

2009

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 2009”**

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SITUACIÓN DEL SALMÓN ATLÁNTICO EN GALICIA	2
MUESTRAS ANALIZADAS	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
❖ MARCADORES MICROSATÉLITES	4
❖ DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA.....	5
❖ ANÁLISIS ESTADÍSTICO	6
ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA POBLACIONAL	7
ESTUDIO DE VARIACIONES DEMOGRÁFICAS.....	10
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	13
❖ <i>F_{ST}</i> POR PARES DE POBLACIONES	13
❖ DISTANCIA GENÉTICA Y DISTANCIA GEOGRÁFICA.....	14
❖ ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA).....	15
❖ ASIGNACIÓN DE INDIVIDUOS A POBLACIONES	16
EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	19
ASIGNACIÓN DE LA PATERNIDAD	23
SEXADO.....	25
CONCLUSIONES GENERALES	27
REFERENCIAS	29
APÉNDICE.....	31

RESUMEN

En este trabajo se explican los análisis realizados para el seguimiento de las poblaciones de salmón de Galicia que incluyen la determinación del sexo de los salmones capturados y el análisis mediante marcadores moleculares de salmones adultos de los ríos Lérez, Eo y Ulla y también juveniles de este último río.

La temporada de pesca del salmón del año 2009 fue nefasta en los ríos del cantábrico y algo peor que otros años en los ríos del atlántico. El bajo nivel de capturas dificulta enormemente la comparación con los resultados de años anteriores ya que los resultados pueden estar sesgados de forma significativa debido al escaso número de individuos analizados. Los resultados obtenidos indican que el año 2009 es el de menor rendimiento del programa de conservación en los últimos cinco años. A pesar de que los niveles de variabilidad genética son todavía elevados, la integridad de las poblaciones de estos tres ríos podría verse comprometida si se mantiene la disminución del número de salmones adultos en cada río. Es más, la proporción de sexos en los salmones capturados es opuesta a la encontrada en años anteriores. Es la primera vez que se observa esta abundancia de machos.

Este año se han analizado juveniles a los que se ha realizado análisis de paternidad con el fin de explorar la potencialidad de este método a la hora de cuantificar la proporción de salmones adultos que controlan en la estación de captura versus la que no se controla, a través de la estimación de la participación en la reproducción medida como número de descendientes. Los datos sugieren que un 32% de los individuos no se asignan a ningún parental, lo que implicaría que este porcentaje de adultos no fue controlado en la estación de captura en el momento de su retorno al río.



SITUACIÓN DEL SALMÓN ATLÁNTICO EN GALICIA

Las poblaciones españolas de salmón atlántico (*Salmo salar* L.) han sufrido una fuerte disminución desde mediados del siglo XX. Los principales factores responsables de este descenso incluyen: la construcción de presas y minicentrales hidroeléctricas, la polución y la sobrepesca. También comienza a ser un factor preocupante en los últimos años el cambio climático, que contribuye al incremento en la temperatura de los océanos.

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. A mediados de los años 90, y con objeto de recuperar parte de la población perdida, la Xunta de Galicia estableció un programa de recuperación basado en tres frentes principales: la mejora del hábitat, la regulación de la pesca recreativa y el establecimiento de un programa de repoblación.

Es importante resaltar que la protección del hábitat, aunque se centre en la recuperación de una especie concreta, tiene consecuencias positivas sobre comunidades enteras o incluso ecosistemas.

La mayoría de los programas de repoblación de especies anádromas consiste en capturar un grupo de individuos de la población natural, desovarlos en cautividad y liberar la descendencia al hábitat del que proceden sus progenitores. Aunque en algunos casos esta estrategia es la única opción para salvar la población, es importante tener en cuenta la necesidad de identificar y erradicar los principales factores causantes del declive de las poblaciones.

Los resultados del programa de repoblación están siendo muy positivos. 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 que se liberan al río cada año, y los descendientes de los salmones de retorno repoblados (considerados nativos).

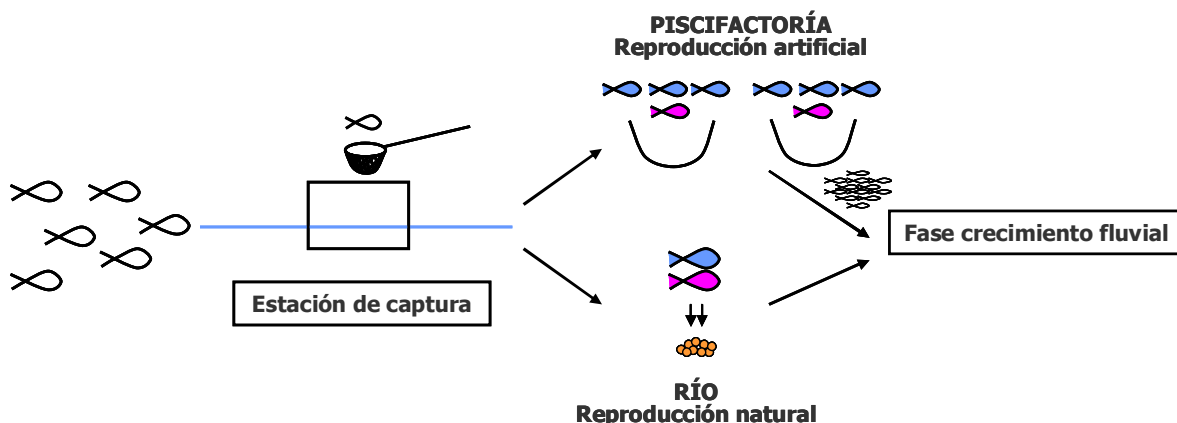


Figura 1. Esquema de un programa de repoblación. En la estación de captura de adultos los individuos son marcados, medidos y pesados. También se les toma una muestra de tejido para el análisis genético. Parte de los individuos se llevan a una piscifactoría y se desovan artificialmente. La descendencia obtenida se libera al río en estadio de juvenil, mezclándose con los individuos nacidos naturalmente en el río.

El grupo de Genética de Poblaciones y Citogenética de la Universidad de Vigo realiza anualmente, desde el año 2005, la evaluación genética de los salmones de los tres principales ríos salmoneros gallegos: Lérez, Ulla y Eo.

A continuación se describen y explican los resultados obtenidos y se proporcionan las principales conclusiones y sugerencias para una mejora de la gestión del programa de conservación.

MUESTRAS ANALIZADAS

Durante el año 2009 han llegado a nuestro laboratorio muestras de aleta procedentes de los salmones capturados y/o pescados en los ríos Lérez, Ulla y Eo. El número de individuos de cada río y categoría se resumen en la Tabla 1.



Río	Categoría	Número
Ulla	Juveniles	143 (141)
	Adultos capturados	86 (82)
	Adultos pescados	32 (32)
Lérez	Adultos capturados	46 (22)
	Adultos pescados	6 (5)
Eo	Adultos pescados	27

Tabla 1. Muestras recogidas y analizadas a lo largo de la temporada 2009. Entre paréntesis se indica el número de muestras utilizadas para el análisis de ADN.

Los individuos se agruparon en las categorías “capturados” y “pescados” con el objetivo de detectar alguna señal que indique un efecto negativo de la pesca por estar concentrada en los salmones que retornan al principio de la temporada. Estos salmones son los de mayor tamaño y edad, y en Galicia este grupo de retorno temprano suele estar sesgado hacia las hembras, por lo que el impacto de la pesca podría ser importante (en el análisis de los datos, esta distinción se realiza únicamente en el caso del río Ulla, ya que en el río Lérez el escaso número de individuos pescados no permite obtener suficiente potencia estadística). La temporada hábil para la pesca coincide en el tiempo con el retorno de los individuos de mayor edad. Se sabe que el tiempo que los salmones permanecen en el mar está determinado genéticamente. Si la fracción de mayor edad está sometida a una mayor presión por pesca que los individuos añales, la consecuencia podría ser una disminución de esta fracción de la población con el paso del tiempo. Esta tendencia se ha demostrado previamente en otros ríos españoles salmoneros, como el río Bidasoa (Saura y col., 2009).

MATERIAL Y MÉTODOS

❖ Marcadores microsatélites

La técnica utilizada para el análisis genético fue el análisis de marcadores microsatélites. Esta técnica se utiliza de manera habitual para analizar la variabilidad genética a nivel poblacional, incluyendo: análisis de parentesco y paternidad, asignación de individuos a poblaciones, y estimación de censos efectivos, entre otros.



Los marcadores microsatélites son fragmentos de ADN no codificante que se encuentran repartidos por todo el genoma. Consisten en repeticiones en tándem de motivos de entre uno y seis nucleótidos. 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.

Para la realización del presente trabajo se utilizó una batería de microsatélites (ver Tabla 2) recomendada en el workshop celebrado en 2004 “Atlantic salmon, Microsatellites and Genetic Stock Identification (Virginia, EEUU)”. La finalidad de esta reunión consistió en establecer un protocolo homogeneizado de análisis para los laboratorios que trabajan con salmón atlántico, de modo que los resultados de sus estudios puedan ser comparables.

Marcador	Tipo repetición	Rango (pb)	Referencia
SSsp2210	Tetra	104 - 185	Patterson y col., 2004
SSspG7	Tetra	112 - 214	Patterson y col., 2004
SsaD144	Tetra	112 - 289	King y col., 2005
Ssa202	Tetra	200 - 330	O'Reilly y col., 1996
Sp2201	Tetra	220 - 371	Patterson y col., 2004
SsaD157	Tetra	316 - 416	King y col., 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 μL 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 μM . Los microsatélites se amplificaron en dos reacciones multiplex. La primera incluyó los loci *SSsp2210*, *SSspG7* y *Ssa202* y la segunda, los loci *SsaD144*, *Sp2201* y *SsaD157*. El programa de temperaturas utilizado para la amplificación constaba de 30 ciclos y se especifica en la Figura 2.

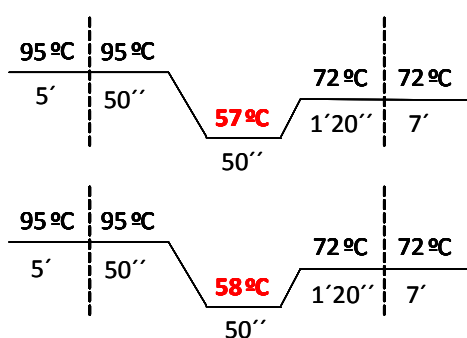


Figura 2. Programas de temperaturas utilizados para la amplificación de los seis marcadores microsatélites. El primer programa se utilizó para amplificar la multiplex I, y el segundo programa, cuya temperatura de hibridación se incrementó en 1°C, fue utilizado para amplificar la multiplex II.
[']: minuto; ["]: segundo.

Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) y los resultados, procesados por el software GENEMAPPER (Applied Biosystems).

❖ Análisis estadístico

El programa GeneAlex v. 6.3 (Peakall y Smouse, 2006) se utilizó para calcular las estimas de variabilidad genética, análisis de varianza molecular y asignación de individuos a poblaciones (opción "Leave one out"). Las estimas de F_{ST} y riqueza alélica se realizaron con FSTAT v. 2.9.3 (Goudet, 2001). El programa Bottleneck 1.2. (Cornuet y Luikart, 1996) se utilizó para la detección de cuellos de botella. El test de Mantel se realizó mediante la rutina "Correlación" disponible en el programa SPSS. Por último, se utilizó el programa PASOS (Duchesne y col., 2005) para realizar la asignación de paternidades. Este programa se basa en el método de máxima verosimilitud y tiene en cuenta la existencia de mutación o errores de genotipado (en este caso se permitió solamente un error por pareja y descendiente).



ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA POBLACIONAL

La variabilidad genética es uno de los parámetros más informativos del estado demográfico de una población, al estar influenciado por procesos como la deriva genética, la selección, la consanguinidad y la migración.

El estimador de variabilidad genética más utilizado es la heterocigosis. Este parámetro puede tomar valores entre 0 y 1 (0: consanguinidad total; 1: variabilidad genética máxima). También se utilizan el número de alelos y la riqueza alélica (corrección del anterior), que son indicativos de la variabilidad alélica que existe en una población. El número de alelos únicos, o alelos privados, da una idea de la diferenciación entre las poblaciones, ya que se refiere al número de alelos que está representado de manera exclusiva en una población y que no aparece en las demás.

En la Tabla 3 se muestran los valores de estos parámetros para cada categoría poblacional. Los valores de heterocigosis observada fueron en todos los casos superiores a 0,80 (rango: 0,81 - 0,85) un valor elevado indicativo de que los individuos se están cruzando al azar con baja incidencia de apareamientos entre parientes. Esto es importante para la supervivencia de la población a largo plazo, ya que unos elevados niveles de diversidad genética son necesarios para que la población se adapte a cambios en el ambiente.

El número observado de alelos varió desde 9,7 (Lérez) a 15,83 (Ulla juveniles). No obstante, estas medidas no son comparables ya que dependen del tamaño de la muestra. En este caso se utiliza la riqueza alélica, parámetro corregido por el tamaño muestral más bajo (en este caso, 24 individuos). Los valores de riqueza alélica variaron desde 11 (Lérez) a 13,5 (Eo), siendo por tanto similares en todos los grupos.



	<i>SSsp2210</i>	<i>SSspG7</i>	<i>SsaD144</i>	<i>Ssa202</i>	<i>Sp2201</i>	<i>SsaD157</i>	Media
Ulla							
<i>N</i>	114	114	110	113	110	112	112,2
<i>Na</i>	9	14	21	8	18	18	14,7
<i>Ra</i>	7,02	11,07	16,16	6,93	13,24	13,65	11,35
<i>Np</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ho</i>	0,75	0,81	0,93	0,80	0,93	0,88	0,85
<i>He</i>	0,71	0,84	0,92	0,77	0,91	0,88	0,84
Eo							
<i>N</i>	27	27	27	27	27	27	27
<i>Na</i>	8	14	15	8	18	15	13
<i>Ra</i>	7,77	13,41	14,53	7,67	17,09	14,53	12,5
<i>Np</i>	2	1	1	0	0	2	1
<i>Ho</i>	0,89	0,7	0,85	0,63	0,96	0,89	0,82
<i>He</i>	0,8	0,88*	0,93	0,76	0,92	0,92	0,87
Lérez							
<i>N</i>	27	25	27	27	25	24	26,3
<i>Na</i>	5	10	16	7	15	5	9,7
<i>Ra</i>	4,99	9,92	15,42	6,88	14,76	14	11
<i>Np</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ho</i>	0,82	0,80	0,89	0,78	0,80	0,82	0,81
<i>He</i>	0,72	0,87	0,92*	0,79	0,90	0,72*	0,82

A. Individuos agrupados por río y población de adultos.



	<i>SSsp2210</i>	<i>SSspG7</i>	<i>SsaD144</i>	<i>Ssa202</i>	<i>Sp2201</i>	<i>SsaD157</i>	Media
Ulla Ad C							
<i>N</i>	82	82	80	82	80	81	81,2
<i>Na</i>	9	13	19	8	17	18	14
<i>Ra</i>	7	10,97	16,07	7	13,55	13,69	11,38
<i>Np</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ho</i>	0,81	0,85	0,93	0,74	0,94	0,88	0,85
<i>He</i>	0,73	0,85	0,92	0,78	0,91	0,89	0,85
Ulla Ad P							
<i>N</i>	32	32	30	31	30	31	31
<i>Na</i>	7	12	18	7	13	14	11,8
<i>Ra</i>	6,74	10,85	16,63	6,97	12,68	13,15	11,17
<i>Np</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ho</i>	0,63	0,69	0,93	0,87	0,90	0,90	0,82
<i>He</i>	0,66	0,82*	0,91	0,76	0,92	0,88	0,83
Ulla Juv							
<i>N</i>	141	141	140	141	141	139	140,5
<i>Na</i>	8	12	25	9	21	20	15,83
<i>Ra</i>	6,85	9,59	16,64	7,13	14,20	13,97	11,40
<i>Np</i>	0	0	4	1	5	1	1,83
<i>Ho</i>	0,78	0,69	0,91	0,72	0,89	0,9	0,81
<i>He</i>	0,73	0,84*	0,93*	0,79	0,91*	0,88*	0,85

B. Río Ulla. Desglose en categorías de adultos pescados o recogidos en la estación de captura y juveniles. Ad: adultos; C: capturados; P: pescados; Juv: juveniles.

Tabla 3. Parámetros de variabilidad genética por locus y población.

N: número de individuos; *Na*: número de alelos; *Ra*: riqueza alélica; *Np*: número de alelos privados; *Ho*: heterocigosis observada; *He*: heterocigosis esperada. Ulla Juv: juveniles; Ulla Ad: adultos.

El asterisco indica la ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg en los loci correspondientes.

La población formada por los juveniles del río Ulla fue la población con mayor incidencia de alelos privados, seguida de la población del río Eo. En las poblaciones restantes no se detectó ningún alelo privado, por lo que se podría esperar que estas poblaciones fuesen más similares entre sí. Los juveniles del río Ulla pertenecen a una cohorte diferente, por lo que la composición génica puede variar. Por su parte, el río Eo es el más alejado geográficamente y por tanto se espera que la composición génica sea diferente a la de los ríos del sur, más cercanos entre sí con mayores tasas de migración.



ESTUDIO DE VARIACIONES DEMOGRÁFICAS

La relación entre la heterocigosis y las frecuencias alélicas puede ser muy informativa en términos de cambio demográfico.

Cuando una población experimenta una drástica reducción en su censo efectivo, lo que se conoce como “cuello de botella”, se interrumpe temporalmente el equilibrio entre mutación y deriva, de modo que la heterocigosis observada en un locus determinado excede la heterocigosis esperada para el número de alelos observados. Por tanto, un cuello de botella mostrará un exceso de heterocigosis debido a que los alelos raros se pierden más rápidamente que la tasa de decrecimiento de la heterocigosis.

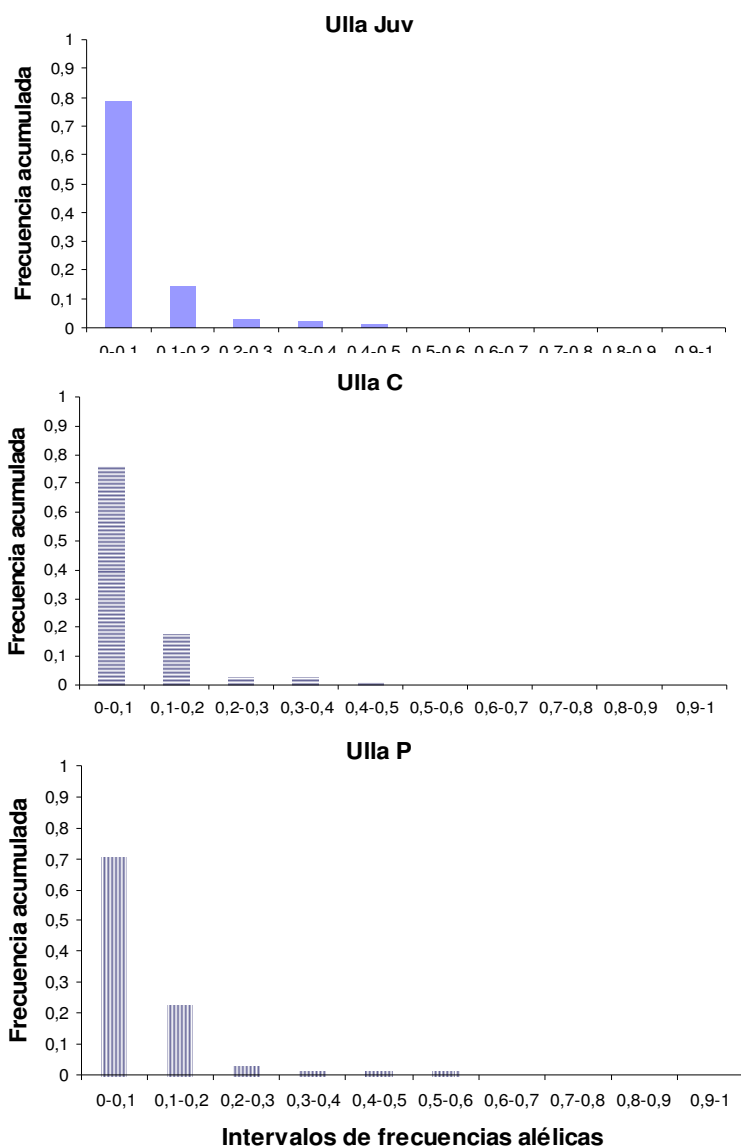
Este fenómeno se puede evaluar mediante un test de Wilcoxon (ver Tabla 4), que calcula la probabilidad de exceso de heterocigosis para el número de alelos observado. Este cálculo lo realiza en base al modelo mutacional que se utiliza para los marcadores microsatélites, que asume que la mayor parte de las mutaciones (90%) se ajustan al modelo de mutación paso a paso, mientras que una pequeña proporción (10%) sigue el modelo de alelos infinitos. Los resultados del test de Wilcoxon sugieren que en el río Lérez se ha producido una reducción considerable en el censo efectivo de la población, en vista de los valores de probabilidad. No obstante, este resultado debe ser interpretado con precaución, ya que un número importante de muestras procedentes de este río no fueron incluidas en el estudio por motivos técnicos.

