de poblaciones, donde Batabanó es significativamente diferente de las poblaciones Cienfuegos y Manzanillo. Por lo tanto aunque la “variabilidad” en términos “cuantitativos” es homogénea en las poblaciones cubanas de *L. schmitti*, cualitativamente la forma en que esa variabilidad genética existe es diferente en cada una de las poblaciones y posiblemente represente adaptaciones locales importantes para la supervivencia de la especie en cada área geográfica.

#### Asignación de individuos a poblaciones

Las pruebas de asignación pueden reafirmar la existencia de peculiaridades genéticas en las poblaciones en estudio. Estas pruebas se han utilizado además para discriminar especies muy relacionadas, identificar individuos inmigrantes ó descendientes de inmigrantes en una población, y para evaluar el impacto de individuos cultivados en poblaciones naturales (Hansen y col., 2001 y referencias incluidas).

En poblaciones de salmón atlántico, las cuales se encuentran naturalmente subestructuradas en múltiples stocks diferenciados genéticamente y más ó menos aislados reproductivamente (Stahl, 1987; Vespoor, 1988; Blanco y col., 1992), Sánchez y col. (2000) utilizaron los loci microsatélites para llevar a cabo asignaciones de individuos a sus poblaciones de origen y encontraron un 73% de asignaciones correctas. En el otro extremo se encuentra el caso del rape (*Lophius piscatorious* y *Lophius budegasa*), demersales con gran dispersión en el mar de larvas, juveniles y adultos, donde se han encontrado bajos porcentajes de asignación correcta de los individuos a sus poblaciones (27,4% para *L. piscatoriuos* y 15,9% para *L. budegasa*, Cagigas, comunicación personal). Estos dos estudios confirman la existencia de correlaciones positivas entre el grado de diferenciación genética entre poblaciones y las asignaciones correctas de individuos a sus poblaciones.

En este trabajo el 74,5% de los individuos fueron correctamente asignados a sus poblaciones de origen y un alto porcentaje de ellos (más de un 38%) aparecen además “excluidos” como posibles integrantes de las otras poblaciones. Por lo tanto, se confirma la idea de la existencia de diferenciación genética entre las poblaciones naturales de *L. schmitti* en Cuba.

¿Qué causas podrían explicar esta diferenciación genética entre poblaciones tan cercanas geográficamente? Penetrando en dirección Este-Oeste en la costa sur de Cuba se encuentra la

corriente principal del Caribe, esta se encuentra en la zona Norte-Occidental con la Contracorriente Cubana que fluye en sentido contrario creando un gran giro en esa zona de la plataforma sur (García y col., 1991), no obstante parece ser que las corrientes no garantizan una adecuada homogenización de las larvas ó no contribuyen sustancialmente a los movimientos de los juveniles y adultos hacia otras localidades. Este hecho puede deberse en primer lugar, a la ubicación cercana a la costa del camarón blanco *L. schmitti* (las puestas ocurren entre los 3-10 metros de profundidad, Guitart y col., 1985); a la existencia de barreras geográficas en la plataforma sur cubana como pueden serlo la Fosa de Jagua, ubicada a la salida de la Bahía de Cienfuegos y con más de 2000 m de profundidad (Ibarra-Martín y col., 1978); y además a la existencia de pequeños, pero persistentes giros que ocurren cerca de la costa en toda la plataforma y que contribuirían a la retención de las larvas (Alfonso y col., 1991).

De esta forma la diferenciación genética encontrada entre las poblaciones cubanas de *L. schmitti* al utilizar alozimas (Espinosa y col., en prensa) se corrobora al utilizar loci microsatélites y puede deberse a restricciones al flujo génico entre estas poblaciones naturales, sumado a los cuellos de botella generados por haber sufrido periódicamente reducciones importantes en los números de individuos como consecuencia de prolongadas sequías, construcción de embalses e intensa presión pesquera.

En resumen, los loci microsatélites muestran mayores niveles de variabilidad que los encontrados con enzimas en poblaciones naturales de *Litopenaeus schmitti*, no obstante esa variabilidad se reparte de igual forma dentro y entre poblaciones al utilizar uno u otro marcador genético. No obstante, los mayores niveles de variabilidad encontrados al utilizar los loci microsatélites, permiten asignar retrospectivamente a los individuos capturados a sus poblaciones de origen, lo cual podría ser de utilidad en el manejo de las poblaciones naturales y de cultivo de la especie en Cuba.

V.5. Tablas.-

Tabla 1. Frecuencias génicas y parámetros de variabilidad genética en poblaciones naturales de *Litopenaeus schmitti* de Cuba utilizando loci microsatélites.

Locus	Alelos	Poblaciones				Locus	Alelos	Poblaciones				Locus	Alelos	Poblaciones			
		BT	CF	TZ	MZ.			BT	CF	TZ	MZ.			BT	CF	TZ	MZ.
Lsch-1	(n)	42	39	45	39	Pse028	(n)	40	35	37	33	Pse036	(n)	39	39	40	33
	136	<b>,560</b>	,282	,344	<b>,538</b>		146	<u>,025</u>	,000	,000	,000		134	,000	<u>,013</u>	,000	,000
	142	,012	,000	,011	,000		154	,000	,000	,000	<u>,015</u>		136	<u>,013</u>	,000	,000	,000
	162	,036	,064	<u>,033</u>	,090		156	,000	,000	,027	,015		138	,000	<u>,013</u>	,000	,000
	174	,000	,000	<u>,011</u>	,000		158	,087	<b>,157</b>	<b>,176</b>	,121		140	,013	,000	,013	,015
	176	,393	<b>,641</b>	<b>,567</b>	,321		160	,013	,071	,027	,000		142	,051	,013	,013	,015
	206	,000	,013	,033	,051		162	,025	,086	,000	,015		144	,090	,026	,050	,030
							164	,087	,000	,027	,000		146	,038	,051	,025	,091
							166	<u>,013</u>	,000	,000	,000		148	,051	<b>,115</b>	,063	,061
Lsch-2	(n)	35	35	46	38		174	,000	,000	,000	<u>,015</u>		150	,064	,077	<b>,112</b>	,091
	206	,000	<u>,014</u>	,000	,000		180	<u>,013</u>	,000	,000	,000		152	,064	<b>,115</b>	,050	,091
	208	,000	,014	,011	,000		182	,000	,014	,000	,015		154	,051	,051	,075	,061
	209	,014	,000	,011	,000		186	,013	,014	,000	,000		156	<b>,103</b>	,064	<b>,112</b>	,061
	210	,200	,257	,228	,211		188	,000	,029	,027	,000		158	<b>,103</b>	,064	,013	,045
	211	,000	,029	,011	,039		190	,025	,071	,041	,045		160	,038	,038	,075	,106
	212	,071	,014	,054	,026		192	,087	,043	,081	,061		162	,051	<b>,115</b>	,100	,061
	213	,000	,029	,054	,000		194	,000	,014	,027	,030		164	,051	,090	<b>,112</b>	,061
	214	<b>,657</b>	<b>,614</b>	<b>,620</b>	<b>,697</b>		196	,000	,029	,000	,015		166	,038	,090	,063	,061
	215	,057	,029	,011	,026		200	,013	,014	,000	,000		168	,077	,026	,050	,000
							202	,000	,000	,014	,015		170	,038	,000	,013	<b>,121</b>
							204	,000	,000	,014	,061		172	,038	,013	,038	,000
Lsch-3	(n)	39	34	38	37		206	,025	,000	,014	,015		174	,013	,013	,013	,030
	134	,013	,015	,000	,000		208	,063	,000	,000	,015		176	,013	,013	,013	,000
	136	,026	,000	,105	,014		210	,112	,014	,054	,030						
	137	<b>,692</b>	<b>,676</b>	<b>,697</b>	<b>,743</b>		212	,000	,029	,027	,000						
	138	,141	,162	,118	,122		214	,000	,014	,000	,045						
	139	,077	,088	,026	,095		216	,050	,043	,081	,045						
	140	,000	<u>,029</u>	,000	,000		218	<b>,175</b>	,000	,108	,045						
	143	,051	,029	,053	,027		220	,063	,071	,095	,076						
							222	,050	,129	,095	,061						
							224	,000	,057	,027	<b>,152</b>						
							226	,013	,071	,000	,030						
							230	,000	,000	,000	<u>,015</u>						
							250	,013	,000	,027	,030	P <sub>0,95</sub>	100	100	100	100	
							252	,013	,014	,014	,000	Na	11,6	11,6	11,6	11,0	
							254	,013	,014	,000	,015	H <sub>o</sub>	0,609	0,653	0,605	0,612	
							258	<u>,013</u>	,000	,000	,000	H <sub>e</sub>	0,688	0,691	0,696	0,678	

P<sub>0,95</sub> : % loci polimórfico. Na: Número medio de alelos por locus.

H<sub>o</sub>: Heterocigosidad media observada.

H<sub>e</sub>: Heterocigosidad media.

BT: Batabanó, CF: Cienfuegos, TZ: Tunas de Zaza, MZ: Manzanillo

Los alelos exclusivos están subrayados y los alelos más frecuentes por locus en cada población aparecen en negritas.

Tabla 2. Desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $F_{IS}$ ) en poblaciones naturales de *L.schmitti* de Cuba utilizando loci microsatélites.

Locus	Poblaciones			
	Batabanó	Cienfuegos	Tunas de Zaza	Manzanillo
Lsch-1	-0,019	-0,257*	-0,065	+0,067
Lsch-2	+0,025	-0,070	+0,192*	-0,115
Lsch-3	-0,083	-0,147	+0,037	-0,201*
Pse028	+0,357***	+0,453***	+0,362***	+0,298***
Pse036	+0,108*	+0,010	+0,037	+0,161**

p<0,05 (\*); p<0,01 (\*\*); p<0,001 (\*\*\*).

Tabla 3. Diversidad genética total ( $H_T$ ) y su distribución dentro ( $H_S$ ) y entre muestras ( $D_{ST}$ ) en poblaciones naturales de *L.schmitti* de Cuba utilizando loci microsatélites.

	valores absolutos			valores relativos	
	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$H_S$	$D_{ST}$
Lsch-1	0,580	0,548	0,032	0,945	0,055
Lsch-2	0,528	0,524	0,003	0,994	0,006
Lsch-3	0,480	0,477	0,004	0,992	0,008
Pse028	0,940	0,921	0,019	0,980	0,020
Pse036	0,936	0,926	0,011	0,989	0,011
medias	0,693	0,678	0,014	0,980	0,020

Tabla 4. Distancias genéticas de Nei, D (Nei, 1978) (sobre la diagonal) y geográficas<sup>1</sup> (bajo la diagonal) entre muestras de poblaciones naturales de *L.schmitti* de Cuba.

	Batabanó	Cienfuegos	Tunas de Zaza	Manzanillo
Batabanó	-	0,059	0,022	0,011
Cienfuegos	158	-	0,001	0,053
Tunas de Zaza	266	108	-	0,034
Manzanillo	518	360	252	-

<sup>1</sup>tomadas del Atlas de Cuba (Ibarra-Martín y col., 1978) (error 5-10 Km).

Tabla 5. Asignación de individuos a poblaciones en el camarón blanco *L.schmitti* utilizando el método Bayesiano (GeneClass). “Rechazo” se refiere a la proporción de individuos con genotipos más improbables en cada población (1%).

Origen real		Batabanó	Cienfuegos	Tunas de Zaza	Manzanillo	Rechazo en todas
Batabanó n=42	Asignado	<b>0,739</b>	0,071	0,071	0,119	-
	Rechazado	<b>0,000</b>	0,285	0,142	0,238	
Cienfuegos n=39	Asignado	0,077	<b>0,795</b>	0,103	0,025	-
	Rechazado	0,282	<b>0,000</b>	0,179	0,230	
T. Zaza n=45	Asignado	0,067	0,133	<b>0,733</b>	0,045	0,022
	Rechazado	0,200	0,177	<b>0,022</b>	0,200	
Manzanillo n=39	Asignado	0,128	0,128	0,026	<b>0,718</b>	-
	Rechazado	0,333	0,256	0,128	<b>0,000</b>	

V.6. Figuras.

