

VARIABILIDAD DE LOCI MICROSATÉLITES EN SALMÓN ATLÁNTICO (*Salmo salar* L.)

LOCI MICROSATELLITE VARIATION IN ATLANTIC SALMON (*Salmo salar* L.)

Hermes Pineda-Santús¹, Emilia Vázquez², Gloria Blanco² y José A. Sánchez²

Resumen

La disminución del salmón en el océano Atlántico ha enfatizado la necesidad de conocer la variación genética intra e interpoblacional de la especie para racionalizar su manejo en la explotación comercial y su conservación en el medio natural. Sin embargo, los estudios previos realizados con loci codificantes de proteínas han revelado una variación genética poco informativa. Los loci microsatélites se encuentran entre las últimas herramientas genéticas diseñadas para el estudio de variabilidad y han demostrado ser altamente variables en la mayoría de las especies animales y vegetales en que se han utilizado. En este trabajo se analizaron cinco loci microsatélites (μ -SsaF-43*, μ -StrP-15*, μ -SsaD-30*, μ -Ssa20.19* y μ -Ssa13.37*) en tres muestras de dos poblaciones naturales situadas en el norte de España (ríos Sella y Bidasoa). Los resultados obtenidos revelaron un elevado grado de polimorfismo en los loci analizados. Al comparar las frecuencias génicas entre las poblaciones se observaron diferencias estadísticamente significativas, encontrándose algunos alelos en baja frecuencia que pueden ser específicos de una población. Por otra parte, también se detectaron alelos específicos en las clases analizadas pero todos en tan baja frecuencia que no definen categóricamente a cada clase en particular.

Palabras claves: variación de microsatélites, heterocigosidad, genética de poblaciones, *Salmo salar*.

Abstract

The decrease of Atlantic salmon in the Atlantic ocean has emphasized the necessity to know its genetic variation, within and among populations, in order to rationalize the management of commercial exploitation and its preservation in natural environment. However, previous works using protein-coding loci have revealed low levels of genetic variation. Microsatellite loci are included among the latest genetic tool to study genetic populations structure and have showed high levels of variation in many animal and plant species analyzed. In this work, five microsatellite loci were studied (μ -SsaF-43*, μ -StrP-15*, μ -SsaD-30*, μ -Ssa20.19* and μ -Ssa13.37*) in three samples of two wild populations located in northern Spain (Sella and Bidasoa rivers). Microsatellite loci assayed in this study displayed high levels of polymorphism and significant allele frequency differences among populations, with some alleles at low frequency that can be specific for a population. At the other hand, some specific alleles were also found in each class analyzed but all of them at low frequencies that cannot define a particular class categorically.

Key words: microsatellite variation, heterozygosity, population genetics, *Salmo salar*.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, las técnicas moleculares están abriendo la posibilidad de encontrar marcadores genéticos que puedan ser relevantes en la identificación de "stocks"

de peces. Entre éstas, los loci microsatélites se presentan como una herramienta valiosa en la descripción de la variación genética. Ellos están

Recibido: enero de 1999; aprobado para publicación: marzo de 1999.

¹ Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, AA 1226. Medellín, Colombia. E-mail: hpinedas@matematicas.udea.edu.co

² Departamento de Biología Funcional, C/ Julián Clavería s/n, Universidad de Oviedo, 33006, Oviedo, España.

E-mail: jafsp@sauron.quimica.uniovi.es

compuestos por secuencias de DNA nuclear no codificante y constituidos por repeticiones de un motivo entre uno y cinco pares de bases (Tautz, 1989; Bentzen y Wright, 1993), y se encuentran distribuidos aleatoriamente en los genomas eucarióticos (Epplen, 1988; Rassman *et al.*, 1991). La utilización de iniciadores homólogos a la secuencia flanqueante del microsatélite determina la especificidad del locus (Litt y Luty, 1989; Weber y May, 1989). Además, su alto polimorfismo ha sido demostrado en varias especies animales (Ostrander *et al.*, 1993; Schlotterer *et al.*, 1991; Stallings *et al.*, 1991; Villarreal *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1996) y vegetales (Morgante y Olivieri, 1993; Pfeiffer *et al.*, 1997). En salmónidos, además, se ha comprobado su herencia mendeliana (Presa, 1995; Slettan *et al.*, 1995) y, por ejemplo, que el motivo (GT)*n* se encuentra entre 6.3×10^4 (Slettan *et al.*, 1995) y 2.5×10^5 (McConnell *et al.*, 1995) en el genoma de la especie, lo que permite hacer deducciones sobre la enorme variabilidad que es posible estudiar con esta técnica.

