

2008

Universidad de Vigo

Paloma Morán, María Saura, Pilar Alvariño, Nieves Santamaría

INFORME

“Caracterización genética de los salmones capturados en la pesquería gallega en la temporada 2008”

Informe salmón 2008

SITUACIÓN DEL SALMÓN ATLÁNTICO EN GALICIA.....	3
MUESTRAS ANALIZADAS	7
ESTUDIO DE LA PROPORCIÓN DE SEXOS	8
IDENTIFICACIÓN DE MACHOS Y HEMBRAS DE SALMÓN	8
VITELÓGENINA.....	9
MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO MEDIANTE ELISA.....	9
1. <i>Procesado de la sangre:</i>	9
2. <i>Anticuerpo empleado para el Inmunoensayo</i>	10
3. <i>Test de Inmuno Ensayo en placa de policarbonato (ELISA)</i>	10
DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE SEXOS EN LOS RÍOS ULLA Y LÉREZ	12
ESTUDIO GENÉTICO	14
MARCADORES MOLECULARES	14
DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA	15
ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	16
DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DE CUELLOS DE BOTELLA	18
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL	20
1. <i>Estadístico FST</i>	20
2. <i>Test de asignación</i>	21
3. <i>Análisis de la varianza molecular (AMOVA)</i>	22
5. <i>Correlación entre distancia genética y distancia geográfica</i>	23
EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	24
CONCLUSIONES	28
REFERENCIAS	29
APÉNDICE	33
❖ RESUMEN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS POR LOCUS Y POBLACIÓN.	33
❖ RESULTADOS DEL SEXADO POR RÍO, CÓDIGO Y FECHA DE CAPTURA.	35
❖ CONTROLES UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO.....	38

SITUACIÓN DEL SALMÓN ATLÁNTICO EN GALICIA

Las poblaciones de salmón atlántico de los ríos españoles han sufrido una drástica disminución a lo largo del último siglo. En algunos ríos su actual área accesible es probablemente similar a la existente durante la primera mitad del siglo XX, mientras que en otros casos se ha producido una pérdida significativa ocasionada por el desarrollo hidroeléctrico experimentado durante el período 1955-1975 (Braña y *col.*, 1995; García de Leániz y *col.*, 2001). No obstante, otros factores, como la polución o la sobrepesca, han contribuido a agudizar este declive. Este descenso tan acusado en las capturas parecer ser generalizado en todas las poblaciones de salmón y en todo su rango de distribución (Klemetsen y *col.*, 2003) (Ver Figura 1).

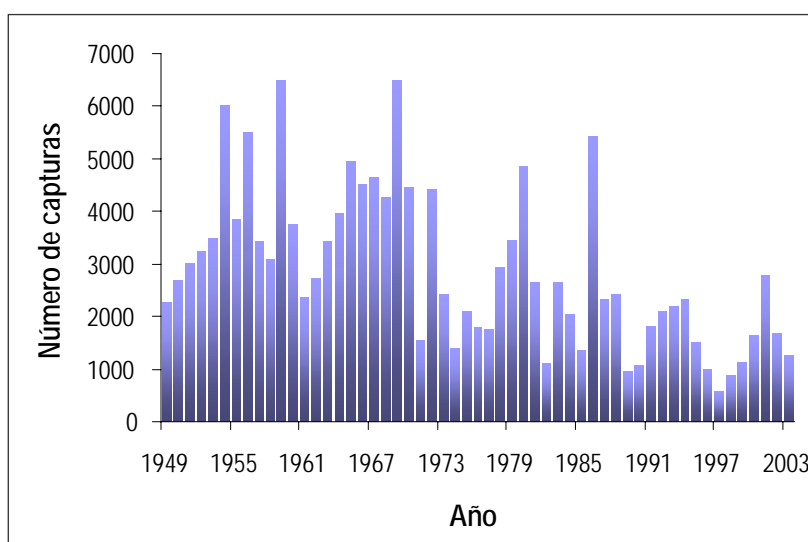


Figura 1. Capturas acumuladas por años en los principales ríos salmoneros españoles.

En el caso concreto de Galicia, así como históricamente esta especie se podía encontrar en 18 cuencas fluviales, en la actualidad existe únicamente en 7 de ellas (Figura 2). Aunque existen pocos datos históricos fiables, los ríos gallegos podrían haber llegado a producir cerca de 12.000 salmones anualmente durante la década de 1920-30, si bien se trata de meras estimaciones. El análisis de las estadísticas oficiales de captura desde 1949 indica que se ha producido una acusada disminución en las capturas a partir de mediados de los años 80, alcanzando su punto más bajo durante 1996-97, momento a partir del cual parece registrarse una evolución ascendente. Considerando que el esfuerzo de pesca deportiva permanece constante a lo largo de los años, las capturas pueden considerarse indicadoras de la abundancia de adultos en la población.

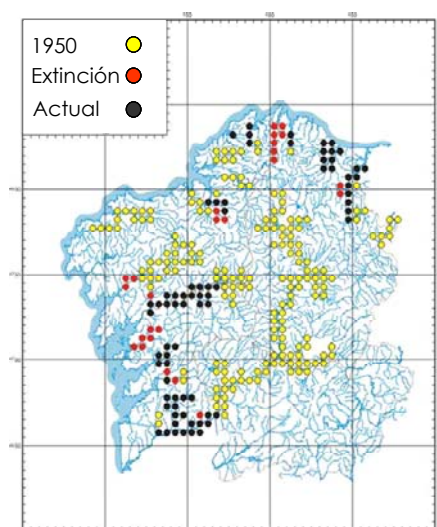


Figura 2. Áreas de ocupación del salmón atlántico en Galicia. En amarillo se representan los ríos ocupados en la década de los años 50, en rojo las áreas de extinción reciente y en negro, las áreas de distribución actual (Hervella y Caballero, 1999).

El programa de recuperación del salmón atlántico en los ríos gallegos fue establecido en el año 1996 por la Xunta de Galicia. Este programa se implementa en la piscifactoría de Carballedo y se dispone de estaciones de captura de adultos en las cuencas de los ríos Ulla y Lérez. El programa de cruzamientos que se realiza cada año depende principalmente de la disponibilidad de hembras y de su estado de maduración.

La existencia de estaciones de captura a escasos kilómetros de la desembocadura permite la monitorización del programa (ver Figura 3). En el río Ulla posibilita el control de aproximadamente el 40% de la población, mientras que en el río Lérez se controla el 100% de los adultos que retornan al río para desovar. Así al paso de cada individuo por la estación de captura (necesariamente en su retorno), se recogen una serie de datos como peso, longitud furcal y sexo. Asimismo se toma una muestra de escama (para la lectura de edades de río y mar) y de tejido (para el análisis de ADN).

En los ríos que al inicio del programa contaban con un suficiente número de reproductores, las repoblaciones se llevaron a cabo con salmones del propio río. Por el contrario, aquellos ríos en los que el número de individuos era insuficiente (o inexistente, como era el caso del río Lérez) fueron repoblados con los descendientes de un stock creado con 500 adultos de retorno de varios ríos gallegos (Eo, Mandeo, Masma, Ulla y Miño). A partir del año 1999, sin embargo, cada río es repoblado con

Informe salmón 2008

descendientes nativos. Los huevos o alevines son utilizados en diferentes fases del ciclo vital para repoblar las poblaciones naturales de los ríos.



Figura 3. Estación de captura de adultos de Bora, río Lérez.

El micromarcado de juveniles, que permite su identificación, y unas mejores estimas de la relación juveniles salvajes/juveniles de repoblación han permitido estimar con precisión el éxito de retorno de individuos de repoblación con relación a los salmones nativos.

El balance del programa en el periodo comprendido entre los años 1999-2001 permitió: (1) calcular la tasa mínima de recaptura, que fue de 1,3 adultos por cada 1.000 juveniles repoblados, (2) determinar que la supervivencia en el mar (de esguín a adulto) es al menos dos veces superior en los salmones salvajes, y (3) que el rendimiento de todo el ciclo vital (de huevo a adulto) es casi dos veces superior en los peces de repoblación frente a los salvajes, manteniendo los dos grupos unas características bastantes similares. La información recogida en las estaciones de captura de los ríos Ulla y Lérez confirma que el retorno de peces de repoblación contribuye en gran medida al incremento en el número de salmones. En el año 2001, el 60% de los salmones de retorno del río Lérez y el 44% de los salmones de retorno del río Ulla eran de repoblación (Caballero, 2002). El desove natural de los peces de retorno hace, por tanto, que la población de cada río esté compuesta por los salmones nacidos en el propio río, los individuos de repoblación procedentes de la piscifactoría

Informe salmón 2008

que se liberan al río cada año, y los descendientes de los salmones de retorno repoblados (considerados nativos).

Los programas de repoblación, sin embargo, no están exentos de inconvenientes. Actualmente, y de modo generalizado, se reconoce que las repoblaciones deben ser efectuadas con individuos nativos, con el objetivo de preservar tanto las adaptaciones locales como la estructuración poblacional, aunque históricamente esto no se haya practicado. Como ejemplo, entre los años 1970-1990 se realizaron intensas repoblaciones en los ríos españoles con salmón importado del norte de Europa (Escocia, Irlanda, Noruega, Islandia). Los resultados de estas repoblaciones no sólo no lograron un incremento en el número de individuos sino que, al menos a corto plazo, podrían haber alterado la estructura genética de las poblaciones nativas. A pesar de que, en general, el impacto derivado de estas prácticas ha sido mínimo (García de Leániz *y col.*, 1989; Vázquez *y col.*, 1993; Morán *y col.*, 1994; Verspoor y García de Leániz, 1997; Blanco *y col.*, 2005; Morán *y col.*, 2005a; Morán *y col.*, 2005b), existe cierto grado de introgresión, más evidente en los ríos situados más al este de la Península (Morán *y col.*, 2005a; Campos *y col.*, 2007).

A partir del año 1992 se adopta otro tipo de medidas para la recuperación de las poblaciones, basándose en individuos nativos. Esta técnica implica la captura de adultos del río, para su reproducción y cría de los descendientes en piscifactoría, la recuperación de zancados y el cultivo holobiótico de juveniles (ciclo cerrado en agua dulce). No obstante, incluso utilizando individuos nativos existe la posibilidad de reducir el censo efectivo de la población (Waples y Do, 1994; Ryman *y col.*, 1995) y promover inintencionadamente selección artificial. Es importante, por tanto, realizar un seguimiento genético para determinar el impacto de este tipo de prácticas sobre la población natural.

