

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“EVALUACIÓN GENÉTICA DE LOS
SALMONIDOS ASTURIANOS COMO
RECURSO NATURAL”**

PROYECTO FIN DE MÁSTER

POR

DAVID ABAD GARCÍA

JULIO, 2012





Máster en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dra. Eva García Vázquez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que **David Abad García** ha realizado bajo mi dirección el Proyecto de Investigación al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, promoción 2011-2012.

Oviedo, 17 de Julio de 2012

Eva García Vázquez

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

Para ti.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas del laboratorio de genética de recursos naturales por su ayuda durante todo el proyecto, y en especial, a Eva García Vázquez por concederme esta oportunidad, y a José Luis Hórreo Escandón, por su apoyo durante los primeros meses.

ÍNDICE

Índice.....	1
Resumen.....	3
Abstract.....	3
Lista de tablas y figuras.....	4
Glosario.....	7
1. Introducción.....	9
1.1 La trucha en Asturias.....	10
2. Consideraciones teóricas y experimentales.....	12
2.1 Antecedentes bibliográficos.....	12
2.1.1 Distribución geográfica.....	12
2.1.2 Gestión y conservación de los recursos.....	13
2.1.3 Repoblaciones.....	14
2.1.4 Análisis genético.....	16
2.2 Técnicas experimentales.....	17
2.2.1 Aislamiento del ADN.....	17
2.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	17
2.2.2.1 Fundamentos.....	18
2.2.2.2 Reactivos.....	19
2.2.2.3 Ciclo de temperaturas.....	20
2.2.3 Electroforesis.....	21
2.2.3.1 Fundamentos.....	21
2.2.3.2 Medios de soporte.....	22

2.2.3.3 Visualización.....	24
2.2.4 Enzimas de restricción.....	24
3. Material y métodos.....	26
3.1 Toma de muestras.....	26
3.2 Evaluación genética.....	27
3.2.1 Extracción del ADN.....	28
3.2.2 Amplificación del ADN.....	29
3.2.3 Digestión del ADN.....	34
4. Resultados experimentales y discusión.....	37
4.1 Resultados experimentales.....	37
4.1.2 Las mestas.....	37
4.1.2.1 Evolución de genotipos de las Mestas.....	38
4.1.2 Infiesto.....	39
4.1.2.1 Evolución de genotipos de Infiesto.....	42
4.1.2.2 Comparación de tamaños.....	43
4.2 Discusión.....	46
5. Conclusiones.....	48
6. Bibliografía.....	49
7. Apéndices.....	51

RESUMEN

En este proyecto se analiza la estructura genética de los stocks utilizados para la repoblación de trucha común en el Principado de Asturias, pertenecientes a dos piscifactorías diferentes, con el fin de establecer si los repobladores cumplen con la normativa vigente sobre la liberación de individuos no autóctonos al medio natural, que está actualmente prohibida. Para ello se utiliza como marcador genético el gen del enzima lactato deshidrogenasa LDH-C, que permite diferenciar las poblaciones nativas de las truchas de otros orígenes, por ejemplo las de origen centroeuropeo que fueron importadas hace años para repoblación en la región. Las distribuciones de genotipos para este gen mostraron que en ambas piscifactorías todavía existe un cierto grado de introgresión genética de trucha foránea, que varía notablemente entre ambas. La evolución en el tiempo de los genotipos de las dos piscifactorías revela una tendencia a la disminución del genotipo centroeuropeo, que sin embargo no ha llegado a ser eliminado. La distribución de tamaños en los juveniles apunta la posibilidad de que los individuos de genotipo foráneo crezcan más rápido que el resto de genotipos en piscifactoría, por lo que su eliminación sería más difícil al estar favorecidos por la selección.

ABSTRACT

This project analyzes the genetic structure of the stocks employed for stocking wild populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) in Asturian rivers, in order to know if they accomplish the current legislation about introduction of exotics in the wild which is forbidden in the region. They correspond to two different regional hatcheries. For determining the proportion of allochthonous genotypes we have employed as a genetic marker the gene of the enzyme lactate dehydrogenase LDH-C, which can differentiate the native individuals from foreign stocks like for example the center European individuals imported for stocking some years ago. The genotypes found in both hatcheries showed some degree of genetic introgression from foreign trout, which varies considerably between them. The evolution of genotypes over the years in these hatcheries showed a clear tendency to the reduction of foreign genotypes. Size distribution of juveniles of different genotypes suggests the possibility that the individuals of foreign genotype grow up faster than the other genotypes in hatchery conditions, which would make their elimination difficult being favoured by selection.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1: clasificación de la trucha común.....9

Tabla 2.1: medios de soporte para electroforesis en función de la fricción.....22

Tabla 3.1: tipo y número de muestras aportadas por cada una de las piscifactorías.....27

Tabla 3.2: reactivos para el Chelex al 10%.....28

Tabla 3.3: secuencias de los primers utilizados.....31

Tabla 3.4: reactivos del PCR-mix.....31

Tabla 3.5: reactivos del gel de agarosa.....33

Tabla 3.6: reactivos del BslI-mix.....35

Tabla 4.1: alevines las Mestas.....37

Tabla 4.3: reproductores Infiesto.....38

Tabla 4.4: alevines con vesícula de Infiesto.....39

Tabla 4.5: alevines sin vesícula de Infiesto.....40

Tabla 4.6: porcentajes de los genotipos de los reproductores de Infiesto 2012.....41

Tabla 4.7: individuos por genotipos y tallas.....42

Tabla 4.8: media de tamaños y desviaciones.....43

Tabla 4.2: comparación de porcentajes de las Mestas por años.....43

Tabla 7.1: genotipos de los alevines de las mestas 1 a 40.....51

Tabla 7.2: genotipos de los alevines de las mestas 41 a 80.....52

Tabla 7.3: genotipos de los alevines de las mestas 81 a 120.....53

Tabla 7.4: genotipos de los alevines de las mestas 121 a 160.....54

Tabla 7.5: genotipos de los reproductores de Infiesto 1 a 30.....55

Tabla 7.6: genotipos de los reproductores de Infiesto 31 a 54.....56

Tabla 7.7: genotipos de los alevines vesiculados de Infiesto 1 a 40.....	57
Tabla 7.8: genotipos de los alevines vesiculados de Infiesto 41 a 85.....	58
Tabla 7.9: genotipos de los juveniles de Infiesto 1 a 28.....	59
Tabla 7.10: genotipos de los juveniles de Infiesto 29 a 56.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: ciclo de vida de la trucha.....	10
Figura 2.1: mapa de España en el que se muestra la distribución de la trucha común..	12
Figura 2.2. usos del río Narcea.....	13
Figura 2.3. la imagen representa una de las repoblaciones llevadas a cabo por la Real Asociación Asturiana de Pesca Fluvial en el 2012.....	15
Figura 2.4: representación gráfica de la desnaturalización del ADN.....	20
Figura 2.5: esquema del anillado de los primers.....	20
Figura 2.6: representación esquemática de la elongación del ADN.....	21
Figura 2.7: electroforesis submarina.....	23
Figura 2.8: electroforesis en gel de acrilamida.....	23
Figura 2.9. estructura del Bromuro de Etidio.....	24
Figura 2.10: cortes producidos por <i>SmaI</i> y por <i>EcoRI</i>	25
Figura 3.1: mapa de Asturias con.....	26
Figura 3.2: anatomía de la trucha en la que se observa la localización de la aleta adiposa utilizada para la extracción de ADN.....	27
Figura 3.3. tubo Eppendorf conteniendo ADN tras la extracción con Chelex, en el que se aprecian las dos fases.....	29
Figura 3.4: amplificación del ADN (PCR).....	30

Figura 3.5. ciclo de temperaturas de PCR para la amplificación de LDH-C.....	32
Figura 3.6: carga de muestras en el gel y estructura del bromuro de etidio.....	33
Figura 3.7. visualización de los resultados de una PCR en un gel de agarosa al 2%, tras su exposición a luz ultravioleta.....	34
Figura 3.8: secuencia diana de BslI.....	35
Figura 3.8. visualización de los resultados de la digestión del ADN mediante el enzima BslI en un gel de agarosa al 2%, tras su exposición a luz ultravioleta.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1: porcentajes de genotipos en el stock de la piscifactoría de las Mestas.....	37
Gráfico 4.2: evolución de los genotipos en las Mestas.....	38
Gráfico 4.3: porcentajes de genotipos de los reproductores de Infiesto 2012.....	39
Gráfico 4.4: porcentajes de genotipos de los alevines con vesícula de Infiesto 2012...	40
Gráfico 4.5: porcentajes de genotipos de los alevines sin vesícula de Infiesto 2012...	41
Gráfico 4.6: evolución de los genotipos de los reproductores de Infiesto 2012.....	42
Gráfico 4.7: distribución de tamaños para el genotipo 90/90.....	44
Gráfico 4.8: distribución de tamaños para el genotipo 100/100.....	44
Gráfico 4.9: distribución de tamaños para el genotipo 90/100.....	45

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Adenina: una de las bases nitrogenadas que forma parte de los ácidos nucleicos, cuya representación en el código genético es la letra A.

ADN polimerasa: enzima encargada de la replicación del ADN.

Agente intercalante: Compuesto que se inserta entre las bases de una molécula de ADN, interrumpiendo la alineación y el emparejamiento de bases de las cadenas complementarias.

Agente quelante: sustancia que forma complejos con iones de metales pesados.

Alelo: cada una de las formas alternativas que puede tener un gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función.

ARNasas: nucleasa que cataliza la hidrólisis del ARN.

Cebadores: véase primers.

Desnaturalización: cambio estructural de las proteínas o los ácidos nucleicos en el que pierden su estructura nativa, pudiendo afecta a su funcionamiento y propiedades.

Diana de restricción: secuencia de nucleótidos en el cortan los enzimas de restricción.

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato. Son utilizados por las polimerasas para la síntesis de ADN.

Endonucleasas: nucleadas que cortan los enlaces fosfodiéster situados en el interior de los nucleótidos.

Foránea: especie que está fuera de su distribución natural.

Genotipo: la totalidad de la información genética presente en un organismo.

Guanina: otra de las bases nitrogenadas que forma parte de los ácidos nucleicos, cuya representación en el código genético es la letra G.

Heterocigoto: individuo que para un gen dado tiene en cada cromosoma homólogo un alelo distinto

Homocigoto: individuo que para un gen dado tiene en cada cromosoma homólogo el mismo alelo.

Introgresión genética: introducción de genes de una población en otra diferente.

Locus: posición fija en un cromosoma, ya sea de un gen o de un marcador genético.

Marcador genético: secuencia de ADN con una ubicación identificable cuya herencia se puede rastrear.

Nucleasas: enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster.

Nucleótidos: moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato.

Pares de bases (pb): término utilizado para expresar la longitud de una secuencia de ADN, correspondiente a dos nucleótidos opuestos y complementarios conectados por puentes de hidrógeno.

Poblaciones conespecíficas: que pertenecen a la misma especie.

Primers: cadena de ácidos nucleicos que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Replicación: mecanismo mediante el cual el ADN se duplica.

Especies simpátricas: que viven en la misma área geográfica.

Tamaño efectivo: número de individuos de una población que dejan descendientes.

Taq polimerasa: ADN polimerasa procedente de la bacteria *Thermus Aquaticus*.

1. INTRODUCCIÓN

La trucha común, también denominada trucha europea o trucha de río, *Salmo trutta*, es un pez de la familia de los salmónidos que, a diferencia de otras especies como el salmón, es capaz de desarrollar toda su vida exclusivamente en agua dulce.

Clasificación	
Clase	Actinopterygii
Orden	Salmoniformes
Familia	Salmonidae
Género	<i>Salmo</i>
Especie	<i>Salmo trutta</i>

Tabla 1.1: Clasificación taxonómica de la trucha común

Presenta un cuerpo alargado cubierto de numerosas motas oscuras y puntos anaranjados rodeados de un halo blanquecino en los flancos. Entre la aleta dorsal y la aleta caudal presenta un carácter común en toda la familia de los salmónidos: una aleta adiposa con una característica mancha rojiza en el borde.

Preferentemente ocupa aguas frías, limpias y oxigenadas aunque dada su gran elasticidad ecológica se adapta a distintos tipos de aguas con el único condicionante de la temperatura. En aguas rápidas y frías de montaña lo más frecuente es encontrarse ejemplares de pequeño tamaño, mientras que en aguas lentas, como pueden ser embalses y lagos, alcanzan un tamaño superior.

Su alimentación se basa principalmente en larvas e insectos, aunque cuando son más grandes pueden llegar a comer animales de pequeño tamaño. Entre los meses de noviembre y enero, cuando el agua está más fría, se desplazan de forma breve hacia los afluentes de los ríos de mayor caudal en cuya grava realizan la puesta de huevos.