	Probabilidad
Ulla Juv	0,42
Ulla Ad	0,58
<i>Ulla Ad C</i>	0,34
<i>Ulla Ad P</i>	0,92
Lérez	0,02*
Eo	0,42

Tabla 4. Test de probabilidad para la detección de cuellos de botella.
Juv: juveniles; Ad: adultos; P: pescados; C: capturados.
El asterisco señala las probabilidades significativas.



Otro método para evidenciar la ocurrencia de cuellos de botella consiste en representar las frecuencias alélicas acumuladas en intervalos de frecuencias alélicas (Cornuet y Luikart, 1996) (ver Figura 3). En una población que no ha sufrido una regresión reciente y brusca en su censo efectivo, la mayoría de los alelos se presentan a frecuencias bajas, por lo que la representación de las frecuencias acumuladas resulta en una gráfica con forma de "L". Por el contrario, un cuello de botella elimina más fácilmente 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.



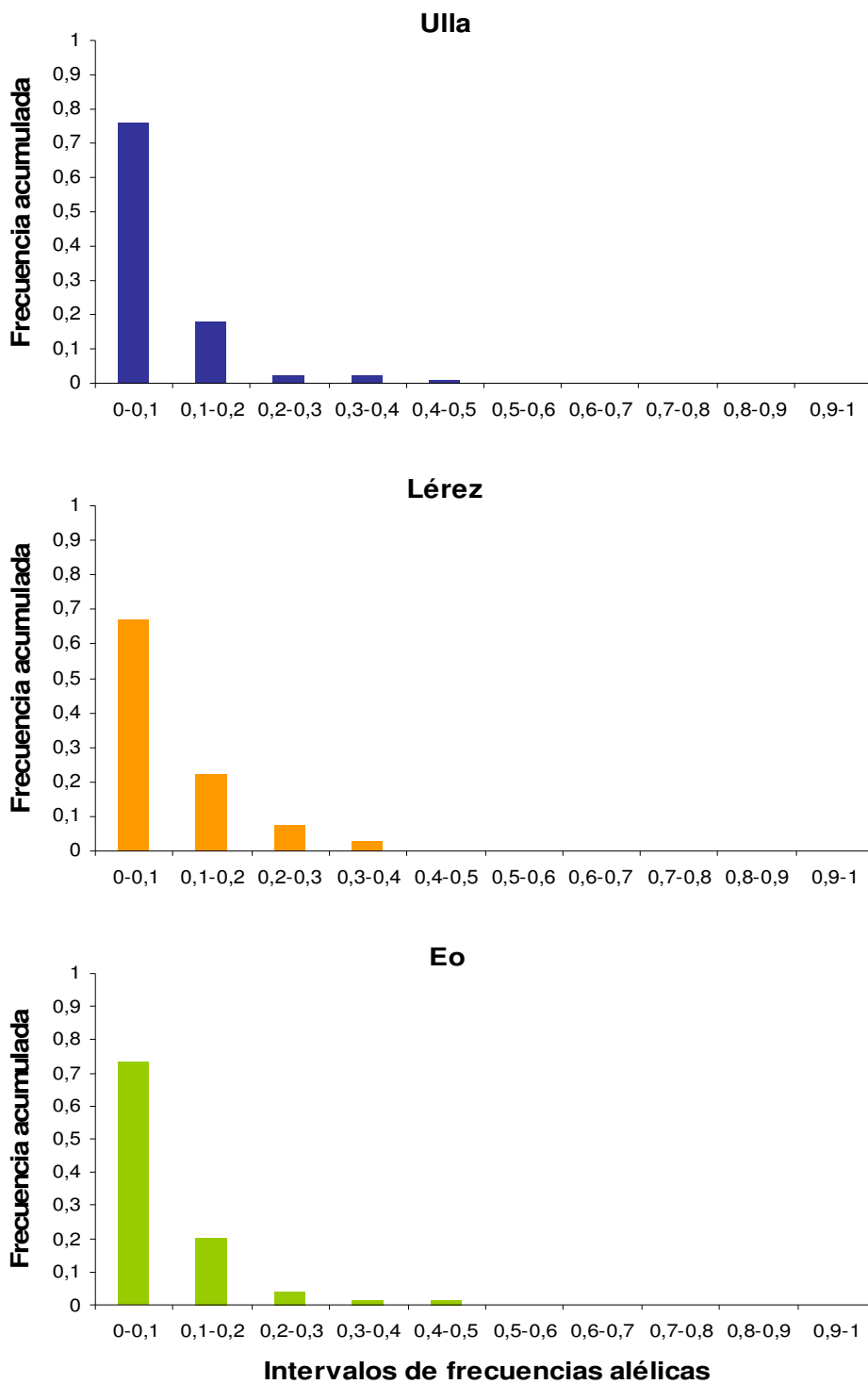


Figura 3. Representación gráfica de las frecuencias alélicas acumuladas.



En general, en todos los grupos poblacionales se observa una topología característica de la ausencia de cuellos de botella, con la excepción (poco acentuada) del río Lérez. En el caso de este río, la segunda categoría de frecuencias acumuladas es mayor en comparación con los otros ríos, en detrimento de la primera. Es decir, que una fracción importante de alelos (aproximadamente un 25%) se encuentra a frecuencias moderadas y no bajas, como cabría esperar. A pesar de que este método es cualitativo y en ningún caso diagnóstico, sí apoya los resultados obtenidos en el test de Wilcoxon, pero de nuevo se reitera la posibilidad de que se trate de un artefacto causado por el bajo tamaño muestral.

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL

❖ *F_{ST}* por pares de poblaciones

Los niveles de conectividad y de diversidad genética de las poblaciones de peces están relacionados con las tácticas de comportamiento adoptadas por las diferentes especies. En especies anádromas como el salmón atlántico, la fidelidad de retorno al río de origen, la fragmentación del hábitat en términos reproductivos y la capacidad de adaptación local, proporcionan los requisitos necesarios para la estructuración poblacional.

El uso de herramientas genéticas puede dar información sobre la estructura poblacional y el flujo (génico) entre las poblaciones. Esta información es importante ya que permite identificar el número de poblaciones para una especie dada en términos de unidades reproductivas, teniendo importantes implicaciones en la gestión y manejo de las poblaciones.

En el presente trabajo se utilizó el estadístico *F_{ST}* para estimar la diferenciación a nivel genético entre las poblaciones. Este índice puede tomar valores entre 0 y 1 (0: ausencia de estructura; 1: estructuración total). Los valores de *F_{ST}* por pares de



poblaciones se indican en la Tabla 5. Los resultados (tanto por grupos como por ríos) revelan unos valores de diferenciación muy bajos, aunque estadísticamente significativos en todas las comparaciones excepto comparando juveniles versus adultos capturados del río Ulla. Se espera que, por proximidad geográfica, exista migración entre los ríos Ulla y Lérez, y es por ello que su parecido genético es también mayor. Existe una pequeña incoherencia en los valores de *FST* en las comparaciones con el río Eo, ya que por su localización geográfica se esperaría una mayor diferenciación entre los ríos Lérez y Eo que Lérez y Ulla. No obstante, estos valores son prácticamente iguales. Teniendo en cuenta además que en el apartado anterior se detectó una caída en el censo efectivo del río Lérez, esto podría estar afectando a la composición genética de los individuos, que en este caso parecen compartir similitudes con sus conespecíficos del río Eo.

	Ulla C	Ulla P
Ulla Juv	0,0000	0,003*
Ulla C		0,001

A. Río Ulla: desglose en categorías.

	Eo	Lérez
Ulla	0,015*	0,011*
Eo		0,009*

B. Poblaciones agrupadas por ríos.

Tabla 5. *FST* por pares de poblaciones. El asterisco señala los valores estadísticamente significativos.

❖ Distancia genética y distancia geográfica

Con objeto de detectar la existencia de correlación entre distancia genética y distancia geográfica se realizó un test de Mantel. La distancia genética se calculó como sigue:

$$DG = \frac{(1 - FST)}{FST}$$



Los resultados del test no fueron significativos, por lo que se descarta la existencia de correlación. La Figura 4 representa este resultado de manera gráfica.

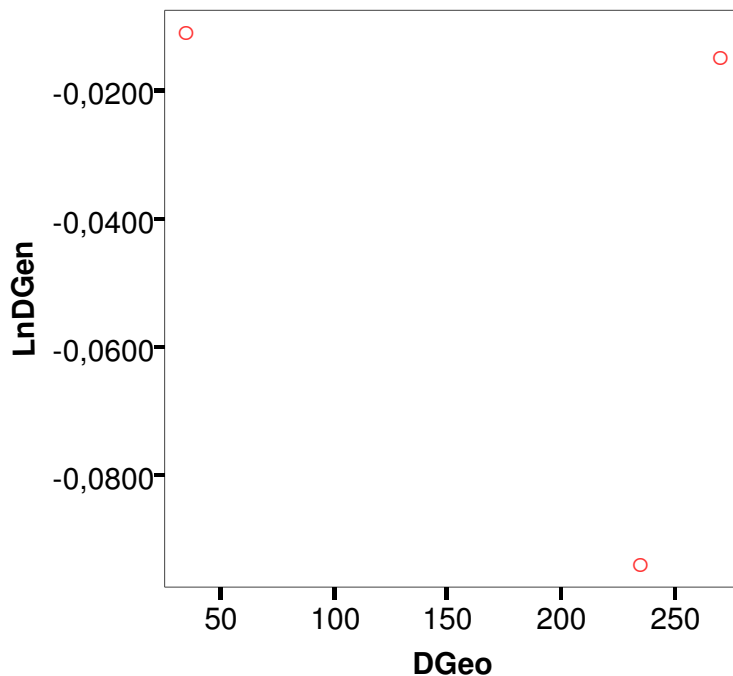


Figura 4. Representación gráfica de la relación entre distancias genética (abscisas) y geográfica (transformada mediante Ln; ordenadas).

❖ **Análisis de la varianza molecular (AMOVA)**

El análisis de varianza molecular se utiliza para detectar qué parte de la variación molecular total se debe a diferencias entre o dentro de las poblaciones.