En este informe se detallan los resultados obtenidos del análisis genético de los salmones retornados durante el año 2008 a los ríos Ulla, Léz y Eo. Se incluyen también los datos procedentes del sexado de adultos de retorno a los ríos Ulla y Léz, que proporcionan información igualmente importante para la gestión de las poblaciones.

MUESTRAS ANALIZADAS

Se tomaron muestras de aleta de los salmones adultos que retornaron a los ríos Ulla, Lézé y Eo para desovar durante el año 2008. Estas muestras procedían, bien de los individuos pescados durante la temporada hábil para la pesca, o bien de individuos recogidos en las estaciones de captura. El total de muestras recogidas fue de 325, de las cuales 150 muestras procedían del río Ulla, 61 del río Lézé y 114 muestras del río Eo.

Asimismo, se tomaron 94 muestras de sangre de los mismos salmones capturados dentro del periodo hábil para la pesca en los ríos Ulla y Lézé, siendo el número de muestras por río de 77 y 17 respectivamente.

Estos dos tipos de especímenes fueron utilizados para la realización de los dos estudios mencionados en el apartado anterior. Así, las muestras de aleta se utilizaron para realizar el análisis genético, mientras que las muestras de sangre se destinaron al estudio de la proporción de sexos.

ESTUDIO DE LA PROPORCIÓN DE SEXOS

Identificación de machos y hembras de salmón

Los salmones son "reproductores totales", es decir, después de comenzar a madurar las gónadas, todos los huevos o el esperma que van a ser emitidos por cada pez en un solo período de reproducción se desarrollan sincrónicamente. Su emisión ocurre en el breve espacio de una semana, más o menos, y su época de reproducción está claramente definida.

El desarrollo de las gónadas va acompañado de la presencia de caracteres sexuales secundarios. En el salmón destaca la transformación de las mandíbulas de los machos. En general, la hembra es más grande que el macho, debido a que se encarga de la prole y es la que aporta los óvulos al momento de la fecundación.

Por lo general, la determinación del sexo en esta etapa no representa dificultad, ya que se puede determinar el sexo por las características externas. En cambio, en etapas juveniles es necesario abrir la cavidad visceral y exponer las gónadas para determinar el sexo. Incluso así, la diferenciación entre machos y hembras en fases tempranas de la madurez sexual puede ser difícil y es necesario el empleo de equipos ópticos para identificar las gónadas.

La identificación no destructiva del sexo en los salmones adultos cuando no hay evidencias claras de caracteres sexuales secundarios se puede realizar de dos modos:

- Utilizando un marcador genético sexo-específico, que actualmente no existe, aunque la determinación del sexo en esta especie es genética.
- Mediante la observación de alteraciones fenotípicas asociadas con el desarrollo reproductivo.

Los cambios específicos de sexo relacionados con el sistema endocrino de los peces asociados con el desarrollo reproductivo, son detectables hasta 12 meses antes del desove. La modificación más pronunciada ocurre a nivel de la proteína precursora de la vitelogenina del saco vitelino de los huevos en las hembras.

Vitelogenina

La vitelogenina, según Stifani *y col.* (1990), es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos (peces, anfibios, reptiles y aves), durante el ciclo de maduración ovárica. Esta proteína es un complejo fosfoglicoprotéico plasmático, cuyo peso molecular oscila entre 250 y 600 kDa (Norberg y Aux., 1985). Su composición bioquímica es del tipo aminoacídica con lípidos, carbohidratos y fosfatos. Además tiene la capacidad de unir cationes divalentes, principalmente calcio.

La presencia de vitelogenina en el plasma es coincidente con la aparición de los primeros gránulos de vitelo en los ovocitos. Su síntesis se lleva a cabo en el hígado, inducida por la estimulación de los estrógenos ováricos, de los cuales el más importante es el estradiol (Zanuy y Carrillo, 1987). Una vez secretada por el hígado es transportada vía torrente sanguíneo de donde es captada en forma selectiva por los ovocitos, los cuales la disocian en dos proteínas fosforadas (lipovitelina y fosvitina), que actúan como fuente nutritiva para el desarrollo del embrión (Redshaw y Follet, 1971; Carnevali y Belvedere, 1991). Por lo tanto, la síntesis de vitelogenina está estrechamente ligada con el desarrollo gonadal de las hembras.

La vitelogenina se puede utilizar como un marcador específico para hembras de vertebrados ovíparos que no presentan dimorfismo sexual en las primeras etapas de su desarrollo. Existen diferentes métodos para detectarla: la inmunoaglutinación (LeBail y Breton, 1981); el radioinmunoensayo (Idler *y col.*, 1979; Hara *y col.*, 1983); la detección en doble difusión (Gordon *y col.*, 1984), la inmunolectroforesis empleada por Maitre *y col.* (1985), y el método inmunocolorimétrico que detecta cuantitativamente la vitelogenina sérica usando el ensayo inmunoenzimático ELISA. Este método se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima específica, de forma que los conjugados que resultan tengan tanto actividad inmunológica como enzimática.

Método inmunoenzimático mediante ELISA

1. *Procesado de la sangre:*

Las muestras se dejan a temperatura ambiente para que se forme el coágulo y se separe el suero del plasma sanguíneo, y se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido, el cual corresponde al suero, se transfiere a tubos Eppendorf que se almacenan a -20°C para su posterior análisis.

Informe salmón 2008

2. Anticuerpo empleado para el Inmunoensayo

Se utiliza un anticuerpo anti-vitelo de salmón, que en este caso correspondió a suero de conejo inmunizado con vitelogenina de salmón.

3. Test de Inmuno Ensayo en placa de policarbonato (ELISA)

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Leche 1% (leche en polvo en PBS) o PBS-BSA 1%(Albúmina en PBS 1X).
- PBS 1X.
- PBS-Tween (PBS 1X y Tween20 al 0.005%).
- Solución de revelado: 5mL de Buffer citrato* + 250µL de ABTS (20X)**+ 2 gotas de H₂O₂ (agua oxigenada 10%).
- Placa de Elisa Falcon.

TAPIZADO

- 1) 50 µL por pocillo de solución problema diluida en PBS (0,5µl suero sanguíneo + 49,5µL PBS 1X).
- 2) Incubar a 4°C toda la noche.

BLOQUEO

- 3) Añadir a cada pocillo 150 µL de leche 1% con azida al 0.01% [15mL por placa].
- 4) Incubar a 4°C toda la noche o 2 horas a 37°C.

ANTICUERPO ANTI-BSA

- 5) Lavar la placa tres veces con PBS-TWEEN y una vez con PBS.
- 6) Añadir el anticuerpo antivitelogenina diluido 1:1200 volumen final = 50 µL por pocillo [PBS para las diluciones].
- 7) Incubar 2 horas a 4°C.
- 8) Lavar la placa dos veces con PBS-TWEEN y una vez con PBS.
- 9) 50 µL por pocillo de Anti-rabbit IgG***, dilución 1:2000.
- 10) Incubar de 1 h 30 min o 2 h a 37°C.
- 11) Lavar la placa dos veces con PBS-TWEEN y una vez con PBS.
- 12) Preparar la solución Avidina(A)-Biotina(B)***a dilución 1:2000 (1 µL A+ 1 µL B en 2000 µL PBS 1X). Echar 50 µL de la dilución en cada pocillo e incubar 15 min a T° ambiente.

Informe salmón 2008

IMPORTANTE: la dilución debe prepararse 30 min antes de ser utilizada y permanecer en oscuridad.

13) Lavar la placa dos veces con PBS-TWEEN y una vez con PBS.

REVELADO Y LECTURA

14) Dispensar 50 μ L de solución de revelado por pocillo.

15) A los 2-3 minutos bloquear reacción con ácido cítrico 0.1 M (50 μ L/pocillo).

16) Leer a 405 nm en el espectrofotómetro.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

17) Las hembras de salmón darán a simple vista un color verde intenso, mientras que en los machos no detectaremos color o éste será muy débil (ver Figura 4).

* Mezclar v/v ácido cítrico y citrato sódico y ajustar el pH a 4.3 (añadiendo ácido cítrico).

** Una pastilla de ABTS (Sigma-Aldrich, A-9941) en 910 μ L de Buffer citrato (tubo Eppendorf envuelto en papel de aluminio).

***Anti-rabbit, avidina y biotina, kit comercial VECTASTAIN ELITE ABC KIT de VECTOR LABORATORIES.

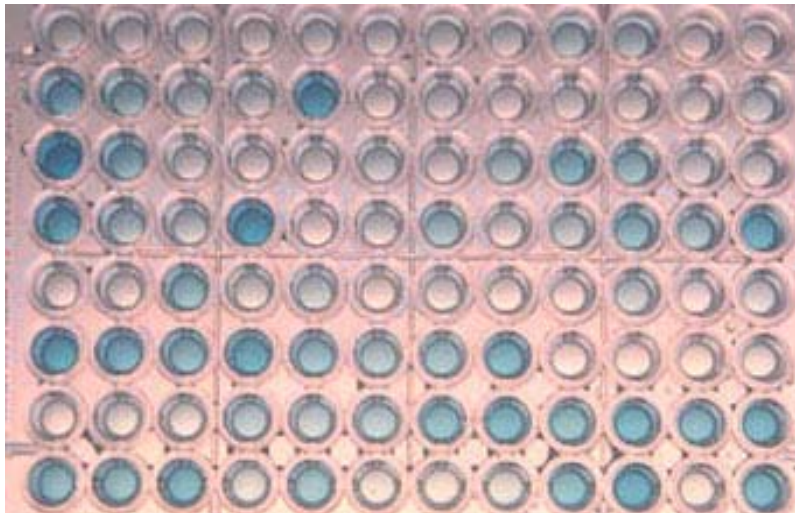
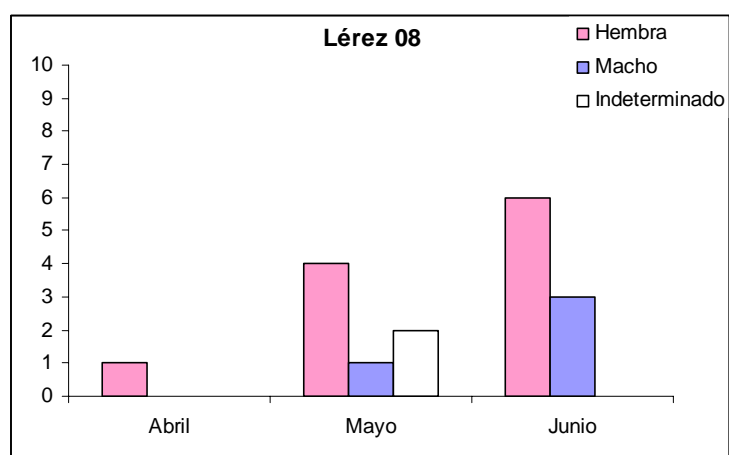
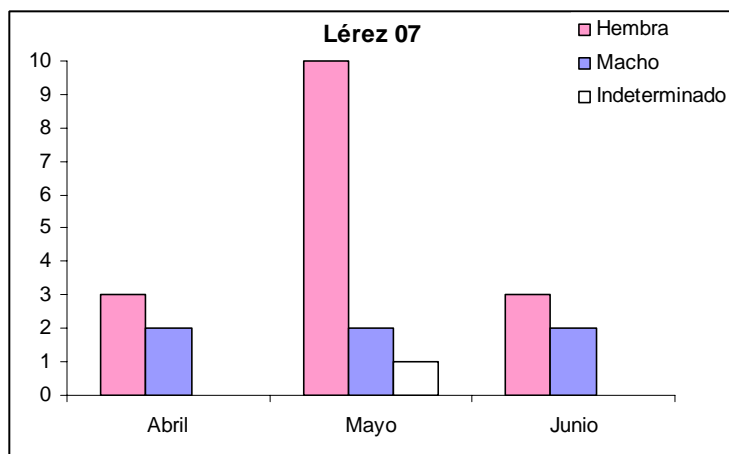


Figura 4. Fotografía de una placa de ELISA revelada para la vitelogenina. Los pocillos en verde indican la presencia de la proteína en la sangre del pez analizado.