Este trabajo pretende describir la variabilidad genética en poblaciones de salmón Atlántico (*Salmo salar* L.) utilizando cinco loci microsatélites como herramienta de estudio μ -*SsaF-43**, μ -*SsaD-30**, μ -*Ssa20.19**, μ -*Ssa13.37** y μ -*StrP-15**. Así mismo, la comparación entre datos agrupados para poblaciones permite analizar la existencia de diferencias genéticas, e incluso de alelos exclusivos, entre clases que pueden facilitar tanto la discriminación de poblaciones como de individuos diferentes en sexo, edad de maduración sexual, o época de retorno al río madre; caracteres todos ellos del máximo interés tanto en la gestión natural, como en la explotación del recurso.

Tanto dentro de la dinámica de las poblaciones naturales como desde el punto de vista de la explotación comercial, la edad de maduración sexual es un carácter genético de máxima importancia (Nævdal, 1983; Gjerde, 1984; Skilbrei, 1989; Blanco *et al.*, 1994). En los ríos españoles, los salmones (*Salmo salar* L.) se reproducen en diciembre-enero y los juveniles crecen en agua dulce durante uno o dos años antes de emigrar al mar. Los

salmones retornan a su río "madre" entre uno y tres años después como adultos "pre-maduros". El retorno se realiza en oleadas sucesivas a lo largo del periodo del año comprendido entre febrero y julio-agosto (Martín-Ventura, 1987; Nicieza *et al.*, 1990). Un último dato de interés sobre el que podemos obtener algún dato con este trabajo es comprobar si existen diferencias genéticas detectables entre los salmones que retornan al río en diferentes épocas del año, ya que se discute la idea de que representan subpoblaciones dentro del mismo río, que de confirmarse tendría que servir para replantearse el modelo de gestión que maneja el río como unidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 135 salmones adultos que retornaron para su reproducción a dos ríos (Sella y Bidasoa) localizados en el norte de España, en lo que se considera actualmente el límite sur de la distribución geográfica de la especie (*Salmo salar* L.) en Europa. Las capturas se realizaron durante la temporada de pesca de los años 1993 (44 individuos) y 1994 (46 individuos) en el río Sella y en el año 1995 (45 individuos) en el río Bidasoa. Para cada individuo, se obtuvieron datos sobre su sexo, época de retorno y edad, esta última estimada a partir de la lectura de escamas según el método descrito por Bagliniere (1985) y Richard (1986).

De cada individuo se obtuvieron 3 ml de sangre periférica que se mezclaron con tampón TNES-Úrea para su conservación y traslado al laboratorio. Para la extracción de DNA genómico se siguió el método de Taggart *et al.* (1992), que básicamente consiste en una extracción con fenol/cloroformo y una precipitación con etanol. La pureza del DNA genómico fue determinada mediante un análisis de absorbancia en dos longitudes de onda. Sólo el DNA genómico con una pureza ideal entre 1.8-2.0 fue considerado para posteriores estudios.

Se analizó la variación de cinco loci microsatélites. Cuatro de ellos se corresponden con repeticiones de dinucleótidos: μ -*SsaF-43**: (CA/TG)*n*; μ -*SsaD-30**: (TC/AG)*n*; μ -*Ssa20.19**: (AC/TG)*n*; μ -*StrP-15**: (GA/CT)*n*. El quinto locus microsatélite, μ -*Ssa13.37**, es una repetición de tetranucleótidos

(CCTT/GGAA)_n. Las condiciones de amplificación mediante PCR y la secuencia de los iniciadores específicos son las descritas en Sánchez *et al.* (1996) y Estoup *et al.* (1993). Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y observados sobre una pantalla de luz ultravioleta para confirmar la efectividad de la amplificación. Posteriormente, para la determinación de los distintos alelos y genotipos se realizó electroforesis en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) (6% poli(acrilamida), 6M úrea, 30% formamida), siguiendo el método descrito por Litt *et al.* (1993, protocolo 2). La visualización de las bandas en los geles se realizó mediante tinción de plata siguiendo el manual técnico suministrado por la casa comercial Promega. Los tamaños de los alelos se determinaron utilizando como control reacciones de secuenciación de tamaño conocido.

Las frecuencias alélicas para cada locus fueron determinadas por conteo directo a partir de las frecuencias genotípicas observadas. Para la comparación de frecuencias alélicas entre poblaciones o muestras se utilizó el test exacto de diferenciación de Raymond y Rousset (1995).