Los resultados del análisis (Tabla 6 y Figura 5) mostraron que la mayor parte de las diferencias (97%) se debe a las diferencias entre los individuos dentro de las poblaciones.

	gl	SC	% Explicación
Entre poblaciones	5	18,303	0%
Entre individuos	417	1091,273	3%
Dentro de poblaciones	423	1043,000	97%
Total	845	2152,576	100%

Tabla 6. Resultados del AMOVA.



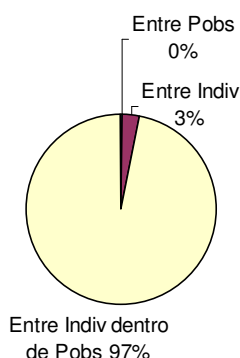


Figura 5. Porcentajes de la varianza molecular explicados por cada categoría.

❖ **Asignación de individuos a poblaciones**

Esta prueba se utilizó para una mejor comprensión de las relaciones entre las poblaciones. El test asignó correctamente el 85% de los individuos del río Lérez, el 74% de los individuos del Ulla y el 81% de los individuos del Eo, por lo que estos ríos conforman entidades bien diferenciadas. En todos los casos los resultados fueron estadísticamente significativos (ver Tabla 7).

	Lérez	Ulla	Eo
Correctos	23 (85%)	84 (74%)	22 (81%)
Incorrectos	4	30	5
Total	27	114	27
Observados	23	84	22
Esperados	9	38	9
Chi2	21,8*	55,7*	18,8*

Tabla 7. Prueba Chi-cuadrado para determinar la significación de las asignaciones correctas.

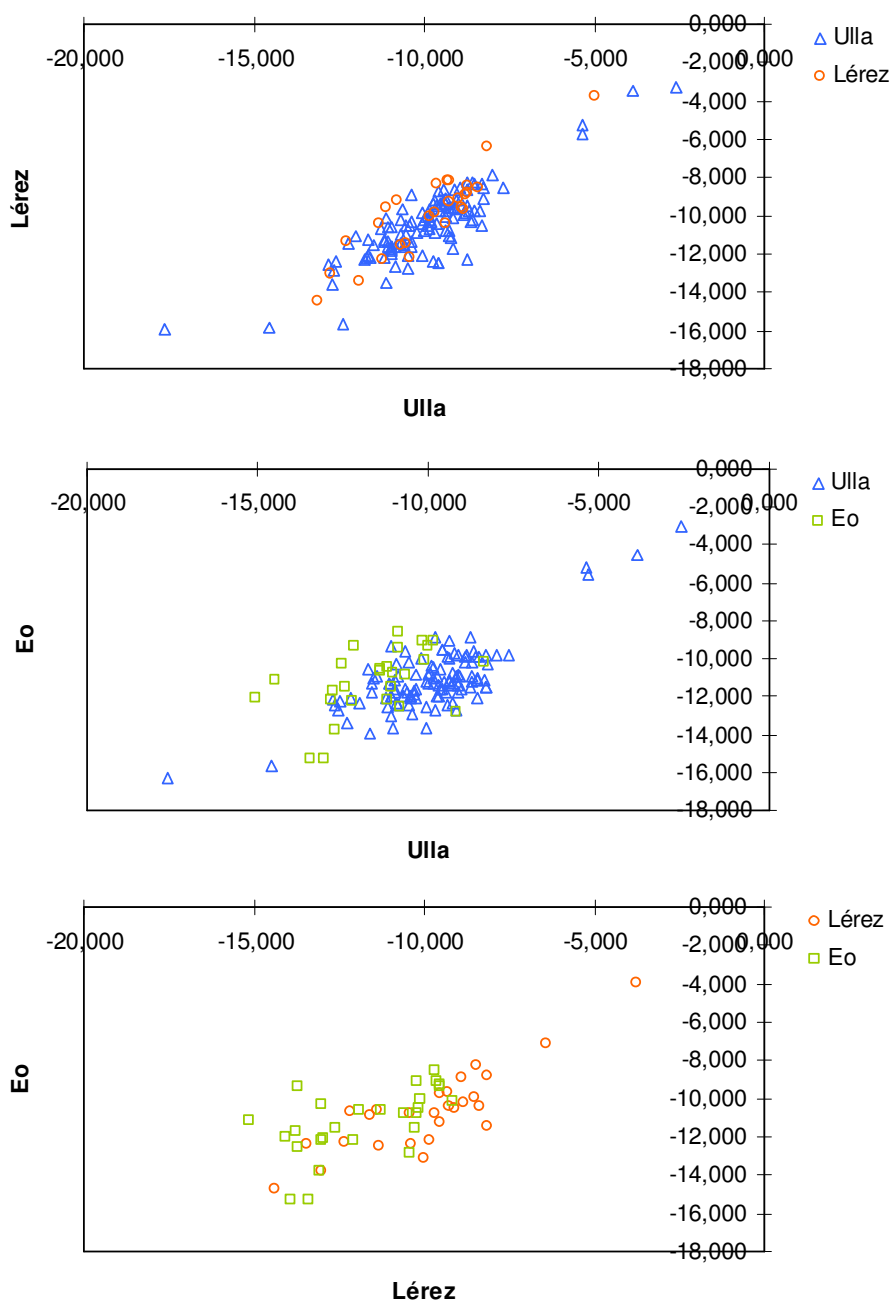
En la Figura 6 se representa la asignación de individuos a poblaciones enfrentadas por parejas. Las principales conclusiones que se pueden extraer de estas gráficas son: (1) que las poblaciones de los ríos Ulla y Lérez tienen una composición genética similar; (2) que las poblaciones de los ríos Ulla y Eo constituyen entidades diferenciadas; (3) que la explicación de la menor diferenciación observada entre la población del río Lérez y la del Eo (ver valores de *F_{ST}*) se debe a la elevada varianza en la composición genética del río Lérez. Su población está compuesta por pocos individuos que se sitúan dispersos,



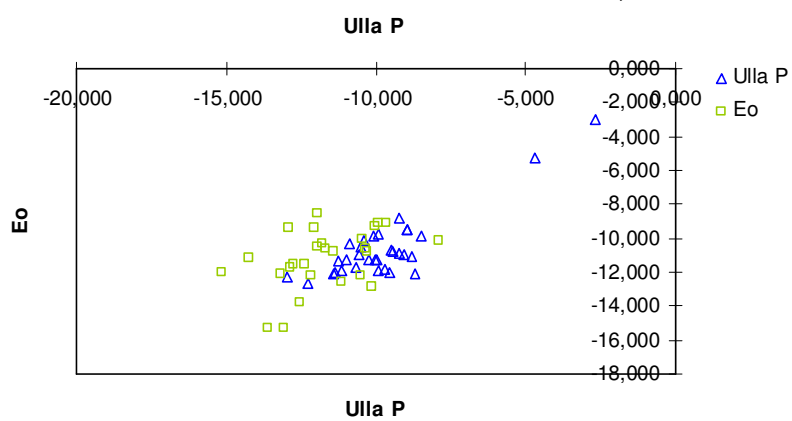
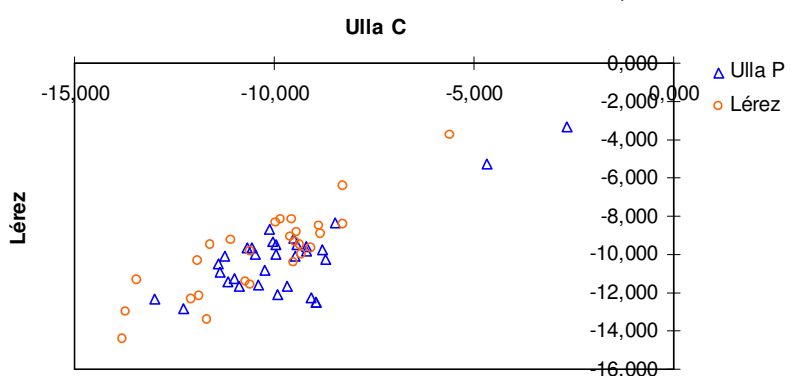
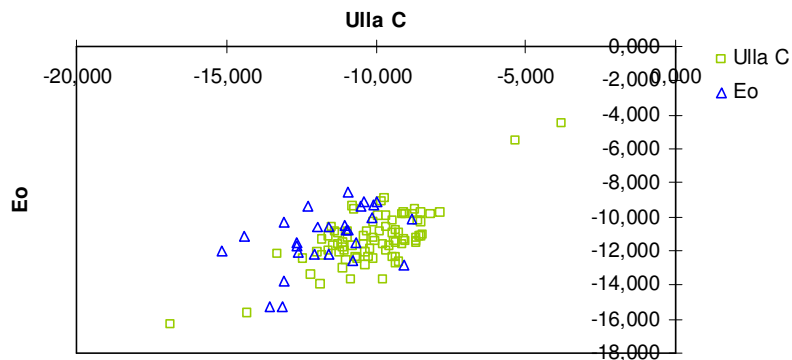
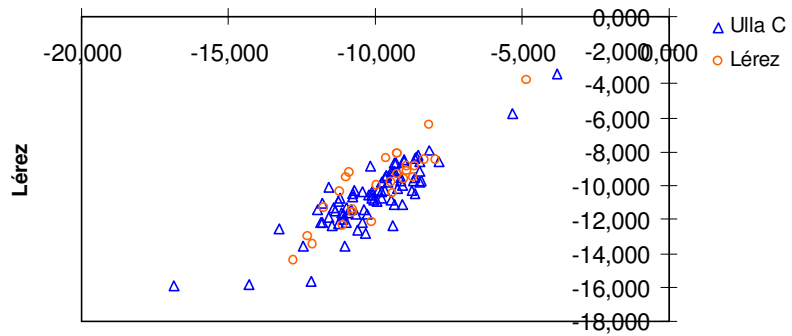
hecho que puede estar actuando como un artefacto y por tanto sesgando los resultados.

Figura 6. Gráficas resultantes de la asignación por pares de poblaciones. (A) Asignación por parejas de ríos, cada población incluye todos los individuos adultos correspondientes a cada río; (B) Desglose de la población adulta del río Ulla, cuyas fracciones (C: capturados; P: pescados) se enfrentan a las completas de los otros dos ríos.

A.



B.



EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

La existencia de datos genéticos desde el año 2005 hace posible el estudio de la evolución de la variabilidad genética a lo largo del tiempo. En este apartado se resumen los parámetros de heterocigosis, F_{ST} por pares de poblaciones y representación del gráfico de Cornuet y Luikart (1996) para la detección de cuellos de botella para los ríos Lérez, Ulla y Eo desde el año 2005 hasta el año 2009.