Determinación de la proporción de sexos en los ríos Ulla y Lézé

Se analizaron 94 muestras de sangre de salmones retornados a los ríos Ulla y Lézé durante la temporada de pesca del 2008. 17 de las muestras correspondieron al río Lézé, 3 al río Tambre y 77 al río Ulla. Se incluyeron además 18 muestras del río Lézé correspondientes al año 2007, y 5 muestras del Ulla de ese mismo año que no habían sido incluidas en los análisis realizados el pasado año. En la Figura 5 se resumen los resultados del análisis por cada río y año. En los casos que se presentan como indeterminados, lo más probable es que sean hembras en estadios tempranos del desarrollo sexual. Como control al experimento se utilizaron salmones capturados durante la temporada de pesca y que fueron enviados a la piscifactoría donde terminaron su maduración sexual (Ver Apéndice para más información).



Informe salmón 2008

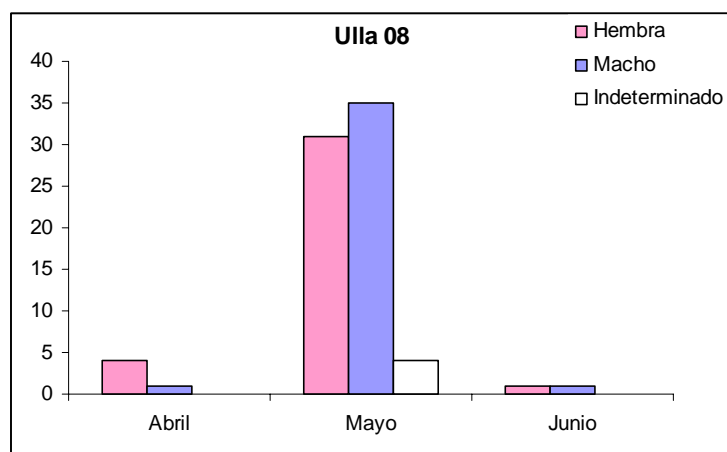


Figura 5. Resultados del sexado por río, mes y año de captura.

En la Tabla 1 se presenta un resumen del número de machos y hembras por río y año. Para el río Ulla el porcentaje de hembras en el año 2008 fue de aproximadamente el 50%, inferior al aproximadamente 60% del año 2007. En el río Lárez el porcentaje de hembras en el año 2008 fue de aproximadamente el 64%, ligeramente inferior al 68% registrado en el año 2007.

Río	Hembra		Macho		¿	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008
Ulla	46	36	28	37	3	4
Lárez	24	11	11	4	0	2

Tabla 1. Tabla resumen del número de machos y hembras por río.

ESTUDIO GENÉTICO

Marcadores moleculares

La herramienta empleada para evaluar el estado genético de las poblaciones de salmón de los ríos mencionados anteriormente, fue la técnica de genotipado de marcadores **microsatélites**.

Los marcadores microsatélites son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos (Figura 6). Las ventajas de estos marcadores frente a otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) se resumen en su alto grado de polimorfismo, el tipo de herencia (mendeliana simple) y el modo de dominancia (codominancia, pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos). Asimismo, son fáciles de medir y analizar, son altamente fiables, repetibles y pueden ser automatizados. El elevado grado de polimorfismo que presentan los microsatélites y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, dada la escasa probabilidad de que dos individuos elegidos al azar analizados para una serie de estos marcadores, compartan todos sus alelos.

Una de las principales utilidades de este tipo de marcador, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudios es de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones de animales en peligro de extinción.

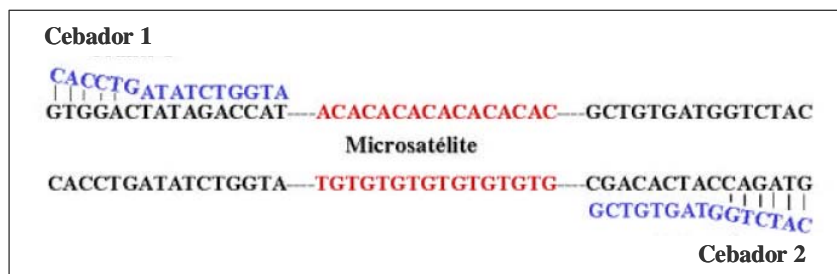


Figura 6. Esquema de un marcador microsatélite, flanqueado por sus cebadores directo (1) e inverso (2).

Informe salmón 2008

Los primeros microsatélites específicos para el salmón atlántico fueron aislados por Slettan *y col.* (1993), y desde esa fecha se han aislado más de 200 loci, aunque para el estudio poblacional no todos son igual de "populares". La optimización en el uso de marcadores microsatélites ha pasado por la sustitución de técnicas manuales (geles de acrilamida) a la utilización de secuenciadores automáticos. Este avance ha dado una nueva perspectiva metodológica, de modo que permite procesar un mayor número de muestras en menor tiempo.

Actualmente, existen muchos datos disponibles aunque no todos los resultados son comparables, dado que no todos los laboratorios utilizan los mismos loci. Es por ello que recientemente se ha celebrado una reunión, "Atlantic salmon, Microsatellites and Genetic Stock Identification" (Virginia, EEUU, 2004) en la que han participado diferentes grupos de investigación para llegar a un acuerdo en la utilización de los mismos loci microsatélites y establecer un laboratorio de referencia que permita comparar los datos de las diferentes poblaciones. Los microsatélites utilizados para realizar este trabajo se resumen en la Tabla 2.

	Tipo repetición	Rango (pb)	Referencia
SSsp2210	Tetra	104 - 185	Patterson <i>y col.</i> , 2004
SSspG7	Tetra	112 - 214	Patterson <i>y col.</i> , 2004
SsaD144	Tetra	112 - 289	King <i>y col.</i> , 2005
Ssa202	Tetra	200 - 330	O'Reilly <i>y col.</i> , 1996
Sp2201	Tetra	220 - 371	Patterson <i>y col.</i> , 2004
SsaD157	Tetra	316 - 416	King <i>y col.</i> , 2005

Tabla 2. Relación de los loci microsatélites utilizados en el presente estudio. Tetra: tetranucleótido; pb: pares de bases.

Descripción de la técnica

El ADN genómico se aisló en base al protocolo de extracción con resina Chelex de Estoup *y col.* (1996).

Las reacciones de PCR contenían 1-2 μ L del ADN extraído, 10 unidades de BioTaq polimerasa, 2.5 mM de $MgCl_2$, 2.5 mM de cada dNTP y concentraciones de los cebadores entre 0.13 y 0.3 μ M. Los microsatélites se amplificaron en dos reacciones multiplex. La primera incluyó los loci *SSsp2210*, *SspG7* y *Ssa202* y la segunda, los loci

SsaD144, *SSsp2201* y *SsaD157*. El programa de temperaturas utilizado para la amplificación constaba de 30 ciclos y se especifica en la Figura 7.

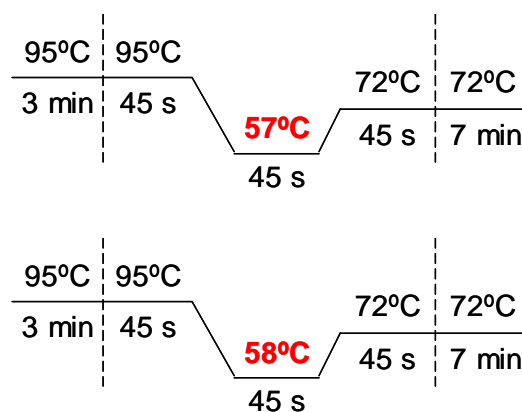


Figura 7. Programas de temperaturas utilizados para la amplificación de los seis marcadores microsatélites. El primer programa se utilizó para la amplificación de la multiplex I, y el segundo programa, cuya temperatura de hibridación se incrementó en 1°C, fue utilizado para amplificar la multiplex II.

Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) y los resultados, procesados por el software GENESCAN (Applied Biosystems).

Estudio de la variabilidad genética

Heterocigosis:

Niveles: 0-1.

Significado biológico: 0, consanguinidad total; 1, variabilidad máxima.

La variabilidad o diversidad genética está influida por diferentes factores, como la selección, la deriva genética, la consanguinidad, la migración y la especiación (Avice, 2004). La deriva genética (cambio aleatorio en las frecuencias génicas de una generación a la siguiente) resulta en la pérdida de diversidad genética ya que, por azar en el proceso reproductivo, algunos alelos no se transmiten a la siguiente generación. Uno de los principales problemas que afectan a las poblaciones minoritarias son los inevitables apareamientos entre individuos emparentados, que se traduce genéticamente en un incremento de la consanguinidad con la consiguiente depresión consanguínea (la reducción de los valores medios fenotípicos de los caracteres productivos y reproductivos) y, como consecuencia de la misma, la inevitable disminución del censo y/o extinción de la población.

Informe salmón 2008

Un objetivo esencial en un programa de conservación es, por tanto, el mantenimiento de altos niveles de variabilidad genética al tiempo que se evite el incremento de consanguinidad.