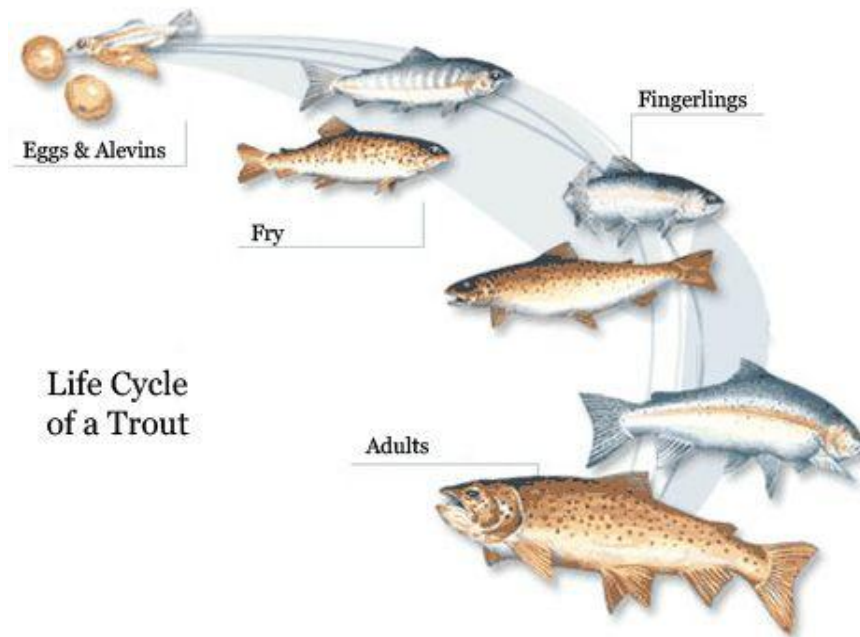


Figura 1.1: Ciclo de vida de la trucha común

1.1 LA TRUCHA EN ASTURIAS

A día de hoy la principal importancia económica de la trucha en nuestra región se debe casi exclusivamente a la pesca deportiva, aunque también cabe destacar la influencia que tiene el turismo: una actividad que en Asturias reúne a una gran cantidad de adeptos atraídos por el encanto de los ríos del Principado y por sus especies piscícolas.

Pese a su gran atractivo, el medio fluvial en Asturias no está exento de problemas. Entre ellos destacan la destrucción del hábitat y la aparición de multitud de obstáculos en los cauces que impiden a las truchas acceder a sus áreas de puesta de huevos, así como la contaminación de las aguas y el incremento de la pesca. De hecho, esta explotación de la especie conlleva una fluctuación continua de las poblaciones naturales presentes en nuestros ríos y que normalmente suele acarrear consecuencias negativas.

La disminución de las poblaciones por debajo de unos límites sostenibles generan un riesgo para la especie, pudiendo incluso llegar a desaparecer sino se llevasen a cabo programas de conservación adecuados; de ahí el interés de que periódicamente se efectúen repoblaciones para suplementar poblaciones naturales en declive (Ryman et al., 1995).

Es necesario hacer un seguimiento de las poblaciones que habitan los distintos ríos, así como de las piscifactorías que se encargan de las repoblaciones, puesto que desde hace unos años se ha visto que las truchas de origen centroeuropeo utilizadas están produciendo cambios en el estructura genética de las poblaciones nativas (Izquierdo et al., 2006).

El presente proyecto trata de analizar la composición genética de los stocks de truchas de distintas piscifactorías que serán utilizadas para la repoblación, estableciendo así los genotipos presentes en las mismas y la proporción de individuos de origen no autóctono que todavía quede en ellos, si los hubiera. Se pretende determinar el grado de introgresión genética en los stocks repobladores y averiguar si cumplen el requisito, establecido por Ley, de que sean de origen autóctono. Estos conceptos se desarrollarán más ampliamente en la siguiente sección.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1.1 Distribución geográfica

Salmo trutta, o trucha común, es la especie más común de la familia de los salmónidos en Europa. Está ampliamente distribuida por todo el continente Europeo, del cual se considera nativa, estando presente desde las regiones más septentrionales, como las costas de Islandia, hasta las zonas del sur como el mar Mediterráneo.

Su gran capacidad de adaptación ha promovido que desde finales del siglo pasado hasta la actualidad la trucha común haya sido introducida en multitud de países, llegando a estar presente en la actualidad en todos los continentes excepto en la Antártida (McCrimmon, 1968).

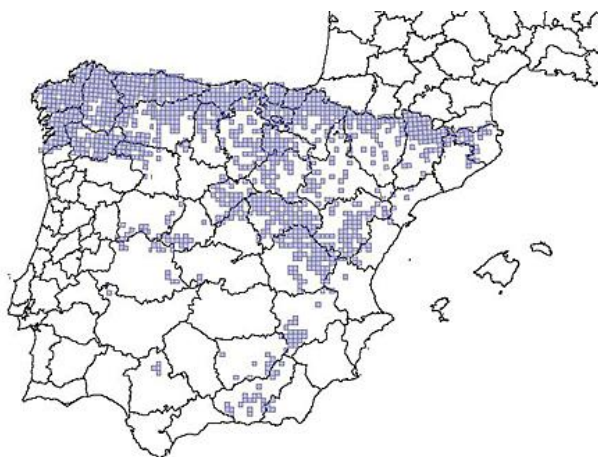


Figura 2.1: Mapa de España en el que se muestra la distribución de la trucha común (sombreada en oscuro).

En España se localiza principalmente en la zona norte, ocupando las cabeceras de los ríos de la región cantábrica y de los Pirineos. También se pueden encontrar poblaciones estables en los tramos altos de los ríos de las comunidades de Castilla y Aragón, siendo mucho menos común en los litorales levantinos y del sur de la península.

Su distribución actual, se encuentra fuertemente influenciada por las repoblaciones llevadas a cabo durante los últimos años, llegando a existir poblaciones que únicamente están constituidas por truchas procedentes de repoblación.

2.1.2 Gestión y conservación de los recursos

Las tres principales actividades humanas que afectan a la conservación de las poblaciones trucheras son la alteración del hábitat, la sobreexplotación pesquera, y la repoblación, que también afectan indirectamente a las poblaciones de salmón y que se comentará en mayor detalle en el apartado siguiente.

La degradación del medio fluvial en que vive la trucha puede deberse tanto a su destrucción física directa, como por ejemplo debido a la presencia de centrales hidroeléctricas que impiden el ascenso de los reproductores a los lugares de puesta de huevos y que crean modificaciones del curso del río, o a modificaciones en la calidad del mismo a través de diversas formas de contaminación. Las repercusiones de todo esto se traducen en un descenso de las poblaciones naturales, que conllevarían un riesgo para la especie si no se llevasen a cabo programas de conservación adecuados.

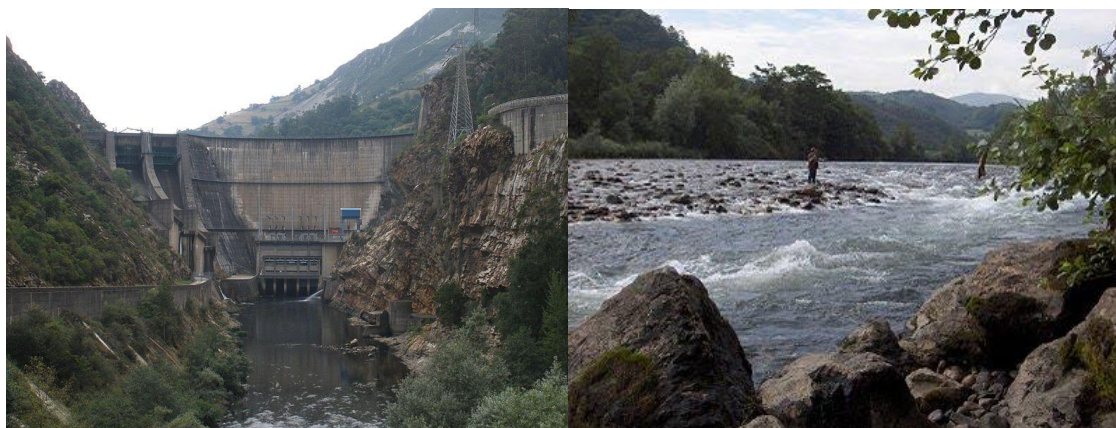


Figura 2.2. Usos del río Narcea. La imagen de la izquierda muestra la presa de la central hidroeléctrica del embalse de La Barca, en el cauce principal del Narcea. En la derecha, un pescador en el mismo río.

La explotación de las poblaciones naturales de trucha mediante la pesca tiene principalmente un carácter recreativo, aunque en algunas regiones todavía se mantiene su comercialización, lo que no hace otra cosa más que agravar el problema porque puede inducir a su sobreexplotación. En Asturias prevalece la pesca deportiva. A pesar de la existencia de una gran cantidad de cotos sin muerte, hay abundantes capturas en los otros cotos; esto, junto con el furtivismo y las alteraciones del hábitat comentadas antes, trae como consecuencia la disminución de las poblaciones de esta especie. Se considera necesario repoblar para mantener las poblaciones presentes en los ríos asturianos dentro de unos límites sostenibles.

Cuando no se conoce la estructura genética de las poblaciones naturales de trucha, la gestión del recurso se realiza a menudo de forma inadecuada al no poder estimar la tasa de explotación de las unidades poblacionales naturales. La presión de pesca excesiva puede alterar los recursos poblacionales, como por ejemplo mediante una selección para disminución de tamaño de los individuos al detraerse del río los ejemplares mayores, o una maduración sexual temprana si quedan para reproducirse los más jóvenes durante varias generaciones; las poblaciones menos abundantes pueden llegar a desaparecer si no existe una regulación específica de los recursos genéticos (Ryman et al., 1995).

La pérdida de dichos recursos dentro de la especie puede producirse de manera drástica por la eliminación de poblaciones diferenciadas, pero también la propia disminución del tamaño efectivo poblacional puede tener efectos negativos sobre la viabilidad y futuro de las poblaciones. Todo esto conlleva la pérdida de diversidad genética, lo que trae como resultado la disminución de la viabilidad de las poblaciones puesto que representa la capacidad para hacer frente a cambios ambientales. Por lo tanto, el conocimiento de la estructura genética de la trucha común es un elemento clave a tener en cuenta en la aplicación de programas de gestión y conservación de recursos.

2.1.3 Repoblaciones

Lo primero a tener en cuenta es si los programas de repoblación se utilizan en aquellas áreas realmente deterioradas, dentro de un modelo de gestión de poblaciones autosostenibles. Para planificar las repoblaciones, es necesario evaluar la cantidad de individuos a liberar en relación con el tamaño efectivo de la población nativa, y el grado de diferenciación de las poblaciones repobladas respecto a las nativas para evitar alteraciones genéticas en las poblaciones naturales (Ryman, 1991) que, como se explicó arriba, podrían llegar a desaparecer si se modifican sus características propias que posibilitan su adaptación local —es decir, al hábitat propio de cada río o afluente (Ryman et al., 1995).

Desgraciadamente, hasta no hace mucho tiempo las repoblaciones constituyeron la principal medida de conservación de las poblaciones trucheras en Asturias, y han utilizado para este fin truchas importadas de origen centroeuropeo. Este tipo de truchas

cultivadas, a pesar de que son muy apropiadas para el cultivo en piscifactorías, pertenecen a un linaje genético diferente al nativo de las poblaciones locales, y han dado lugar a una introgresión genética foránea que se ha introducido en las poblaciones naturales de los ríos en los que fueron liberadas (Izquierdo et al., 2006)

La introducción de variantes foráneas puede afectar a los recursos genéticos de una especie de varias formas. Por una parte, puede ocasionar la extinción de las poblaciones nativas; también puede producir hibridación con ellas, que eliminaría la capacidad de adaptación a las peculiaridades del medio local, así como la introducción de parásitos y enfermedades previamente no presentes en el medio (Ryman et al., 1995).



Figura 2.3. La imagen representa una de las repoblaciones llevadas a cabo por la Real Asociación Asturiana de Pesca Fluvial en el 2012

Aún más, se ha comprobado que las variantes foráneas de trucha contribuyen a aumentar la hibridación entre la trucha y el salmón (Castillo et al., 2008), probablemente debido a que su conducta reproductora está alterada por la domesticación. Es decir, dado que los híbridos son menos fértiles que los ejemplares puros de cada especie, las repoblaciones no nativas no solamente afectan a las poblaciones conespecíficas, sino que también interfieren con la otra especie simpátrida que en el momento actual es motivo de preocupación en Asturias debido al declive de sus poblaciones (Hórreo et al., 2011).

Por todo lo explicado anteriormente, desde el año 2007 se ha prohibido explícitamente el uso de stocks foráneos de trucha, así como de las demás especies

fluviales, con el fin de conservar los linajes autóctonos como reservorios de diversidad genética (Artículo 52.2, Ley 42/2007 del Patrimonio Natural y la Biodiversidad).

De acuerdo con esta legislación, y con el fin de mantener las características genéticas específicas de cada región, se ha comenzado a repoblar con individuos procedentes de cultivo de truchas de origen salvaje. Éstas presentan mayores dificultades para su cría en piscifactoría desde el punto de vista de comportamiento, un crecimiento ralentizado y menor puesta de huevos, así como una alta tasa de mortalidad en cautividad. Aún así, dado que se van a soltar en la naturaleza siempre es preferible utilizar truchas no domesticadas y genéticamente representativas de las poblaciones nativas a repoblar.