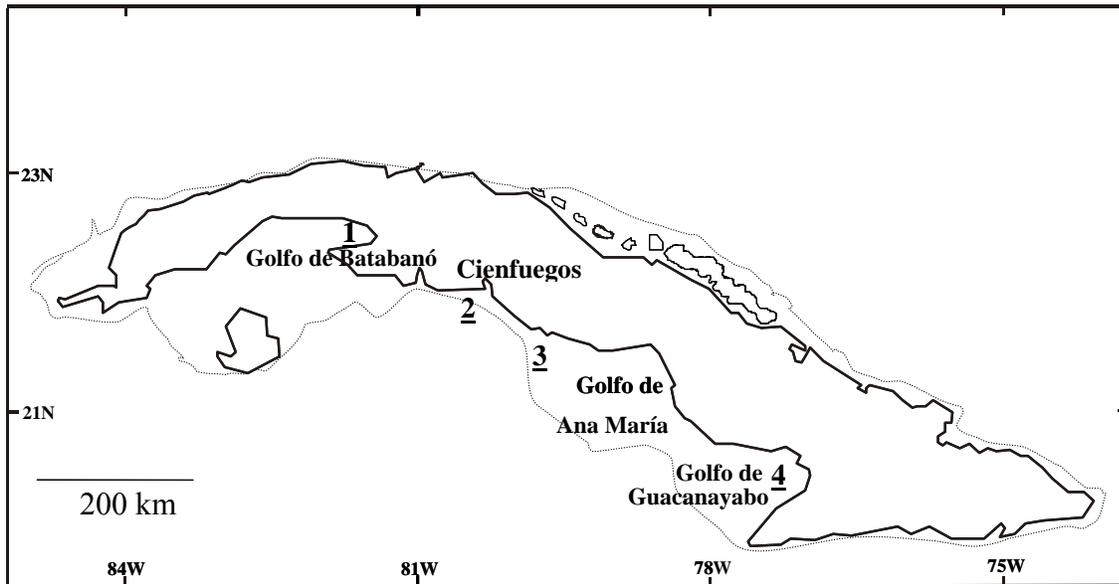


Figura 1. Mapa de Cuba (las localizaciones geográficas de las cuatro muestras utilizadas en este estudio están señaladas: 1. Batabanó, 2. Cienfuegos, 3. Tunas de Zaza (Golfo de Ana María), 4. Manzanillo (Golfo de Guacanayabo)).

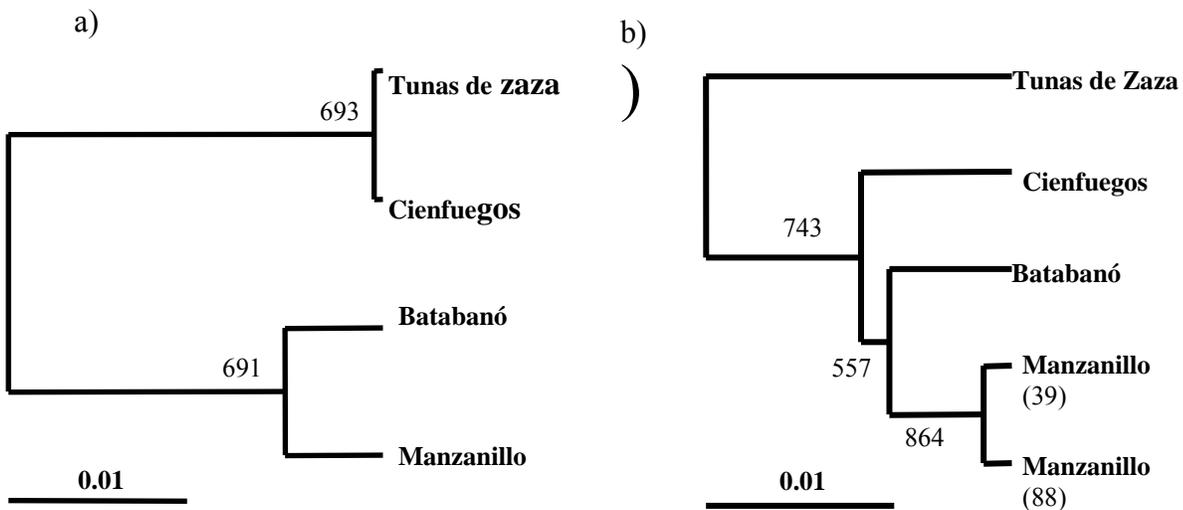
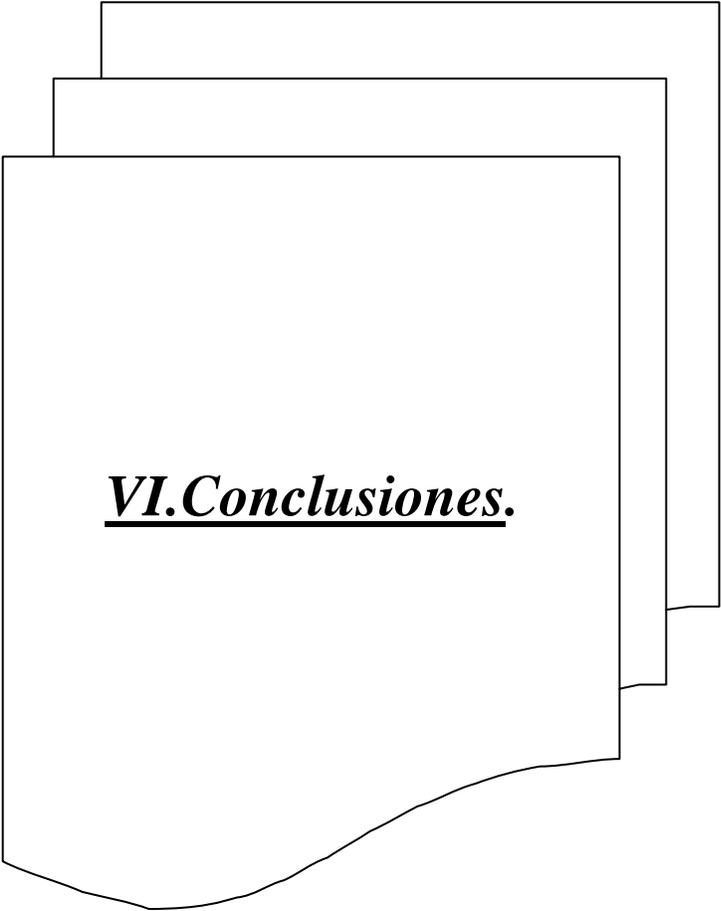


Figura 2. Dendrogramas consenso UPGMA mostrando las distancias genéticas D (Nei, 1978) entre muestras de poblaciones naturales de *L. schmitti* en Cuba.

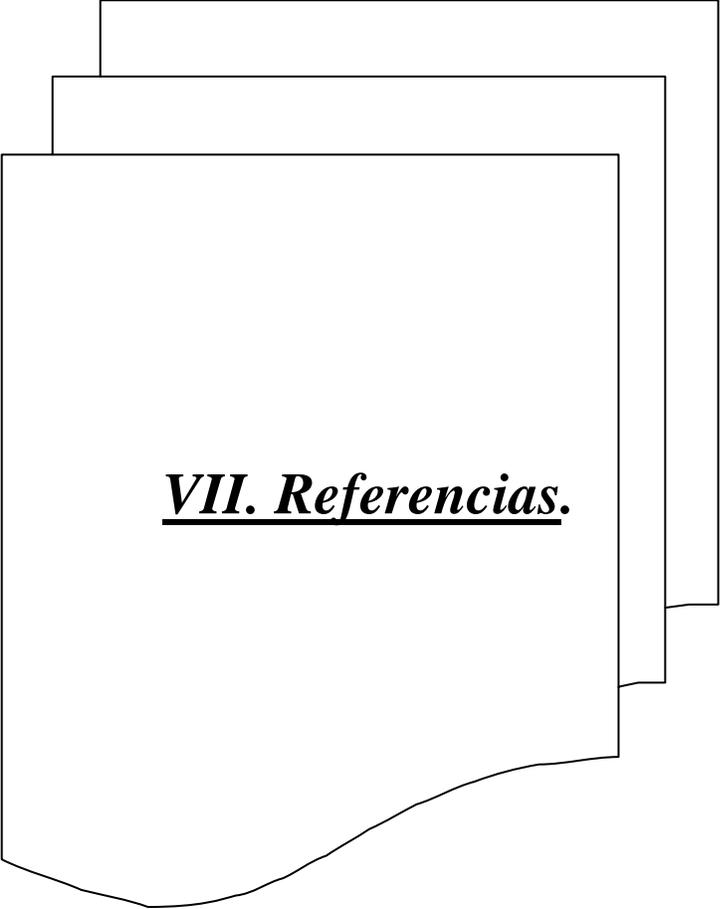
a) utilizando loci microsatélites. b) utilizando enzimas (datos tomados de Espinosa y col., (en prensa)) (en las muestras de Manzanillo los números indican diferentes localidades).





1. Para utilizar los loci microsatélites en el diseño del manejo de reproductores en programas de cultivo es imprescindible tener en cuenta los siguientes elementos:
  - a) La variabilidad de los loci microsatélites en los reproductores (PIC, heterocigosidad y número de alelos, en general y por sexos).
  - b) La posibilidad de mutaciones y presencia de alelos nulos.
  - c) Las relaciones genéticas existentes entre los reproductores.
2. No se encuentra una relación entre alelos específicos, ni enzimáticos, ni microsatélites, con ninguno de los caracteres estudiados. Las asociaciones existentes entre los niveles de heterocigosidad enzimática y momento del inicio de la alimentación activa ó estado fisiológico de los individuos, no se observan al considerar los niveles de heterocigosidad microsatélite.
3. Dentro del debate existente sobre las causas y consecuencias de las correlaciones entre heterocigosidad genética y eficacia biológica, estos resultados apoyan la idea de que las enzimas y los microsatélites son diferencialmente afectados por la selección natural y que los loci enzimáticos, posiblemente a través del control de las reacciones metabólicas, juegan un papel fundamental en el incremento de la eficacia biológica.
4. Los loci microsatélites muestran mayores niveles de variabilidad que los encontrados con enzimas en poblaciones naturales de *Litopenaeus schmitti*, aunque esa variabilidad se reparte de igual forma dentro y entre poblaciones al utilizar uno u otro marcador genético. No obstante, estos mayores niveles de variabilidad permiten asignar con mayor fiabilidad los individuos capturados a sus poblaciones de origen, mejorando así el manejo de las poblaciones naturales. Por otra parte, al menos cuatro de los loci microsatélites utilizados son adecuados para su aplicación en programas de manejo de reproductores en las estaciones de cultivo.





**VII. Referencias.**



- Akashige, S. y Fushimi, T., 1992. Growth, survival and glycogen content of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 58: 1063–1071.
- Alfonso, I.; Frias, MP.; Baisre, J.; Campos, A. 1991. Distribución y abundancia de larvas de la langosta *Panulirus argus* en aguas alrededor de Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*. 12: 5-19.
- Allen Jr., SK. y Downing, SL., 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg : I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 102: 197–208.
- Amos, W. 1999. A comparative approach to the study of microsatellite evolution. En: *Microsatellites, Evolution and Applications* (eds Goldstein, DB. y Schlotterer, Ch.): pp, 66-79. Oxford University Press.
- Amos, W.; Sawcer, SJ.; Feakes, RW.; Rubinsztein, DC. 1996. Microsatellites shows mutational bias and heterozygote instability. *Nature Genetics*. 13: 390-391.
- Aubert, H. y Lightner, DV. 2000. Identification of genetic populations of the pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the gulf of California, Mexico. *Marine Biology*. 137: 875-885.
- Bailey, JK. y Friars, GW. 1994. Sources of variation in age at smolting in hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Animal Science*. 74: 223-227.
- Bailey, JK.; Saunders, RL; Buzeta, MI. 1980. Influence of parental smolt age and sea age on growth and smolting of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*. 37: 1379-1386.
- Balding, D. 1999. Forensic applications of microsatellite markers. En: *Microsatellites, Evolution and Applications* (eds Goldstein, DB. y Schlotterer, Ch.): pp, 198-210. Oxford University Press.
- Ball, AO.; Leonard, S. y Chapman, RW. 1998. Characterization of (GT)<sub>n</sub> from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Molecular Ecology*. 7: 1251-1253.
- Bangkok, 2000. Aquaculture Development Beyond 2000: The Bangkok Declaration and Strategy. Bangkok. Thailandia.
- Bardakci, F.; y Skibinski, DOF. 1994. Application of RAPDs technique in tilapia fish-species and subspecies identification. *Heredity*. 73:117-123.
- Bartley, D. 1998. Genetics in aquaculture. En *FAO fisheries Department Review of the state of World Aquaculture Development trends*.
- Beachman, TD.; Withler, FC. y Morley, RB. 1985. Effect of egg size incubation time and fry size in Chum salmon and Coho salmon. *Canadian Journal of Zoology*. 63: 847-850.
- Beall, E.; Dumas, J.; Claireaux, D.; Barriere, L. y Marty, C. 1994. Dispersal patterns and survival of Atlantic salmon juveniles in a nursery stream. *ICES Journal of Marine Science*. 51:1-9.
- Beckmann, JS. y Weber, JL. 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*. 12: 627-631.
- Bentzen, P.; Taggart CT.; Ruzzante, DE.; Cook, D. 1996. Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northwest Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*. 53: 2706-2721.
- Benzie, JAH. 2000. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research*. 31: 95-119.
- Benzie, JAH.; Frusher, S.; y Ballment, E. 1992. Geographical variation in allozyme frequencies of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) populations in Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 43: 715-725.