También se estimaron los valores de heterocigosidad observada y esperada para cada locus en cada población, así como sus valores medios teniendo en cuenta simultáneamente los cinco loci analizados. Para la comparación de las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg, se utilizó el test exacto descrito por Louis y Dempster (1987) cuando se presentaban menos de cinco alelos por loci, y cuando el número de alelos era mayor, el método en cadena de Markov que estima, sin sesgo, el valor de probabilidad exacta para este mismo test (Guo y Thompson, 1992). Se calculó para cada locus el valor de F_{IS} (Wright, 1969), $\{F_{IS} = 1 - (h_o/h_e)\}$, estimándose su significación mediante el método combinado de Fisher. Un valor F_{IS} negativo implica un exceso de heterocigotos, mientras que un valor positivo indica una deficiencia de ellos. Todos los análisis fueron realizados mediante los programas de computador BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1989), GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995) y Statistica for Windows 4.0 Microsoft.

RESULTADOS

Variabilidad de los loci microsatélites y diferenciación entre poblaciones. Los cinco loci microsatélites examinados mostraron altos niveles de polimorfismo en las tres muestras analizadas. El número medio de alelos por loci fue de 4.2, oscilando entre los ocho alelos del locus μ -*SsaF-43** y los dos del μ -*Ssa13.37** (tabla 1). Las diferencias en tamaño entre los alelos descritos fueron de cuatro pares de bases para el locus μ -*Ssa13.37** y de dos para el resto de los loci, lo que está de acuerdo con el hecho de que la variabilidad en los microsatélites se debe a diferencias en el número de repeticiones del motivo del microsatélite. Los niveles de heterocigosidad presentaron una amplia oscilación, entre un 4.4% (locus μ -*SsaD-30** en la población Bidasoa) hasta un 68.2% (μ -*Ssa20.19** en la muestra Sella 93). No obstante, se pueden considerar dos grupos: uno de ellos, con altos niveles, que incluye los loci μ -*SsaF-43**, μ -*Ssa20.19** y μ -*Ssa13.37**, donde los individuos heterocigotos representan entre 40 y 68% del total de individuos analizados, y otro con bajos niveles, los loci μ -*StrP-15** y μ -*SsaD-30**, con no más de 13%. No se detectaron valores significativos para la deficiencia o el exceso de heterocigotos en los loci y poblaciones estudiadas con respecto a los valores en el equilibrio de Hardy-Weinberg. El valor de la heterocigosidad media observada fue similar en las tres muestras, aunque se detectaron diferencias significativas entre los niveles de heterocigosidad de Sella 94 y Bidasoa 95 ($t = 3.24$; g.l. = 4; $P = 0.016$).

El locus μ -*SsaF-43** fue el que presentó el mayor número de alelos, ocho en total. El alelo más común fue μ -*SsaF-43*-115*, con frecuencias que oscilaron entre 0.625 (Sella 93) y 0.478 (Bidasoa). Cuatro de ellos aparecieron como exclusivos de alguna población: los alelos μ -*SsaF-43*-127* y μ -*SsaF-43*-119* se presentaron sólo en la población Sella y los alelos μ -*SsaF-43*-107* y μ -*SsaF-43*-123* únicamente en la población Bidasoa (tabla 1). Al comparar las frecuencias alélicas observadas para este locus en las muestras analizadas, se encontraron

Tabla 1. Frecuencias alélicas y niveles de heterocigosidad en las tres muestras analizadas.

Locus	Poblaciones		
	Sella 93	Sella 94	Bidasoa 95
<i>μ-SsaF-43*(n)</i>	44	46	45
103	0.205	0.109	0.211
107	0.000	0.000	0.056
115	0.625	0.587	0.478
119	0.000	0.033	0.000
121	0.136	0.228	0.211
123	0.000	0.000	0.022
125	0.023	0.043	0.022
127	0.011	0.000	0.000
ho	0.523	0.587	0.578
F _{IS}	0.058	0.014	0.159
P		0.007**	
<i>μ-StrP-15*(n)</i>	44	46	45
216	0.943	0.924	0.944
218	0.057	0.054	0.056
220	0.000	0.022	0.000
ho	0.114	0.109	0.067
F _{IS}	-0.049	0.250	0.374
P		0.674	
<i>μ-SsaD-30*</i>	44	46	45
226	0.011	0.011	0.000
234	0.943	0.935	0.978
236	0.000	0.011	0.000
240	0.045	0.043	0.022
ho	0.068	0.130	0.044
F _{IS}	0.380	-0.040	-0.011
P		0.792	
<i>μ-Ssa20.19*</i>	44	46	45
96	0.455	0.554	0.700
98	0.125	0.120	0.122
100	0.205	0.206	0.078
102	0.216	0.120	0.100
ho	0.682	0.565	0.511
F _{IS}	0.022	0.101	-0.056
P		0.015*	
<i>μ-Ssa13.37*</i>	44	46	45
112	0.500	0.609	0.689
116	0.500	0.391	0.311
ho	0.591	0.522	0.400
F _{IS}	-0.171	-0.084	0.078
P		0.039*	
Ho	0.395	0.383	0.320
F _(IS)	0.000	0.030	0.088
P _{TOTAL}	X ² = 25.87; g.l. = 10; P = 0.004		