En primer lugar y previamente al estudio de los datos genéticos, en la Figura 7 se representa el número de individuos registrados por año, datos procedentes de los registros en las estaciones de captura o bien de las pesquerías.

De forma llamativa sorprende la caída generalizada en los tres ríos este último año. Si bien el río Lérez presenta suaves oscilaciones, los ríos Ulla y Eo han registrado una caída importante. No obstante, y como se ha mencionado en la sección de “Estudio de variaciones demográficas”, es precisamente el río Lérez el que se encuentra en una situación más comprometida.

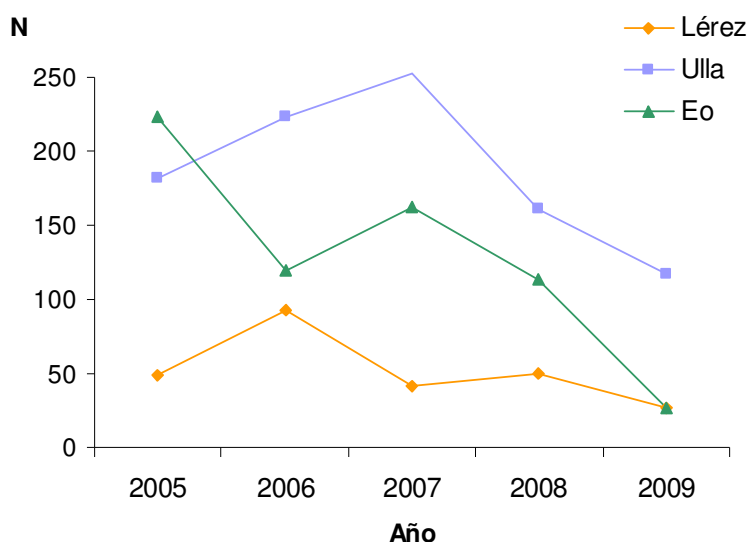
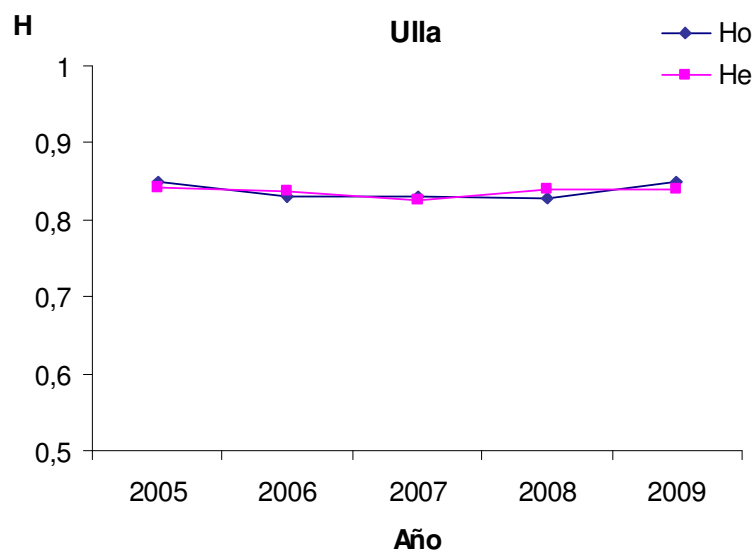
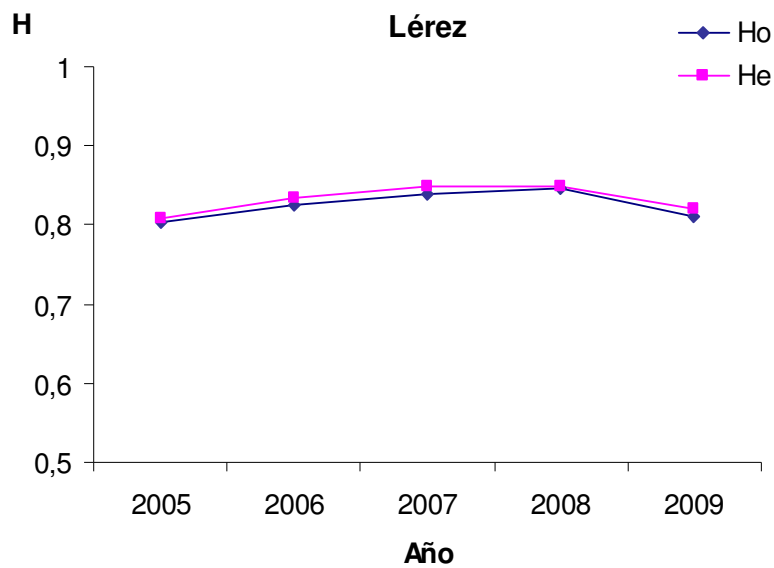


Figura 7. Número de individuos registrados por año, datos procedentes de los registros en las estaciones de captura o bien de las pesquerías.



La Figura 8 resume los datos de heterocigosis observada y esperada. En general, la tendencia se mantiene constante a lo largo del tiempo en todos los casos, existiendo ligeras diferencias entre heterocigosis observada y esperada en el río Eo durante este último año. Esto podría indicar que existe cierto grado de apareamiento no aleatorio, en cualquier caso poco preocupante en vista de los altos niveles de heterocigosis observada.



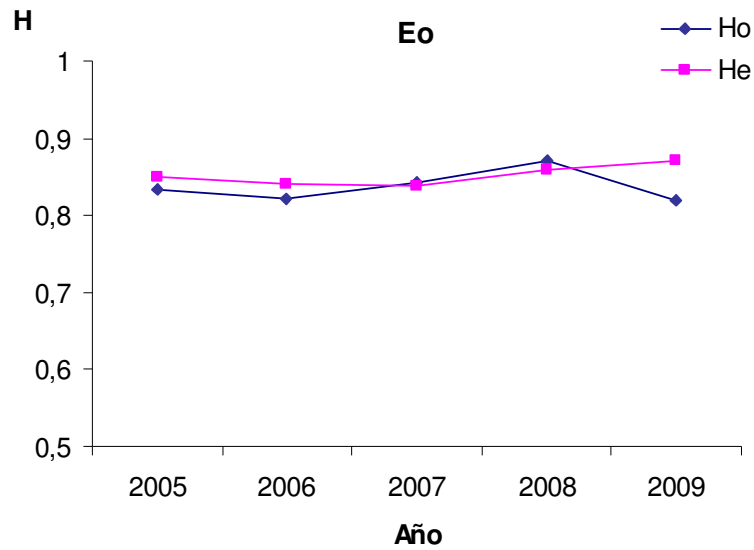


Figura 8. Representación de la evolución temporal de la heterocigosis observada y esperada.

En la Figura 9 se muestra un resumen de los valores de F_{ST} por pares de poblaciones en su evolución temporal. Los valores en las comparaciones Lérez-Ulla y Ulla-Eo son consistentes con los niveles de diferenciación de años precedentes. El valor de diferenciación en la comparación Lérez-Eo, sin embargo, no sigue un patrón constante y ha decrecido de manera evidente.

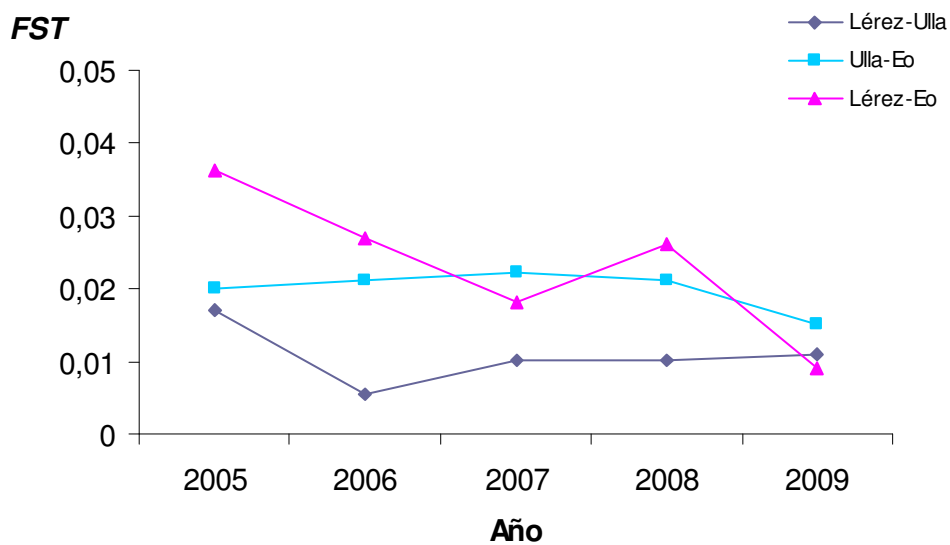
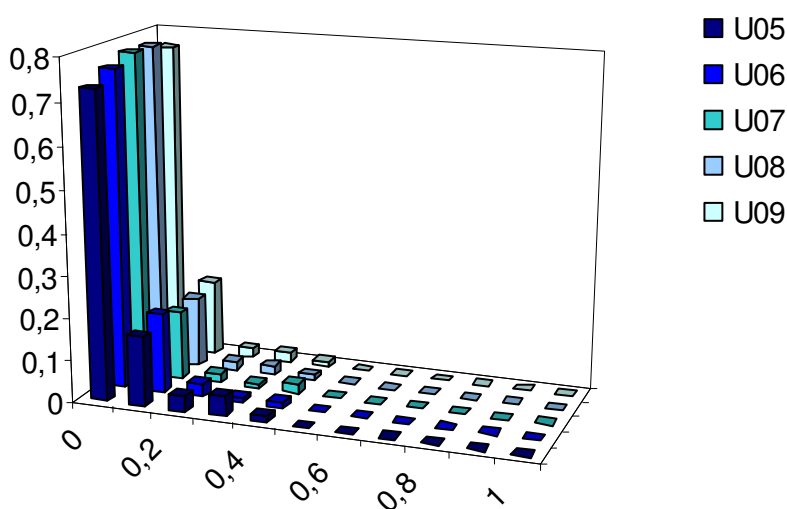
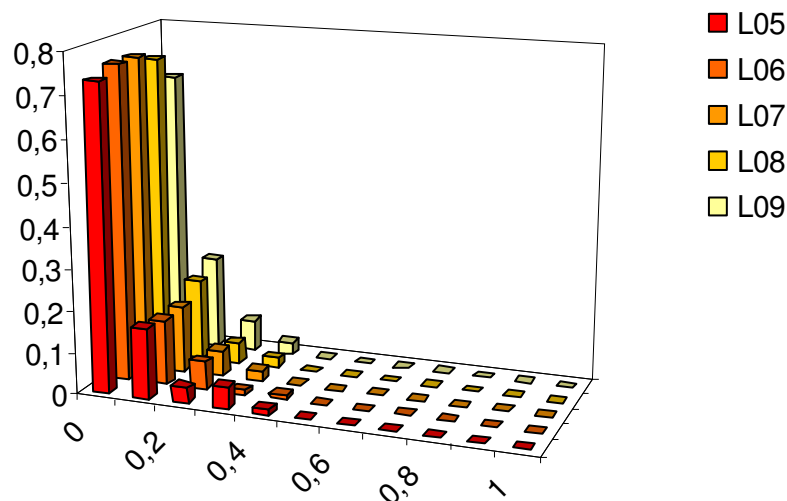


Figura 9. Evolución temporal del índice F_{ST} por pares de poblaciones.