- Bierne, N.; Beuzart, I.; Vonau, V.; Bonhomme, F.; Bédier, E.; AQUACOP. 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 184: 203–219.
- Blanco, G. y Sánchez, JA. 1986. Enzymatic heterozygosity and morphological variance in synthetic populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetic Selection and Evolution*. 18: 417-426.
- Blanco, G.; Presa, P.; Vazquez, E. y Sánchez, JA. 1998. Allozyme heterozygosity and development in Atlantic salmon. *Fish Physiology and Biochemistry*. 19: 163-169.
- Blanco, G.; Ramos, D.; Vázquez, E. y Sánchez, JA. 1997. Genetic base of age at maturity in *Salmo salar*: preliminary results. *ICES CM*. HH:04
- Blanco, G.; Sánchez, JA.; Vazquez, E.; Rubio, J.; Utter, FM. 1992. Genetic differentiation among natural European populations of Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, from drainages of Atlantic Ocean. *Animal Genetics*. 23:11-18.
- Blanco, G.; Sánchez, JA.; Vázquez, E.; Garcia, E.; Rubio, J. 1988. Análisis morfológicos y bioquímicos en *Salmo salar L.* de ríos asturianos. *En: Proceedings, Symposium sobre cultivo Intensivo de peces de aguas continentales. Sociedad Española de Acuicultura, Madrid, 339 pp.*
- Blanco, G.; Sánchez, JA.; Vázquez, E.; García, E.; Rubio, J. 1990. Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in *Salmo salar L.* *Aquaculture*. 84: 199-209.
- Blouin, MS.; Parson, M.; Lacaille, V.; y Lotz, S. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*. 5: 393-401.
- Botstein, D.; White, R.; Skolnik, M.; Dawis, RW. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-31.
- Boudry, P.; Collet, B.; Cornette, F.; Hervouet, V.; y Bonhomme, F. 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*. 204 (3-4): 283-296.
- Bourke, EA.; Coughlan, J.; Jansson, H.; Galvin, P. y Cross, TF. 1997. Allozyme variation in populations of Atlantic salmon located throughout Europe: diversity that could be compromised by introduction of reared fish. *ICES Journal of Marine Science*. 54:974-985.
- Bouza, C., Sánchez, L., Martínez, P. 1997. Gene diversity analysis in natural populations and cultured stocks of turbot (*Scophthalmus maximus L.*) *Animal Genetics*. 28: 28-36.
- Bowcock, AM.; Ruiz-Linares, A.; Tomfohrde, J.; Minch, E.; Kidd, JR.; y Cavally-Sforza, LL. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*. 368: 455-457.
- Bowen, BW. y Grant, WS. 1997. Phylogeography of sardines (*Sardinus spp.*): assessing biogeographic models and population histories in temperature upwelling zones. *Evolution*. 51: 1601-1610.
- Brannas, E. 1995. First access to territorial space and exposure to strong predation pressure: a conflict in early emerging Atlantic salmon fry. *Evolutionary Ecology*. 9: 411-420.
- Bucklin, A. y Kann, L. 1991. Mitochondrial DNA variation of copepods: markers of species identity and population differentiation in *Calanus*. *Biology Bulletin*. 181: 357.
- Burkenroad, M. D. 1936. A new species of *Penaeus* from the American Atlantic. *Anais Acad. Brasil. Cienc. Rio de Janeiro*. 8: 315–318.
- Caballero, A. 1994. Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* 73: 657-679.

- Cagigas, E.; Vázquez, E.; Blanco, G.; Sánchez, JA. 1999. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta L.*) based on allozymes, microsatellites and RAPDs markers. *Marine Biotechnology*. 1: 286--296
- Carl, LM. y Healey, MC. 1984. Differences in enzyme frequency and body morphology among three juvenile life history types of chinook salmon in the Nanaimo River. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*. 41:1070-1077.
- Cipriano, F. y Palumbi, SR. 1999. Genetic tracking of a protected whale. *Nature*. 397: 307-309.
- Clarke, G. 1995. Relationships between developmental stability and fitness. Application for conservation biology. *Conservation Biology*. 9(1): 18-24.
- Clarke, GM. 1998. Developmental stability and fitness: the evidence is not quite so clear. *American Naturalist*. 152 : 762-766.
- Coltman, DW.; Bowen, WD.; y Wright, JM. 1998. Birth weight and neonatal survival of harbour sea pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. *Proceedings of the Royal Society of London*. B265: 803-809.
- Coltman, DW.; Pilkington, JG.; Smith, JA.; Pemberton, JM. 1999. Parasite-mediated selection against inbred soay shepp in free-living, island population. *Evolution*. 53: 1259-1267.
- Cornuet, JM.; Piry, S.; Luikart, G.; Estoup, A.; Solignac M. 1999. Comparison of methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*. 153: 1989-2000.
- Coughlan, J.; MacCarthy, E.; McGregor, D.; O'Donoghue, P; Galvin P.; Fitzgerald, R.; Daemen, E.; Imsland, A.; Stefansson, S y Cross, T. 1998. Four polymorphic microsatellites in turbot *Scophthalmus maximus*. *Animal Genetics*. 27: 441-442.
- Coulson, TN.; Albon, S.; Slate, J.; Pemberton, J. 1999. Microsatellite loci reveal sex-dependent responses to inbreeding and outbreeding in red deer calves. *Evolution*. 53: 1951-1960.
- Coulson, TN.; Pemberton, JM. y Albon, SD. 1998. Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proceedings of the Royal Society of London*. B265: 489-495.
- Crawford, AM. y Cuthbertson, RP. 1996. Mutations in sheep microsatellites. *Genome Research*. 6: 876-879.
- Cross, TF. y Ward, RD. 1980. Protein variation and duplicate loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar L.* *Genetical Research*. 36: 147-165.
- Cunningham, EP.; Dooley, JJ.; Splan, RK. y Bradley, DO. 2001. Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Animal Genetics*. 32 (6):360-364.
- Cutts, CJ.; Metcalfe, NB.; Taylor, AC. 1999. Competitive asymmetries in territorial juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Oikos*. 86: 479-486.
- Chakraborty, R. y Kimmel, M. 1999. Statistic of microsatellite loci: estimation of mutation rate and pattern of population expansion. . *En: Microsatellites, Evolution and Applications (eds Goldstein, DB. y Schlotterer, Ch.)*: pp, 140-149. Oxford University Press.
- Chakraborty, R. y Leimar, O. 1987. Genetic variation within a subdivided population. *En Population Genetics and Fishery Management*. (Ryman, N. y Utter, F. eds.): pp, 89-120. Seattle: Washington Sea Grant Publications/University of Washington Press.
- Chakraborty, R.; Meagher, T.; Smouse, P.E. 1988. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics*. 118: 527-536.

- Chamberlain, NL.; Driver, ED.; y Miesfeld, RL. 1994. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acid Research*. 22: 3181-3186.
- Chao, NH.; Tsai, HP.; Liang, CI.; Chen, HY.; Cheng, JH.; Ho, YT. 1999. Induction and performance of triploid oyster, *Crassostrea gigas*, in Taiwan. *COA Council of Agriculture, Taiwan Fisheries Series No. 65*, pp. 99–115 .
- Chrakaborty, R.; Haag, M.; Ryman, N.; Stahl, G. 1982. Hierarchical gene diversity analysis and its application to brown trout populations data. *Hereditas*. 97: 17-21.
- Dall, W.; Hill, BJ.; Rothlisberg, PC.; Staples, DJ. 1990. The Biology of Penaeidea. *Advances in Marine Biology*. 27: 1-489.
- Dallas, JF. 1992. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*. 3: 452-456.
- Danzmann, RG. 1997. PROBMAX: a computer program for assigning unknown parentage in pedigree analysis from known genotypic pools of parents and progeny. *Journal of Heredity*. 88: 333.
- Danzmann, RG.; Jackson, TR.; Ferguson, MM.; Ihssen PE. 1997. The identification of multiple QTL influencing temperature tolerance in rainbow trout and their phenotypic effects and genomic backgrounds. *Abstract and presentation to the Sixth International Symposium on genetics and Aquaculture, 24-28 June, Stirling, Scotland*.
- David, P. 1997. Modeling the genetic basis of heterosis: test of alternative hypotheses. *Evolution*. 51:1049-1057.
- David, P., Delay, B., Jarne, P. 1997. Heterozygosity and growth in the marine bivalve *Spisula ovalis*: testing alternative hypothesis. *Genetic Research Camb*. 70: 215-223.
- Davidson, WS.; Birt, TP. y Green, JM. 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.
- De March, BGE. 1995. Effects of temperature on the hatching success of Arctic char eggs. *The Progressive Fish Culturist*. 57:132-136.
- DeWoody, JA. y Avise, JC. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*. 56: 461-473.
- Dib, C.; Faure, S.; Fizames, C.; Samson, D.; Drouot, N.; Vignal, A.; Millasseau, P. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 380: 152-154.
- Dietrich, WF.; Miller, J.; Steen, R.; Merchant, MA.; Damron-Boles, D.; Husain Z. 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*. 380:149-152.
- Doyle, RW.; Perez-Enriquez, R., Takagi, M.; Taniguchi, N. 2001. Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish population. *Genetica*. 111(1-3): 291-304.
- Dunham, RA. 1995. The contribution of genetically improve organisms to global food security. *Thematic paper presented at the Japan/FAO International Conference on Sustainable Contribution of Fisheries to Food Security, 4-9 December, Kyoto, Japan*.
- Eanes, WF. 1978. Morphological variance and enzyme heterozygosity in the monarch butterfly. *Nature*. 276 : 263-264 .
- Edwards, A.; Civitello, A.; Hammond, HA.; y Caskey, CT. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*. 49: 746-756.
- Eknath, AE.; Bentsen, HB.; Gjerde, B.; Tayamen, MM.; Abella, TA.; Gjedrem, T., y Pullin, RSV. 1991. Approaches to national fish breeding programs: pointers from a tilapia pilot study. *NAGA, The ICLARM Quartely* 723: 10-12.

- Entis, E. 1997. Aquabiotech: a blue revolution? *World aquaculture*. 28:12-15.
- Espinosa, G.; Díaz, R.; Matos, J.; Becquer, U.; Romo, J. y Borrell, Y. Variación aloenzimática en poblaciones cubanas del camarón blanco *L. schmitti*. *Revista de Investigaciones Marinas*. (en prensa).
- Espinosa, G.; Jager, M.; Machado, E.; Borrell, Y.; Corona, N.; Robainas, A.; Deutsh, J. 2001. Microsatellites from the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda). *Biotechnología Aplicada*. 18(4): 19-22.
- Estoup, A. y Angers, B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. *En Advances in Molecular Ecology*. G.R.Carvalho (Ed). pp, 55-86. IOS press Amsterdam.
- Estoup, A. y Cournet, JM. 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data. *En: Microsatellites, Evolution and Applications (eds Goldstein, DB. y Schlotterer, Ch.)*: pp, 49-65. Oxford University Press.
- Estoup, A.; Gharbi, K.; SanCristobal, M.; Chevalet, C.; Haffray, P. y Guyomard, R. 1998. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 715-725.
- FAO. 1998a. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome, Italy.
- FAO. 1998b. Aquaculture production 1984-1998. FISHSTAT Plus. Universal software for fishery statistical time series.
- FAO. 2000. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome, Italy.
- Feldman, MW.; Kumm, J.; y Pritchard, J. 1999. Mutation and migration in models of microsatellite evolution. *En: Microsatellites, Evolution and Applications (eds Goldstein, DB. y Schlotterer, Ch.)*: pp, 98-115. Oxford University Press.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Dept. Genetics, University of Washington, Seattle.
- FitzSimmons, NN.; Moritz, C.; Moore, SS. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 12: 432-440.
- Forbes, AT.; Demetriades, NT.; Benzie JAH.; y Ballment, E. 1999. Allozyme frequencies indicate little geographic variation amongst stocks of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in the south-east Indian Ocean. *South African Journal Of Marine Biology*. 21:271-277.
- Formoso, M.; Ros, R.; Borrero, M. y Coto, M. 1990. Primeros resultados en la introducción de especies foráneas de camarones Peneidos para su cultivo en Cuba. *Paper delivered at the II Congreso de Ciencias del Mar, Habana, Cuba, june 18-22*.
- Frydenberg, O.; Moller, D.; Naevdal, G.; Sick, K. 1965. Haemoglobin polymorphism in Norwegian cod populations. *Hereditas*. 53: 257-271.
- García de León, FJ.; Cannonne, M.; Quillet, E.; Bonhomme, F.; Chatain, B. 1998. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*. 159: 303-316.
- García, C.; Chirino, A.; Rodríguez, J. 1991. Corrientes Geostróficas en la ZEE al sur de Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*. 12: 29-38.
- García, D.; Dhar, AK.; Alcívar-Warren, A. 1996. Molecular análisis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expresión in *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 5(1): 71-83.
- García-Machado, E.; Robainas, A.; Espinosa, G.; Oliva, M.; Páez J.; Verdecia, N.; y Monnerot, M. 2001. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations

- of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea, Decapoda). *Marine Biology*. 138: 701-707.
- Garza, J.C.; Slatkin, M.; y Freimer, N.B. 1995. Microsatellites allele frequencies in humans and chimpanzes, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution*. 12: 594-603.
- Gill, P.; Swparkes, R.; y Kimpton, C. 1997. Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. *Forensic Science International*. 89: 185-197.
- Gjedrem, T. 1997. Selective breeding to improve aquaculture production. *World Aquaculture*. 28: 33-45.
- Gjedrem, T. y Fimland E. 1995. Potential benefits from high health and genetically improved shrimp stocks. *En: Swimming through trouble water, proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture'95. Browdy, CL. and Hopkins, editors.* pp, 60-65. *World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.*
- Gjedrem, T.; Salte, R.; Gjoen, H.M. 1991. Genetic variation in susceptibility of atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture*. 97:1-6.
- Gjerde, B. 1986. Growth and reproduction in fish and shellfish. *Aquaculture*. 57:37-55.
- Gjerde, B. y Olsen, B. 1990. Economic value of breeding program. *Aktuelt fra Statens Fagteneste for Landbruket, Husdyrforsoksmotet 13-14 Februar*: 60-61.
- Gjerde, B.; Gunnes, K.; Gjedrem, T. 1983. Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout. *Aquaculture*. 34: 327-332.
- Gold, J.R.; Kristmundsdottir, A.Y.; Richardson, L.R. 1997. Allozymes and mitochondrial DNA variation in king mackerel (*Scomberomorus cavalla*) from the western Atlantic Ocean and Gulf of Mexico. *Marine Biology*. 129: 221-232.
- Goldberg, Y.P.; McMurray, C.T.; Zeisler, J.; Almqvist, E.; Sillence, D.; Richards, F. 1995. Increased instability of intermediated alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediated alleles in the general population. *Human Molecular genetics*. 4: 1911-1918.
- Goldstein, D.B. y Schlotterer, Ch. 1999. Microsatellites, Evolution and Applications. pp, 1-343. *Oxford University Press.*
- Goudet, J. 1995. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*. 86: 485-486.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Goudet, J.; Raymond, M.; De Meeus, T. y Rousset, F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*. 144: 933-1940.
- Grewe, P.M. y Hampton, J. 1998. An assessment of bigeye (*Thunnus obesus*) population structure in the Pacific Ocean, based on mitochondrial DNA and DNA microsatellites analysis. *CSIRO Marine Research, Hobart, Australia.*
- Guitart, B.; González, E.; Fraga, I.; Reyes, R. 1985. Áreas y épocas de desove de los camarones *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti* en la plataforma cubana. *Revista de Investigaciones Pesqueras*. 10(3-4): 58-76.
- Gustavson-Marjanen, K.I. y Dowse, H.B. 1983. Seasonal and diel patterns of emergence from the red of Atlantic salmon fry. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*. 40: 813-817.
- Hammond, R.L.; Saccheri, I.J.; Ciofi, C.; Coote, T.; Funk, S.M.; McMillan, W.O. 1998. Isolation of microsatellite markers in animals. *En: Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals (eds A. Karp, P.G. Isaac y D.S. Ingram)* pp, 279-285. Chapman and Hall, London.

- Hancock, JM. 1995. The contribution of slippage-like process to genome evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 41: 1038-1047.
- Hancock, JM. 1996a. Microsatellites and other simple sequences in the evolution of the human genome. *En Human Genome Evolution (eds MS Jackson, G. Dover and T. Strachan)*: pp, 191-210. Bios. Oxford University Press.
- Hancock, JM. 1996b. Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays*.18: 421-425.
- Hancock, JM. 1999. Microsatellites and the other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *En: Microsatellites, Evolution and Applications (eds Goldstein, DB. y Schlotterer, Ch.)*: pp, 1-9. Oxford University Press.
- Handford, P. 1980. Heterozygosity at enzyme loci and morphological variation. *Nature*. 286: 261-262 .
- Hansen, M.; Kenchington, E.; Nielsen, E. 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish and Fisheries*. 2: 93-112.
- Harvey, WD. 1990. Electrophoretic techniques in forensics and law enforcement. *En Whitmore, D. H. (ed) , Electrophoretic and isoelectric Focusing Techniques in fisheries management*. pp, 314-321. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Hauser, L. y Ward, RD. 1998. Population identification in pelagic fish: the limits of molecular markers. *En Advances in Molecular Ecology. G.R. Carvalho (Ed)*, pp, 191-224. IOS press.
- Hedgecock, D. y Malecha, S. 1991. Prospects for the application of biotechnology to the development and improvement of shrimp and prawn. *En: Shrimp Culture in North America and The Caribbean* ed. By A. Sandifer, pp. 161-200. Advances in World Aquaculture, Vol 4. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Hedrick, PW. 2001. Invasion of transgenes from salmon or other genetically modified organism into natural populations. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*. 58: 841-844.
- Henderson, ST. y Petes, TD. 1992. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*. 12: 2749-2957.
- Herbinger, CM.; O'Reilly, PT.; Doyle, RW.; Wright, JM.; O'Flynn, F. 1999. Early growth performance of Atlantic Salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture*. 173(1-4): 105-116.
- Hershberger, WK.; Myers, JM.; Iwamoto, RN.; McAuley, WC.; y Saxton AM. 1990. Genetic changes in the growth of coho salmon (*Orcorhynchus kitsutch*) in marine net-pens, produced by ten years of selection. *Aquaculture*. 85:187-197.
- Houle, D. 1989. Allozyme-associated heterosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 123: 789-801.
- Hu, YP.; Lutz, RA.; Vrijenhoek, RC. 1992. Electrophoretic identification and genetic analysis of bivalve larvae. *Marine Biology*. 113: 227-230.
- Huijser, P.; Hennig, W y Dijkhof, R. 1987. Poly(dC-dA/dG-dT) repeats in the *Drosophila* genome: a key function for dosage compensation and position effects? *Chromosome*. 95: 209-215.
- Ibarra-Martín, C.; Vega, R.; Espinosa, R.; Domínguez, R.; Carasa, J. 1978. Atlas de Cuba. pp, 143. Instituto de Geodesia y Cartografía, La Habana, Cuba.
- Ihssen, PE.; Booke, HE.; Casselman, JM.; McGlade, JM.; Payne, NR.; Utter, FM. 1981. Stock identification: materials and methods. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*. 38: 1838-1855.
- Ilyassov, YI. 1987. Genetic principles of fish selection for disease resistance. *En K.Tiew's editor. Proceedings of the world symposium on selection, hybridisation and genetic engineering in aquaculture*. pp, 455-469. H. Heenemann GMBH, Berlin Germany.

- Iyengar, A.; Piyapattanakorn, S.; Heilpel, DA.; Stone, DM.; Howell, BR.; Child, AR. y Maclean, N. 2000. A suite of highly polymorphic microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with potential for use across several flatfish species. *Molecular Ecology*. 9:365-378.
- Jackson, TR; Ferguson, M.; Danzmann, R.; Fishback, A.; Ihssen, P.; O'Connell, M. y Crease, T. 1998. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity*. 80:143-151.
- Jamieson, A. 1973. Genetic tags for marine fish stocks. *En: Sea Fisheries Research (eds Hardin JFR)* pp. 91-99. Elek Science, London.
- Jeffreys, AJ.; Tamaki, K.; MacLeod, A.; Monckton, DG.; Neil, DL.; y Armour, JAL. 1994. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genetics*. 6: 136-145.
- Jones, AG. y Avise, JC. 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.
- Jordan, WC. y Youngson, AF., 1991. Genetic protein variation and natural selection in Atlantic salmon parr. *Journal of Fish Biology*. 39:185-192.
- Jordan, WC.; Youngson, AF. y Webb, JH. 1990. Genetic variation at the malic enzyme-2 locus and age at maturity in sea-run Atlantic salmon. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*. 47: 1672-1677.
- Josupeit, H. 1996. European markets for seabass, seabream and turbot. *Aquaculture Europe*. 20: 6-12.
- Jurka, J. y Pethiyagoda, C. 1995. Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis. *Journal of Molecular Evolution*. 40: 120-126.
- Kapuscinski, ARD. y Lannan, JE. 1984. Application of a conceptual fitness model for managing Pacific salmon fisheries. *Aquaculture*. 43: 135-146.
- Kapuscinski, ARD. y Lannan, JE. 1986. A conceptual genetic fitness model for fisheries management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 43: 1606-1616.
- Kashi, Y. y Soller, M. 1999. Functional role of microsatellites and minisatellites. *En: Microsatellites, Evolution and Applications (eds Goldstein, DB. y Schlotterer, Ch.)*: pp, 11-33. Oxford University Press.
- Kerby, J.; Everson, JM.; Harrell, RM.; Geiger, J.; Starling, CC.; Revels, H. Performance comparisons between diploid and triploid sunshine bass in fresh water ponds. *Aquaculture*. 210 (1-4): 91-108.
- Kincaid, HL. 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture*. 33: 215-227.
- Klibunga, S.; Penman, DJ.; McAndrew, BJ.; Tassanakajon, A.; y Jarayabhand, P. 1998. Genetic variation, population differentiation, and gene flow of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* inferred from mtDNA-RFLP data. *En: Advances in Shrimp Biotechnology*. Ed. by T.W Flegel, pp 51-59. National Center for genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Knibb, W. 2000. Genetic improvement of marine fish-which method for industry? *Aquaculture Research*. 31: 11-23.
- Knowles, P. y Mitton, JB. 1980. Genetic heterozygosity and radial growth variability in *Pinus contorta*. *Silvae Genetica* 29: 114-118.
- Koehn, RK.; Diehl, W. y Scott, TM. 1988. The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clam *Mulinia lateralis*. *Genetics*. 118: 121-130.

- Larkin, PA. 1988. Pacific salmon. *En: Fish population dynamic, J.A. Gulland (Ed).* pp, 153-183. Wiley, Chichester.
- Leary, RF.; Allendorf, FW.; Knudsen, KL. 1984. Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in salmonid fishes. *American Naturalist.* 124: 540-551.
- Lemaire, C.; Allegrucci, G.; Naciri, M.; Bahri-Sfar, L.; Kara, H. 2000. Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Molecular Ecology.* 9: 457-467.
- Lerner, IM. 1954. Genetic homeostasis. Olivier and Boyd eds, Edinburgh, pp, 134.
- Lester, LJ. 1979. Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *The Journal of Heredity.* 70: 175-180.
- Lester, LJ. y Pante MJR. 1992. Genetics of *Penaeus* species. *En: Fast AW, Lester LJ (eds) Marine Shrimp Culture: principles and practices.* pp 29-52. Elsevier Science Publishers, New York, USA.
- Levinson, G. y Gutman, GA. 1987a. High frequencies of short frameshifts in poly Ca/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research.* 15: 5323-5338.
- Levinson, G. y Gutman, GA. 1987b. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution.* 4: 203-221.
- Lie, O.; Danzmann, RG.; Guyomard, R.; Holm, LE., Hoyheim, B.; Powell, R., Slettan, A.; Taggart, J. 1997. Constructing a genetic map of salmonid fishes: SALMAP. *Poster presentation to the Sixth International Symposium on genetics and Aquaculture, 24-28 June, stirling, Scotland.*
- Lindner, KR.; Seeb, JE.; Habicht, C.; Knudsen, KL.; Kretschmer, E.; Reedy, DJ.; Spruell, P.; Allendorf, FW. 2000. Gene-centromere mapping of 312 marker loci in pink salmon by half-tetrad analysis. *Genome.* 43: 1-12.
- Liskauskas, AP. y Ferguson, MM. 1990. Enzyme heterozygosity and fecundity in naturalized populations of Brook trout. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science.* 47: 2010-2015.
- Liskauskas, AP. y Ferguson, MM. 1991. Genetic variation and fitness: a test in a naturalized population of brook trout. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science.* 48: 2152-2162.
- Litt, M. y Luty, JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics.* 44: 397-401.
- Lue, NL.; Buchman, AR.; y Kornberg, RD. 1989. Activation of yeast RNA polymerase II transcription by thymidine-rich upstream element in vitro. *Proceedings of the national Academy of Science of USA.* 86: 486-490.
- Maggioni, R.; Rogers, AD.; Maclean, N.; D'Incaa, F. 2001. Molecular Phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* Shrimp Based on Mitochondrial 16S Partial Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 18 (1): 66-73.
- Mair, GC.; Abucay, JS.; Beardmore, JA. y Skibinski, DOF. 1995. Growth performance of genetically male tilapia (GMT) derived from YY males in *Oreochromis niloticus* L. on station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. *Aquaculture.* 137: 313-322.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research.* 27: 209-220.
- Marshall, TC.; Slate, J.; Kruuk, LEB.; Pemberton, JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology.* 7: 639-655.