ho = heterocigosidad observada; Ho = heterocigosidad media observada; F_{IS} = valores del coeficiente de Wright (1969) para cada locus y para el conjunto de los loci; P = valor de probabilidad del test exacto de diferenciación de Raymond y Rousset (1995) para cada locus y para el conjunto de los cinco loci según el método de Fisher (P_{TOTAL}). * = P < 0.05; ** = P < 0.01.

diferencias altamente significativas ($P = 0.007$), fundamentalmente debidas al factor río (Sella vs Bidasoa $P = 0.0150$), sin detectarse diferencias significativas entre las muestras Sella 93-Sella 94 ($P = 0.0868$).

Por su parte, el locus μ -*StrP-15** presentó tres alelos, siendo μ -*StrP-15*-216* el más común, con frecuencias que oscilaron entre 0.924 (Sella 94) y 0.944 (Bidasoa 95) (tabla 1). No se encontraron diferencias significativas entre ríos o años para el locus μ -*StrP-15**.

El locus μ -*SsaD-30** presentó cuatro alelos, con una frecuencia elevada para el μ -*SsaD-30*-234* que osciló entre 0.935 (Sella 94) y 0.978 (Bidasoa 95), mientras que μ -*SsaD-30*-226* y μ -*SsaD-30*-236* se presentaron sólo en las muestras del río Sella. Tampoco para este locus se detectaron diferencias significativas entre las muestras ($P = 0.792$) (tabla 1).

En el locus μ -*Ssa20.19** el alelo más común fue μ -*Ssa20.19*-96*, con frecuencias que oscilaron entre 0.455 (Sella 93) y 0.700 (Bidasoa 95), sin encontrarse ningún alelo específico de muestra o población. Al comparar las tres muestras, se detectó una diferencia significativa ($P = 0.015$) atribuible a la comparación entre las poblaciones Sella 93 y Bidasoa 95 ($P = 0.003$).

El locus μ -*Ssa13.37** fue el menos variable y sólo presentó dos alelos, siendo más común el μ -*Ssa13.37*-112*, con valores de frecuencia entre 0.500 (Sella 93) y 0.689 (Bidasoa 95). Se observaron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de este locus para las poblaciones analizadas ($P = 0.039$) (tabla 1), debidas nuevamente a la comparación Sella 93 y Bidasoa 95 ($P = 0.014$).

En resumen, considerando simultáneamente los cinco loci y las tres muestras estudiadas se observaron diferencias altamente significativas ($X^2 = 25.87$; g.l. = 10; $P = 0.004$), siendo las dos muestras del río Sella iguales entre sí ($X^2 = 12.01$; g.l. = 10; $P = 0.285$) y significativamente diferentes de la muestra del río Bidasoa ($X^2 = 27.77$; g.l. = 10; $P = 0.002$), debido a

diferencias entre las frecuencias alélicas de tres de los cinco loci analizados (μ -*SsaF-43**, $P = 0.007$; μ -*Ssa20.19**, $P = 0.015$; y μ -*Ssa13.37**, $P = 0.039$) (tabla 1).

Relación entre la variabilidad microsatélite y parámetros fisiológicos. En el primer análisis, se comparó la constitución genética que presentaron, para estos cinco loci, el conjunto de los machos frente al conjunto de las hembras analizados, ya que de existir algún marcador de sexo, éste debería ser independiente de a qué población pertenece el individuo. Para ninguno de los loci estudiados se detectaron diferencias significativas entre los sexos, como tampoco las hubo al considerar, de forma global, los cinco loci ($X^2 = 6.72$; g.l. = 10; $P = 0.725$) (tabla 2). Sin embargo, se detectaron los alelos específicos μ -*SsaD-30*-236* en machos, y μ -*SsaF-43*-123*, μ -*SsaF-43*-127* y μ -*StrP-15*-220* en hembras, con tan baja frecuencia que no tienen relevancia por sí mismos.