Los cálculos y estimas de heterocigosis, número total de alelos y número privado de alelos (alelos que se encuentran de forma exclusiva en una población) se realizaron mediante el programa GenAlEx v.6 (Peakall y Smouse, 2006). Para estimar la riqueza alélica (corrección que se aplica al número observado de alelos que permite realizar comparaciones entre poblaciones), fue necesario implementar el programa FSTAT (Goudet, 2001), que realiza remuestreos de alelos en cada población utilizando el mínimo tamaño de muestra (en este caso, la muestra más reducida constaba de 58 individuos). Los resultados se resumen en la Tabla 3.

		<i>SSsp2210</i>	<i>SSspG7</i>	<i>SsaD144</i>	<i>Ssa202</i>	<i>Sp2201</i>	<i>SsaD157</i>	Media
Ulla	<i>N</i>	149	149	150	149	149	150	149,33
	<i>Na</i>	9	13	24	9	21	18	15,67
	<i>Ra</i>	7,56	12,20	18,87	7,17	16,85	16,28	13,16
	<i>Np</i>	0	0	1	0	2	1	0,33
	<i>Ho</i>	0,64	0,83	0,92	0,84	0,86	0,87	0,83
	<i>He</i>	0,70	0,84	0,91*	0,77	0,91*	0,89	0,80
Lérez	<i>N</i>	58	58	61	58	60	60	59,17
	<i>Na</i>	7	15	18	8	20	16	14,00
	<i>Ra</i>	7,00	15,00	17,80	8,00	19,73	15,99	13,92
	<i>Np</i>	0	0	1	0	1	0	0,21
	<i>Ho</i>	0,81	0,78	0,89	0,79	0,95	0,87	0,85
	<i>He</i>	0,71	0,87	0,89	0,82	0,90	0,90	0,85
Eo	<i>N</i>	114	114	113	112	112	108	112,17
	<i>Na</i>	10	17	26	9	25	19	17,67
	<i>Ra</i>	8,66	14,71	21,52	8,49	21,47	17,61	15,41
	<i>Np</i>	1	2	3	0	4	2	0,58
	<i>Ho</i>	0,80	0,81	0,93	0,84	0,90	0,95	0,87
	<i>He</i>	0,79	0,85	0,92	0,77	0,91	0,92	0,86

Tabla 3. Resultados de los parámetros de variabilidad genética. *N*, número de individuos de la población; *Na*, número de alelos observado; *Ra*, riqueza alélica; *Np*, número de alelos privados; *Ho*, heterocigosis observada; *He*, heterocigosis esperada. Los loci que se desvían del equilibrio de Hardy-Weinberg se simbolizan con asterisco.

Los niveles de heterocigosis fueron, en los tres casos, superiores a 0,80, que es indicativo de una variabilidad genética elevada y, por tanto, de una baja incidencia de apareamiento entre individuos emparentados. Del mismo modo, los niveles de riqueza alélica fueron también elevados y similares entre poblaciones. El número de alelos privados o únicos fue sustancialmente mayor en el río Eo, hecho explicable teniendo

en cuenta la distancia geográfica entre los tres ríos. La proximidad entre los ríos Ulla y Lárez facilita la migración de individuos entre estas dos poblaciones, por lo que se espera que su parecido sea mayor.

Determinación de la existencia de cuellos de botella

Un cuello de botella es el resultado de una reducción drástica en el censo efectivo de una población. En una población que ha sufrido un cuello de botella, los individuos están más emparentados de lo esperado, ya que provienen de unos pocos individuos que pueden haber dejado más o menos descendencia. A nivel molecular, este suceso produce una disminución de la variabilidad total, con la peculiaridad de que los niveles de heterocigosis disminuyen en menor magnitud de lo que se esperaría bajo equilibrio mutación-deriva para el grado de reducción del número de alelos.

La determinación de la existencia de cuellos de botella en las poblaciones estudiadas se realizó mediante el programa Bottleneck (Cornuet y Luikart, 1996). Esta aplicación calcula la probabilidad de ocurrencia de un cuello de botella en función del modelo mutacional asumido (modelo de alelos infinito, IAM; modelo de mutación paso a paso, SMM). El modelo que se supone para los microsatélites es el TPM, que consiste en un modelo mixto en el cual se asume que el 90% de las mutaciones siguen un modelo de mutación paso a paso y el 10% restante se ajustan al modelo de alelos infinitos. Estadísticamente se implementa un test de los signos (100000 iteraciones) para detectar exceso de heterocigosis. Los resultados de este análisis se resumen en Tabla 4.

	IAM	TPM	SSM
Ulla	0,008*	0,42	1,0
Lárez	0,008*	0,42	0,98
Eo	0,008*	0,95	0,99

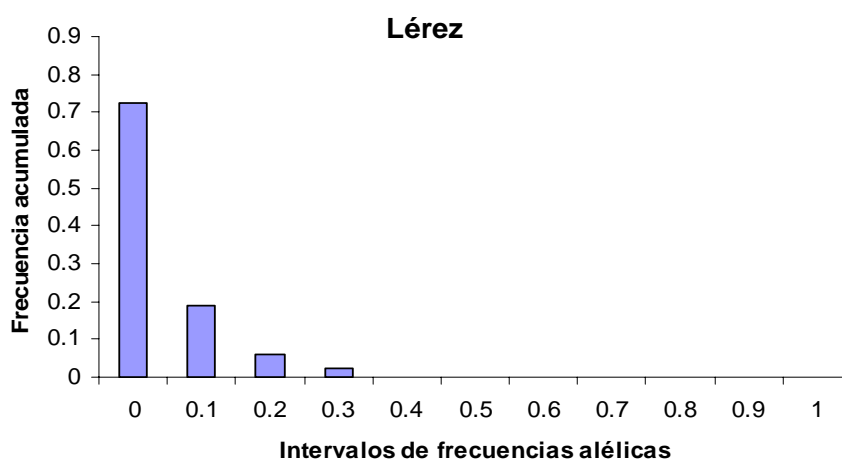
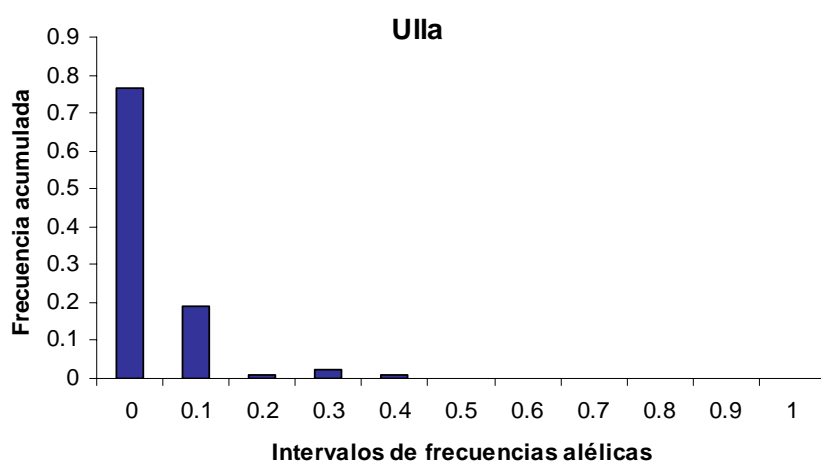
Tabla 4. Valores de probabilidad resultantes del análisis para cada uno de los modelos mutacionales. Valores significativos señalados con asterisco.

Este mismo programa proporciona una salida gráfica correspondiente al método gráfico de Cornuet y Luikart (1996). Este método es de gran utilidad para visualizar la existencia de cuellos de botella recientes pese a que es un método cualitativo y no cuantitativo. Se basa en una representación gráfica, donde el eje X representa los intervalos de frecuencias alélicas, mientras que el eje Y se corresponde con la frecuencia acumulada de dichas frecuencias.

Informe salmón 2008

De este modo, se puede conocer el rango de frecuencias en que se incluyen la mayoría de los alelos de la población. La consecuencia de un cuello de botella es eliminar principalmente los alelos poco frecuentes como resultado de la deriva genética, por lo que un déficit de ellos en la gráfica implicaría una reducción en el censo efectivo poblacional.

Contrariamente, en una población que no ha sufrido una regresión reciente y brusca en su censo efectivo, la mayoría de los alelos se presentan en frecuencias bajas, resultando en una gráfica con forma típica en "L". En la Figura 8 se representan las gráficas de frecuencias acumuladas para cada una de las poblaciones de estudio.



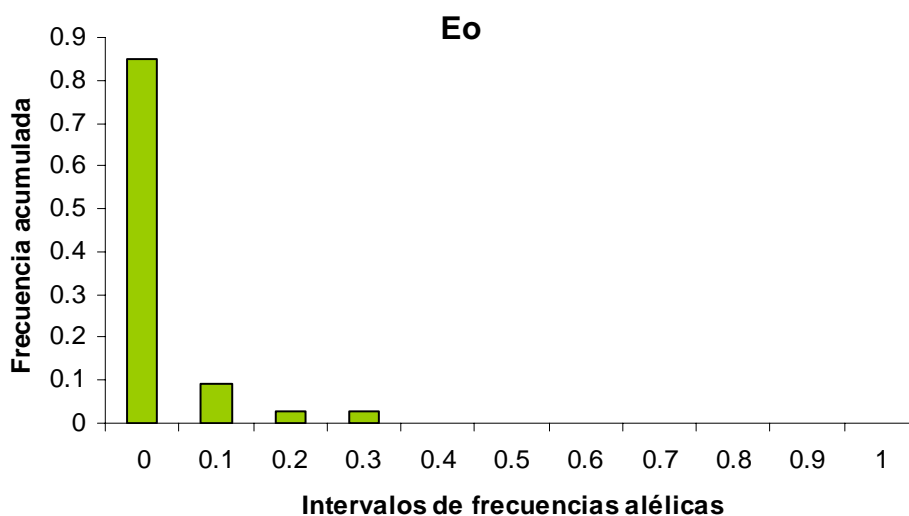


Figura 8. Representación de las frecuencias alélicas acumuladas para cada población. Nótese la distribución típica en “L” en todos los casos.

El test de los signos para detectar deficiencia de heterocigosis indicó, para el modelo mutacional que se asume para los microsatélites, la ausencia de cuellos de botella que hayan perdurado hasta el presente. Del mismo modo, el método gráfico confirmó este resultado, atendiendo a la forma típica en “L” de la distribución de frecuencias acumuladas.

Análisis de la estructura poblacional

1. Estadístico *F_{ST}*

F_{ST}:

Niveles: 0-1

Significado biológico: 0, estructura poblacional nula; 1, estructuración total.