- Martínez, J.L. 2000. Desarrollo de marcadores microsatélites en el salmón atlántico y su aplicación al estudio de poblaciones y estrategias reproductivas de salmónidos. *Tesis de doctorado*. Universidad de Oviedo. España.
- McAndrew, B.J.; Ward, R.D.; Beardmore, J.A. 1982. Lack of relationship between morphological variance and enzyme heterozygosity in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Heredity*. 48: 177-125.
- McCarthy, I.; Sánchez, J.A.; Blanco, G. y Houlihan, D. 1996. The relationship between timing of first feeding, genetic heterozygosity and subsequent life history strategy in Atlantic salmon. *The Physiology of Migratory Fish Symposium Proceedings*. pp, 83-90.
- McDowall, R.M. 1988. Diadromy in fishes. *Migrations between freshwater and marine environments*. Croom Helm, London.
- McGoldrick, D.J.; Hedgecock, D.; English, L.; Baoprasertkul, P.; y Ward, R.D. 2000. The transmission of microsatellite alleles in Australian and north American stocks of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research*. 19(2): 779-788.
- Metcalf, N.B. y Thorpe, J.E. 1992. Early predictors of life-history events: the link between first feeding date, dominance and seaward migration in Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*. 41: 93-99.
- Metcalf, N.B.; Huntingford, F.A.; Graham, W.D. y Thorpe, J.E. 1989. Early social status and development of life-history strategies in Atlantic salmon. *Proceedings of Royal Society of London. B* 236: 7-19.
- Metcalf, N.B.; Taylor, A.C.; Thorpe, J.E. 1995. Metabolic rate, social status and life-history strategies in Atlantic salmon. *Animal Behavior*. 49: 431-436.
- Mitton, J.B. 1997. Selection in Natural Populations. Oxford University Press.
- Mitton, J.B. 1978. Relationship between heterozygosity for enzyme loci and variation of morphological characters in natural populations. *Nature*. 273: 661-662.
- Mitton, J.B. 1998. Molecular markers and natural selection. *En Advances in Molecular Ecology. G. R. Carvalho (Ed.)*. pp, 225-241. IOS Press.
- Mitton, J.B. y Grant, M.C. 1984. Association among protein heterozygosity, growth rate and developmental homeostasis. *Annual Review Of Ecology and Systematics*. 15: 479-499.
- Mitton, J.B. y Koehn, R.K. 1985. Shell shape variation in the blue mussel and its association with enzyme heterozygosity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 90:73-80.
- Moller, A.P. 1997. Developmental stability and fitness: a review. *American Naturalist*. 149: 916-932.
- Moller, A.P. 1999. Developmental stability is related to fitness. *American Naturalist*. 153: 556-560.
- Moore, S.S.; Whan, V.; Davis, G.; Byrne, K.; Hetzel, D.; Preston, N. 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 173: 19-32.
- Mork, J.; Solemdal, P.; Sundnes, G. 1983. Identification of marine eggs fish, a biochemical genetic approach. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*. 40:361-369.
- Mulley, J.C. y Latter, B.D.H. 1980. Genetic variation and evolutionary relationship within a group of thirteen species of penaeid prawns. *Evolution*. 34: 904-916.
- Nauta, M.J. y Weissing, F.J. 1996. Constraints on allele size at microsatellite loci: Implications for genetic differentiation. *Genetics*. 143: 1021-1032.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University. Press, New York.

- Nell, JA. 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture*. 210 (1-4): 69-88.
- Nielsen, EE; Hansen, MM.; Loeschcke V. 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, EE; Hansen, MM.; Loeschcke V. 1999. Genetic variation in time and space: Microsatellite analysis of old extinct and extant populations of Atlantic salmon. *Evolution*. 53(1): 261-268.
- Norris, AT.; Bradley, DG.; Cunningham, EP. 2000. Parentage and relatedness determination in farmed atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*. 182: 73-83.
- Olson, RR.; Runstadler, JA.; Kocher, TD. 1991. Whose larvae? *Nature*. 351: 357-358.
- Ovenden, JR. 1990. Mitochondrial DNA and marine stocks assessment: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 41: 835-853.
- Page, RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Palsboll, P.J., Allen, J. y Berude, M. 1997. Genetic tagging of humpback whales. *Nature* 388: 767-769.
- Park, LK. y Moran, P. 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 4: 272-299.
- Parker, A. y Kornfield, I. 1996. Polygynandry in *Pseudotropheus zebra*, a cichlid fish from lake Malawi. *Environmental Biology of fishes* 47: 345-352.
- Pemberton, JM.; Coltman, DW.; Coulson, TN.; Slate, J. 1999. Using microsatellites to measure the fitness consequences of inbreeding and outbreeding. En: *Goldstein D B, Schlötterer C (eds) Microsatellites: Evolution and Applications*. pp, 151-164. Oxford University Press.
- Pemberton, JM.; Slate, J.; Bancroft, DR.; y Barrett JA. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*. 4: 249-52.
- Pérez-Enriquez, R.; Takagi, M.; Taniguchi, N. 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.
- Pérez-Farfante, I. 1969. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. *US Fish Wild Service Bulletin*. 67: 461-591
- Pérez-Farfante, I., y Kensley, B. F. 1997. Peaneoid and Serges-toid shrimps and prawns of the world: Keys and diagnoses for the families and genera. *Me'm. Mus. Natl. Hist. Nat.* 175: 1-233.
- Pineda, H.; Vázquez, E., Blanco G.; y Sánchez, J.A., 1999. Variabilidad de loci microsatélites en salmón atlántico (*Salmo salar L.*). *Actualidad Biológica*. 21: 19-28.
- Pogson, GH.; Mesa, KA.; Boutilier, RG. 1995. Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLPs loci. *Genetics*. 139: 375-385.
- Pogson, GH. y Fevolden, SE. 1998. DNA heterozygosity and growth rate in the Atlantic Cod *Gadus morhua (L.)*. *Evolution*. 52 : 915-920.
- Pollard, SM.; Danzmann. RG. y Claytor, RR.. 1994. Association between regulatory locus PGM-1r\* and life-history types of juvenile Atlantic salmon. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*. 51: 1322-1329.
- Pongsomboon, S.; Whan, V.; Moore, SS.; Tassanakajon, A. 2000. Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Science Asia*. 26: 1-8.

- Presa, P. y Guyomard, R. 1996. Conservation of microsatellites in three species of Salmonids. *Journal of Fish Biology*. 49: 1326-1329.
- Primmer, CR.; Ellegren, H.; Saino, N.; y Moller, AP. 1996. Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nature Genetics*. 13: 391-393.
- Ptashne, M. 1988. How eukaryotic transcriptional activators work? *Nature*. 335: 683-689.
- Queller, DC. y Goodnight, KF. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*. 43: 258-275.
- Quinteiro, J.; Sotelo, CG.; Rehbein, H.; Pryde, SE.; Medina, I.; Pérez-Martin, RI.; Rey-Méndez, M.; Mackie, IM. 1998. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Biochemistry*. 46: 1662-1669.
- Ramos, MD. 1998. Polimorfismo en loci enzimáticos y microsatélites de locus único en salmón atlántico, *Salmo salar* (L). *Tesis de doctorado*. Universidad de Oviedo.
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.
- Rice, WR. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225.
- Rico, C.; Rico, I y Hewitt, G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 263: 549-557.
- Rothuizen, J.; Wolfswinkel, J.; Lenstra, JA.; y Frants, RR. 1994. The incidence of minisatellite and microsatellite repetitive DNA in the canine genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 89: 403-406.
- Rowe, G. y Beebee, TJC. 2001. Fitness and microsatellite diversity estimates were not correlated in two outbreed anuran populations. *Heredity*. 87: 558-565.
- Rowe, G.; Beebee, TJC.; Burke, T. 1999. Microsatellite heterozygosity, fitness and demography in natterjack toads *Bufo calamita*. *Animal Conservation*. 2 : 85-92.
- Rubinsztein, DC. 1999. Trinucleotide expansion mutations cause diseases which do not conform to classical mendelian expectations. *En: Microsatellites, Evolution and Applications (eds Goldstein, DB. y Schlotterer, Ch.):* pp, 80-97. Oxford University Press.
- Rubinsztein, DC.; Amos, W.; Leggo, J.; Goodburn, S.; Ramesar, RS.; Old, J. 1994a. Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. *Nature Genetics*. 7: 525-530.
- Rubinsztein, DC.; Leggo, J.; Amos, W.; Barton, DE.; y Ferguson-Smith, MA. 1994b. Myotonic dystrophy CTG repeats and the associated insertion/deletion polymorphism in human and primate populations. *Human Molecular Genetics*. 3: 2031-2035.
- Ruzzante, DE.; Taggart, CT. y Cook, D. 1998. A nuclear DNA basis for shelf- and bank-scale population structure in NW Atlantic cod (*Gadus morhua*): Labrador to Georges Bank. *Molecular Ecology*. 7: 1663-1680.
- Ruzzante, DE.; Taggart, CT.; Cook, D.; Goddard, SV. 1997. Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua*) off Newfoundland: a test and evidence of temporal stability. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54: 2700-2708.
- Ryman, N. 1991. Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology*. 39 (A): 211-224.
- Sakamoto, T.; Danzmann, RG.; Gharbi, K.; Howard, P.; Ozaki, A.; Khoo, SK.; Guyomard, R.; Hoyheim, B. 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Orcorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics*. 155: 1331-1345.

- Sánchez, JA.; Blanco, G.; Vázquez, E.; García, E. y Rubio, J. 1991. Allozyme variation in natural populations of Atlantic salmon in Asturias (northern Spain). *Aquaculture*. 93: 291-298.
- Sánchez, JA.; Clabby, C.; Ramos, D.; Blanco, G.; Flavin F.; Vazquez, E. y Powell, R. 1996. Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon). *Heredity*. 77: 423-432.
- Sánchez, JA.; Ramos, MD.; Pineda, H.; Borrell, YJ.; Vázquez E. y Blanco, G. 2000. The application of genetic variation at microsatellite loci in atlantic salmon (*Salmo salar* L) stock identification. *ICES. C. M 2000/Y:06*.
- Sánchez, JA.; Vazquez, E.; Blanco, G. 1994. Relationships between genetic variability and precocious maturity and smolting in Atlantic salmon. *ICES C.M. M 27*. pp, 12.
- Savolainen, O. y Hedrick, P. 1995. Heterozygosity and fitness: no association in Scots pine. *Genetics*. 140: 755-766.
- Schlotterer, Ch. y Wiehe, T. 1999. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. *En: Microsatellites, Evolution and Applications (eds Goldstein, DB. y Schlotterer, Ch.)*: pp, 238-248. Oxford University Press.
- Schug, MD.; Mackay, TFC.; y Aquadro, CF. 1997. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*. 15: 99-102.
- Schug, MD.; Wetterstrand, KA.; Gaudette, MS.; Lim, RH.; Hutter, CM. y Aquadro, CF. 1998. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*. 7: 57-69.
- Seeb, LW.; y Kendall, AW. 1991. Allozymes polymorphism permit the identification of larval and juvenile rockfishes of the genus *Sebastes*. *Environmental Biology of Fishes*. 30: 191-201.
- Selvamani, MJP.; Degnan, SM. y Degnan, BM. 2001. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture. *Marine Biotechnology* 3: 478-485.
- Shaklee, JB. y Keenan, CP. 1986. A practical laboratory guide to the techniques and methodology of electrophoresis and its application to fish fillet identification. *CSIRO Mar. Lab. Report 177, CSIRO, Hobart, Australia*.
- Shaw, PW.; Turan, C.; Wright, JM.; O'Connell, M. y Carvalho, G. 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. *Heredity*. 83: 490– 499.
- Sick, K. 1961. Haemoglobin polymorphism in fishes. *Nature*. 192: 894-896.
- Slettan, A.; Olsaker, I. y Lie, O. 1993. Isolation and characterization of variable (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Animal Genetics*. 24: 195-197.
- Slettan, A.; Olsaker, I. y Lie, O. 1995. Atlantic salmon, *Salmo salar* L, microsatellites at the SSOSL311, SSOSL417, SSOSL85, SSOSL25 loci. *Animal Genetics* . 26: 277-285.
- Smith, GP. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*. 191: 528-535.
- Smith, PJ.; Jamieson, A.; Birley, AJ. 1990. Electrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. *Journal du Conseil International d'Exploration Du Mer*. 47: 231-245.
- Stahl, G. 1987. Genetic population structure of Atlantic salmon. *En: Ryman, N. and Utter, F., (eds) Population Genetics and Fishery management*. pp, 121-140. University of Washintong press, Seattle.
- Stallings, RL. 1992. CpG suppression in vertebrate genomes does not account for the rarity of (CpG)<sub>n</sub> microsatellite repeats. *Genomics*. 17: 890-891.

- Stallings, RL. 1994. Distribution of trinucleotide microsatellites in different categories of mammalian genomic sequence: implication for human genetic diseases. *Genomic*. 21: 116-121.
- Stanley, JG.; Allen, SK.; Hidu, H. 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*. 23: 1-10.
- Strand, M.; Prolla, TA.; Liskay, RM.; Peters, TD. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutation affecting DNA mismatch repair. *Nature*. 365: 274-276.
- Streelman, JT. y Kocher, TD. 2002. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenge tilapia. *Physiology Genomics*. 9: 1-4.
- Streisinger, G.; Okada, Y.; Emrich, J.; Newton, J.; Tsugita, A.; Terzaghi, E. 1966. Frameshift mutation and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 31: 77-84.
- Su, GS.; Liljedabl, LE.; Gall, GAE. 1996. Effects of inbreeding on growth and reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 142: 139-148.
- Suen, TC. y Hung, MC. 1990. Multiple cis- and trans-acting elements involved in regulation of the neu gene. *Molecular and Cellular Biology*. 10: 6306-6315.
- Summers, K. y Amos, B. 1997. Behavioral ecological and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. *Behavioral Ecology*. 8: 260-267.
- Swofford, DL . y Selander, B. 1989. BYOSIS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in populations genetics and systematics. *Journal of Heredity*. 72: 282-302.
- Takezaki, N. y Nei, M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite data. *Genetics*. 144: 380-399.
- Tassanakajon, A.; Supangul, P.; Klinbunga, S.; Jarayabhand, P.; Boosaeng, V. 1998b. Microsatellite variation in wild populations of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. *En: Agricultural Biotechnology: Laboratory, Field and Market* ed. by P. Larkin. pp, 255-257. Proceedings of the 4<sup>th</sup> Asia-Pacific conference on Agricultural Biotechnology. CPN Publications, Canberra.
- Tassanakajon, A.; Tiptawonnukul, A.; Supangul, P.; Rimphanitchayakit, V.; Cook, D.; Jarayabhand, P.; Klinbunga, S. y Boosaeng, V. 1998a. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 7: 55-61.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of single sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleid Acids Research*. 17: 6463-6471.
- Tautz, D.; Trick, M.; y Dover, GA. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*. 322: 652-656.
- Thelen, GC. y Allendorf, FW. 2001. Heterozygosity- fitness correlation in rainbow trout: Effects of allozyme loci or associative overdominance? *Evolution*. 55(6):1180-1187.
- Thorpe, JE. y Morgan, R. 1978. Parental influence on growth rate, smolting rate and survival in hatchery reared juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*. 13: 549-556.
- Thorpe, JE.; Metcalfe, NB. y Huntingford, FA. 1992. Behavioural influences on life-history variation in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Environmental Biology of Fishes*. 33: 331-340.
- Torrison, KR. 1991. Genetic variation in growth rates with different trypsin-like isozymes patterns. *Aquaculture*. 93: 299-312.