Para un segundo análisis, se agrupó la muestra total disponible en función del número de años que los individuos analizados permanecieron en el mar antes de volver al río de origen como indicación de la edad de maduración sexual (tabla 2). Sólo para el locus μ -*Ssa13.37** se observaron diferencias significativas ($P = 0.036$) entre las frecuencias alélicas estimadas en los individuos de uno o dos años de mar, aunque no se detectó la existencia de alelos exclusivos. Para el resto de los loci aparecieron alelos exclusivos de sólo una de las dos clases, así: en la clase un año se presentaron los alelos μ -*SsaF-43*-107*, μ -*StrP-15*-220*, μ -*SsaD-30*-226* y μ -*SsaD-30*-236*, y en la clase dos años, μ -*SsaF-43*-123* y μ -*SsaF-43*-127*, todos en baja frecuencia con poca relevancia por sí solos (tabla 2). Al considerar simultáneamente los cinco loci, tampoco se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos ($X^2 = 17.22$; g.l. = 10; $P = 0.074$).

Para un análisis más fino de la relación entre la variación de loci microsatélites y la edad de maduración, se compararon muestras de individuos que pertenecen a la misma población y año de nacimiento, pero que regresaron en años distintos

Tabla 2. Frecuencias alélicas y niveles de heterocigosidad observada en los diferentes parámetros y clases analizados.

Parámetros	Sexos		Edad de mar		Igual acervo génico		Época de retorno	
	Machos	Hembras	Un año	Dos años	Sella 93/1+	Sella 94/2+	Abril-Mayo	Junio-Julio
μ -SSaF-43* (n)	70	64	69	65	21	30	45	89
103	0.179	0.164	0.174	0.169	0.214	0.133	0.167	0.174
107	0.014	0.023	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028
115	0.586	0.547	0.536	0.600	0.619	0.617	0.600	0.551
119	0.007	0.016	0.007	0.015	0.000	0.033	0.011	0.011
121	0.179	0.203	0.217	0.162	0.143	0.167	0.189	0.191
123	0.000	0.016	0.000	0.015	0.000	0.000	0.011	0.006
125	0.036	0.023	0.029	0.031	0.024	0.050	0.022	0.034
127	0.000	0.008	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.006
ho	0.586	0.531	0.580	0.538	0.524	0.533	0.556	0.562
F _{IS}	0.017	0.166	0.091	0.085	0.072	0.082	0.046	0.111
P	0.775		0.163		0.693		0.840	
μ -StrP-15* (n)	70	64	69	65	21	30	45	89
216	0.936	0.938	0.942	0.931	0.976	0.933	0.933	0.938
218	0.064	0.047	0.043	0.069	0.024	0.067	0.067	0.051
220	0.000	0.016	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011
ho	0.071	0.125	0.087	0.108	0.048	0.067	0.089	0.101
F _{IS}	0.412*	-0.046	0.220	0.172	0.000	0.477	0.296	0.142
P	0.345		0.270		0.646		0.630	
μ -SsaD-30* (n)	70	64	69	65	21	30	45	89
226	0.007	0.008	0.014	0.000	0.024	0.000	0.000	0.011
234	0.950	0.953	0.935	0.969	0.928	0.967	0.967	0.944
236	0.007	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000
240	0.036	0.039	0.043	0.031	0.048	0.033	0.022	0.045
ho	0.071	0.094	0.130	0.031	0.143	0.067	0.067	0.090
F _{IS}	0.264	-0.034	-0.044	0.490*	-0.034	-0.018	-0.015	0.166
P	1.000		0.504		0.590		0.334	
μ -Ssa20.19*(n)	70	64	69	65	21	30	45	89
96	0.593	0.547	0.594	0.546	0.476	0.583	0.578	0.567
98	0.086	0.164	0.138	0.108	0.119	0.083	0.111	0.129
100	0.179	0.141	0.116	0.208	0.167	0.217	0.200	0.140
102	0.143	0.148	0.152	0.138	0.238	0.117	0.111	0.163
ho	0.557	0.609	0.594	0.569	0.714	0.602	0.511	0.618
F _{IS}	0.061	0.044	0.003	0.101	-0.034	0.172	0.161	0.001
P	0.243		0.230		0.339		0.479	
μ -Ssa13.37*(n)	70	64	69	65	21	30	45	89
112	0.579	0.617	0.659	0.531	0.452	0.583	0.589	0.601
116	0.421	0.383	0.341	0.469	0.548	0.417	0.411	0.399
ho	0.443	0.578	0.507	0.508	0.714	0.500	0.556	0.483
F _{IS}	0.099	-0.216	-0.122	-0.011	-0.422	-0.012	-0.136	-0.002
P	0.535		0.036*		0.226		0.896	
Ho	0.346	0.387	0.380	0.351	0.429	0.333	0.356	0.371
F _{IS}	0.089	0.010	0.010	0.084	-0.100	0.110	0.048	0.054
P _{TOTAL}	X ² = 6.72; g.l. = 10 P = 0.725		X ² = 17.22; g.l. = 10 P = 0.074		X ² = 7.80; g.l. = 10 P = 0.629		X ² = 5.16; g.l. = 10 P = 0.891	