Por último, la Figura 10 representa la evolución de las frecuencias alélicas durante estos últimos cinco años. En una población en la que el censo efectivo se mantiene constante, la representación de las frecuencias alélicas acumuladas da lugar a una gráfica en forma de "L", indicando que la mayoría de los alelos se encuentran a frecuencias muy bajas, y sólo unos pocos se encuentran a frecuencias intermedias. Como se puede observar en la figura, en el año 2009 se ha producido en los tres casos una reducción en la primera categoría de frecuencias y un incremento en las siguientes categorías, con especial incidencia en el río Lérez. Es importante tener en cuenta este dato, ya que podría estar comprometiéndose el censo efectivo de las poblaciones.



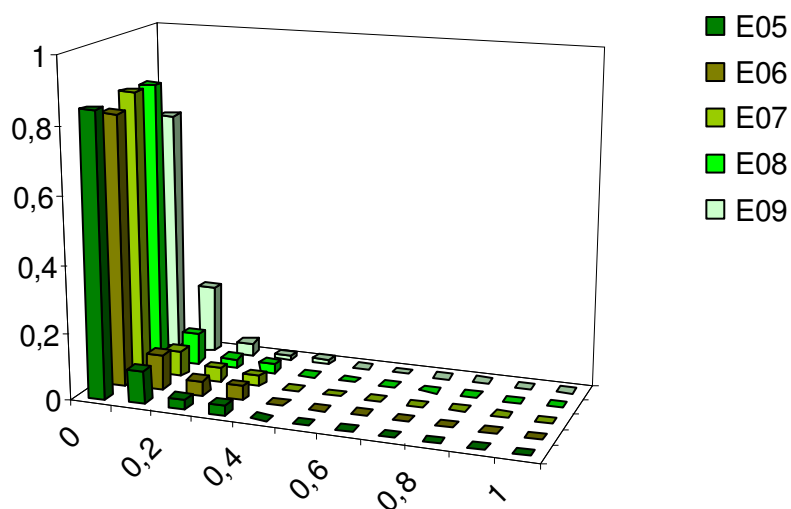


Figura 10. Representación de las frecuencias alélicas acumuladas en intervalos.

ASIGNACIÓN DE LA PATERNIDAD

Como ya se mencionó en apartados anteriores, los marcadores moleculares constituyen las herramientas básicas que permiten caracterizar las poblaciones, proporcionando información relevante en términos de variación genética, grado de parentesco de la población, estructura poblacional, historia demográfica, análisis de paternidad, asignación de individuos a poblaciones, variación genética cuantitativa, potencial adaptativo y gestión del manejo de las poblaciones.

Gracias a la labor de control y micromarcado en las estaciones de captura gestionado por la Dirección Xeral de Conservación da Natureza (Consellería do Medio Rural), se dispone de una gran cantidad de información acerca de los salmones que han retornado al río Ulla desde el año 2005 hasta la actualidad. Esta información ha permitido determinar la paternidad de los salmones juveniles muestreados en el río Ulla en 2009, gracias a la información genética registrada a lo largo de estos años.

La asignación de la paternidad permite obtener información detallada acerca de la estructura familiar, de las diferentes tácticas reproductivas dentro de una misma



especie o del éxito reproductivo de los individuos dentro de y entre poblaciones naturales, mediante el genotipado múltiple de marcadores microsatélites.

Durante el año 2009 se tomaron muestras de 141 salmones en estadio de juvenil. Estos individuos podrían pertenecer a diferentes cohortes, bien salmones 1+, hijos de los adultos que desovaron en 2007, o bien salmones 2+ hijos de los adultos que desovaron en 2006. Con el objetivo de determinar la paternidad de cada juvenil, se realizaron análisis de paternidades, utilizando la información genética de los adultos retornados en 2006 y 2007 obtenida en nuestro laboratorio de biología molecular en los correspondientes años. Por problemas técnicos, de las 141 muestras, 8 de ellas no se incluyeron en los análisis.

Los resultados del análisis revelaron lo siguiente: (I) el 6% de los juveniles se asignaron a parejas retornadas en 2006, (II) el 21% fueron asignados a un solo parental retornado en 2006, (III) el 13% de los juveniles se asignaron a parejas retornadas en 2007, (IV) el 28% se asignaron a un solo parental retornado en 2007 y, por último, (V) un 32% de los individuos no fue asignado a ningún adulto (ver Apéndice, Sumario II para más detalle).

Esta información se resume de un modo más sintético en la Tabla 8, que muestra los resultados de media (\bar{k}) y varianza ($V_{\bar{k}}$) en el éxito reproductivo de los adultos que han contribuido a la descendencia. La media indica el número medio de hijos por cada adulto (teniendo en cuenta tanto los que se reproducen como los que no), y la varianza es una medida de las desviaciones de la media. Una media de dos individuos por parental y una varianza igual a cero es la situación óptima en la que el censo efectivo se maximiza.

	2006	2007
\bar{k}	1,22	1,17
$V_{\bar{k}}$	0,23	0,18

Tabla 8. Resumen de la media y varianza en el éxito reproductivo de los adultos correspondientes a 2006 y 2007, respectivamente.



A diferencia del río Lérez, en el río Ulla no se controla la entrada del 100% de los adultos de retorno, ya que no todos los salmones pasan a través de la estación de captura en su retorno a la cabecera del río, o bien se reproducen en zonas del río aguas abajo de la estación. Esta es la razón por la cual un 43% de los juveniles no es asignado por el análisis a ningún parental.

Este tipo de metodología es muy útil y permite obtener información muy diversa. En el río Lérez nuestro equipo la ha aplicado previamente para determinar la contribución de los machos precoces al censo efectivo de la población, y en el río Bidasoa ha resultado muy útil para determinar el impacto de la pesca recreativa sobre la abundancia de clases de edad (ver Saura y col. 2008 y Saura y col. 2009 para más información).

SEXADO

Se analizaron un total de 32 muestras de sangre de salmones retornados a los ríos Ulla y Lérez durante la temporada de pesca del 2009 (no fue posible analizar todos los individuos, ya que no se disponía de muestras de sangre de todos ellos). De estas muestras, 5 correspondieron al río Lérez y 27 al río Ulla. Se utilizó el método inmunocolorimétrico, que detecta cuantitativamente la vitelogenina sérica usando el ensayo inmunoenzimático ELISA tal y como se ilustra en la Figura 11.

En la Tabla 9 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. Los sexos individualizados se detallan en el Apéndice (Sumario III).





Figura 11. 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.

Río	Machos	Hembras	¿?
Lérez	2	2	1
Ulla	14	9	4

Tabla 9. Tabla resumen del número de machos y hembras por río.



CONCLUSIONES GENERALES

Los principales objetivos de un programa de conservación son: (1) mantener unos niveles elevados de variabilidad genética y (2) evitar el incremento de la consanguinidad. Por lo que respecta a este punto, el programa está resultando satisfactorio, ya que cumple ambos requisitos atendiendo a los parámetros relacionados con la variabilidad genética.

Durante este año 2009, sin embargo, se han alterado los patrones de diferenciación genética, ya que las diferencias existentes entre el río Lérez y el Eo son inferiores a lo esperado (no así las diferencias entre los ríos Ulla y Eo). Como consecuencia, esta alteración ha afectado a la correlación entre distancia genética y geográfica, que por primera vez en cinco años, no ha sido significativa. Del mismo modo, el número de individuos retornados a cada río este año ha caído de manera generalizada en los tres ríos, comparando este dato con el mismo de años precedentes. En 2009 se ha detectado un cuello de botella en el río Lérez, indicativo de que su población ha sufrido una caída importante en su censo efectivo. Aunque en los otros dos ríos estudiados no se ha detectado de manera cuantitativa este efecto, es importante tener en cuenta la pequeña caída en las frecuencias alélicas acumuladas de la primera categoría de frecuencias. Si esta tendencia se mantiene en años venideros, es muy probable que el censo efectivo de estas poblaciones resulte también afectado.

No obstante, los resultados relativos al río Lérez podrían estar sesgados, debido a que no se incluyeron en los análisis la totalidad de las muestras por circunstancias de diversa índole. Por tanto, conviene interpretar estos resultados con precaución.

Con respecto al sexado, la proporción de sexos es opuesta a la encontrada en años anteriores. Es la primera vez que se observa esta abundancia de machos. Tradicionalmente, las poblaciones del atlántico están claramente sesgadas hacia hembras. El dato de este año es puntual y puede deberse al escaso número de salmones capturados en la temporada de pesca.



Los datos del análisis de paternidad revelan la potencialidad de este método a la hora de intentar cuantificar el número de individuos que no se controlan en la estación de captura. Este método puede resultar también interesante para determinar la edad de mar de los individuos que se analizan, en función de la cohorte de parentales a la que sean asignados. Los datos sugieren que un 32% de los individuos no se asignan a ningún parental, lo que implicaría que este porcentaje de adultos no fue controlado en la estación de captura en el momento de su retorno al río. Cabe puntualizar que no es posible distinguir este dato de la contribución de los machos precoces. No obstante, se podría introducir una corrección aplicando los porcentajes de contribución de los machos precoces estimados en otros estudios en ríos gallegos.

Independientemente de los posibles artefactos que sesguen las estimas del río Léz, los datos de evolución temporal de las poblaciones ponen de manifiesto que el año 2009 es el de menor rendimiento del programa en los últimos cinco años. A pesar de que los niveles de variabilidad genética son todavía elevados, la integridad de las poblaciones de estos tres ríos podría verse comprometida si la tendencia observada en este año se mantiene. En cualquier caso, las poblaciones de esta especie suelen sufrir oscilaciones temporales debido a diversas causas, como cambios en el régimen de lluvias, temperatura, etc., por lo que no conviene extraer conclusiones precipitadas. En los próximos años se podrá verificar si este resultado es anecdótico o si por el contrario se trata de una tendencia indicativa de algún proceso que esté amenazando a las poblaciones de salmón atlántico gallego.