Finalmente, es necesario la monitorización periódica de los stocks utilizados para la repoblación con el fin de mantener en el tiempo sus características genéticas y para evitar la presencia los reproductores centroeuropeos (Hórreo & García-Vázquez, 2011).

2.1.4 Análisis genético

Los efectos de las repoblaciones con estas truchas de origen centroeuropeo son fácilmente trazables a través de análisis genéticos que actualmente no requieren el sacrificio de los animales, ya que se pueden realizar a partir de ADN extraído de pequeñas muestra de aleta o escamas (McMeel et al., 2001). La existencia de marcadores genéticos para el diagnóstico en la trucha común entre el stock centroeuropeo utilizado durante años para la repoblación en la Península Ibérica y las poblaciones nativas, facilita la evaluación y seguimiento de esta práctica de gestión.

Entre los marcadores genéticos más utilizados se encuentra el locus LDH-C*, correspondiente al enzima lactato deshidrogenasa, que se encuentra fijado para el alelo *100 en las poblaciones nativas y para el alelo *90 en los stocks, lo que lo convierte en un excelente marcador diagnóstico (Morán et al., 1991). Este marcador se ha utilizado para evaluar el impacto de las repoblaciones en la península Ibérica (García-Marín et al., 1991; Arias et al., 1995). Los resultados obtenidos demostraban que tras años de repoblación las poblaciones Cantábricas apenas muestran presencia de repobladores, incrementándose la incidencia de los mismos a medida que nos aproximamos a la zona

Mediterránea. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que existe cierto nivel de introgresión de los stocks centroeuropeos y que probablemente se debe a las repoblaciones reiteradas con líneas de piscifactoría que todavía los contienen (Izquierdo et al., 2006).

2.2 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

2.2.1 Aislamiento del ADN

El **aislamiento del ADN** es un procedimiento de rutina utilizado en todos los laboratorios de análisis moleculares para extraer el ADN de las células con el fin de realizar estudios posteriores a partir del mismo. Existen una serie de pasos básicos, de los cuales algunos son opcionales, que se enumeran a continuación:

1. Ruptura de las células, más conocida con el nombre de lisis celular, para liberar el ADN del interior. Normalmente se consigue por métodos físicos o químicos, como puede ser el tratamiento con altas temperaturas.
2. Eliminación de los lípidos de membrana mediante detergentes.
3. Eliminación de proteínas mediante la adición de proteasas.
4. Eliminación de ARN con ARNasas
5. Precipitación del ADN utilizando alcohol. El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se agrega, dando lugar a un precipitado tras la centrifugación.

En algunos casos esta técnica incluye la adición de un agente quelante que secuestra los cationes divalentes tales como Mg^{2+} o Ca^{2+} , que previenen que enzimas como las ADNasas degraden el ADN.

2.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La **reacción en cadena de la polimerasa**, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés “**P**olymerase **C**hain **R**eaction”, es una técnica común y normalmente indispensable utilizada en biología molecular desarrollada en 1986 por el bioquímico Kary Mullis y que le sirvió para ganar el Premio Nobel de química en 1993, cuyo

principal objetivo amplificar un fragmento de ADN específico a partir de muy pocas copias.

La capacidad de obtener un número de copias tan elevado de la secuencia diana hace que tenga una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y test de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas.

2.2.2.1 Fundamentos

La base física para este método se fundamenta en la propia estructura del ADN, constituido por dos cadenas de nucleótidos unidos por puentes de hidrógeno, en las que al someterse a altas temperaturas los enlaces se rompen dando lugar a dos cadenas simples de ADN, fenómeno conocido como desnaturalización. A su vez, también depende de la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las hebras de ADN para que vuelvan a duplicarlas.

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables como la *Taq-polimerasa*, extraídas de microorganismos de aguas termales adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos.

Hoy en día todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para

PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico.

Actualmente casi todos los termocicladores realizan la reacción de PCR con la llamada "tapa caliente", un sistema mediante el cual aplicará calor a la parte de arriba del tubo que contiene la mezcla de PCR. Al principio los laboratorios que empezaron a usar los primeros aparatos que se comercializaron, y que no incluían este sistema, tenían que poner unas gotas de aceite dentro del tubo. El objetivo de este procedimiento, al igual que el de la tapa caliente, es evitar la condensación de la muestra, ya que en el eppendorf se encuentran dos fases: líquido y gas. Al condensarse la muestra, perdemos volumen de la mezcla. Sin embargo, calentando la tapa o poniendo las gotas de aceite evitamos este proceso físico, conservando casi intacto el volumen de la muestra.

2.2.2.2 Reactivos

- Agua bidestilada: actúa como base para todo el mix.
- *Buffer* o tampón: provee un ambiente químico óptimo para la actividad y estabilidad de la Taq polimerasa, además de los iones necesarios para su funcionamiento.
- *Primers* o cebadores: complementarios a las secuencias de los extremos 3' del ADN que se quiere amplificar. A partir de su secuencia y mediante una sencilla fórmula se calcula lo que se conoce en inglés como "melting temperature" (T_m), que nos permite estimar una temperatura para la fase de anillado.
- Taq polimerasa: ADN polimerasa termoestable aislada originalmente de la bacteria *Thermus aquaticus*. Puesto que resiste las altas temperaturas utilizadas en este proceso, es capaz de sintetizar nuevas cadenas de ADN a lo largo de todo el proceso sin sufrir desnaturalización.
- dNTPs: estos nucleótidos que contienen grupos trifosfato son utilizados como "materia prima" para la síntesis de ADN por la polimerasa.

2.2.2.3 Ciclo de temperaturas

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura denominados ciclos, cada uno de ellos suele consistir en tres pasos a diferentes temperaturas. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura ($> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de productos que hubiesen quedado sin completar, además de un descenso de temperatura para su almacenaje.

1. Desnaturalización: este paso consiste en calentar la reacción hasta alcanzar los 98°C durante aproximadamente 20 segundos, lo que provoca la separación de la doble cadena de ADN por la interrupción de los enlaces de las bases complementarias, dando lugar a ADN de cadena sencilla.

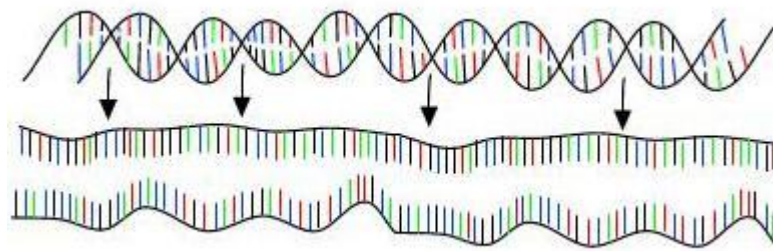


Figura 2.4: Representación gráfica de la desnaturalización del ADN

2. Anillado: la temperatura de la reacción se baja a 63°C durante unos 20 segundos permitiendo la unión de los primers a las regiones complementarias del ADN molde de cadena sencilla. Esta temperatura suele ser generalmente entre 3 y $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ más baja que la T_m de los primers utilizados. Sólo se produce dicha unión cuando la secuencia del primer es complementaria con el ADN molde.

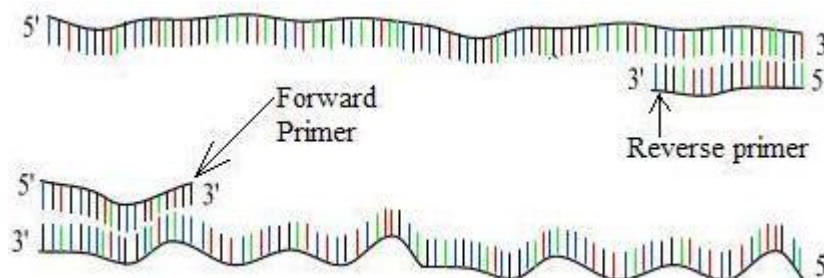


Figura 2.5: Esquema del anillado de los primers

3. **Elongación:** a continuación se sube la temperatura, que en este caso depende de la polimerasa utilizada, en nuestro caso la Taq polimerasa, tiene un óptimo de 72°C. En este paso el enzima se une a los puntos donde se anillaron los primers y comienza la síntesis de ADN a partir de la hebra molde mediante la adición de dNTPs en dirección 5' → 3'.

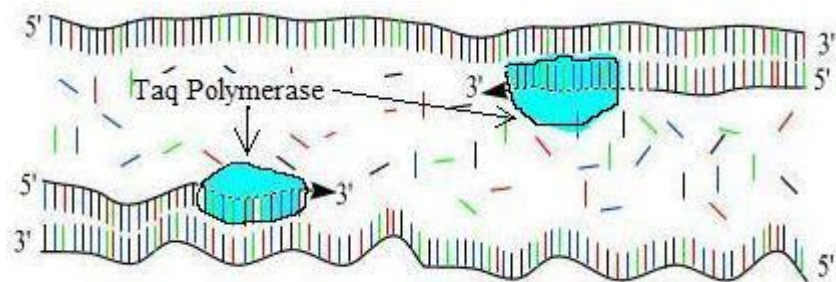


Figura 2.6: Representación esquemática de la elongación del ADN

Por lo general, las temperaturas y tiempos utilizados para cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen el enzima usado para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y de los dNTP en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores, así como la longitud del ADN que se desea amplificar.

2.2.3 Electroforesis

La **electroforesis** se trata de una técnica principalmente analítica con mucho poder de resolución, aunque también se puede realizar con fines preparativos, que consiste básicamente en un fenómeno de transporte de moléculas cargadas en suspensión.

Es un método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de ADN. Abarca aplicaciones tan diversas como la determinación de la secuencia de un fragmento de ADN, la separación incluso de cromosomas enteros o la creación de mapas de restricción.

2.2.3.1 Fundamentos

La mayoría de las moléculas biológicas tienen una carga eléctrica cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran y como consecuencia de ello, se desplazan cuando se ven sometidas a un campo eléctrico.

Cada molécula se desplaza por efecto del campo, alcanzando rápidamente una velocidad constante al equilibrarse la fuerza impulsora del campo eléctrico con la resistencia al avance correspondiente al rozamiento producido por el medio en el que se desplaza.

$$\begin{array}{lcl} \text{Fuerza del campo eléctrico} & = & \text{Fuerza de fricción} \\ q \times E & = & f \times v \\ q = \text{carga (C)} & & f = \text{coeficiente de fricción (C} \times \text{V / s)} \\ E = \text{intensidad del campo (V} \times \text{m)} & & v = \text{velocidad de la molécula (m / s)} \end{array}$$

El coeficiente de fricción mide la resistencia intrínseca debida a las características de cada molécula, como son la forma y el tamaño. Por ejemplo, las más grandes y asimétricas poseerán un coeficiente más alto que las pequeñas y compactas.

La velocidad por unidad de campo recibe el nombre de movilidad electroforética:

$$v / E = \mu = q / f = Ze / f$$

En unas condiciones determinadas de electroforesis, la diferente movilidad de cada molécula definirá su separación en el espacio, separándose progresivamente.

2.2.3.2 Medios de soporte

La muestra debe situarse en o sobre un medio de soporte para evitar perturbaciones durante la separación. En algunos, como puede ser el papel, la muestra queda sobre la superficie y avanza a lo largo de ella, con una fricción reducida, por lo que el mecanismo principal de separación es la magnitud de carga. Otros medios, también denominados geles, que están formados por polímeros que forman una matriz a través de la cual deben de avanzar las moléculas de la muestra que están embebidas en el medio de soporte. Como consecuencia el rozamiento es mayor, con lo que la forma y el tamaño adquieren una alta relevancia en la separación.

Fricción	Medios		Separación
Baja	Papel	Acetato de celulosa	Carga
Alta	Gel de almidón	Gel de poliacrilamida	Tamaño y forma
	Gel de agarosa	Gel de agarosa + poliacrilamida	

Tabla 2.1: Medios de soporte para electroforesis en función de la fricción

En cuanto a la disposición del soporte, existen generalmente dos tipos:

Horizontal: la más común de las dos disposiciones. En papel para moléculas pequeñas y acetato de celulosa para proteínas. En geles para proteínas, y sobre todo, ácidos nucleicos. Normalmente el tampón cubre el gel, para mantener el contacto eléctrico entre los polos y evitar que se seque por el calentamiento al paso de la corriente, denominándose “electroforesis submarina”.

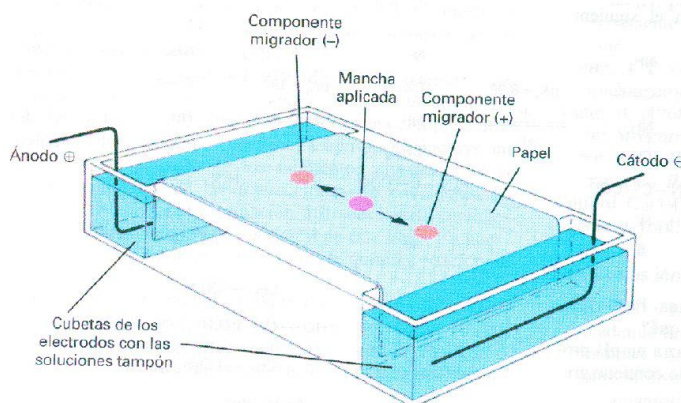


Figura 2.7: Electroforesis submarina

Vertical: casi exclusivamente con geles de poliacrilamida, puesto que presentan una mayor resistencia física, para proteínas y ácidos nucleicos de pequeño tamaño. Por lo general, el gel suele estar contenido entre dos placas rectangulares de tal forma que quede embebido en el tampón y se produzca contacto eléctrico entre el ánodo y el cátodo.