ho = heterocigosidad observada; Ho = heterocigosidad media observada; F_{IS} = valores del coeficiente de Wright (1969) para cada locus y para el conjunto de los loci; P = valor de probabilidad del test exacto de diferenciación de Raymond y Rousset (1995) para cada locus y para el conjunto de los cinco loci según el método de Fisher (P_{TOTAL}).

* = P < 0.05; ** = P < 0.01.

[los individuos que retornaron al río Sella en 1993 con un año de mar ($n = 21$) y los que volvieron en 1994 con dos años de mar ($n = 30$) y que pertenecen a un grupo de peces nacidos de un mismo grupo de reproductores]. Tampoco en este caso se observó una asociación de ningún alelo con la edad de maduración, ya que ni para cada locus particular, ni tampoco a nivel global, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($X^2 = 7.80$; g.l. = 10; $P = 0.629$) (tabla 2).

Finalmente, al analizar la época de retorno, la baja frecuencia de aparición de los alelos exclusivos (μ -*SsaD-30*-236* en el periodo abril/mayo, y μ -*SsaF-43*-107*, μ -*SsaF-43*-127*, μ -*StrP-15*-220* y μ -*SsaD-30*-226* en el periodo junio/julio) los hizo irrelevantes y no se detectaron diferencias significativas entre ambas clases ($X^2 = 5.16$; g.l. = 10; $P = 0.891$) (tabla 2).

DISCUSIÓN

Este estudio muestra la utilidad de los loci microsatélites como herramienta para estudiar la variabilidad genética y resolver aspectos concretos de la gestión o el manejo de peces, como la caracterización de poblaciones o "stocks" y su posible asociación con algunas características de interés en la especie, como sexo, edad de maduración sexual y época de retorno al río.

Los resultados obtenidos mostraron el elevado grado de polimorfismo detectado en estos loci, que son similares a los descritos para este tipo de marcadores en esta y otras especies (Estoup *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 1996) y muy superiores a los descritos para esta especie con loci enzimáticos, donde el número de alelos por locus no excede de tres y los niveles de heterocigosidad y proporción de loci polimórficos se sitúan aproximadamente en el 4.5 y el 16%, respectivamente (Stahl, 1987; Davidson *et al.*, 1989; Sánchez *et al.*, 1996).

No se observaron diferencias entre las dos muestras del río Sella, lo que implica una estabilidad anual de las frecuencias génicas. Esto permite caracterizar una población con base en la descripción de la variabilidad

para esos loci a partir de los resultados de una muestra específica. Este hecho ya estaba probado con loci alozímicos, pero para los loci microsatélites, debido a su elevado número de alelos, se discutía su existencia y había que comprobar dicha estabilidad. No es de extrañar el hecho de observar ligeras diferencias en frecuencias entre distintas muestras de una misma población cuando se analizan marcadores con un elevado número de alelos, pues la posibilidad de detectar un alelo presente en la población con baja frecuencia dependerá directamente del tamaño muestral que se utilice. Así, para detectar en una muestra, con un nivel de probabilidad del 95%, al menos un individuo portador de un alelo que se presente en frecuencia 0.1, es necesario analizar un mínimo de 45 individuos.

Por otra parte, se han detectado diferencias significativas entre las muestras de los ríos Sella y Bidasoa (tabla 1), en contraste con lo encontrado entre estas mismas poblaciones cuando se usaron loci enzimáticos, ya que a ese nivel no se detectaron ni diferencias en frecuencias ni la presencia de alelos específicos de población (Sánchez *et al.*, 1996; Ramos, 1998).