- Valle, G. 1993. TA-repeat microsatellites are closely associated with ARS consensus sequences in yeast chromosome III. *Yeast*. 9: 753-759.
- Vázquez, E.; Presa, P.; Sánchez, JA.; Blanco, G.; Utter, F. 1988. Relationship between biochemical heterozygosity and morphological variability in a stock of *Salmo salar* L. *Revista de Biología de la Universidad de Oviedo*. 6: 3-15.
- Vespoor, E. 1988. Identification of stocks in the Atlantic salmon. En: Stroud, R. H. (Ed) *Proceeding of the Symposium on future Atlantic salmon management*. pp, 37-46. Marine Recreational Fisheries Series. Savannah. USA.
- Vrijenhoek, RC. 1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*. 53 (A): 394-412.
- Walsh, PS.; Metzger, DA. y Higuchi, R. 1991. Chelex<sup>R</sup> 100 as a médium for simple extraction of DNA for PCR-based typing form forensic material. *Biotechnics*. 10: 506-510.
- Ward, RD. 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia*. 420: 191-200.
- Ward, RD.; Elliot, NG.; Grewe, PM. 1995. Allozyme and mitochondrial DNA separation of Pacific northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus orientalis* (Temminck and Schlegel), from southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 46: 921-930.
- Ward, RD.; Elliot, NG.; Innes, BH.; Smolenski, AJ.; Grewe, PM. 1997. Global population structure of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) inferred from allozymes and mitochondrial DNA variation. *Fishery Bulletin US*. 95: 566-575.
- Ward, RD.; Elliott, NG.; Grewe, PM. 1994b. Allozyme and mitochondrial DNA variation in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the Pacific Ocean. *Marine Biology*. 118: 531-539.
- Ward, RD.; Woodwark, M.; y Skibinski, DOF. 1994a. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fish. *Journal of Fish Biology*. 44: 213-232.
- Weber, JL. y May, PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*. 44: 388-396.
- Weber, JL. 1990. Informativeness of Human (dC-dA)<sub>n</sub>. (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*. 7: 524-530.
- Weber, JL. y Wong, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*. 2: 1123-1128.
- Wierdl, M.; Dominska, M. y Petes, TD. 1997. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*. 146: 769-779.
- Wolfus, GM.; García, GK.; Alcivar-Warren A. 1997. Application of the microsatellites technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*. 152: 35-47.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. 28: 114-138.
- Xu, Z.; Dhar, AK.; Wyrzykowski, J.; y Alcivar-Warren, A. 1999. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon* ). *Animal Genetics*. 30: 150-156.
- Xu, Z.; Primavera, JH.; De la Pena, L.; Petit, P.; Belak, J. y Alcívar-Warren, A. 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black Tigre Shrimp (*Penaeus monodom*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*. 199: 13-40.
- Yearsley, KG.; Last, PR.; Ward, RD. 1999. Australian sea-food handbook: domestic species. *CSIRO Division of marine Research, CSIRO, Hobart, Australia*.
- Zheng, L.; Collins, FH.; Kumar, V. y Kafatos, FC. 1993. A detailed genetic map for the X chromosome of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science*. 261: 605-608.

- Zhivotovsky, LA.; Feldman, MW.; y Grishechkin, SA. 1997. Biased mutation and microsatellite variation. *Molecular Biology and Evolution*. 14: 926-933.
- Zouros, E. 1993. Associative overdominance: evaluating the effects of inbreeding and linkage disequilibrium. *Genetica*. 89: 35-46.
- Zouros, E. y Foltz, DW. 1987. The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis. *Isozymes: Current Topics in Biological Medical Research*. 13: 1-59.
- Zouros, E. y Pogson, GH. 1994. Allozymes and RFLP's heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus*: a test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics*. 137: 221-231.

**Anexo 1. Descripción de los loci microsatélites utilizados en esta Tesis de Doctorado.**

Locus	Especie	Oligonucleótidos	Secuencia repetida	Hibridación (°C)	Fuente
<b>Rodaballo</b>					
Smax-01	<i>S. maximus</i>	ATTCTATCATATGCAGATGG CACAAGTAATCTCCCAACTG	(TG) <sub>n</sub>	56	Coughlan y col., 1998
Smax-02	<i>S. maximus</i>	AGACATATGGGAGATGGAGG AGAGCAGGTCATTATACAGC	(TG) <sub>n</sub>	56	<i>idem</i>
Smax-03	<i>S. maximus</i>	GACGGAGTGATGTTAACTGG TCAGAACTACAGGTGGTCTC	(AC) <sub>n</sub>	58	<i>idem</i>
Sma3-8	<i>S. maximus</i>	CCCTCCGTCAGACAAAGAG GACGAAGTTAATGTTTCATTG	(GT) <sub>n</sub> X(CT) <sub>n</sub>	56	Estoup y col., 1998
Sma3-12	<i>S. maximus</i>	CACAATTGAATCACGAGATG GCCACCACTGCGTAACAC	(TG) <sub>n</sub>	58	<i>idem</i>
Sma3-129	<i>S. maximus</i>	GCACTGCCTTTTCATTGG CAGCTCTAGATTGTTTATCCC	(GT) <sub>n</sub>	58	<i>idem</i>
Sma3-125	<i>S. maximus</i>	CACACCTGACAAAGCTCAAC GCTGAACATTTTCATGTTGATAG	(TAGA) <sub>n</sub> X(TG) <sub>n</sub>	58	<i>idem</i>
F1-OCA19	<i>S. maximus</i>	AGTTACACCAGTGCACAGAG CCAGGCCATCCACATTTAAC	(CA) <sub>n</sub>	56	Iyengar y col., 2000
<b>Salmón atlántico.</b>					
SsaD30	<i>S. salar</i>	AGCAGTAAAGAGAGAGACTG TGTTGACTTCCTTCCCAAG	(TC) <sub>n</sub>	50	Sánchez y col., 1996
SsaF43	<i>S. salar</i>	AGCGGCATAACGTGCTGTGT GAGTCACTCAAAGTGAGGCC	(CA) <sub>n</sub>	65-60-55	<i>idem</i>
Ssa1337	<i>S. salar</i>	ACCTGCCCACTGACTTGGTT CCAAGGCCTACACTTACCTA	(CCTT) <sub>n</sub>	65-60	<i>idem</i>
Ssa2019	<i>S. salar</i>	CTAGTTTCCCAAGCACAGCC TCAACCTGGTCTGCTTCGAC	(AC) <sub>n</sub>	65-60	<i>idem</i>
SSOSL417	<i>S. salar</i>	TTGTTTCAGTGTATATGTGCCAT GATCTTCACTGCCACCTATGACC	(TG) <sub>n</sub>	50	Slettan y col., 1995
SSOSL311	<i>S. salar</i>	TAGATAATGGAGAACTGCATTCT CATGCTTCATAAGAAAAAGATTGT	(TG) <sub>n</sub>	55	<i>idem</i>
SSOSL1.14	<i>S. salar</i>	GTCAGGTCGTTACGGATGGATTGG CTTCTGTCTGACGCGGCTCTGC	(TG) <sub>n</sub>	65-60-55	Slettan y col., 1993
<b>Trucha común.</b>					
Str15	<i>S. trutta</i>	GCAGGCAGACGGATCAGGC AATCCTCTACTGAAGGGATTGTC	(GA) <sub>n</sub>	65-60	Presa y Guyomard, 1996
Str543	<i>S. trutta</i>	ATTCTTCGGCTTTCTCTTGC ATCTGGTCAGTTCTTTATG	(GA) <sub>n</sub>	55	<i>idem</i>
<b>Camarón blanco.</b>					
Lsch-1	<i>L. schmitti</i>	GGCTTCTATGTGTGCTTCTC GAGGTGGTTACATATTTGCACGC	(GT) <sub>n</sub>	60-58	(Espinosa y col., 2001)
Lsch-2	<i>L. schmitti</i>	TAAGGCGATTGGTTACAGT TTAGTCATTATGAACGAATG	(CTTT) <sub>n</sub> (CTTTT) (CTTTT) <sub>n</sub> (CATT) <sub>n</sub> (CATG) <sub>n</sub> (CATT) <sub>n</sub>	50-48	<i>idem</i>
Lsch-3	<i>L. schmitti</i>	GTCTCACCCATTTAGAACCAG GGTATATCAAGATGGCGACTTCC	(CT) <sub>n</sub> TC(CT) <sub>n</sub> TC (CT) <sub>n</sub> T(CCT) <sub>n</sub> G(CCT)	60-58	-
Pse002	<i>L. setiferus</i>	CTGAAATACAACCACTTTGC CGGATTTCGTGCTTGAGGG	(AC) <sub>n</sub>	55	(Ball y col., 1998)
Pse004	<i>L. setiferus</i>	GATCACGTGACTCTGCAAAG CGTTCAGATTGTCAACTTCGCG	(GT) <sub>n</sub> AT(GT) <sub>n</sub>	50	<i>idem</i>
Pse028	<i>L. setiferus</i>	GATCCTTCTAGCTAAATGGG GATCGAAGGTAAACTTTATTATC	(CA) <sub>n</sub>	54	<i>idem</i>
Pse036	<i>L. setiferus</i>	GACTTTGTATTTTCATAAACGCTG CGCTATATTTTCGAGTAAGGCTAC	(AC) <sub>30</sub>	62	<i>idem</i>
M-1	<i>L. vannamei</i>	GTGTGTTGCGGAATCGAA CTAACCCAATATCGAATC	(CTTT)X(CTTT) <sub>4</sub> X(CTTT)X(CTTT) <sub>5</sub> X(CTTT)X(CTTT) X(CTTT)X(CTTT) <sub>3</sub>	52	(Wolfus y col., 1997)



## ***Anexo 2. Estudios publicados, ó en vías de publicación, relacionados con esta Tesis de Doctorado.***

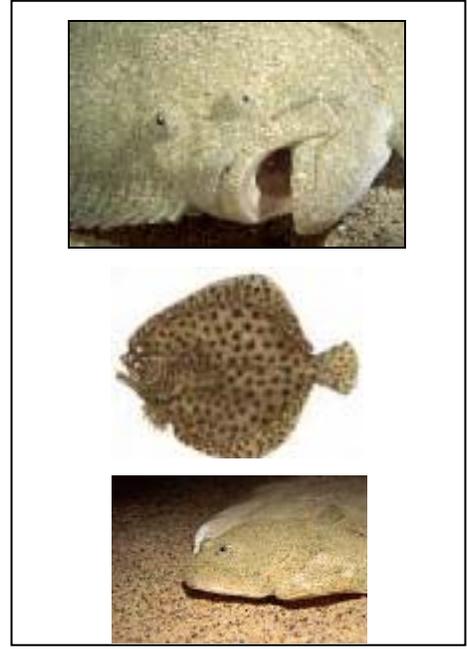
- Sánchez, JA.; Ramos, MD.; Pineda, H.; Borrell, Y.; Vázquez E. y Blanco, G. 2000. The application of genetic variation at microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar L*) stock identification. CM 2000/Y:06.
- Espinosa, G.; Jager, M.; García-Machado, E.; Borrell, Y.; Corona, N.; Barcía, A.; y Deutsh, J. 2001. Microsatellites from the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda). Biotecnología Aplicada. 18(4):19-22.
- Borrell, Y.; Álvarez, J.; Vázquez, E.; Sánchez J.A.; Fernández Pato, C.; Martínez Tapia, C. & Blanco, G. 2002. Aplicación preliminar de marcadores microsatélites a los programas de cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus L*). Boletín del Instituto Español de Oceanografía. 2002. 18(1-4): 203-209.
- Borrell, Y.; Vázquez, E.; Sánchez, J.A. & Blanco, G. 2002. Esclarecimiento de relaciones de parentesco en *Salmo salar (L)* utilizando loci microsatélites. Boletín del Instituto Español de Oceanografía. 2002. 18(1-4): 211-220.
- Espinosa, G., Díaz, R., Matos, J., Becquer, U., Romo, J. y Borrell, Y. Análisis poblacional del camarón blanco *Litopenaeus schmitti* utilizando aloenzimas como marcadores genéticos. Revista de Investigaciones Marinas. 2003. 24(1): 11-16.
- Pineda, H.; Borrell, Y.; McCarthy, I.; Vázquez, E.; Sánchez, JA. y Blanco, G. Timing of first feeding and life-history strategies in salmon: Genetic Data. Hereditas. 2003. 139: 41-48.
- Borrell, Y.; Blanco, G.; Vázquez, E.; Alvarez, J.; Pineda, H.; Espinosa, G.; Fernández-Pato, C.; Martínez, C. y Sánchez, J.A. La variabilidad microsatélite y sus aplicaciones en la Acuicultura. CIVA 2003: 1042-1056.
- Borrell, Y.; Pineda, H.; McCarthy, I.; Vázquez, E.; Sánchez, J.A. y Blanco, G. Heterozygosity-fitness correlations. Some data in Atlantic salmon. Heredity. 2004. 92:586-593.
- Borrell, Y.; Álvarez, J. ; Vázquez, E.; Sánchez J.A.; Fernández Pato, C.; Martínez Tapia, C. & Blanco, G. Applying microsatellites to the managing of farmed turbot stocks (*Scophthalmus maximus L*). Aquaculture. 2004. 241:133-150.
- Borrell, Y.; Espinosa, G.; Romo, J.; Vázquez, E.; Sánchez, JA.; y Blanco, G. DNA microsatellites variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp *Litopenaeus schmitti*. Marine Biology. 2004. 144: 327-333.