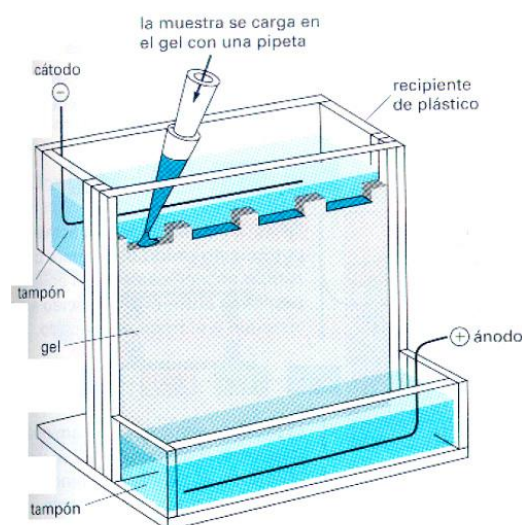


Figura 2.8: Electroforesis en gel de acrilamida

2.2.3.3 Visualización

Generalmente se emplean sustancias coloreadas o fluorescentes que se unen a las proteínas o a los ácidos nucleicos. En el primer caso, suelen ser colorantes inorgánicos que interactúan con las proteínas de forma poco selectiva, principalmente electrostática. En el segundo, se usa azul de metileno o, más frecuentemente, compuestos fluorescentes e intercalantes como el bromuro de etidio. Una vez que el compuesto entra en contacto con el ADN, el gel se expone a luz ultravioleta lo que hace que emita fluorescencia.

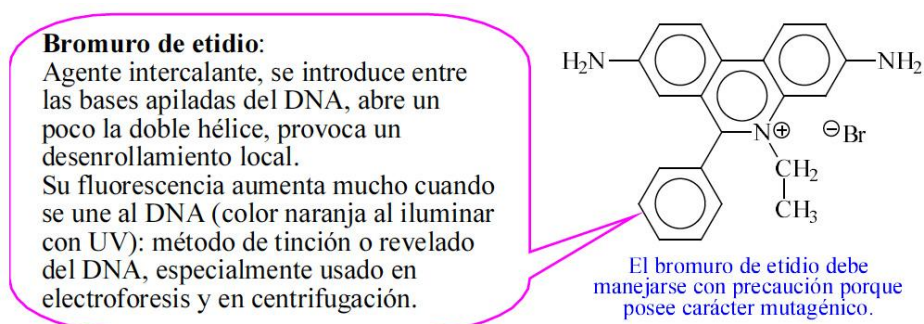


Figura 2.9. Estructura del Bromuro de Etidio

2.2.4 Enzimas de restricción

Los **enzimas de restricción** fueron descubiertos en 1970 por los microbiólogos Werner Arber, Daniel Nathans y Hamilton Smith, lo que les sirvió para ganar el premio Nobel ocho años más tarde. Estas moléculas son endonucleasas que pueden reconocer una secuencia característica de nucleótidos, de entre 4 y 12 pares de bases, dentro de una molécula de ADN y cortarla en ese punto en concreto, denominado sitio o diana de restricción.

Se piensa que estos enzimas, encontrados en bacterias y arqueas, han evolucionado como mecanismo de defensa frente a virus. Dentro de la bacteria los enzimas cortan selectivamente el ADN foráneo, puesto su ADN ha sido metilado por modificación de una metilasa para protegerlo de las mismas.

El mecanismo de corte de DNA se realiza a través de la ruptura de los enlaces fosfodiéster en la doble hebra, lo que da lugar a dos fragmentos de DNA. Éstos pueden ser romos, cuando los enlaces rotos coinciden, o cohesivos si se solapan. Estos últimos tienen tendencia a volver a unirse de modo espontáneo, ya que los extremos se pueden unir a otros extremos coincidentes que pueda haber en la cercanía.

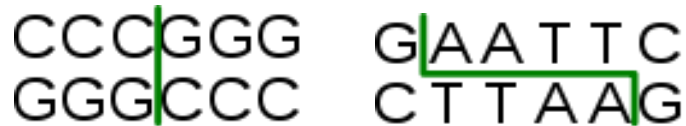


Figura 2.10: A la izquierda, corte producido por *SmaI*, dejando extremos romos, y a la derecha corte de *EcoRI*, dejando extremos cohesivos.

Uno de los campos en los que el uso de enzimas de restricción ha tenido mayor implicación ha sido el diagnóstico de enfermedades genéticas relacionadas con cambios en la secuencia del ADN. Si éstas se producen en un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, al producirse eliminarán o agregarán nuevos sitios de corte. Al aplicar esta enzima al gen de una persona sana y una enferma se deberían observar distintas cantidades de fragmentos para cada caso en una electroforesis.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras fueron proporcionadas por la piscifactoría de las Mestas, en la zona centro-occidente asturiano, perteneciente a la Sociedad de pescadores de las Mestas del Narcea y la piscifactoría de Infiesto, en el oriente, perteneciente al Principado de Asturias. Mientras que la piscifactoría de las Mestas, una de las más grandes de la región, se encarga principalmente de las repoblaciones en el Narcea y, en ocasiones, del Nalón, la de Infiesto se centra en el río Piloña y alrededores.

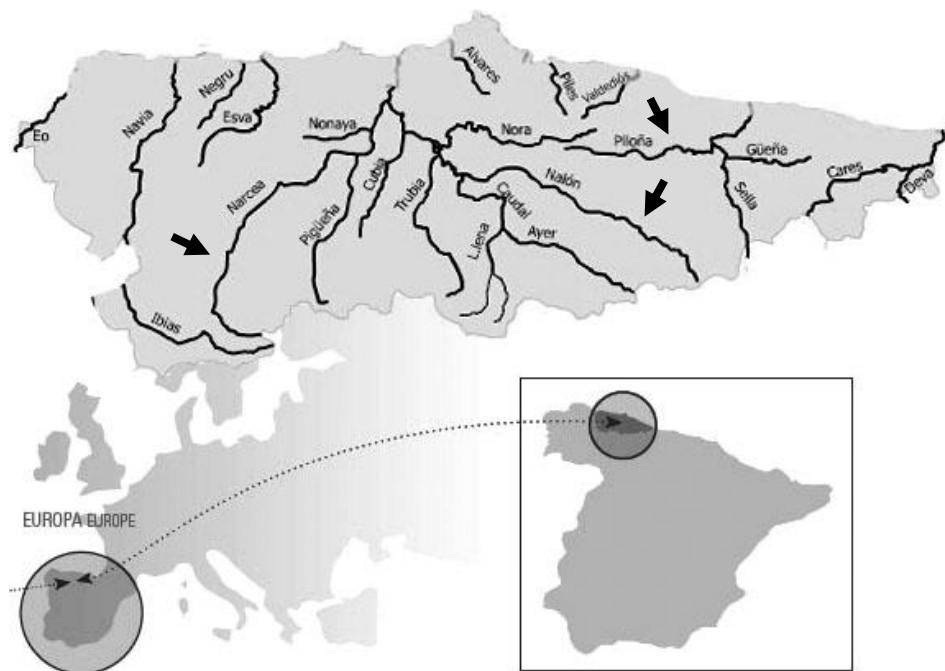


Figura 3.1: mapa de Asturias en el que se destacan con flechas los ríos en los que se las piscifactorías hacen las repoblaciones.

Éstas suelen llegar, dependiendo de si lo que se va a estudiar son los reproductores o los alevines, en forma de aleta adiposa o individuo completo respectivamente, en botes numerados que corresponden a las balsas de las que provienen. Previamente a todo el proceso, cada una de las muestras, ya sean aletas o alevines, ha de ser individualizada, numerada y preservada en alcohol, de tal forma que se pueda identificar cada uno de los resultados con la muestra de origen. Al estar conservadas en alcohol, las muestras deben estar a temperatura ambiente para evitar su degradación.

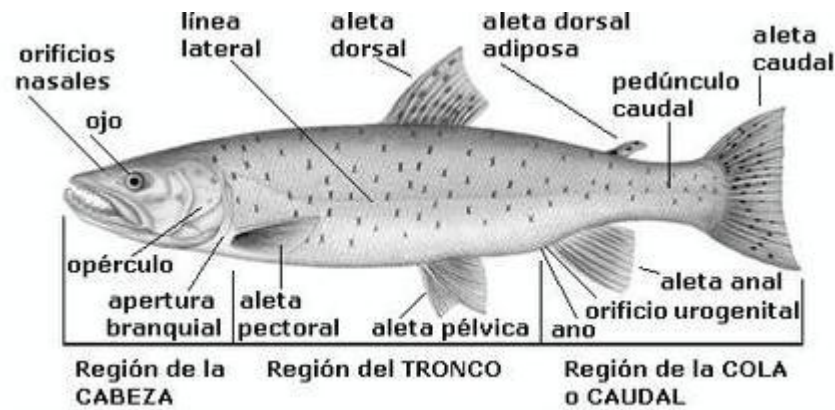


Figura 3.2: anatomía de la trucha en la que se observa la localización de la aleta adiposa utilizada para la extracción de ADN.

Posteriormente se corta un trozo de la muestra, de aproximadamente 1 mm^2 , que se introduce en un tubo Eppendorf, procurando que el tejido quede en el fondo del mismo. En el caso de que no se vayan a utilizar inmediatamente, se podrán almacenar en el congelador a -20°C hasta el momento de su utilización.

Piscifactoría	Tipo de muestra	Número
Las Mestas	Alevines	156
Infiesto	Reproductores	56
Infiesto	Alevines (v)	85
Infiesto	Alevines	56

Tabla 3.1: tipo y número de muestras aportadas por cada una de las piscifactorías para este trabajo.

3.2 EVALUACIÓN GENÉTICA

Como se ha mencionado anteriormente, la utilización de marcadores genéticos es una herramienta que permite diferenciar las truchas de origen centroeuropeo de las nativas. Para ello se utiliza el gen del enzima lactato deshidrogenasa, un locus altamente polimórfico en *Salmo trutta*, en el que la secuencia de nucleótidos del alelo *90 y el alelo *100 difieren en la posición 308, donde la adenina presente en el *100 es remplazada por una guanina en el *90. Tras la digestión de los productos de la PCR con el enzima BslI, un enzima específico que corta en el sitio en el que difieren, da lugar a un fragmento para el homocigoto 100/100, dos fragmentos para el homocigoto 90/90 y

tres fragmentos para el heterocigoto 90/100, que podrán ser analizados mediante electroforesis (McMeel et al., 2001).

3.2.1 Extracción del ADN

Para la extracción se ha recurrido a un método simple y rápido (Estoup et al, 1996), que combina la utilización de un polímero, denominado Chelex 100, y la proteinasa K. El Chelex 100 (BT Chelex 100 Resin 100g, Ref. 143-2832, BIORAD) es una resina que preferentemente captura iones metálicos divalentes en soluciones líquidas, siendo su principal efecto la prevención de la ruptura del ADN ocasionado por metales pesados que podrían dañarlo como consecuencia de su liberación de las células por el tratamiento a altas temperaturas. De igual forma, debido a su acción quelante, esta resina captura el Mg^{2+} necesario para que las nucleasas degraden el ADN. La proteinasa K, como el propio nombre indica, es un enzima que lleva a cabo la digestión de las proteínas con lo que se consigue la eliminación de la contaminación en preparaciones de ácidos nucleicos. Además, se suma a la acción del Chelex 100 frente a las nucleasas, puesto que tiene una gran capacidad de inactivación de las mismas, con lo que se evita la degradación del ADN.

Previamente al comienzo de la extracción se llevara a cabo la preparación de una disolución de Chelex 100 al 10% en agua destilada y con agitación a 55 °C , en las proporciones que se muestran a continuación:

Reactivo	Cantidad
Agua	80 ml
Chelex	10 gramos

Tabla 3.2: Reactivos para el Chelex al 10%

Para la proteinasa K se utiliza una concentración de 400 U/ml que se obtiene mediante la dilución del stock que está a 600 mAmson, que es lo mismo que 600 U/ml, utilizando la fórmula siguiente:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$600 \frac{U}{ml} \times V_i = 400 \frac{U}{ml} \times 1ml$$

$$V_i = \frac{400 \frac{U}{ml} \times 1ml}{600 \frac{U}{ml}} = 666\mu l$$

Después de llevar a cabo las preparaciones anteriores las muestras se incuban con 500 μ l de Chelex 100 10% y 7.5 μ l de proteinasa K durante hora y media en un horno (Mini Oven Mk II, HYBAID) a 55°C, agitándolo cada 15 minutos durante todo el proceso. Una vez transcurrido ese periodo las muestras se meten en un horno a 100°C con lo que se consigue la inactivación del enzima.



Figura 3.3: tubo Eppendorf conteniendo ADN tras la extracción con Chelex, en el que se aprecian las dos fases.