Los datos previos de estudios con loci codificantes de proteínas no han permitido establecer asociaciones particulares alelo/carácter, aunque sí establecen la consistencia de una correlación heterocigosidad genética con eficacia biológica (fitness) y/o ciclo de vida (Verspoor y Jordan, 1989). En este estudio se trató de buscar mediante un método indirecto, al no conocer qué genes mayores definen el carácter, la asociación entre un marcador molecular reconocible de forma fácil y segura y determinada expresión de un carácter (e.g. macho o hembra), mediante una asociación de ligamiento estrecho entre ambos genes, lo que permite predecir la fortaleza de la asociación. Esto, en último término, es la base conceptual de los programas de selección artificial por marcadores moleculares (MAS) para una selección más efectiva.

En este contexto, la utilización de marcadores moleculares altamente variables como los microsatélites aumenta la posibilidad de detectar asociaciones. Sin embargo, en el presente estudio

ninguno de los tres caracteres estudiados se pudo asociar a ningún alelo-marcador de los suministrados por los cinco loci microsátélites que aquí se estudiaron.

La determinación precoz del sexo es un objetivo prioritario en acuicultura. En algunos salmónidos como el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Devlin *et al.*, 1991) y la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Iturra *et al.*, 1998), se han encontrado marcadores moleculares para determinar el sexo. Al considerar el sexo se detectaron alelos exclusivos de uno de ellos (tabla 2), pero en tan baja frecuencia que no podrían tener la consideración de marcadores diagnóstico. Tampoco el conjunto de variación para los cinco loci considerados simultáneamente permitió una discriminación.

Por otro lado, para el carácter edad de maduración sexual en salmón, se ha descrito una asociación, en poblaciones naturales, con el locus enzimático *MEP-2** (Verspoor y Jordan, 1989) y en una línea de cultivo con el locus microsátélite *μ -SsaD-30** (Blanco *et al.*, 1997). Sin embargo, en este trabajo no se encontró ningún marcador que separara los individuos que maduran con un año de vida en el mar de aquellos que necesitan dos años para esa maduración. Las diferencias entre grupos no fueron significativas ni cuando se agrupó el conjunto de los individuos analizados con base en su edad, ni cuando se comparó la constitución genética del conjunto de individuos procedentes de una misma reproducción y que maduraron alternativamente con uno o dos años de mar (tabla 2).

REFERENCIAS

Bagliniere JL. 1985. La détermination de l'âge par scalimétrie chez le saumon Atlantique (*Salmo salar*) dans son aire de répartition méridionale: utilisation pratique et difficulté de la méthode. *Bull Fr Peche Pisci* 298:69-105.

Bentzen P, Wright JM. 1993. Nucleotide sequence and evolutionary conservation of a minisatellite variable number tandem repeat cloned from Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Genome* 36: 271-307.

Por último, el estudio de estos cinco microsátélites tampoco permitió encontrar diferencias en la composición genética de los individuos que retornaron al río madre en distinta época del año (primavera - verano) (tabla 2). Pese a estos resultados negativos, la elevada variabilidad encontrada con los cinco loci microsátélites estudiados, unida al carácter neutral de estos marcadores, hace prever que sean muy útiles en este campo, una vez se haya probado un número suficiente de ellos. No olvidemos que para enzimas se han estudiado más de 70 sistemas enzimáticos y en este trabajo se utilizaron sólo cinco loci microsátélites.

En cuanto a la separación o identificación de poblaciones, sí podemos asegurar que con el análisis de sólo cinco loci microsátélites se supera la discriminación hecha con enzimas, siendo estos resultados concordantes con otros trabajos en este mismo campo (Estoup *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 1996). Finalmente, creemos que un mayor número de loci microsátélites permitirá obtener un mejor conocimiento de la especie y por tanto facilitará su conservación y manejo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) mediante la beca ICI-1995-1997 al becario Hermes Pineda-Santís y dentro del proyecto CE96-036 financiado por la Unión Europea (UE). También queremos agradecer a la doctora María Dolores Ramos su colaboración y apoyo en todo momento.

Blanco G, Vázquez E, Sánchez JA. 1994. Genetic variation and age at maturity in populations of Atlantic salmon of Northern Spain. *ICES CM. M:16*, 15 p.

Blanco G, Ramos MD, Vázquez E, Sánchez JA. 1997. Genetic bases of age at maturity in *Salmo salar* L: Preliminary results. *ICES CM. HH:04*.