El salmón atlántico es una especie con una alta fidelidad de retorno al río de origen, por lo que es esperable detectar cierto grado de estructuración entre las poblaciones. No obstante, tanto la migración (aunque baja) como la repoblación con individuos de ríos diferentes, pueden haber contribuido a homogeneizar genéticamente estas poblaciones.

Con objeto de determinar este grado de estructuración, se implementó el programa Genetix (Belkhir y col., 2001), que dispone de una herramienta para calcular los estadísticos *F*. En este caso, se presentan los resultados del índice *F_{ST}* por pares de poblaciones (Tabla 5).

Informe salmón 2008

	Lérez	Eo
Ulla	0,012*	0,021*
Lérez		0,027*

Tabla 5. Valores de FST por pares de poblaciones. En todas las comparaciones las diferencias fueron estadísticamente significativas (asterisco).

Los resultados revelaron un grado de estructuración poblacional bajo, pero estadísticamente significativo. Asimismo, las diferencias obtenidas entre el río Eo y los otros dos ríos de la vertiente atlántica fueron mayores que entre estos últimos, consistentemente con la estructura geográfica de estas poblaciones.

2. Test de asignación

Otro modo de comprobar el grado de parecido entre los individuos de cada población, es realizando un test de asignación. El programa GenALEX v.6 implementa el método basado en las frecuencias de Paetkau *y col.* (1995, 2004).

Los porcentajes de asignación correcta de los individuos a su río de origen fueron: un 69% para el río Ulla, un 62% para el río Lérez y un 81% para el río Eo, valores significativamente diferentes de los que se esperarían en el caso de que las tres poblaciones constituyesen una única población (33% para cada una de ellas). La Figura 9 representa la asignación de cada una de las muestras a la población con mayor verosimilitud (en términos del valor más negativo del logaritmo de la verosimilitud).

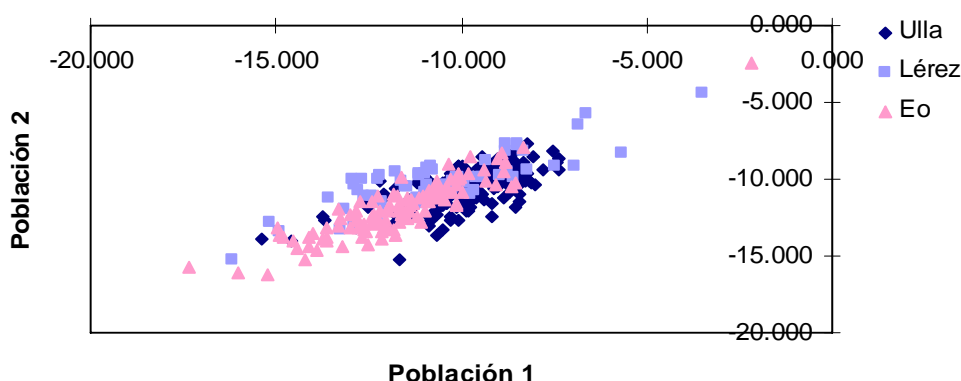


Figura 9. Asignación de los individuos a las poblaciones en función de su verosimilitud (logaritmo negativo de la verosimilitud).

3. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

El AMOVA es una importante herramienta estadística que permite particionar jerárquicamente la variación genética en diferentes niveles (poblaciones, regiones, etc), de modo que da a conocer qué parte de la variación total se atribuye a diferencias dentro de o entre poblaciones.

El análisis fue realizado mediante el programa GenAlEx v.6, que implementa los métodos de Excoffier *et al.* (1992).

El programa fue testado con dos particiones diferentes. En primer lugar, se compararon las tres poblaciones en global, con objeto de conocer qué parte de la variación es atribuible a las diferencias dentro de población y entre poblaciones.

En segundo lugar, se introdujo un nivel más de estructuración para los ríos Ulla y Lárez, dentro de los cuales se distinguieron otros dos grupos. Esta jerarquización se realizó con objeto de determinar diferencias genéticas entre los individuos retornados al río antes del mes de agosto (que se presuponen en su mayoría añales), y los retornados después de este mes (que se presuponen salmones multi-invierno).

El análisis del primer caso atribuyó el 98% de la variación a diferencias dentro de cada población (Figura 10), mientras que el restante 2% se debía a diferencias entre poblaciones. El análisis del segundo caso no aportó información adicional, no detectando diferencias entre los dos grupos dentro de cada río.

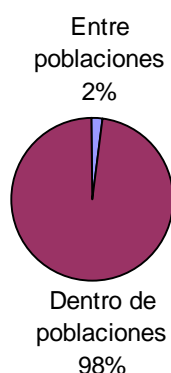


Figura 10. Resultado del análisis de la varianza molecular.

5. Correlación entre distancia genética y distancia geográfica

R^2 :

Niveles: 0-1

Significado biológico: 0, correlación nula; 1, correlación total.

El test de Mantel es una prueba estadística de correlación entre dos matrices. En este caso, se trata de correlacionar una matriz de distancia genética y una matriz de distancia geográfica. Esta prueba se basa en realizar permutaciones aleatorias de las filas y columnas (1000 en nuestro caso), de modo que la correlación es recalculada en cada permutación. La significación de la correlación observada viene dada por la proporción de permutaciones con un coeficiente de correlación superior al observado.

Para implementar el test de Mantel se utilizó el programa PopTools (Hood, 2008). La matriz de distancia genética (Distancia de Nei 1972) fue estimada previamente con el programa Genetix. Las correspondientes matrices utilizadas en el test se resumen en la Tabla 6.

	Lérez	Ulla	Eo
Lérez	0	0,105	0,223
Ulla	35	0	0,154
Eo	270	235	0

Tabla 6. Matrices de distancias utilizadas en el presente estudio. Bajo la diagonal se representa la distancia geográfica en Km. La distancia genética (Nei 1972), se representa sobre la diagonal.

El test de correlación de matrices resultó ser significativo ($p < 0.01$). El valor del coeficiente de correlación fue de 0.78 (ver Figura 11). Este resultado es consistente con los anteriores análisis de la estructura poblacional, y confirma que existe cierto grado de aislamiento por distancia entre las poblaciones de los ríos estudiados.

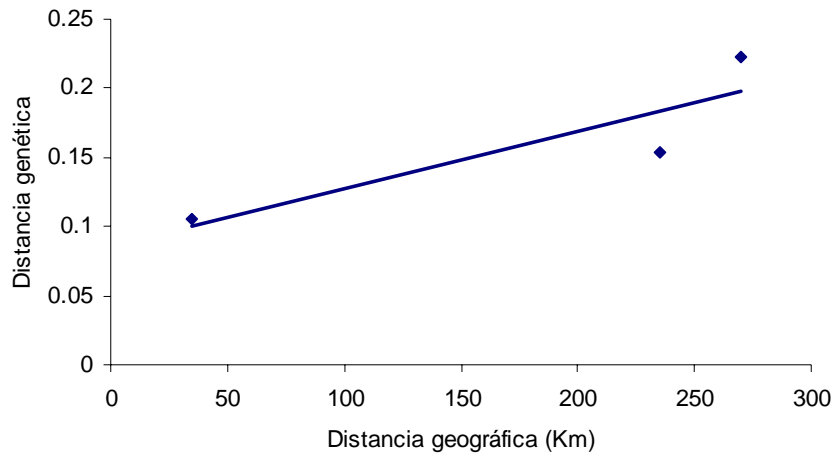


Figura 11. Correlación entre distancia genética y geográfica ($y = 0.0004x + 0.0861$, $R^2 = 0.7846$).

Evolución temporal de la variabilidad genética

En este apartado realizamos una recopilación de los datos desde el año 2005, con objeto de evaluar la tendencia, en términos de variabilidad genética, de las poblaciones de salmón de los ríos estudiados.

Los datos de heterocigosis observada y esperada (Figura 12) y variabilidad alélica (Figura 13), resultaron ser estables a lo largo del tiempo.

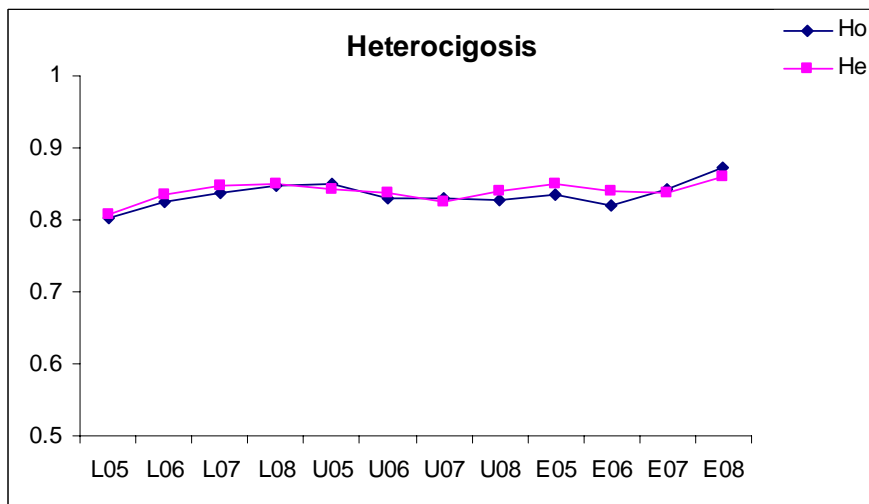


Figura 12. Recopilación de datos de heterocigosis observada (Ho) y esperada (He) en los ríos estudiados (L: Lérez; U: Ulla; E: Eo), desde el año 2005 hasta el año 2008.

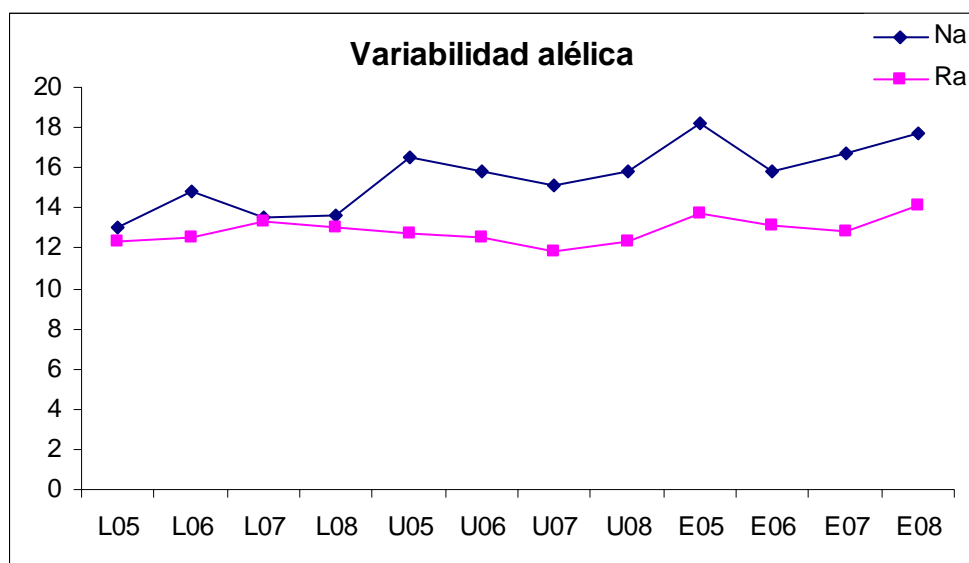


Figura 13. Recopilación de datos del número observado de alelos (Na) y riqueza alélica (Ra, calculado para un tamaño de población de 40 individuos) en los ríos estudiados (L: Lérez; U: Ulla; E: Eo), desde el año 2005 hasta el año 2008. La desviación entre el número observado de alelos y la riqueza alélica se debe a los diferentes tamaños de muestra de las poblaciones reales.