Aprender del pasado para ser capaz de predecir el futuro, es el primer paso para conseguir un desarrollo sostenible.



REFERENCIAS

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.

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.

Duchesne P., Tanguy C., Bernatchez L. (2005). PASOS (parental allocation of singles in open systems): a computer program for individual parental allocation with missing parents. *Molecular Ecology Notes*, 5, 701-704.

Estoup A., Largiader 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.

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.

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.

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.



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.

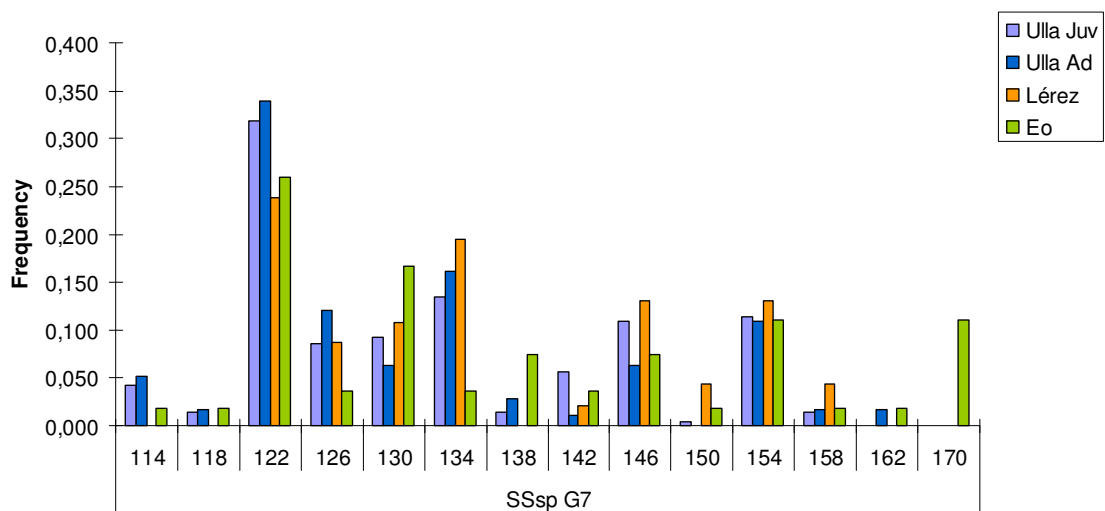
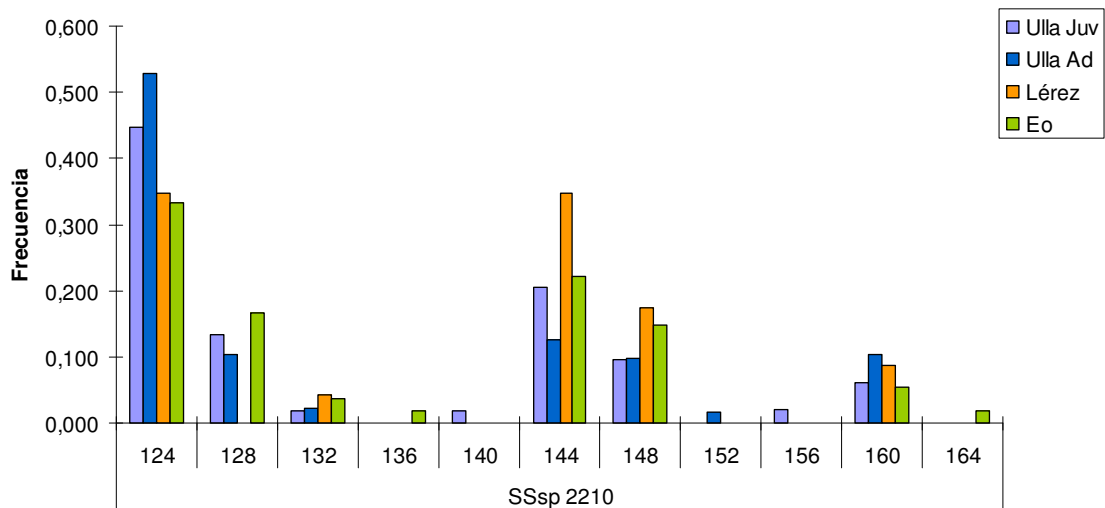
Saura M., Caballero A., Caballero P. and Morán P. (2008). Impact of precocious male parr on the effective size of a wild population of Atlantic salmon. *Freshwater Biology*, 53: 2375-2384.

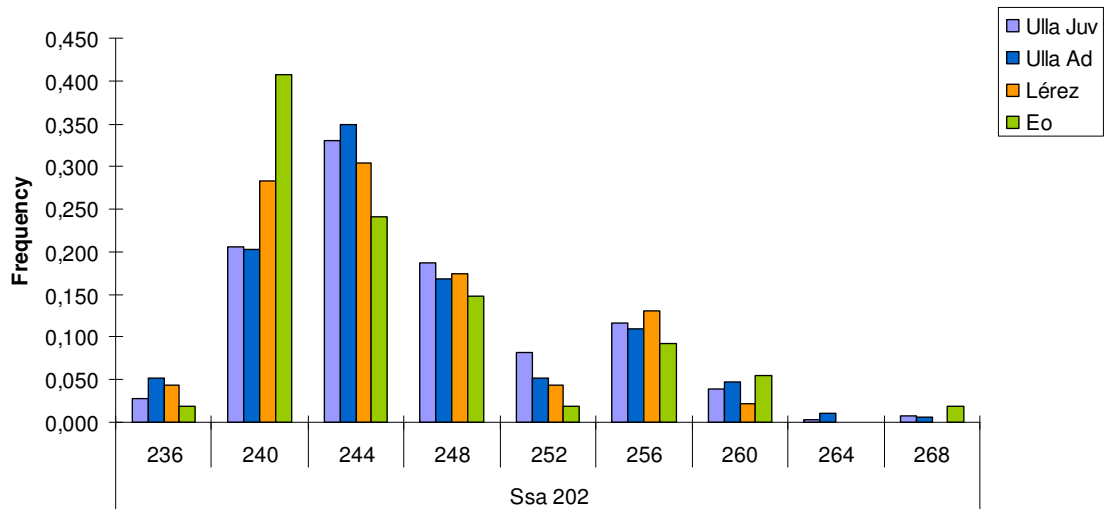
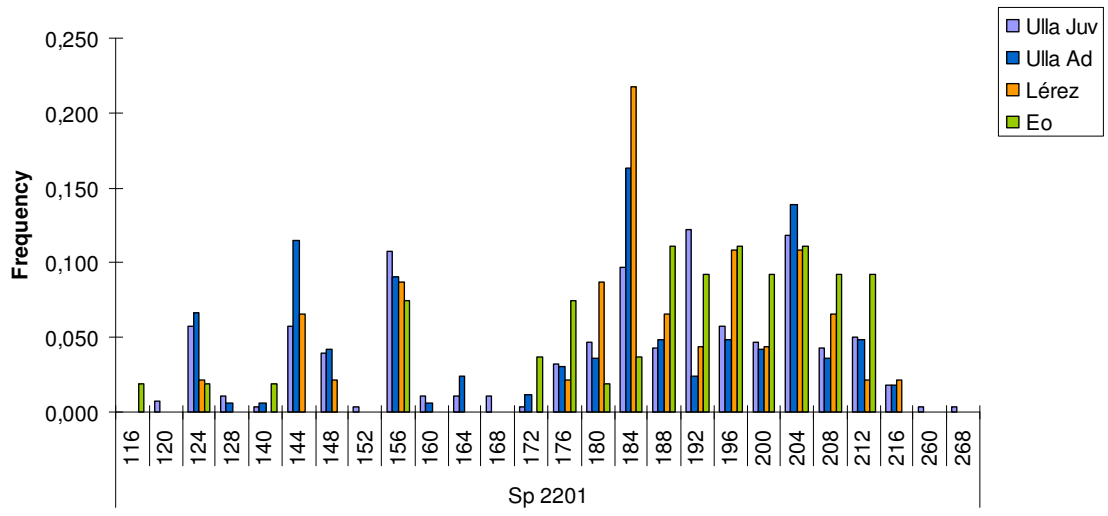
Saura M., Morán P., Brotherstone S., Caballero A., Álvarez J. and Villanueva B. (2009). Predictions of response to selection caused by angling in a wild population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Freshwater Biology*, 55: 923-930

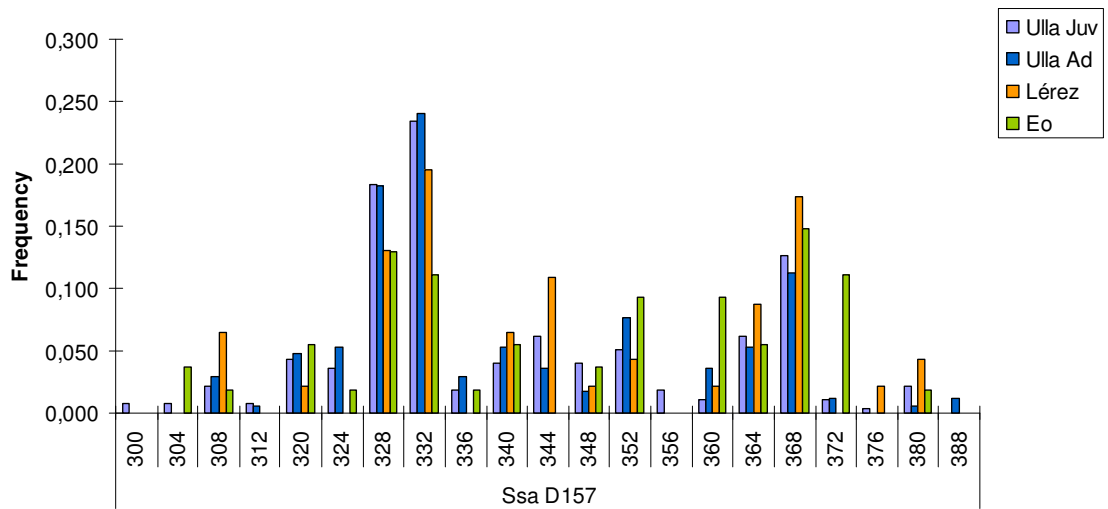
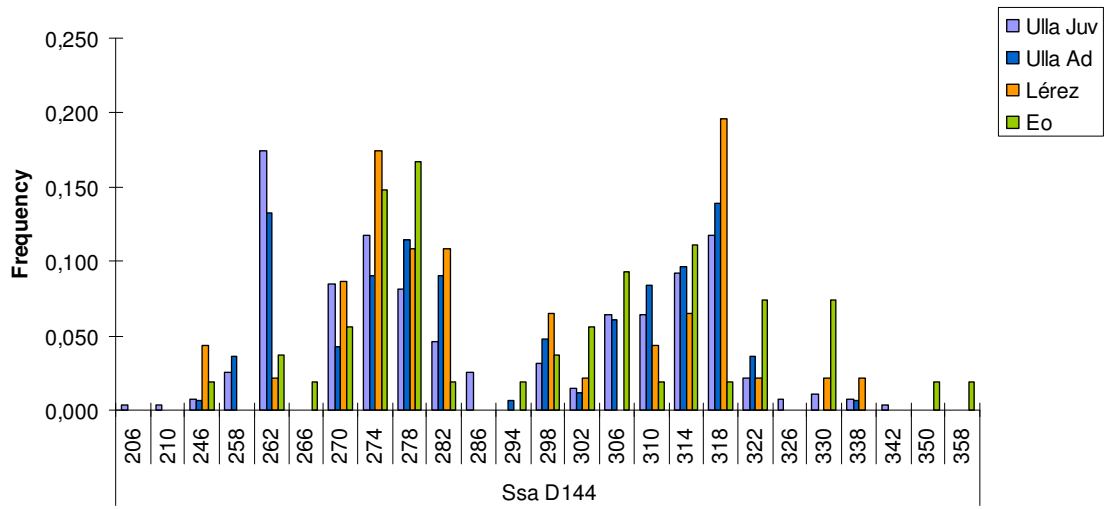