- Davidson WS, Birt TP, Green JM. 1989. A review of genetic variation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and its importance for stock identification, enhancement programmes and aquaculture. *J Fish Biol* 34:547-560.
- Devlin RH, McNeil BK, Groves TD, Donaldson EM. 1991. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can J Fish Aquat Sci* 48:1606-1612.
- Epplen JT. 1988. On simple repeated GA(T-C)A sequences in animal genomes: a critical reappraisal. *J Hered* 79:409-417.
- Gjerde B. 1984. Response to individual selection for age at sexual maturity in Atlantic salmon. *Aquaculture* 38:229-240.
- Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- Iturra P, Medrano JF, Bagley M, Lam N, Vergara N, Marín JC. 1998. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPD's and fluorescent *in situ* hybridization in rainbow trout. *Genetica* 101:209-213.
- Litt M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Gen* 4:397-401.
- Litt M, Hauge X, Sharma V. 1993. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *Biotechniques* 15, Nº 2:280-284.
- Louis EJ, Dempster ER. 1987. An exact test for Hardy Weinberg and multiple alleles. *Biometrics* 43:805-811.
- Martín-Ventura JA. 1987. Le saumon Atlantique dans les rivières de la province des Asturies (Espagne). En: Thibault M, Billard R (eds.). *La restauration des rivières a saumons*. INRA, Paris, pp.139-144.
- McConnell SK, O'Reilly P, Hamilton L, Wright JM, Bentzen P. 1995. Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. *Can J Fish Aquat Sci* 52:1863-1872.
- Morgante M, Olivieri AM. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3:175-182.
- Naevdal G. 1983. Genetic factors in connection with age at maturity. *Aquaculture* 33:97-106.
- Nicieza A, Toledo M, Braña F. 1990. Capturas de salmón Atlántico en los ríos asturianos en el periodo 1953-1989: variaciones en abundancia y estructura de edades de mar. *BIOBAS Rev Biol Univ de Oviedo* IV:pp. 91.
- Ostrander EA, Sprague GF, Rine J. 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics* 16:207-213.
- Pfeiffer A, Olivieri AM, Morgante M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 40:411-419.
- Presa P. 1995. Determinisme et polymorphisme génétique des séquences microsatellites de *Salmo trutta* L. et d'autres salmonides: comparaison avec le polymorphisme des locus enzymatiques. Tesis doctoral. Laboratoire de Génétique des Poissons INRA, France.
- Promega. 1993. Promega Silver Sequence™ DNA Staining (Manual Técnico).
- Ramos MD. 1998. Polimorfismo en loci enzimáticos microsatélites de locus único en salmón Atlántico, *Salmo salar* L. Tesis doctoral. Univ. de Oviedo, Oviedo, España.
- Rassmann K, Schlotterer C, Tautz D. 1991. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction base DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12:113-118.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (versión 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248-249.
- Richard A. 1986. Les populations de truite de mer *Salmo trutta* L. de L'Orne et de la Touques (Basse-Normandie): scalimétrie, sexage, caractéristiques biométriques, démographiques et migratoires. Tesis doctoral. Univ. de Rennes I, France, 138 p.
- Sánchez JA, Clabby C, Ramos D, Blanco G, Flavin F, Vázquez E, Powell R. 1996. Protein and Skilbrei OT. 1989. Relationship between smolt length and growth and maturation in the sea of individually tagged Atlantic salmon. *Aquaculture* 83:95-108.
- Slettan A, Olsaker I, Lie O. 1995. Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Ani Genet* 26:277-285.
- Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moyis RK. 1991. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10:807-815.
- Stahl G. 1987. Genetic population structure of Atlantic salmon. En: Ryman N, Utter F (eds.). *Population Genetics and Fishery Management*, Cap. 5:121-140.

Swofford DL, Selander RB. 1989. BIOSYS-1: a fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in populations genetics and systematics. *J Hered* 72:282-302.

Taggart JB, Hynes RA, Prodohl PA, Ferguson A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from Salmonids fishes. *J Fish Biol* 40:963-965.

Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl Acids Res* 17:6463-6471.

Verspoor E, Jordan WC. 1989. Genetic variation at the *Me-2* locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence for selective maintenance. *J Fish Bio* 35:205-213.

Villarreal X, Bricker J, Reinert HK, Gelbert L, Bushar LM. 1996. Isolation and characterization of microsatellite loci for use in population genetic analysis in the timber rattlesnake, *Crotalus horridus*. *J Hered* 87:152-155.

Weber JL, May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-396.

Wright S. 1969. Evolution and the genetics of population. Vol. II. Chicago Pr. Univ. US.