Las estimas de FST por pares de poblaciones (dentro de cada año) se resumen en la Figura 14. A pesar de existir ligeras oscilaciones, se puede observar que este índice es estable a lo largo de los años. En todos los casos, las diferencias observadas entre cada pareja fueron significativas, indicativo de que se mantiene la estructura poblacional.

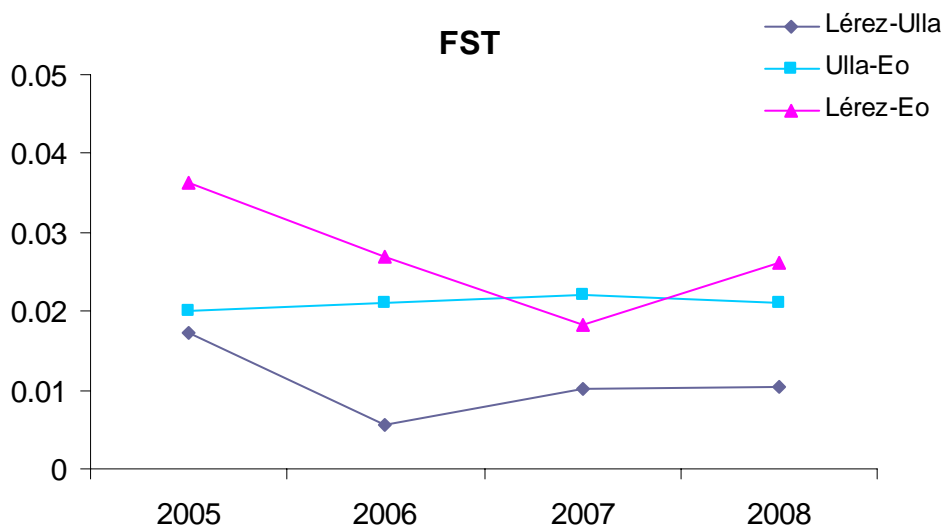


Figura 14. Representación del FST por pares de poblaciones en cada uno de los años de estudio.

Por último, se representaron las frecuencias alélicas acumuladas para cada río en los diferentes años de estudio, con el objetivo de visualizar reducciones en el censo

Informe salmón 2008

efectivo poblacional (Figura 15). A modo de recordatorio, mencionar que en una población que no ha sufrido reducciones importantes en su censo efectivo, la distribución de frecuencias alélicas se representa como una gráfica típica en forma de “L”, que indica que la mayor parte de los alelos se encuentra a frecuencias bajas.

En este caso, las gráficas de los distintos años confirman una gran estabilidad en la distribución de frecuencias a lo largo del tiempo.

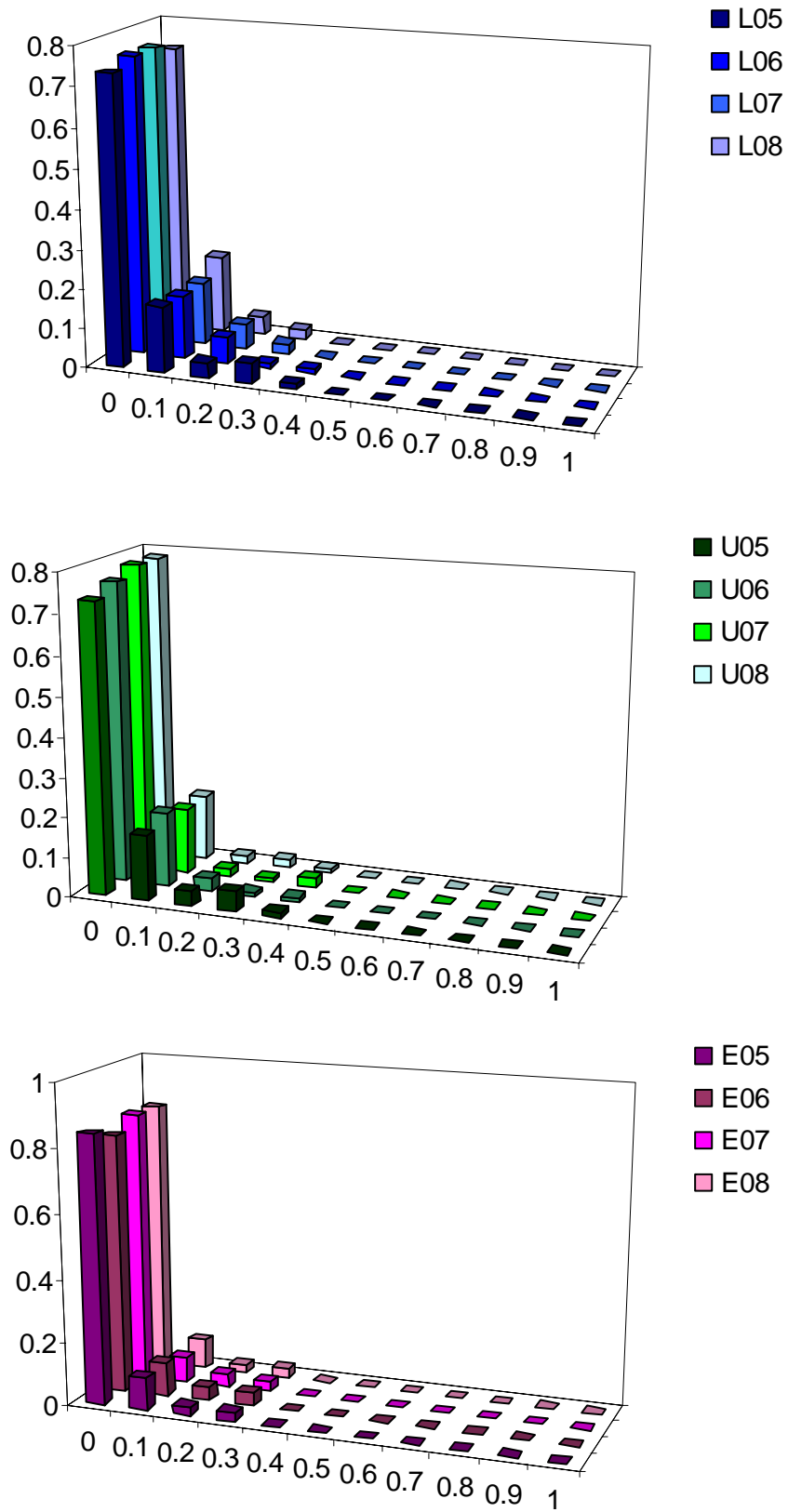


Figura 15. Método gráfico de Cornuet y Luikart (1996). Representación de las frecuencias alélicas acumuladas a lo largo del tiempo en los tres ríos estudiados (L: Lérez; U: Ulla, E: Eo).

CONCLUSIONES

Los resultados derivados del presente trabajo validan el éxito en la gestión de los programas de repoblación de los ríos estudiados.

1. La recuperación de las poblaciones de salmón atlántico en los ríos gallegos estudiados se hace evidente no sólo atendiendo al número de individuos que cada año retornan a estos ríos, sino por los elevados niveles de variabilidad genética existentes en estas poblaciones. Los resultados de heterocigosis y número de alelos sugieren unos bajos niveles de consanguinidad.

2. La elevada fidelidad en el retorno al río de origen que presenta el salmón atlántico conduce a cierto grado de aislamiento entre las poblaciones de diferentes ríos, incluso si éstos se encuentran cercanos, principalmente por el efecto de la deriva genética. Los resultados del análisis de la estructura poblacional confirman cierto grado de estructuración entre las poblaciones, con diferencias locales necesarias para preservar el potencial adaptativo.

3. El censo efectivo de las poblaciones estudiadas se mantiene en unos niveles adecuados, ya que no se han detectado cuellos de botella cuyo efecto haya perdurado hasta las poblaciones actuales.

4. Los datos acumulados a lo largo de los últimos años (2005-2008) confirman la estabilidad genética de las poblaciones de salmón de los ríos Léz, Ulla y Eo. El éxito de las repoblaciones con salmónes nativos realizadas a partir del año 1990, pone de manifiesto la importancia de mantener la variación genética de la población natural.

REFERENCIAS

- Avise J.C. (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd Edition. Sinauer Associates, Sunderland, USA, pp. 684.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. and Bonhomme F. (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Blanco G., Ramos M.D., Vázquez E., and Sánchez J.A. (2005) Assessing temporal and spatial variation in wild populations of Atlantic salmon with particular reference to Asturias (Northern Spain) rivers. *Journal of Fish Biology*, **67** (Supplement A): 169-184.
- Braña F., Garrido R., Reyes-Gavilán L.F., Toledo M.M. and Nicieza A.G. (1995a) Distribución del salmón Atlántico en la península ibérica. Localización en las cuencas fluviales y en el contexto de las comunidades de peces. In: *Biología y conservación del salmón atlántico (Salmo salar)* en los ríos de la región cantábrica, Braña F. (Ed.), ICONA, Madrid, pp. 13-25.
- Caballero P. (2002) Programas de recuperación del salmón Atlántico (*Salmo salar* L.) en los ríos Ulla, Lérez y Miño. In: *II Jornadas del Salmón Atlántico en la Península Ibérica*, Xunta de Galicia, pp. 83-116.
- Campos J.L., Posada D. and Morán P. (2007) Introgression and genetic structure in northern Spanish Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations according to mtDNA data. *Conservation Genetics*, **9**: 157-169.
- Carnevali O., Belvedere P. (1991) Comparative studies of fish amphibian and reptilian vitellogenin. *Journal of Experimental Zoology*, **259**: 18-25.
- Cornuet J.M. and Luikart G., (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**: 2001-2014.
- Estoup A., Largiadere C.R., Perrot E., and Chourrout D. (1996) Rapid one-tube extraction for a reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **5**: 295-298.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, **131**: 479-491.
- García de Leániz C., Serdio A. and Consuegra S. (2001) Present status of Atlantic salmon in Cantabria. In: *El Salmón, Joya de Nuestros Ríos* (Eds.), Santander, pp. 55-82.