APÉNDICE

Sumario I. Frecuencias alélicas por locus y población (Ulla Juv: Ulla Juveniles; Ulla Ad: Ulla Adultos; Lérez y Eo).







Sumario II. Resultados de la asignación de paternidades. Cód: código. D: desconocido.

Cód Estación	Cód Análisis	Parental 1	Parental 2	Cohorte
100	Juvenil 1	Adulto 52	D	2006
1019	Juvenil 2	D	D	
1021	Juvenil 3	Adulto 32	D	2006
1022	Juvenil 4	D	D	
1026	Juvenil 5	Adulto 200	D	2007
1027	Juvenil 6	Adulto 269	D	2007
1028	Juvenil 7	Adulto 338	Adulto 346	2007
1029	Juvenil 8	Adulto 270	D	2007
1030	Juvenil 9	Adulto 241	D	2007
1031	Juvenil 10	Adulto 303	D	2007
1032	Juvenil 11	Adulto 311	Adulto 360	2007
1033	Juvenil 12	Adulto 408	D	2007
1034	Juvenil 13	D	D	
1035	Juvenil 14	Adulto 301	D	2007
1036	Juvenil 15	Adulto 251	Adulto 406	2007
111	Juvenil 16	Adulto 300	D	2007
112	Juvenil 17	Adulto 403	D	2007
1164	Juvenil 18	Adulto 77	D	2006
1165	Juvenil 19	Adulto 151	Adulto 162	2006
1166	Juvenil 20	D	D	
1167	Juvenil 21	Adulto 323	D	2007
1177	Juvenil 22	Adulto 270	Adulto 406	2007
1178	Juvenil 23	Adulto 240	Adulto 285	2007
1179	Juvenil 24	D	D	
1213	Juvenil 25	Adulto 214	D	2007
1215	Juvenil 26	D	D	
1221	Juvenil 27	Adulto 207	Adulto 364	2007
1229	Juvenil 28	D	D	
1230	Juvenil 29	Adulto 238	D	2007
1235	Juvenil 30	Adulto 203	D	2007
125	Juvenil 31	D	D	
1252	Juvenil 32	D	D	
1272	Juvenil 33	D	D	
1358	Juvenil 34	Adulto 86	D	2006
1359	Juvenil 35	Adulto 226	Adulto 228	2007
136	Juvenil 36	D	D	
1360	Juvenil 37	Adulto 35	D	2006
1361	Juvenil 38	D	D	
1362	Juvenil 39	Adulto 360	D	2007
1363	Juvenil 40	Adulto 204	D	2007
1364	Juvenil 41	D	D	



Cód Estación	Cód Análisis	Parental 1	Parental 2	Cohorte
137	Juvenil 42	D	D	
1383	Juvenil 43	Adulto 231	D	2007
1384	Juvenil 44	D	D	
1385	Juvenil 45	D	D	
1386	Juvenil 46	Adulto 302	D	2007
1387	Juvenil 47	D	D	
1388	Juvenil 48	Adulto 213	D	2007
142	Juvenil 49	D	D	
1459	Juvenil 50	Adulto 81	D	2006
1460	Juvenil 51	D	D	
1463	Juvenil 52	Adulto 411	D	2007
1464	Juvenil 53	D	D	
147	Juvenil 54	Adulto 26	Adulto 114	2006
156	Juvenil 55	Adulto 266	Adulto 304	2007
174	Juvenil 56	Adulto 11	D	2006
196	Juvenil 57	Adulto 165	D	2006
199	Juvenil 58	Adulto 412	D	2007
216	Juvenil 59	Adulto 198	Adulto 251	2007
222	Juvenil 60	Adulto 150	D	2006
230	Juvenil 61	Adulto 149	D	2006
231	Juvenil 62	Adulto 42	D	2006
234	Juvenil 63	D	D	
236	Juvenil 64	D	D	
327	Juvenil 65	Adulto 183	D	2006
328	Juvenil 66	D	D	
329	Juvenil 67	Adulto 34	D	2006
334	Juvenil 68	Adulto 261	D	2007
362	Juvenil 69	Adulto 295	D	2007
363	Juvenil 70	Adulto 362	D	2007
364	Juvenil 71	Adulto 283	D	2007
379	Juvenil 72	Adulto 297	D	2007
380	Juvenil 73	Adulto 48	Adulto 132	2006
388	Juvenil 74	D	D	
399	Juvenil 75	Adulto 266	D	2007
400	Juvenil 76	Adulto 24	D	2006
404	Juvenil 77	Adulto 209	Adulto 297	2007
405	Juvenil 78	D	D	
416	Juvenil 79	Adulto 116	D	2006
427	Juvenil 80	D	D	
43	Juvenil 81	D	D	
433	Juvenil 82	Adulto 26	D	2006
441	Juvenil 83	D	D	
47	Juvenil 84	Adulto 339	D	2007



Cód Estación	Cód Análisis	Parental 1	Parental 2	Cohorte
527	Juvenil 85	Adulto 374	D	2007
530	Juvenil 86	D	D	
535	Juvenil 87	D	D	
543	Juvenil 88	Adulto 235	Adulto 319	2007
551	Juvenil 89	Adulto 359	D	2007
554	Juvenil 90	Adulto 360	D	2007
574	Juvenil 91	D	D	
58	Juvenil 92	Adulto 29	Adulto 117	2006
588	Juvenil 93	D	D	
619	Juvenil 94	D	D	
629	Juvenil 95	Adulto 323	D	2007
640	Juvenil 96	Adulto 149	D	2006
655	Juvenil 97	Adulto 286	D	2007
661	Juvenil 98	Adulto 54	D	2006
667	Juvenil 99	Adulto 167	D	2006
695	Juvenil 100	Adulto 183	D	2006
725	Juvenil 101	Adulto 304	D	2007
726	Juvenil 102	Adulto 333	Adulto 406	2007
727	Juvenil 103	Adulto 211	D	2007
728	Juvenil 104	Adulto 252	Adulto 372	2007
729	Juvenil 105	D	D	
730	Juvenil 106	Adulto 11	D	2006
775	Juvenil 107	Adulto 231	D	2007
776	Juvenil 108	Adulto 131	D	2006
777	Juvenil 109	Adulto 219	Adulto 273	2007
778	Juvenil 110	Adulto 238	Adulto 383	2007
779	Juvenil 111	D	D	
780	Juvenil 112	D	D	
781	Juvenil 113	D	D	
782	Juvenil 114	D	D	
784	Juvenil 115	Adulto 244	Adulto 267	2007
785	Juvenil 116	D	D	
81	Juvenil 117	Adulto 116	D	2006
821	Juvenil 118	Adulto 31	Adulto 177	2006
822	Juvenil 119	Adulto 42	D	2006
823	Juvenil 120	D	D	
909	Juvenil 121	Adulto 58	Adulto 143	2006
914	Juvenil 122	Adulto 61	Adulto 151	2006
920	Juvenil 123	Adulto 24	Adulto 99	2006
922	Juvenil 124	D	D	
955	Juvenil 125	Adulto 36	D	2006
956	Juvenil 126	Adulto 2	D	2006
957	Juvenil 127	Adulto 70	D	2006



Cód Estación	Cód Análisis	Parental 1	Parental 2	Cohorte
958	Juvenil 128	Adulto 249	D	2007
962	Juvenil 129	Adulto 162	D	2006
963	Juvenil 130	D	D	
99	Juvenil 131	Adulto 399	Adulto 402	2007
993	Juvenil 132	Adulto 217	D	2007
999	Juvenil 133	D	D	

Sumario III. Resultados del análisis de sexado mediante ELISA. H-Hembra. M-Macho. ¿? Sin determinar.

Muestras salmón 2009	SEXO ELISA
21011 LÉREZ 2009	M
21012 LÉREZ 2009	¿?
21014 LÉREZ 2009	H
21015 LÉREZ 2009	M
? LÉREZ 2009	H
20041 ULLA 2009	H
21232 ULLA 2009	H
21254 ULLA 2009	M
20053 ULLA 2009	M
20049 ULLA 2009	¿?
20054 ULLA 2009	¿?
21240 ULLA 2009	M
21253 ULLA 2009	M
21256 ULLA 2009	M
21239 ULLA 2009	H
21235 ULLA 2009	M
21234 ULLA 2009	M
20058 ULLA 2009	H
21252 ULLA 2009	M
21257 ULLA 2009	H
21251 ULLA 2009	H
21233 ULLA 2009	M
20051 ULLA 2009	H
21231 ULLA 2009	M
20052 ULLA 2009	H
21261 ULLA 2009	M
20048 ULLA 2009	¿?
21260 ULLA 2009	M
21262 ULLA 2009	H



Muestras salmón 2009	SEXO ELISA
21255 ULLA 2009	M
21253 ULLA 2009	M
20043 ULLA 2009	¿?
BLANCO	M
12547 L07 CONTROL HEMBRA	H
12560 L07 CONROL MACHO	M
BLANCO	M
12547 L07 CONTROL HEMBRA	H
12560 L07 CONROL MACHO	M