El resultado de todos estos pasos da lugar a un producto en el que se encuentran dos fases claramente diferenciadas: la de abajo, en la que se encuentra el Chelex 100 junto con restos celulares, y la de arriba, en la que se encuentra el ADN.

3.2.2 Amplificación del ADN

El siguiente paso consiste en realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que se utiliza para obtener un gran número de copias del fragmento de ADN de interés partiendo de concentraciones muy bajas.

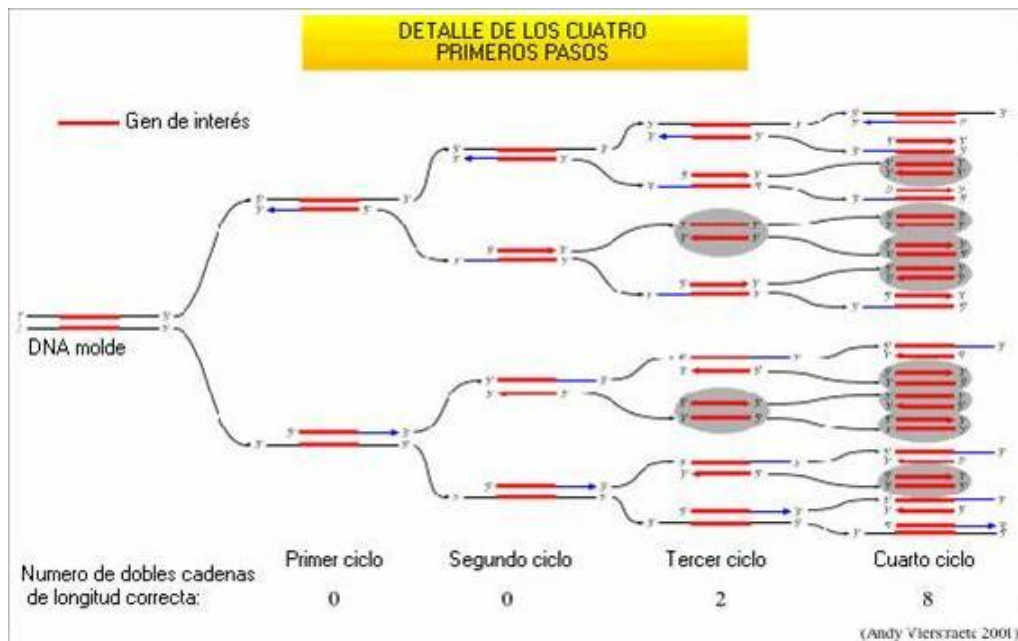


Figura 3.4: amplificación del ADN (PCR)

Este proceso se lleva a cabo en un termociclador (GeneAmp PCR System 2700, APPLIED BIOSYSTEMS), un aparato que permite programar cambios de temperatura, y que durante una serie de ciclos que se repiten un número determinado de veces, alrededor de unos 35, da lugar a billones de copias de la secuencia diana.

Antes de llevar a cabo la PCR, hay que preparar lo que se denomina el mix de PCR que contiene los siguientes reactivos para su realización:

- Agua bidestilada (Ampolla 5ml, LABORATORIOS SIERRA PAMIES)
- Buffer 3 (Ref. F-501L, FINNZYMES)
- Primers: para su utilización habrá que realizar una dilución del stock, pasando de 139 μM a la que se encuentra a 20 μM según la fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$139\text{mM} \times V_i = 20\text{mM} \times 100\mu\text{l}$$

$$V_i = \frac{20\text{mM} \times 100\mu\text{l}}{139\text{mM}} = 14.39\mu\text{l}$$

Primer	Secuencia
LDHX3A	GGCAGCCTCTTCCTCAAAACGCCCAA
LDHX3B	CAACCTGCTCTCTCCCTCCTGCTGACGAA

Tabla 3.3: secuencias de los primers utilizados

- ADN polimerasa (DyNAzyme II DNA Polymerase, Ref. F-501L, FINNZYMES): purificada a partir de un cepa de *Escherichia coli* que lleva un plásmido con el gen del enzima clonado de *Thermus brockianus*.
- dNTPs (Deoxynucleotides set 4 x 250 µl, Ref. 2201230, 5 PRIME): al igual que los primers es necesario hacer una dilución, pasando de 100 nM a 2,5mM por la misma fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$100mM \times V_i = 2.5mM \times 400\mu l$$

$$V_i = \frac{2.5mM \times 400\mu l}{100mM} = 10\mu l$$

Según el número de muestras que se vaya a analizar, la cantidad de los reactivos variará sobre la dada en la tabla inferior:

Reactivo	Cantidad
Agua	10,7 µl
Buffer	2 µl
Primer A	1,5 µl
Primer B	1,5 µl
Taq	0,3 µl
dNTPs	2 µl

Tabla 3.4: reactivos del PCR-mix.

Una vez preparado el mix se toman 2 µl con un micropipeta de la fase superior de los tubos Eppendorf donde se ha realizado la extracción de ADN, procurando no tocar la fase de Chelex 100 puesto que podría afectar negativamente a la reacción, y se deposita en el fondo de los pocillos de la placa de PCR. Una vez se han cargado todas

las muestras, se añaden 18 μl del mix en cada uno de ellos y se meten en el termociclador.

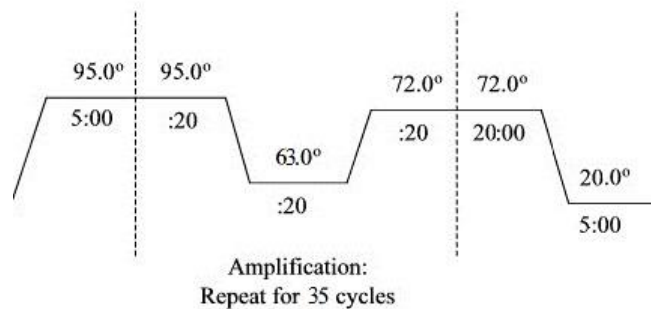


Figura 3.5. ciclo de temperaturas de PCR para la amplificación de LDH-C.

Tras finalizar el ciclo completo, que lleva un tiempo aproximado de dos horas, se realiza una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que la PCR se ha completado con éxito.

Como se explicó en el apartado anterior, la electroforesis es una técnica analítica utilizada para separar gran cantidad de moléculas basándose en distintos parámetros. En este caso se usa para separar el ADN en función de su tamaño, gracias a la aplicación de una corriente eléctrica. Como el ADN tiene carga negativa, y puesto que la densidad de cargas es proporcional a su tamaño, al aplicar la corriente estas se separarán únicamente por su tamaño. Así, las moléculas grandes tardarán más tiempo en atravesar la matriz del gel, mientras que las más pequeñas quedarán mas cerca del polo positivo.

El gel de agarosa tiene una densidad variable, que se elige dependiendo del tamaño de los fragmentos que se vayan a separar. Cuanto más denso sea peor separará los fragmentos grandes, puesto que les costará atravesar la matriz de agarosa, y viceversa. Para los productos de la PCR realizada en este estudio se utilizó un gel al 2% de agarosa:

- Tampón TBE 1x: solución constituida por Tris (108g), responsable del tamponamiento, Borato (55g), que se encarga de ajustar y mantener el pH deseado, y EDTA (9,3g), agente quelante que evita que las nucleasas degraden el ADN. Todo ello se mezcla con un litro de agua destilada (tampón 10x), que será diluido para dar lugar a la concentración requerida.

- Agarosa (Agarose D1 Medium EEO 1kg, Ref. 8023, CONDA): polisacrido soluble que forma una matriz inerte y que se utiliza para separar biomoléculas.
- Bromuro de Etidio (una pastilla en agua, agitar) : agente intercalante de ADN

Reactivo	Cantidad
TBE	100 ml
Agarosa	2 gramos
Bromuro	4 µl

Tabla 3.5: reactivos del gel de agarosa.

El gel se obtiene por suspensión de agarosa en polvo en un tampón acuoso, tras lo cual se hace hervir hasta que la agarosa se funde y se forma una solución transparente. A continuación se añade el bromuro de etidio y se vierte en un molde, dejándolo enfriar a temperatura ambiente.

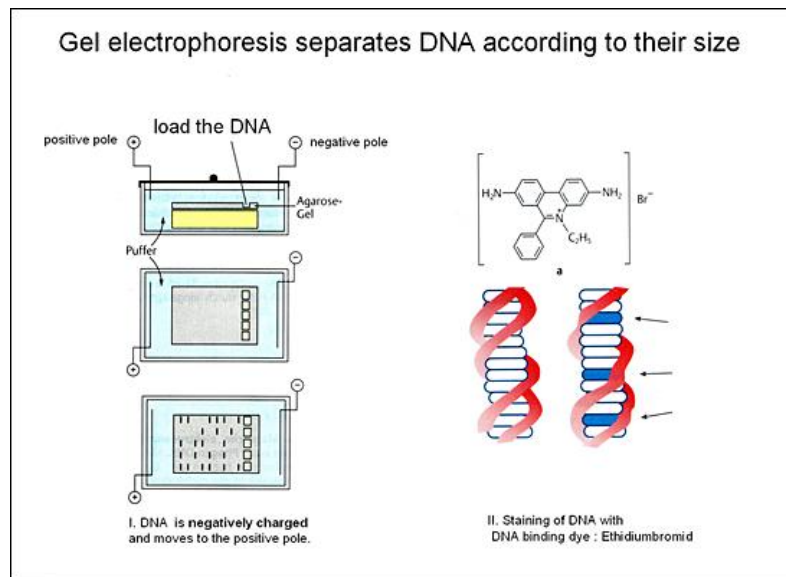


Figura 3.6: carga de muestras en el gel y estructura del bromuro de etidio.

Cuando ya se tiene preparado el gel, se ponen 2 µl de buffer de carga 6x (Sacarosa 40%, Azul de bromofenol 0,25 %), que añade densidad y color a la muestra, facilitando así su carga, en una placa, se mezcla con 7.5 µl de la muestra y se cargan los pocillos, a un voltaje de 120V que se selecciona en la fuente de alimentación (Power Pac 300, BIORAD).

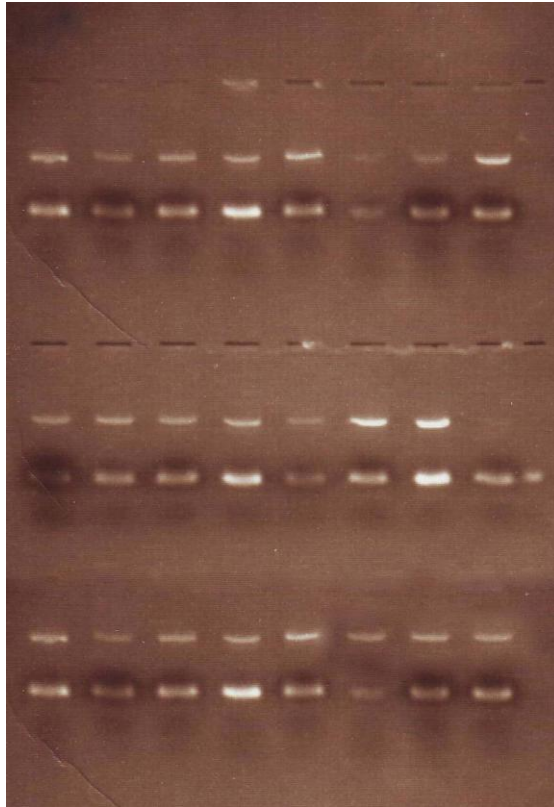


Figura 3.7. visualización de los resultados de una PCR en un gel de agarosa al 2%, tras su exposición a luz ultravioleta.

Transcurridos unos 30 minutos se procede a la visualización del gel en una cámara ultravioleta (Gene Flash, SYNGENE BIO IMAGING). El bromuro de etidio presente en el gel, como se puede ver en la figura 3.7, se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y que cuando se expone a luz ultravioleta emite fluorescencia, permitiendo, por tanto, visualizar los resultados en forma de bandas. Cuando se comprueba el éxito de la PCR sólo aparece una banda.

3.2.3 Digestión de ADN

El último paso en este protocolo, y una vez asegurado que la PCR ha salido correctamente, es la digestión del ADN mediante BslII (McMeel et al., 2001). Las enzimas de restricción son endonucleasas que cortan el ADN en secuencias específicas de nucleótidos, denominadas sitios de restricción. El mecanismo de corte se realiza a través incisiones, correspondientes a la ruptura de los enlaces fosfodiéster presentes en la hebra de ADN, lo que da lugar a dos o más fragmentos dependiendo del número de

dianas. En el caso de este enzima son extremos cohesivos, tal y como se muestra en la figura 3.8.



Figura 3.8: secuencia diana de BslI

La utilización de BslI permite diferenciar los dos alelos del gen. La digestión de los homocigotos 90/90 (CCACGGTCAG $\overline{\text{G}}$) genera dos fragmentos, uno de 360 pares de bases (pb) y el otro de 80 pares de bases. En cambio la digestión de los homocigotos 100/100 (CCACGGTCAG $\underline{\text{A}}$) da lugar a un fragmento sin cortar de 440 pb, mientras que la del heterocigoto 90/100 muestra las tres bandas.