- García de Leániz C., Verspoor E. and Hawkins A.D. (1989) Genetic determination of the contribution of stocked and wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to the angling fisheries in two Spanish rivers. *Journal of Fish Biology*, **35**: 261-270.
- Gordon M., Owen T., Ternan T. and Hildebran L. (1984) Measurement of a sex specific protein in skin mucus of premature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, **43**: 333-339.
- Goudet J., (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). (Updated from Goudet, J. (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**: 485-486.
- Hara A., Tacaño K. and Hirai H. (1983) Immunochemical identification of female specific serum protein, vitellogenin, in the medaks, (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemical Physiology*, **76A**: 135-141.
- Hervella F. and Caballero P. (1999) Inventariación piscícola dos ríos galegos. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela.
- Hood G.M. (2008) PopTools version 3.0.6. Available on the internet. URL <http://www.csl.csiro.au/poptools>.
- Idler D.R., Hwang S.J. and Crim L.W. (1979) Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmunoassay. *Journal Fisheries Research Board Canada*, **36**: 574-578.
- King T.L., Eackles M. and Letcher B. (2005) Microsatellite DNA markers for the study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) kinship, population structure, and mixed-fishery analyses. *Molecular Ecology Notes*, **5**: 130-132.
- Klemetsen A., Amundsen P.A., Dempson J.B., Jonsson B., Jonsson N., O'Connell M.F. and Mortensen E. (2003) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), brown trout (*Salmo trutta* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish*, **12** (1): 1-59.
- Le Bail P.Y. and Breton B. (1981) Rapid determination of the sex of puberal salmon fish by a technique of immunoagglutination. *Aquaculture*, **22**: 367-375.
- Maitre J.L., Le Guellec C., Derrien S., Tenniswood M. and Valotaire Y. (1985) Measurements of vitellogenin from rainbow trout by rocket immunoelectrophoresis: application to the kinetic analysis of estrogens stimulation in the male. *Canadian Journal of Biochemical Cellular Biology*, **63**: 982-987
- Morán P., Pendás A.M., García-Vázquez E., Izquierdo J.L. and Rutherford D.T. (1994) Electrophoretic assessment of the contribution of transplanted Scottish Atlantic salmon (*Salmo salar*) to the Esva river (Northern Spain). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51**: 248-252.

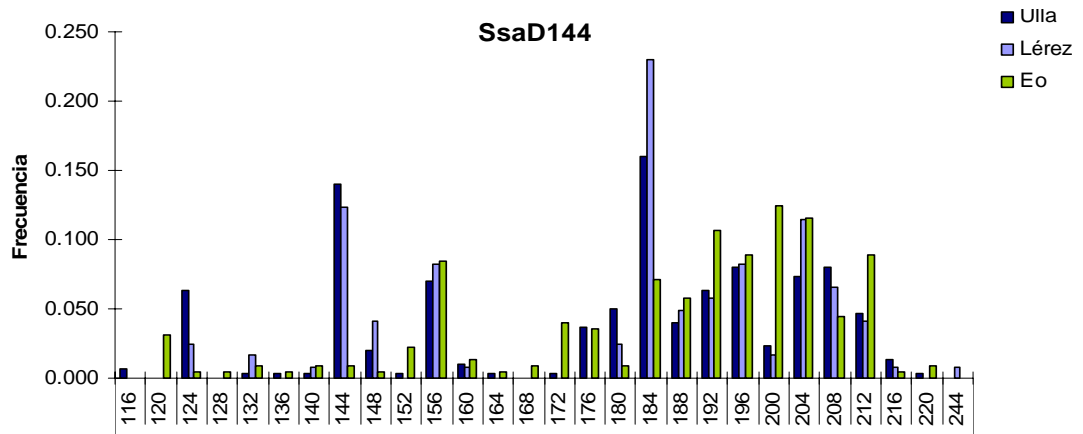
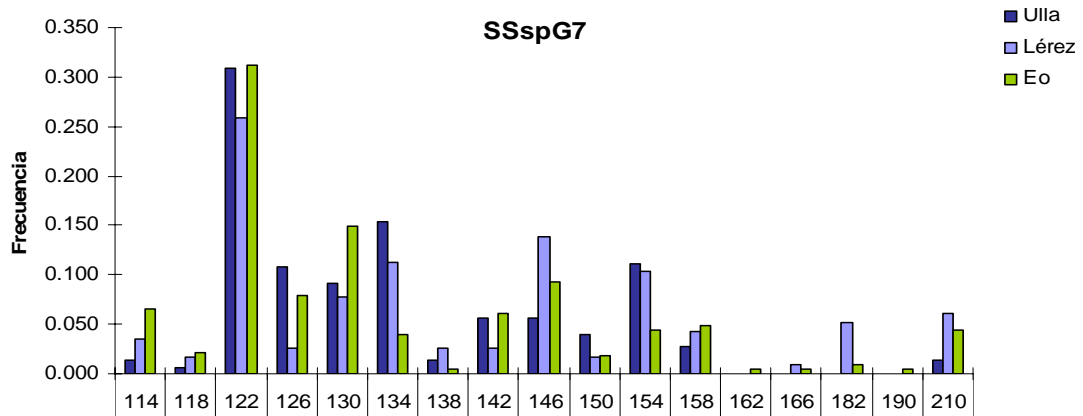
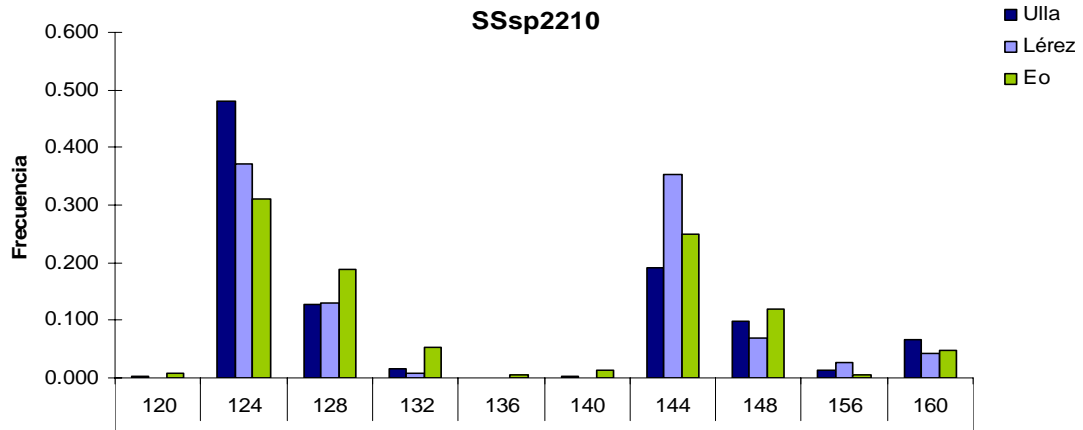
- Morán P., Pérez J., Dumas J., Beall E. and García-Vázquez (2005a) Stocking-related patterns of genetic variation at enzymatic loci in south European Atlantic salmon populations. *Journal of Fish Biology*, **67**: 185-199.
- Morán P., Pérez J. and García-Vázquez E. (2005b) Genetic variation in endangered populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) from Northwestern Spain. *Journal of Fish Biology*, **67** (Supplement A): 206-212.
- Norberg B. and Haux C. (1985) Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two salmon species: Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comparative Biochemical Physiology*, **81B**: 869-876
- O'Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K. and Wright J.M. (1996) Rapid analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**: 2292-2298.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. (1995) Microsatellite analysis of population structure in canadian polar bears. *Molecular Ecology*, **4**: 347-354.
- Paetkau D., Slade R., Burdens M., Estoup A. (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulationbased exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, **13**: 55-65.
- Patterson S., Piertney S., Knox D., Gilbey J. and Verspoor E. (2004) Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites. *Molecular Ecology Notes*, **4**: 160-162.
- Peakall R. and Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288-295
- Redshaw M.R. and Follett B.K. (1971) The crystalline yolk platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian. *Biochemical Journal*, **124**: 759-766.
- Ryman N., Utter F. and Laikre L. (1995) Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **5** (4): 417-446.
- Slettan A., Olsaker I. and Lie Ö. (1993) Isolation and characterization of variable (GT) repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Animal Genetics*, **24**: 195-197.
- Stifani S., Le Menn F., Rodríguez J.M. and Schneider W.J. (1990) Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochemical Biophysics Acta*, **1045**: 271-279.
- Vázquez E., Presa P., Sánchez J.A., Blanco G. and Utter F. (1993) Genetic characterization of introduced populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Asturias (northern Spain). *Hereditas*, **119**: 45-71.