*Anexo 3. Fotografías de las especies utilizadas para los análisis genéticos en esta Tesis de Doctorado.*



*Salmo salar (L).*  
Salmón Atlántico.



*Scophthalmus maximus (L).*  
Rodaballo.



*Litopenaeus schmitti.*  
Camarón blanco.

**Tesis Doctoral:**

Loci microsatélites como marcadores genéticos para la mejora del rendimiento en acuicultura de especies marinas.

**Autor:**

Yaisel Juan Borrell Pichs.

**Tutores:**

Dra. Gloria Blanco Lizana

Dr José Antonio Sánchez Prado

Dra Emilia Vázquez Menéndez

**FE DE ERRATAS**

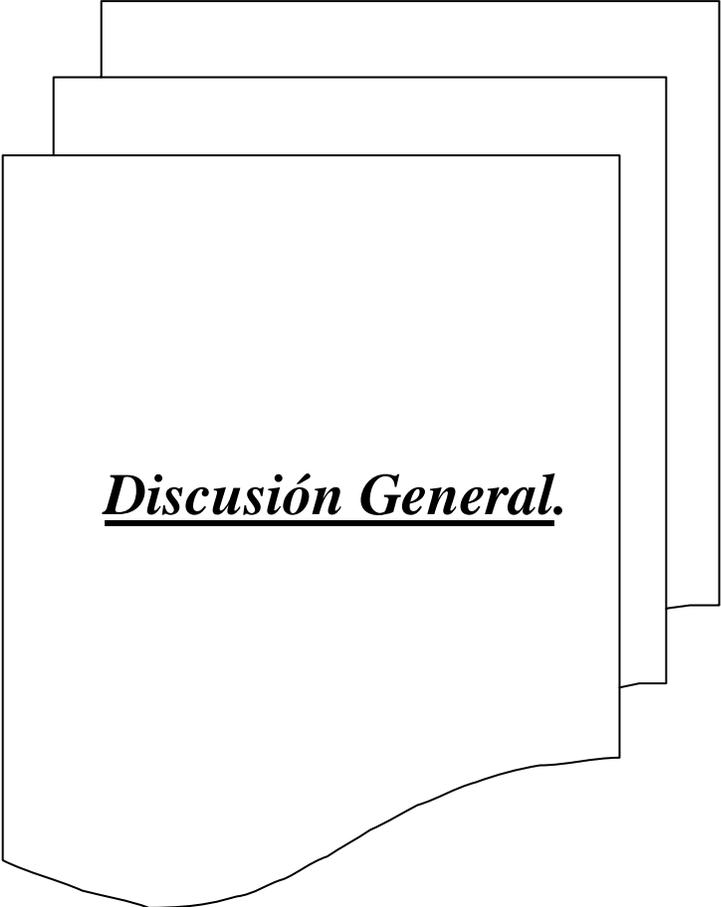
- En la página 25, primer párrafo, línea 5; donde dice *constribuyó*, debe decir contribuyó.
- En la página 26, primer párrafo, línea 2; donde dice *por para*, debe decir para.
- En la página 26, segundo párrafo, línea 3; donde dice *varias*, debe decir varios.
- En la página 47, tabla 10; donde dice *35 (15-19)*, debe decir *34 (15-19)*.
- En la página 49, leyenda Figura 4; donde dice *5 loci microsatélites*, debe decir 8 loci microsatélites.
- En la página 78, primer párrafo, línea 6; donde dice *En el grupo PTE, se encontraron nueve alelos exclusivos*; debe decir se encontraron nueve alelos exclusivos en cuanto a momento de primera alimentación activa.
- En la página 78, tercer párrafo, línea 6; donde dice *(en PTE 9 alelos)*; debe decir (9 alelos exclusivos en cuanto a momento de primera alimentación activa).
- En la página 115, primer párrafo, línea 7; donde dice “*cuantitativos*”; debe decir cuantitativos.
- En la página 115, primer párrafo, línea 8; donde dice *cualitativamente*; debe decir cuantitativamente.

## **Nota:**

Se anexa un texto en forma de Discusión General para la homologación en Cuba del Título de **Doctor** al autor Yaisel Juan Borrell Pichs.

Tesis Doctoral: “*Loci microsatélites como marcadores genéticos para la mejora del rendimiento en acuicultura de especies marinas*”.

Tutores: Dra. Gloria Blanco, Dr. José Antonio Sánchez y Dra. Emilia Vásquez.  
Universidad de Oviedo. España. 2002



**Discusión General.**

La aplicación de la genética al manejo de poblaciones naturales ó cultivadas de especies marinas ha experimentado en los últimos años un importante incremento a partir de la utilización de los loci microsatélites (Estoup y Angers, 1998). Los altos niveles que estos exhiben en cuanto a polimorfismo y número en los genomas de todas las especies, además de su amplia distribución en cuanto a localización genómica, han contribuido a que prácticamente en todos los trabajos que abordan estudios sobre conservación biológica, ecología, conducta, rendimiento de poblaciones cultivadas, entre otros, hayan sustituido a las enzimas como marcadores genéticos de elección y hayan sido descritos para casi todas las especies (Goldstein y Schlotterer, 1999). En esta tesis se pretende comprobar la utilidad de esa variación microsatélite en determinados aspectos concretos que incidirían directamente en la mejora del rendimiento en acuicultura de especies marinas que presentan un alto valor económico. Los aspectos abordados están relacionados con la aplicación de estudios de parentesco ó la búsqueda de marcadores genéticos relacionados con caracteres de interés en especies en cultivo y además, con la caracterización de poblaciones naturales que constituyen la base de la producción por acuicultura en aquellas especies donde los ciclos de producción no están cerrados, donde fenómenos naturales ó epidemias destruyen los bancos de reproductores establecidos ó donde el manejo para generar descendientes y nuevos reproductores ha provocado importantes procesos endogámicos (Hedgecock y Malecha, 1991; Benzie, 2000).

En los loci microsatélites se han encontrado altas tasas de mutación; desde  $10^{-6}$  en *Drosophila* (Schug y col., 1997) hasta  $10^{-2}$  en *E.coli* (Levinson y Gutman, 1987a); lo que determina el que aparezca una gran diversidad alélica en los análisis de poblaciones. Sin embargo, se encuentran loci microsatélites con niveles de variabilidad bajos, medios y altos y esta característica es de importancia en el momento de seleccionar que tipo de loci utilizar para abordar una problemática concreta. De esta forma Hedrick (1999) ha sugerido mayor utilidad de los loci microsatélites con niveles de polimorfismo medios (7-10 alelos) en los análisis de poblaciones naturales, mientras que en estudios genéticos aplicados al cultivo se recomiendan mayores niveles de polimorfismo (Blouin y col., 1996; Estoup y col., 1998).

La necesidad de loci microsatélites con niveles de variabilidad medios en los análisis genéticos de poblaciones naturales, parte de la influencia que sobre los resultados tienen los tamaños de muestras habitualmente utilizados. Así, cuando se analizan 40-50 individuos por población para loci microsatélites con más de 20 alelos, las frecuencias alélicas encontradas son bajas aún para los alelos mayoritarios en las poblaciones (los alelos más frecuentes en los

loci Pse028 y Pse036 analizados en poblaciones cubanas de *L.schmitti* tienen frecuencias por debajo de 0,200, Apartado V, Tabla 1). La presencia de muchos alelos en bajas frecuencias en las poblaciones origina contradicciones en algunas ocasiones entre los resultados obtenidos con muestreos temporales de las mismas poblaciones, detectándose inestabilidades de frecuencias génicas que no se deben a cambios genéticos en las poblaciones sino a efectos de muestreo (Fernández, 1999; Hedrick, 1999). Lo mismo ocurre con los constantes hallazgos de deficiencias de heterocigotos para loci con altos niveles de variabilidad en los análisis de poblaciones naturales (Pongsomboon y col., 2000; Xu y col., 2001). Estos desequilibrios de Hardy-Weinberg, cuando aparecen en la mayoría de los loci analizados, pueden deberse también a la utilización de muestras pequeñas en los experimentos (Pongsomboon y col., 2000). No obstante hay que tener en cuenta que se pueden obtener los mismos resultados (deficits de heterocigotos) cuando se estudian mezclas de poblaciones ó poblaciones subestructuradas (Marshall y col., 1998) ó cuando en algún locus, en particular, aparecen alelos nulos (Pemberton y col., 1995; McGoldrick y col., 2000). En el caso del camarón blanco el locus Pse028 presenta en todas las poblaciones estudiadas un déficit significativo de heterocigotos y frecuencias estimadas para posibles alelos nulos significativamente grandes, siendo esta la causa que con mayor probabilidad podría atribuirse al desequilibrio genético que exhiben las poblaciones de *L.schmitti* (Apartado V, Tabla 2).

Cuando se intenta comparar composiciones genéticas entre poblaciones utilizando loci microsatélites con altos niveles de variabilidad, aparecen alelos exclusivos en bajas frecuencias que son por lo tanto poco útiles para utilizarlos como marcadores genéticos de población. Este es el caso de la caracterización genética de poblaciones de camarón blanco llevada a cabo en este trabajo donde se encontraron 13 alelos exclusivos pero todos en baja frecuencia (un 77% de ellos en los loci Pse028 y Pse036, Apartado V, Tabla 1) y lo mismo ha ocurrido previamente en estudios con salmón atlántico (Ramos, 1998, Fernández, 1999) y en trucha común (Cagigas y col., 1999; Corujo, 1999). Por otra parte el locus Lsch-1 (6 alelos en este trabajo) aparece como el que más contribuye a detectar diferenciación genética entre poblaciones (ver apartado V, Tabla 3), encontrándose una inversión significativa de frecuencias de alelos mayoritarios entre los grupos de poblaciones Batabanó-Manzanillo y Cienfuegos-Tunas de Zaza (Apartado V, Tabla 1). De esta forma en nuestro trabajo con el número de individuos analizados por población (más de 40 individuos como media), los loci con niveles de variabilidad medios parecen ser de mayor utilidad en la caracterización genética de las mismas. La utilización de tamaños grandes de muestras en los análisis genéticos de

poblaciones naturales puede ser un requisito indispensable para que la alta variabilidad que ostentan loci como Pse028 y Pse036 aporte información significativamente diferente a la que se puede obtener en caracterizaciones poblacionales llevadas a cabo con enzimas ó con loci microsatélites menos variables y tamaños muestrales más pequeños, por lo general más accesibles en los estudios genéticos (Fernández, 1999).

Los loci microsatélites con altos niveles de variabilidad pueden tener sin embargo una aplicación concreta en algunos aspectos de interés en el manejo de poblaciones naturales. Tal es el caso del marcaje genético de individuos en especies en peligro de extinción donde Palsboll y col. (1997) y Cipriano y Palumbi (1999) han investigado conductualmente a ballenas identificadas mediante composiciones genotípicas microsatélites; ó en trabajos publicados sobre conductas de apareamiento en otras especies (Parker y Kornfiel, 1996; Jones y Avise, 1997). Finalmente, en la adscripción de individuos a poblaciones de origen en las pesquerías la alta variabilidad de los loci microsatélite juega un papel fundamental (ver Sánchez y col., 2000) y de ahí el interés que los loci Pse028 y Pse036 podrían tener en el caso del camarón blanco *L. schmitti* (Apartado V, Tabla 5).