Al igual que en la PCR se necesita preparar un mix para incubar con el ADN, del tal forma que se lleve a cabo la digestión, constituido por los siguientes reactivos:

- Agua bidestilada
- Bsl I (Ref. R0555L, NEW ENGLAND BIOLABS)
- Buffer 3 (Ref. R0555L, NEW ENGLAND BIOLABS)

Reactivo	Concentración
PCR	10 μl
Buffer	1,5 μl
Agua	3,2 μl
BslI	0,3 μl

Tabla 3.6: reactivos del BslI-mix.

Una vez obtenido el mix se añaden 5 μl a cada pocillo de la placa de PCR y se deja incubar durante tres horas a 55°C. Tras la incubación se procede a verificar los resultados con una electroforesis en gel de agarosa. El proceso es el mismo que el descrito anteriormente, salvo que en este caso también se utiliza un marcador de tamaño (BenchTop 100bp DNA Ladder, Ref. G8291, PROMEGA) que genera un patrón de bandas de tamaño conocido y permite diferenciar las bandas obtenidas. Debido a la densidad de la matriz del gel de agarosa utilizado, la banda más pequeña (80 pb) que

debería estar presente en el homocigoto 90/90 y en el heterocigoto 90/100 no aparece en las imágenes, aunque realmente no es necesaria para el análisis.

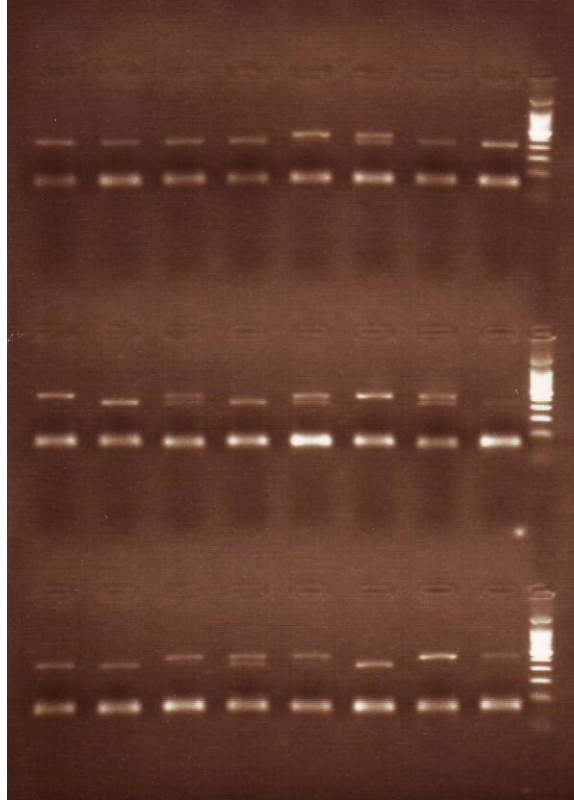


Figura 3.8. visualización de los resultados de la digestión del ADN mediante el enzima BslI en un gel de agarosa al 2%, tras su exposición a luz ultravioleta. Las bandas superiores corresponden al genotipo 100/100, las inferiores al 90/90 y las dobles al heterocigoto. Las columnas de la derecha son las producidas por el marcador de tamaños.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1.1 Las Mestas

La primera parte del estudio se centra en el análisis del stock procedente de la piscifactoría de las Mestas para las repoblaciones del 2012. La tabla inferior muestra que un número considerablemente elevado de los alevines analizados corresponde a los genotipos 90/90 y 90/100, superando en conjunto al 100/100:

Genotipo	Número
90/90	42
100/100	71
90/100	45
Total	158

Tabla 4.1: alevines las Mestas

Los resultados indican claramente que, a pesar de que la existencia de una ley que prohíbe la utilización trucha foránea para repoblación, hay un cierto porcentaje presente en el stock de la piscifactoría, que seguramente se deba al desconocimiento de las características genéticas de los reproductores utilizados. Esto no hace más que acentuar la necesidad de una buena gestión y conservación de los recursos, así como una evaluación continua de la estructura genética de las truchas de repoblación.

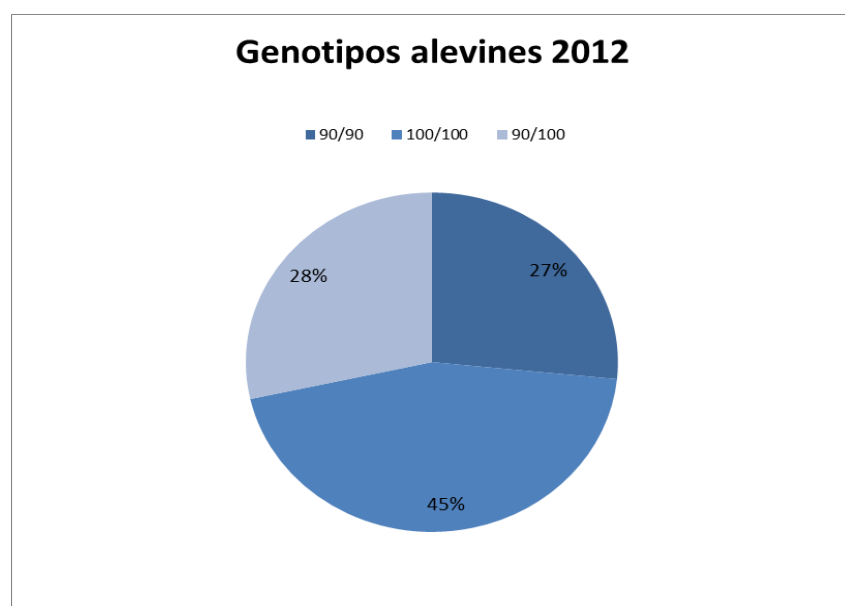


Figura 4.1: Porcentajes de genotipos en el stock de la piscifactoría de las Mestas 2012

4.1.1.1 Evolución de genotipos de las Mestas

Si se comparan estos datos con los últimos obtenidos en esta piscifactoría, que se remontan a 2004, se puede observar que en estos ocho años transcurridos desde entonces se ha producido un cambio favorable en cuanto al aumento de la frecuencia del alelo 100/100, genotipo de las truchas nativas. Esta situación iría asociada con la disminución del porcentaje del genotipo de origen centroeuropeo que disminuye prácticamente a la mitad, quedando el porcentaje de heterocigotos sin apenas variación.

Piscifactoría	Año	90/90	100/100	90/100
Las Mestas	2004	47,5	27,5	25
Las Mestas	2012	26,6	44,9	28,5

Tabla 4.2: comparación de porcentajes de las Mestas por años

Se puede decir que aunque todavía existe un buen porcentaje de truchas de origen centroeuropeo, se están haciendo esfuerzos por parte de la piscifactoría para reducir su presencia. Claramente se observa una tendencia a aumentar el genotipo nativo, en detrimento del genotipo foráneo, mientras que los genotipos 90/100 permanecen más o menos constantes.

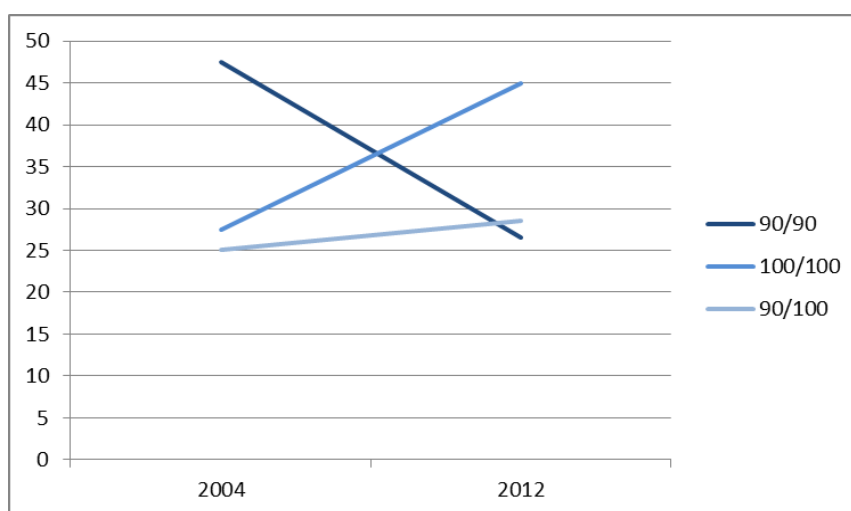


Figura 4.2: Evolución de los genotipos LDH-C de truchas en la piscifactoría de Las Mestas

4.1.2 Infiesto

La segunda parte se basa en los datos obtenidos de las muestras de la piscifactoría de Infiesto para las repoblaciones de 2012. En este caso se dispone de datos más interesantes puesto que se ha hecho un seguimiento en el tiempo: a principios de año se analizaron las aletas adiposas procedentes de los reproductores, y una vez pasada la época de puesta, se siguió con los alevines durante las primeras etapas de su vida (alevines vesiculados, y alevines después de la absorción de la vesícula: juveniles).

Genotipo	Número
90/90	3
100/100	27
90/100	23
Total	53

Tabla 4.3: reproductores Infiesto

En primer lugar se va a comprobar como varían los porcentajes de genotipos en las distintas fases. Se ha visto que el número de reproductores con el genotipo 90/90 de origen centroeuropeo es muy reducido, aunque sigue existiendo contra lo que debería esperarse tratándose de los stocks de repoblación gestionados por la Administración del Principado de Asturias, mientras que los alelos 90/100 y 100/100 tienen una representación similar.

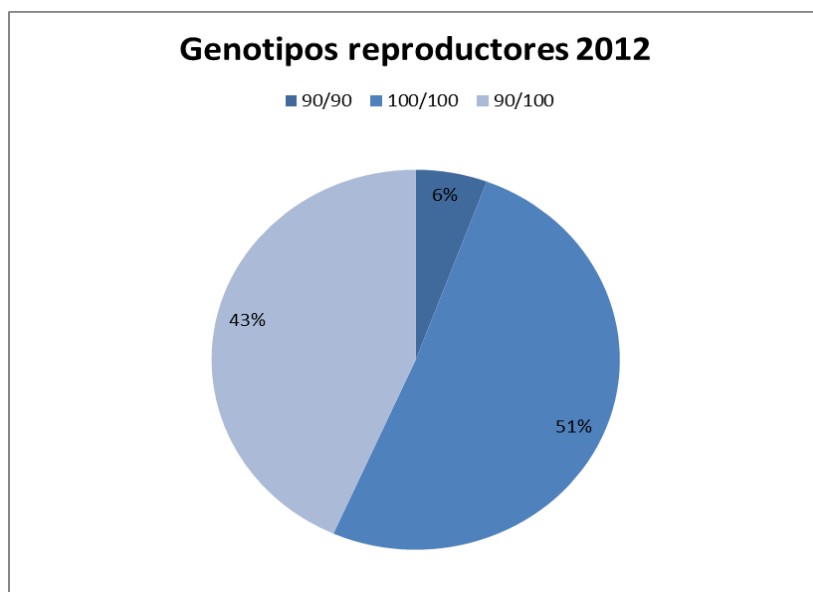


Figura 4.3: Porcentajes de genotipos de LDH-C de los reproductores de Infiesto 2012

En el caso de los alevines vesiculados, se observa que la frecuencia del genotipo 90/90 aumenta considerable, disminuyendo ligeramente la del 90/100, mientras que el número de individuos 100/100 es superior a de los otros dos genotipos.

Genotipo	Número
90/90	15
100/100	42
90/100	19
Total	76

Tabla 4.4: alevines con v. Infiesto

Que la distribución de genotipos haya variado de manera tan apreciable podría deberse a la propia forma de realizar el muestreo, produciéndose un sesgo de selección en el que se ve favorecido la aparición de individuos con el genotipo 90/90. Por lo tanto, los resultados de esta fase quedarían excluidos para consideraciones posteriores siempre y cuando los de la siguiente fase se adaptasen a los valores de los reproductores.

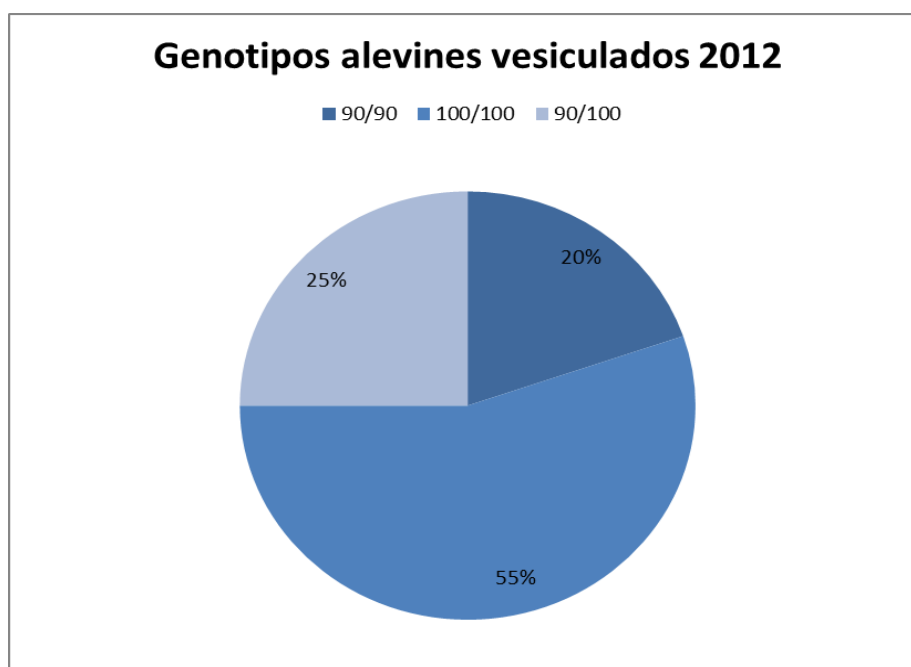


Figura 4.4: Porcentajes de genotipos de LDH-C de los alevines vesiculados de Infiesto 2012

En el caso de los alevines de mayor edad o juveniles, que ya han reabsorbido la vesícula, vuelven a presentar unas frecuencias similares a las de los reproductores, con un número de individuos con el genotipo 90/90 muy inferior al resto, y en el que los genotipos 90/100 y 100/100 presentan valores similares.