Informe salmón 2008

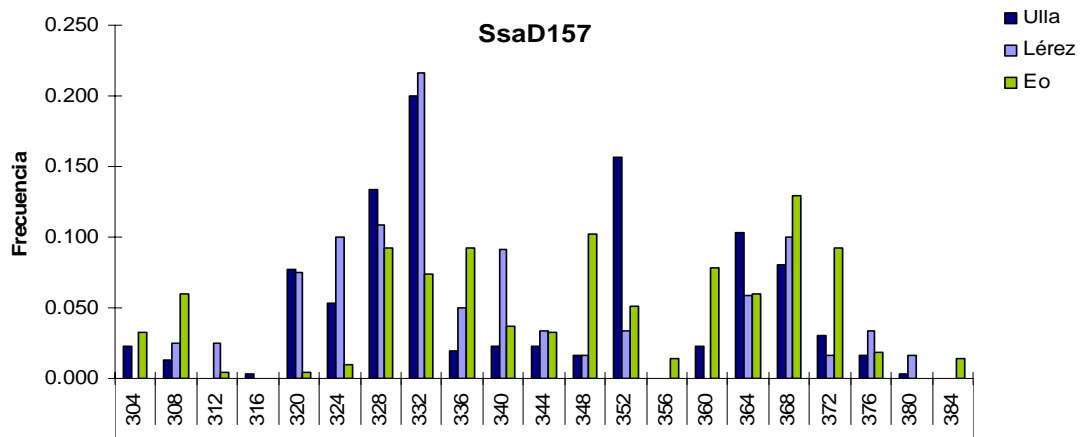
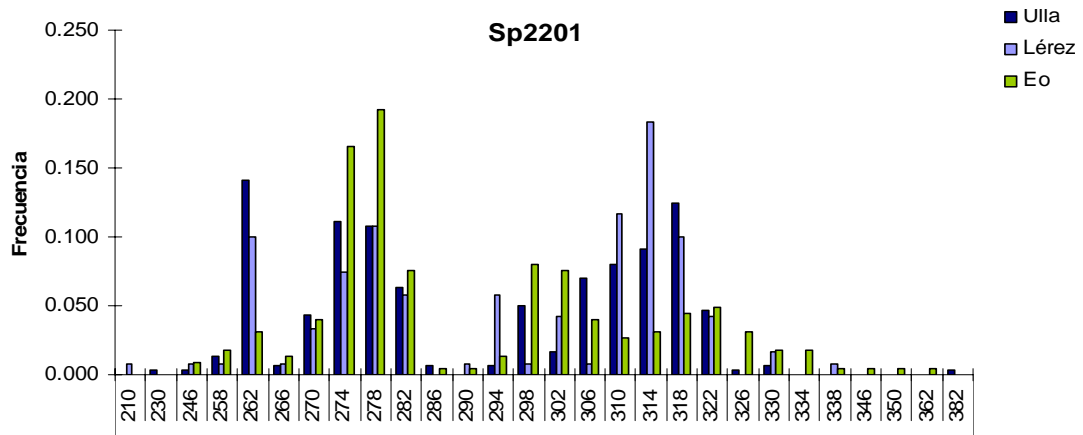
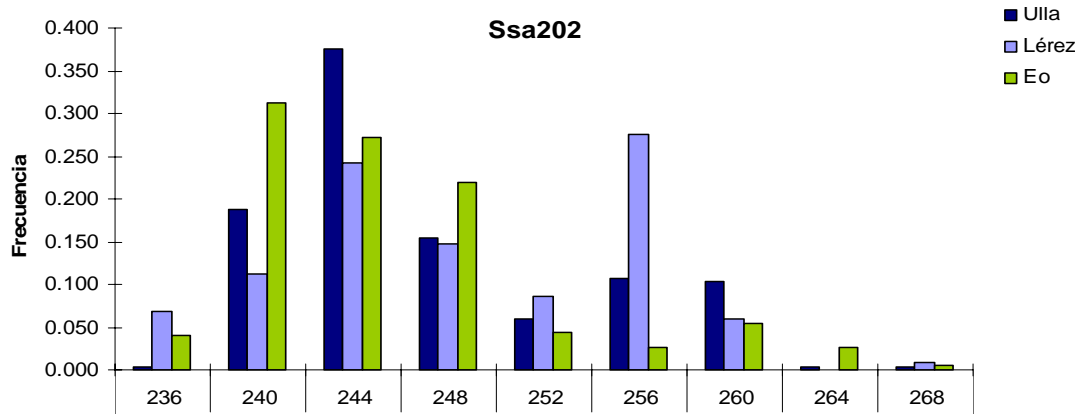
- Verspoor E. and García de Leániz C.G. (1997) Stocking success of Scottish Atlantic salmon in two Spanish rivers. *Journal of Fish Biology*, **51**:1265-1269.
- Waples R.S. and Do C. (1994) Genetic risk associated with supplementation of Pacific salmonids-captive broodstock programs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51**, 310-329.
- Zanuy M. and Carrillo P. (1987) Reproducción de los teleósteos y su aplicación en la acuicultura **1**: 1-102. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Madrid.

APÉNDICE

❖ **Resumen de las frecuencias alélicas por locus y población.**



Informe salmón 2008



Informe salmón 2008

❖ Resultados del sexado por río, código y fecha de captura.

CÓDIGO MUESTRA	RIO	FECHA	SEXO
X5	ULLA	22-abr-08	H
X6	ULLA	22-abr-08	H
X7	ULLA	22-abr-08	H
X8	ULLA	22-abr-08	H
X3	ULLA	22-abr-08	M
19521	XIMONDE-ULLA	1-may-08	H
19522	XIMONDE-ULLA	1-may-08	H
19523	XIMONDE-ULLA	1-may-08	H
19524	XIMONDE-ULLA	1-may-08	H
19526	XIMONDE-ULLA	2-may-08	H
19527	XIMONDE-ULLA	2-may-08	H
19575	XIMONDE-ULLA	2-may-08	M
19529	XIMONDE-ULLA	3-may-08	H
19530	XIMONDE-ULLA	3-may-08	H
19528	XIMONDE-ULLA	3-may-08	M
19385	XIMONDE-ULLA	4-may-08	H
19386	XIMONDE-ULLA	6-may-08	M
19387	XIMONDE-ULLA	6-may-08	M
19621	XIMONDE-ULLA	6-may-08	M
19621	XIMONDE-ULLA	6-may-08	M
19388	XIMONDE-ULLA	7-may-08	H
19390	XIMONDE-ULLA	7-may-08	H
19389	XIMONDE-ULLA	9-may-08	M
19461	XIMONDE-ULLA	9-may-08	M
19462	XIMONDE-ULLA	9-may-08	M
19205	XIMONDE-ULLA	10-may-08	H
19208	XIMONDE-ULLA	10-may-08	H
19202	XIMONDE-ULLA	10-may-08	M
19203	XIMONDE-ULLA	10-may-08	M
19204	XIMONDE-ULLA	10-may-08	M
19206	XIMONDE-ULLA	10-may-08	M
19207	XIMONDE-ULLA	10-may-08	M
19209	XIMONDE-ULLA	10-may-08	M
19210	XIMONDE-ULLA	10-may-08	M
19201	XIMONDE-ULLA	13-may-08	M
19421	XIMONDE-ULLA	13-may-08	M
19423	XIMONDE-ULLA	14-may-08	H
19424	XIMONDE-ULLA	14-may-08	H
19425	XIMONDE-ULLA	14-may-08	H
19422	XIMONDE-ULLA	14-may-08	M
14430	ULLA	14-may-08	M
1,7 ZANCADO	COUSO	14-may-08	M
X16	ULLA	15-may-08	¿?
X11	ULLA	15-may-08	H
X12	ULLA	15-may-08	H

Informe salmón 2008

X13	ULLA	15-may-08	H
X19	ULLA	15-may-08	H
X14	ULLA	15-may-08	M
X17	ULLA	15-may-08	M
19427	XIMONDE-ULLA	16-may-08	¿?
19426	XIMONDE-ULLA	16-may-08	M
19429	XIMONDE-ULLA	17-may-08	H
19431	XIMONDE-ULLA	18-may-08	M
X35	ULLA	20-may-08	¿?
X21	ULLA	20-may-08	H
X30	ULLA	20-may-08	H
X31	ULLA	20-may-08	H
X32	ULLA	20-may-08	H
X33	ULLA	20-may-08	H
19433	XIMONDE-ULLA	20-may-08	H
X22	ULLA	20-may-08	M
X23	ULLA	20-may-08	M
X25	ULLA	20-may-08	M
X29	ULLA	20-may-08	M
X34	ULLA	20-may-08	M
X36	ULLA	20-may-08	M
19432	XIMONDE-ULLA	20-may-08	M
19434	XIMONDE-ULLA	24-may-08	¿?
19440	XIMONDE-ULLA	24-may-08	M
19435	XIMONDE-ULLA	25-may-08	H
19436	XIMONDE-ULLA	25-may-08	M
19437	XIMONDE-ULLA	27-may-08	M
19438	XIMONDE-ULLA	28-may-08	H
19439	XIMONDE-ULLA	30-may-08	H
19463	XIMONDE-ULLA	30-may-08	H
X40	ULLA	19-jun-08	H
19428	XIMONDE-ULLA		M

Informe salmón 2008

CÓDIGO MUESTRA	RIO	FECHA	SEXO
S1	LÉREZ	22-abr-08	H
112900	LÉREZ	1-may-08	H
S2	LÉREZ	15-may-08	H
19420	LÉREZ	17-may-08	H
19413	BORA-LÉREZ	18-may-08	M
S3	LÉREZ	20-may-08	¿?
112960	LÉREZ	25-may-08	H
14914	LÉREZ	27-may-08	¿?
19416	SADURNIL-MONTEPORREIRO LÉREZ	6-jun-08	M
19417	SADURNIL-LÉREZ	8-jun-08	H
19418	MONTEPORREIRO-LÉREZ	8-jun-08	H
19419	LÉREZ	14-jun-08	H
S4	LÉREZ	19-jun-08	H
S5	LÉREZ	19-jun-08	M
S6	LÉREZ	19-jun-08	H
19411	BORA-LÉREZ	PO-20	M
19412	BORA-LÉREZ	PO-70	H

CÓDIGO MUESTRA	RIO	FECHA	SEXO
S3	LÉREZ	13-may-07	H
S4	LÉREZ	13-may-07	H
12541	LÉREZ	13-may-07	M
12542	LÉREZ	17-may-07	H
S6	LÉREZ	29-may-07	M
S10	LÉREZ	13-jun-07	H
12548	LÉREZ	22-jun-07	H
12549	LÉREZ	22-jun-07	H
12551	LÉREZ	23-jun-07	H
12559	LÉREZ	26-jun-07	H
12560	LÉREZ	26-jun-07	M
S12	LÉREZ	27-jun-07	M
12552	LÉREZ	30-jun-07	H
12553	LÉREZ	15-jul-07	H
12558	LÉREZ	20-jul-07	H
112861	LÉREZ	20-jul-07	M
12547	LÉREZ		H
S5-07	LÉREZ		M
X158	ULLA	13-jun-07	¿?
X159	ULLA	13-jun-07	H
X160	ULLA	13-jun-07	H
X162	ULLA	13-jun-07	H
X163	ULLA	13-jun-07	H

Informe salmón 2008

❖ Controles utilizados en el experimento.

	CÓDIGO MUESTRA	RIO	FECHA	SEXO
1	X104	ULLA	29-05-07	M
2	X106	ULLA	29-05-07	H
3	X107	ULLA	29-05-07	H
4	X108	ULLA	30-05-07	M
5	X110	ULLA	30-05-07	H
6	X112	ULLA	30-05-07	H
7	X113	ULLA	30-05-07	M
8	X68	ULLA	23-05-07	H
9	X70	ULLA	23-05-07	M
10	X71	ULLA	23-05-07	H
11	X73	ULLA	23-05-07	H
12	X74	ULLA	23-05-07	M
13	X77	ULLA	24-05-07	H
14	X8	ULLA	24-05-07	H
15	X83	ULLA	24-05-07	H
16	X84	ULLA	24-05-07	H
17	X85	ULLA	25-05-07	H