En los estudios genéticos aplicados al cultivo es indispensable utilizar loci microsatélites con altos niveles de variabilidad. La alta variabilidad y la codominancia permitirían establecer pedigríes en el cultivo (Marshall y col., 1998; Estoup y Angers, 1998) y además inferir relaciones de parentesco entre reproductores de los cuales no se conoce su origen, esto último a través de índices que a partir de la composición genotípica microsatélite, reflejen la similitud genética entre ellos (Queller y Goodnight, 1989). También permitiría implementar programas de selección genética asistidos por marcadores moleculares (MAS). Actualmente los cultivadores utilizan el marcaje físico (imposible en edades tempranas) ó el cultivo en estanques separados de las descendencias (costoso en recursos y espacio) para llevar a cabo programas de selección; utilizando estas metodologías se han enfrentado a la creación de sus bancos de reproductores para establecer cultivos estables, ignorando a veces si desde el mismo punto de partida los individuos de la generación cero están comprometidos en cuanto a la existencia de relaciones de parentesco entre ellos ó si la existencia de una ínfima variabilidad genética impedirá posteriormente llevar a cabo una estrategia de selección genética exitosa.

En esta tesis se llevó a cabo un estudio preliminar de parentesco en salmón atlántico donde siete loci microsatélites con niveles de variabilidad medios (2-10 alelos) y que han contribuido significativamente al estudio genético de poblaciones asturianas de la especie (Sánchez y col., 1996; 2000; Ramos, 1998; Pineda y col., 1999), aportan muy poco en los estudios de

parentesco en un escenario en el cual las asignaciones tuvieran que realizarse entre altos números de posibles genitores (las asignaciones de paternidad entre 10 padres son correctas en un 80%, pero en las simulaciones con mayor número de padres candidatos las asignaciones correctas disminuyen hasta un 30%-50%; Apartado III.2). Sin embargo, Norris y col. (2000) seleccionando ocho loci microsatélites con altos niveles de variabilidad (10-29 alelos por locus) logran asignaciones correctas de paternidad de más del 95% en la misma especie y una discriminación absoluta entre individuos emparentados y no emparentados a través del uso de los coeficientes de relación genética.

Para el caso del rodaballo *Scophthalmus maximus* en esta tesis se han seleccionado, en la literatura, ocho loci microsatélites descritos con altos niveles de polimorfismo ( $PIC > 0,700$ ) y se ha ensayado su utilidad en las asignaciones de paternidad y en la inferencia de relaciones de parentesco entre individuos con origen desconocido en diferentes estaciones para el cultivo de la especie. Los resultados obtenidos (Apartado III.1), confirman la necesidad de altos niveles de polimorfismo, elemento que a través de simulaciones ya había sido sugerido (Blouin y col., 1996; Estoup y Angers, 1998; Estoup y col., 1998). No obstante, en nuestro estudio se han encontrado varios elementos, además de la alta variabilidad genética, que deben ser tenidos en cuenta en este tipo de análisis dentro de las estaciones de cultivo. Parece que mientras que el número de individuos analizados por familia y el número de cruzamientos que generan dichas familias en una estación no afectan significativamente a la capacidad de asignación correcta de un conjunto determinado de loci microsatélites (Apartado III.1, Figuras 3 y 4), la composición genética de los lotes de reproductores si constituye un factor de importancia. De hecho utilizando el mismo conjunto de loci microsatélites se encuentran niveles de variabilidad diferentes en los lotes de reproductores analizados, lo que determina que los resultados entre ellos sean dispares, obteniéndose desde un 80% de asignaciones correctas de paternidad en la Estación 1 hasta solo un 6,5% en el lote D de la Estación 2 (Apartado III.1, Tabla 9). Esta amplia variación encontrada en cuanto a asignaciones correctas, está relacionada con la variabilidad genética en los lotes de reproductores analizados (promedios de PIC y números de alelos) (Apartado III.1, Figuras 5 y 6) y además con su composición en cuanto a similitudes genéticas entre reproductores de los mismos sexos dentro de cada uno de los lotes de reproductores en este caso con las hembras que aparecen siempre como los parentales más relacionados genéticamente (Apartado III.1, Figura 9). Estos resultados sugieren que cada lote de reproductores representa por lo tanto una entidad única con características peculiares en lo que se refiere a su composición genética, la cual dependerá del origen de los individuos que lo

componen (poblaciones naturales de procedencia), ciclos de cultivo que hayan experimentado y tipo de manejo establecido para obtenerlos. Por lo tanto es necesario identificar dentro de un conjunto amplio de loci microsatélites seleccionados en la literatura en función de sus altos niveles de variabilidad, cuales funcionan mejor en cada lote de reproductores a través de un estudio previo en el cual los elementos mencionados (PIC y número de alelos, en general y por sexos) sean los criterios de selección. Puede ocurrir que determinados lotes de reproductores exhiban muy bajos niveles de variabilidad microsatélite con todos los loci ensayados debido a que los individuos que los componen están muy emparentados (el lote D de la Estación 2 en el Apartado III.1 podría ser un ejemplo). En esas condiciones sería recomendable sugerir a los productores una renovación de este lote de reproductores utilizando individuos disponibles en otros lotes dentro de la misma estación ó con individuos procedentes de otras estaciones y con orígenes diferentes, antes de implementar un manejo “asistido” por marcadores genéticos donde la alta variabilidad genética es condición indispensable.

El diseño del estudio de parentesco llevado a cabo en rodaballo donde se analizan progenitores y descendientes y se conoce además el origen de todos los descendientes (solo Norris y col. (2000) han publicado un diseño equivalente), ha permitido identificar además de la importancia que tiene la composición genética de los lotes de reproductores cuando se pretende aplicar esta metodología para mejorar el rendimiento de una especie en cultivo, otros elementos que también afectan a la capacidad de asignación de los loci microsatélites y las inferencias que se hacen a través de los coeficientes de relación genética sobre las relaciones de parentesco entre individuos con origen desconocido: la aparición de mutaciones y de alelos nulos (Pemberton y col., 1995; McGoldrick y col., 2000).

En este trabajo se encontró una tasa de mutación de  $10^{-4}$  (Apartado III.1, Tabla 7), tasa que se encuentra dentro de los rangos descritos para la variación microsatélite (Amos, 1999). Esto determinaría que sólo uno de cada 10 000 individuos no se podría asignar a ningún parental, en el caso de que la mutación produjese un alelo nuevo que no se encuentra en el lote de reproductores, ó sería mal asignado si el cambio es hacia uno de los alelos ya existentes. Sin embargo, los errores de asignación que podrían cometerse debido a la presencia de alelos nulos constituyen un elemento de mayor importancia, en nuestro caso un 70% de los descendientes de un reproductor que portaba un alelo nulo fueron mal asignados en el estudio llevado a cabo en rodaballo (Apartado III.1, Tabla 8). Considerar la posibilidad de que en un estanque de cría donde se han mezclado descendientes, un reproductor que porta un alelo nulo sea responsable de una contribución importante de gametos y por ello las inferencias basadas

en los datos microsatélites sean significativamente erróneas, debe ser una responsabilidad a asumir por parte de los responsables de cada programa genético en una estación de cultivo. Solo un elemento podría parcialmente ayudar a resolver esta problemática y está relacionado con evitar la utilización de loci microsatélites que exhiban, en particular, un déficit significativo de heterocigotos. No obstante, en una situación en la cual todos o casi todos los microsatélites ensayados exhiban déficits significativos de heterocigotos en los reproductores es probable que estemos en presencia de una mezcla importante de acervos génicos diferentes (efecto Wahlund, muy frecuente en las estaciones de cultivo de peces) y no ante una evidencia de alelos nulos, lo cual podría comprobarse investigando el origen de los reproductores, si es que está disponible (Marshall y col., 1998).

Teniendo en cuenta los elementos previamente mencionados es muy probable que en el caso del rodaballo se pueda establecer, en la práctica, un programa que utilizando un número mayor de loci microsatélites ó sustituyendo algunos de los que por sus niveles de variabilidad en los lotes de reproductores analizados no son convenientes, revierta en un mejor rendimiento productivo de las estaciones de cultivo con las que se ha trabajado.

El otro elemento mediante el cual se espera que la alta variación microsatélite constituya una herramienta de importancia en el cultivo de especies marinas es en la selección asistida. Existen expectativas referidas a la posibilidad de encontrar alelos microsatélites marcadores que estén relacionados con caracteres de interés comercial en numerosas especies debido al alto polimorfismo que exhiben y a su distribución ubicua en los cromosomas (Estoup y Angers, 1998; Sakamoto y col., 2000; Lindner y col., 2000). En esta tesis se aborda este enfoque en el salmón atlántico (Apartado IV.1), no obstante, no se encuentra una relación entre los alelos microsatélites y ninguno de los caracteres de interés estudiados (sexo, momento de la primera alimentación activa y estadio fisiológico, Apartado IV.1). Danzmann y col. (1997), Jackson y col. (1998), y además Streelman y Kocher (2002) han encontrado marcadores microsatélites relacionados con la tolerancia a la temperatura en familias de trucha común y con la expresión de prolactina en tilapia, respectivamente. No obstante, se necesita probar muchos marcadores moleculares y un esfuerzo común de varios equipos de investigación tal y como ocurre en los proyectos sobre mapas genéticos de algunas especies (Lie y col., 1997), para obtener resultados satisfactorios en este objetivo. De esta forma es posible localizar la mayor cantidad posible de marcadores genéticos en el genoma (no solo microsatélites, sino también otros marcadores de ADN muy variables) para relacionarlos posteriormente con caracteres de interés económico. Por lo tanto es de esperar que los loci

microsatélites sean útiles en este empeño, pero sólo a través de este enfoque amplio que comprenda la elaboración de un mapa genético de salmón. A pesar de que no se encuentran en este trabajo alelos marcadores ni enzimáticos, ni microsatélites, si se observan diferencias entre ambos tipos de marcadores en cuanto a las asociaciones entre heterocigosidad y eficacia biológica.

El hallazgo de asociaciones positivas entre la heterocigosidad enzimática y el momento de la primera alimentación activa ó el estado fisiológico en salmón atlántico, y la ausencia de estas asociaciones al considerar la heterocigosidad microsatélite (Apartado IV), se implican en un extenso e histórico debate entre neutralismo y seleccionismo para explicar el porque se encontraban correlaciones entre heterocigosidad enzimática y eficacia biológica y sus consecuencias para el cultivo de especies acuícolas, a partir de que las variantes solo representen polimorfismos transientes de alelos neutrales ó variantes alélicas que por sí mismas implican ventajas adaptativas para los individuos (Zouros y Pogson, 1994; Mitton, 1998).

En el Apartado IV.2 se trata con mayor profundidad las relaciones entre eficacia biológica (representada por la estabilidad del desarrollo, la talla y el peso de los individuos) y la heterocigosidad enzimática y microsatélite. Este tipo de experimentos han sido sugeridos como una forma válida de demostrar la hipótesis de la sobredominancia asociativa como base de las asociaciones observadas en multitud de organismos (Zouros y Pogson, 1994; Pogson y Fevolden, 1998; Mitton, 1998; Thelen y Allendorf, 2001), es decir si las asociaciones eficacia biológica-heterocigosidad enzimática son una consecuencia de desequilibrios de ligamiento entre los loci enzimáticos y genes deletéreos, se espera que también los loci microsatélites, con distribuciones ubicuas en los genomas (Sakamoto y col., 2000; Lindner y col., 2000), aparezcan en desequilibrio con estos genes. Los resultados obtenidos en esta tesis contradicen los presupuestos de la hipótesis de la sobredominancia asociativa; la estabilidad del desarrollo, la talla y el peso de los individuos muestran asociaciones significativas y positivas con la heterocigosidad enzimática y no aparecen asociaciones con la heterocigosidad microsatélite. Este experimento parece sugerir como alternativa que las enzimas y los loci microsatélites son diferencialmente afectados por la selección natural ya que posiblemente los loci enzimáticos, a través del control de las reacciones metabólicas, juegan un papel fundamental en el incremento de la eficacia biológica de los individuos. Al menos otros dos resultados publicados parecen reforzar esta hipótesis: Zouros y Pogson (1994) trabajando con juveniles de *Placopecten magellanicus*, que exhiben correlaciones positivas y significativas entre la heterocigosidad

enzimática (7 loci) y la tasa de crecimiento, no encuentran correlación alguna con la heterocigosidad de marcadores de ADN y Thelen y Allendorf (2001) en un estudio con *Oncorhynchus mykiss* utilizando 10 loci enzimáticos y 10 loci microsatélites, obtienen resultados similares y llegan a la misma conclusión.

No obstante, de la misma forma en que en varios experimentos se ha fallado en el intento de demostrar la hipótesis de la sobredominancia asociativa, la sobredominancia directa de las enzimas ha sido demostrada en muy contadas ocasiones en experimentos donde se ha apreciado directamente ventajas selectivas de los individuos heterocigotos frente a los homocigotos. Tal es el caso del polimorfismo de la alcohol deshidrogenasa en salamandra, que a través de los niveles de oxígeno produce variaciones en crecimiento y supervivencia, ó del polimorfismo en la glicerato deshidrogenasa asociado en plantas al crecimiento y a la viabilidad en sitios secos (revisado por Mitton, 1998). De esta forma los resultados obtenidos aquí deben ser interpretados exclusivamente como un experimento en el cual no se ha podido demostrar la hipótesis de la sobredominancia asociativa, pero no como una confirmación de la hipótesis de la sobredominancia directa, objetivo para el que se necesitaría un enfoque distinto al abordado en esta tesis.