Genotipo	Número
90/90	6
100/100	25
90/100	24
Total	55

Tabla 4.5: alevines sin v. Infiesto

Dado la frecuencia de cada uno de los tres genotipos recupera la distribución que tenía en los reproductores, los resultados sugieren que la desviación de la distribución de los alevines con vesícula podría deberse a un muestreo sesgado, por ejemplo eligiendo los de un tamaño determinado o los de algunas balsas en las que predominaran los genotipos 90/90 con respecto al resto.

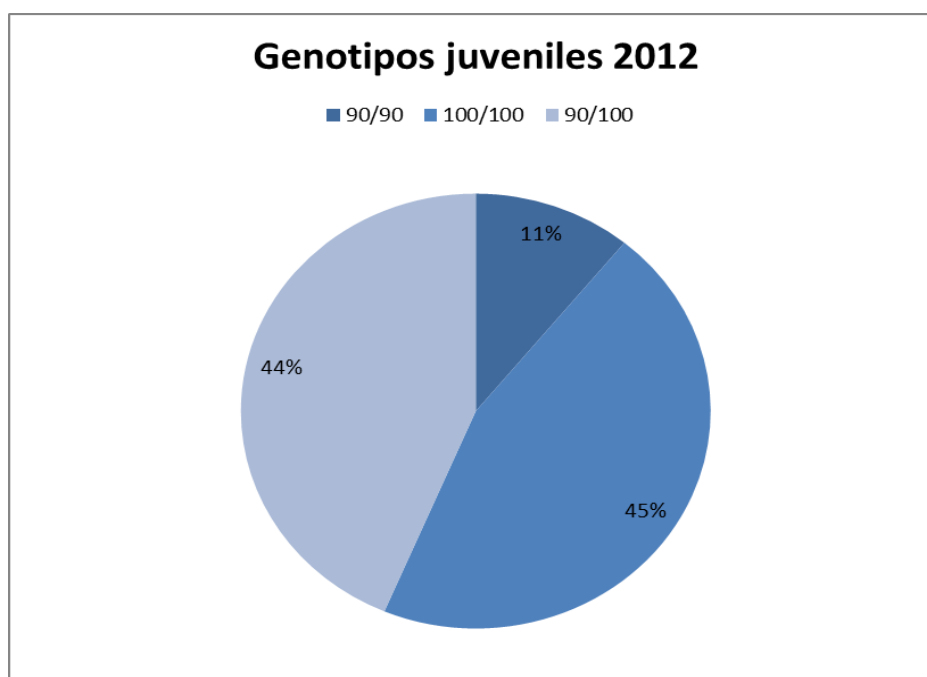


Figura 4.5: Porcentajes de genotipos de LDH-C de los juveniles de Infiesto 2012

4.1.2.1 Evolución de genotipos de Infiesto

A continuación, se analiza la evolución de los genotipos de LDH-C a lo largo de un periodo comprendido entre 1993 y 2012. Como se puede observar, existe tendencia en cuanto a la disminución de la proporción de individuos de origen centroeuropeo, así como otra para el aumento de los genotipos de origen nativo y heterocigotos.

Piscifactoría	Año	100/100	90/100	90/90
Infiesto	1993	5,10	2,55	92,35
Infiesto	1994	17,36	4,51	78,13
Infiesto	1995	83,33	0,00	16,67
Infiesto	1997	39,29	17,86	42,86
Infiesto	2005	27,03	45,95	27,03
Infiesto	2012	50,94	43,40	5,66

Tabla 4.6: Porcentajes de los genotipos LDH-C del stock de trucha de Infiesto

Al igual que en el caso de las Mestas, los resultados concordarían con un esfuerzo por parte de la piscifactoría de Infiesto de reducir el número de reproductores con el genotipo 90/90. A pesar de todo, y tras casi veinte años, no se ha conseguido eliminar su presencia. De la misma forma, se ve una clara tendencia de aumento de los heterocigotos, que resultaría de un cruzamiento entre ambos genotipos homocigotos o bien al hecho de que estuvieran de alguna forma seleccionados en condiciones de cultivo.

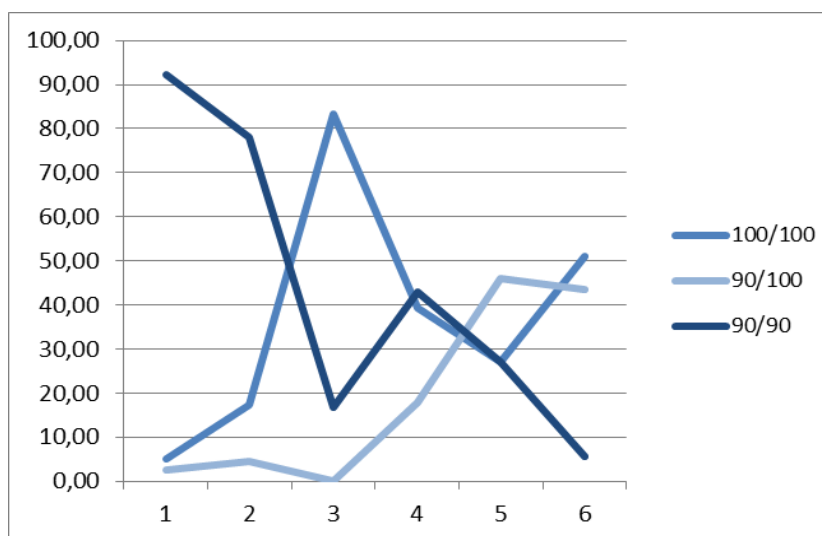


Figura 4.6: Evolución de los genotipos LDH-C del stock de trucha de Infiesto

4.1.2.2 Comparación de tamaños

Por último se realizó un seguimiento de los tamaños de los alevines para realizar una comparación en función de los distintos genotipos. Los resultados obtenidos muestran que el genotipo 90/90 presenta un tamaño algo mayor con respecto al resto de genotipos, aunque la desviación estándar fue elevada y no proporcionó diferencias significativas entre genotipos ($P=0.255$ en test t, no significativo).

Tamaño	Genotipo		
	90/90	100/100	90/100
22	1	0	1
23	0	0	0
24	0	1	1
25	0	3	4
26	0	4	1
27	0	1	2
28	0	1	0
29	0	0	0
30	0	0	1
31	0	3	1
32	0	1	1
33	1	0	2
34	1	2	4
35	2	2	1
36	0	2	0
37	1	4	1
38	0	1	1
39	0	0	2
40	0	0	1
Total	6	25	24

Tabla 4.7: Longitud de individuos de distintos genotipos (juveniles)

Genotipo	Media	D.E.
90/90	32,667	5,391
100/100	31,160	4,827
90/100	31,208	5,488

Tabla 4.8: Media y desviación Standard de tamaño en juveniles de Infiesto.

La diferencia de tamaño podría explicar el hecho de que a pesar de que se estén haciendo esfuerzos para repoblar con individuos de genotipo nativo sigan apareciendo genotipos de trucha foránea. A la hora de competir por los recursos, un tamaño mayor

influenciaría a los individuos con genotipo 90/90 de manera positiva, permitiéndoles persistir en el tiempo al existir una selección inadvertida a su favor. A pesar de todo, debido al escaso número de individuos con ese genotipo analizados, los resultados deberían tomarse con cuidado porque podrían no ser concluyentes.

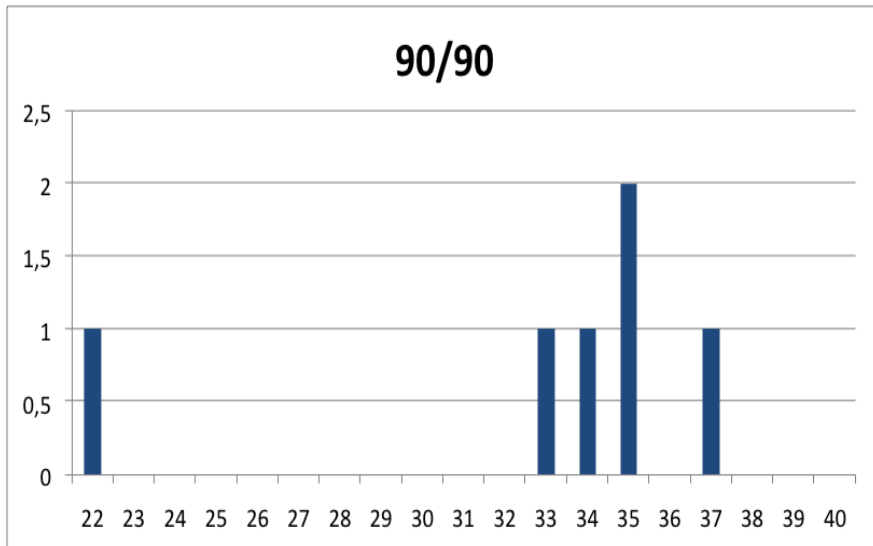


Figura 4.7: Distribución de tamaños en juveniles para el genotipo 90/90

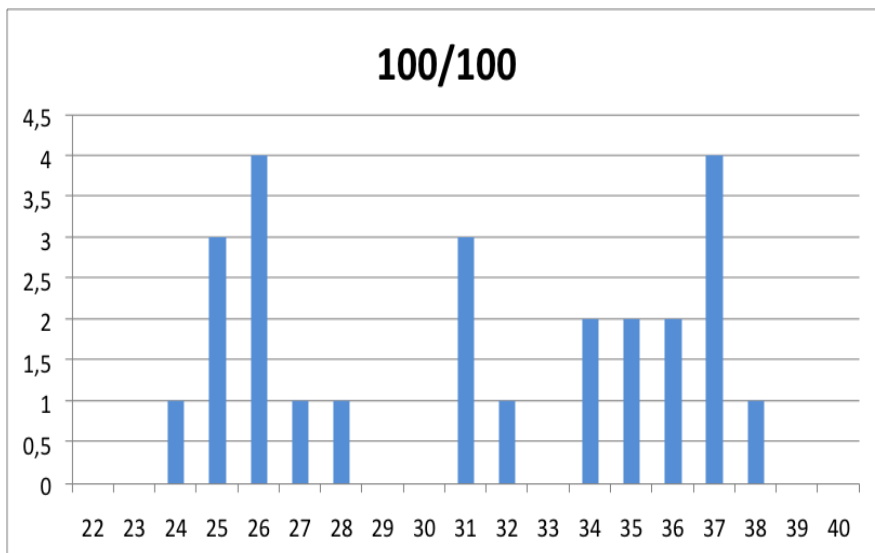


Figura 4.8: Distribución de tamaños de juveniles de trucha de genotipo 100/100

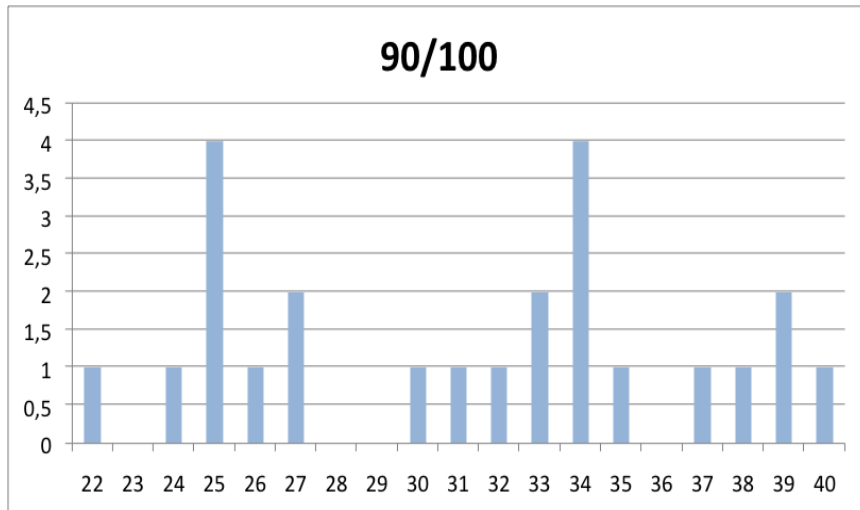


Figura 4.9: Distribución de tamaños de juveniles de trucha de genotipo 90/100

4.2 DISCUSIÓN

Como se ha mencionado al principio del proyecto, las repoblaciones constituyeron la principal medida de conservación de las poblaciones de las truchas en los ríos del Principado de Asturias. Para este fin se habían utilizado truchas de un linaje genético diferente al nativo, más adecuadas para su cultivo en piscifactorías, que como consecuencia han dado lugar a una introgresión genética foránea en las poblaciones naturales (Izquierdo et al., 2006).

De seguir así, la introducción de variantes no autóctonas podría afectar de manera negativa a los recursos genéticos de la especie, pudiendo llegar a producir la extinción de las poblaciones nativas. También podría eliminar la capacidad de adaptación al medio natural en el que viven debido a fenómenos de hibridación entre los dos linajes, así como la aparición de parásitos y enfermedades que no existían previamente en el medio (Ryman et al., 1995). La introgresión en la otra especie simpátrida, el salmón Atlántico (Castillo et al., 2008), es otro de los riesgos constatados que lleva consigo el continuar liberando este tipo de truchas domesticadas al medio natural.

A pesar de que desde hace cinco años se ha prohibido el uso de stocks foráneos de trucha con el fin de conservar los reservorios nativos de diversidad genética (Artículo 52.2, Ley 42/2007 del Patrimonio Natural y la Biodiversidad), los resultados obtenidos muestran que en las dos piscifactorías analizadas no se cumple la normativa en mayor o menor medida, ya que ambas poseen todavía una proporción importante de truchas de origen alóctono.

Sin embargo, cabe destacar que el estudio de la evolución en el tiempo de los genotipos muestra que ambas piscifactorías están haciendo un esfuerzo para reducir el número de individuos con el genotipo centroeuropeo. La existencia a día de hoy de individuos con dicho genotipo alóctono en ambas piscifactorías puede que se deba al desconocimiento de las características genéticas de los reproductores utilizados. No se puede excluir que exista un cierto grado de selección inadvertida a favor de los individuos con el genotipo foráneo, que parecerían crecer más rápido en la piscifactoría. Debido a su mayor tamaño competirían ventajosamente frente a los demás juveniles del mismo tanque y al final aumentaría su frecuencia entre los que se liberan al medio en el verano.

Un crecimiento más rápido de los genotipos foráneos sería esperable dada la historia evolutiva de la trucha. El alelo *90 surgió asociado a las glaciaciones, en poblaciones adaptadas a climas fríos (McMeel et al., 2001); es de esperar por tanto que la tasa metabólica de las truchas de ese origen se acelere en condiciones de temperatura del agua mucho más cálidas como son las asturianas, manifestando un crecimiento más rápido.

Por los motivos citados hasta ahora, los resultados de este trabajo permiten recomendar la monitorización periódica de los stocks utilizados para la repoblación, con el fin de mantener en el tiempo sus características genéticas y evitar la presencia los reproductores centroeuropeos. Sería conveniente analizar todos los adultos de las dos piscifactorías antes de su maduración sexual, apartar para consumo u otras finalidades los que no sean de genotipo 100/100, y dejar solamente estos últimos para reproducción en el stock repoblador.

5. CONCLUSIONES

- 1) El stock de truchas de repoblación de la piscifactoría de las Mestas presenta un porcentaje elevado de trucha foránea así como de heterocigotos.

- 2) En los últimos ocho años el porcentaje de truchas de origen centroeuropeo de las Mestas ha descendido, pero todavía no alcanza los niveles exigidos por la Ley.

- 3) Tanto los stocks de reproductores como los juveniles de la piscifactoría de Infiesto presentan distribuciones similares, con porcentajes bajos pero significativos del genotipo 90/90.

- 4) La evolución a lo largo de casi veinte años de este stock muestra una clara tendencia de aumento del genotipo 100/100 en detrimento del genotipo 90/90.

- 5) La comparación de tamaños de los juveniles sugiere la posibilidad de que los individuos con genotipo 90/90 puedan ser mayores, quizás debido a un crecimiento acelerado en las piscifactorías de esta latitud.

- 6) Se recomienda la revisión del status genético de las piscifactorías de trucha común del Principado de Asturias con el fin de reservar solamente los individuos autóctonos como reproductores en los stocks de repoblación.

6. BIBLIOGRAFÍA

ALONSO, C., GORTÁZAR, J., GARCÍA DE JALÓN, D. 2012. Trucha común – *Salmo trutta*. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Elvira, B. (Eds.).

ARIAS J., SANCHEZ L. Y MARTÍNEZ P. 1995. Low stocking incidence in brown trout populations from Northwestern Spain monitored by LDH-5* diagnostic marker. *J. Fish Biol.*, 47: 170-176.

BARCELÓ F. Técnicas instrumentales en bioquímica y biología. Universidad de las Islas Baleares. 2003. Brown t.a. 2006.

BROWN T.A. 2006. Gene Cloning and DNA analysis: An introduction. 5ta ed. Blackwell Publishing. Oxford, UK.

CASTILLO AGF, AYLLON F, MORAN P, IZQUIERDO JI, MARTINEZ JL, BEALL E, GARCIA-VAZQUEZ E. 2008. Interspecific hybridization and introgression are associated with stock transfers in salmonids. *Aquaculture* 278: 31-36.

DALE J. AND VON SCHANTZ. 2002. From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA technology. John Wiley & Sons Ltd. England.

DOADRIO, I. 2002. Atlas y libro rojo de los peces continentales de España. Segunda edición. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

ESTOUP A., LARGIADER C.R., PERROT E. & CHOURROUT D. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 295-298.

GARCÍA-MARÍN J.L., JORDE P.E., RYMAN N., UTTER F. Y PLA C. 1991. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture*, 95: 235-249.

HORREO & GARCÍA-VÁZQUEZ, 2011. Foreign brown trout in protected landscapes as a consequence of connectivity. *Fisheries Management and ecology*, 18: 431-436.

HORREO JL, MACHADO-SCHIAFFINO G, GRIFFITHS AM, BRIGHT D, STEVENS JR, GARCIA-VAZQUEZ E. 2011. Atlantic salmon at risk: apparent rapid declines in effective population size in southern European populations. *Transactions of the American Fisheries Society* 140: 605-610.

IZQUIERDO J.I., CASTILLO A.G.F., AYLLON F., DE LA HOZ J. & GARCIA-VAZQUEZ E. 2006. Stock transfers in Spanish brown trout populations: a long-term assessment. *Environmental Biology of Fishes* 75: 153–157.

LIU Z.J. Y J.F. CORDES. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.

MACCRIMMON H.R. 1968. World distribution of brown trout, *Salmo trutta*. *J. Fish. Res. Board*, 25: 2527-2548.

MCMEEL O.M., HOEY E.M. Y FERGUSON A. 2001. Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1*90 and *100 alleles. *Mol. Ecol.*, 10: 29-34.

MORÁN P., PENDÁS A.M., GARCÍA-VÁZQUEZ E. E IZQUIERDO J.I. 1991. Failure of stocking policy of hatchery reared brown trout, *S. trutta* L., in Asturias, Spain, detected using LDH- 5* as a genetic marker. *J. Fish Biol.*, 39: 117-122.

RYMAN N. 1991. Conservation genetic considerations in fishery management. *J. Fish Biol.* 39: 211-224.

RYMAN N., UTTER F. Y LAIKRE L. 1995. Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 5: 417-446.

7. APÉNDICES

Balsa	Alevín	Muestra	Genotipo
21	1	1	90/100
	2	2	90/90
	3	3	90/100
	4	4	90/100
	5	5	90/90
	6	6	90/100
	7	7	90/90
	8	8	90/90
	9	9	90/100
	10	10	90/100
	11	11	90/100
	12	12	90/90
	13	13	90/90
	14	14	90/100
	15	15	100/100
	16	16	90/100
	17	17	90/100
	18	18	90/100
	19	19	90/100
22	1	20	90/90
	2	21	100/100
	3	22	90/90
	4	23	100/100
	5	24	100/100
	6	25	90/90
	7	26	100/100
	8	27	90/100
	9	28	100/100
	10	29	90/90
23 y 24	1	30	90/100
	2	31	100/100
	3	32	100/100
	4	33	90/100
	5	34	100/100
	6	35	100/100
	7	36	100/100
	8	37	100/100
	9	38	90/100
	10	39	100/100
	11	40	100/100

Tabla 7.1: genotipos de los alevines de las mestas 1 a 40

Balsa	Alevín	Muestra	Genotipo
23 y 24	12	41	100/100
	13	42	100/100
	14	43	100/100
	15	44	100/100
	16	45	100/100
	17	46	90/100
	18	47	100/100
	19	48	100/100
	20	49	100/100
	21	50	100/100
	22	51	90/100
	23	52	100/100
	24	53	100/100
	25	54	100/100
	26	55	90/100
	27	56	100/100
	28	57	90/90
29	58	100/100	
26	1	59	90/100
	2	60	100/100
	3	61	100/100
	4	62	90/100
	5	63	100/100
	6	64	100/100
	7	65	
	8	66	100/100
	9	67	90/100
	10	68	100/100
	11	69	100/100
	12	70	100/100
	13	71	100/100
	14	72	100/100
	15	73	90/100
	16	74	100/100
33 y 34	1	75	100/100
	2	76	90/90
	3	77	90/90
	4	78	90/100
	5	79	100/100
	6	80	90/100

Tabla 7.2: genotipos de los alevines de las mestas 41 a 80

Balsa	Alevín	Muestra	Genotipo	
33 y 34	7	81	100/100	
	8	82	90/90	
	9	83	90/90	
	10	84	100/100	
	11	85	90/100	
	12	86	90/90	
	13	87	90/100	
	14	88	90/100	
	15	89	90/90	
	16	90	90/90	
	17	91	100/100	
	18	92	90/90	
	19	93	100/100	
	20	94	90/90	
	21	95	100/100	
	22	96	90/90	
	23	97	90/100	
	24	98	90/90	
	25	99	90/100	
	26	100	90/100	
	27	101	90/90	
	28	102	90/100	
	29	103	100/100	
	30	104	90/100	
	31	105	100/100	
	32	106	90/90	
	33	107	90/100	
	34	108	90/100	
	35	109	90/90	
	36	110	100/100	
	37 y 38	1	111	90/100
		2	112	90/90
		3	113	100/100
		4	114	100/100
		5	115	100/100
		6	116	100/100
7		117	100/100	
8		118	90/90	
9		119	90/90	
10		120	90/90	

Tabla 7.3: genotipos de los alevines de las mestas 81 a 120

Balsa	Alevín	Muestra	Genotipo
37 y 38	11	121	90/90
	12	122	90/90
	13	123	100/100
	14	124	90/100
	15	125	90/90
	16	126	90/90
	17	127	100/100
	18	128	90/90
	19	129	90/100
	20	130	90/90
	21	131	90/100
	22	132	100/100
	23	133	90/100
	24	134	90/90
	25	135	90/90
	26	136	90/90
	27	137	100/100
	28	138	90/100
	29	139	100/100
	30	140	90/90
	31	141	100/100
	32	142	100/100
	33	143	90/100
	34	144	90/100
	35	145	
	36	146	90/90
	37	147	90/100
	38	148	90/90
	39	149	100/100
	40	150	90/100
	41	151	100/100
	42	152	90/90
20	1	153	100/100
	2	154	100/100
	3	155	100/100
	4	156	100/100
	5	157	100/100
	6	158	100/100
	7	159	100/100
	8	160	100/100

Tabla 7.4: genotipos de los alevines de las mestas 121 a 160

Balsa	Género	Muestra	Genotipo
3,1	H	1	100/100
3,1	M	2	100/100
3,2	H	3	100/100
3,2	M	4	100/100
3,3	H	5	90/90
3,3	M	6	90/90
3,4	H	7	100/100
3,4	M	8	90/100
4,1	H	9	
4,1	M	10	100/100
4,2	H	11	100/100
4,2	M	12	100/100
4,3	H	13	100/100
4,3	M	14	100/100
4,4	H	15	100/100
4,4	M	16	90/90
5,1	H	17	90/100
5,1	M	18	90/100
5,2	H	19	90/100
5,2	M	20	90/100
5,3	H	21	90/100
5,3	M	22	100/100
6,2	H	23	90/100
6,2	M	24	90/100
6,3	H	25	90/100
6,3	M	26	100/100
7,3	H	27	90/100
7,3	M	28	90/100
7,4	H	29	90/100
7,4	M	30	90/100

Tabla 7.5: genotipos de los reproductores de Infiesto 1 a 30

Balsa	Género	Muestra	Genotipo
8,2	H	31	90/100
8,2	M	32	90/100
9,1	H	33	100/100
9,1	M	34	100/100
9,2	H	35	100/100
9,2	M	36	100/100
9,3	H	37	100/100
9,3	M	38	90/100
9,4	H	39	100/100
9,4	M	40	100/100
9,5	H	41	90/100
9,5	M	42	90/100
9,6	H	43	90/100
9,6	M	44	100/100
12,4	H	45	100/100
12,4	M	46	100/100
12,5	H	47	100/100
12,5	M	48	100/100
13,1	H	49	100/100
13,1	M	50	90/100
13,2	H	51	90/100
13,2	M	52	100/100
13,4	H	53	90/100
13,4	M	54	90/100

Tabla 7.6: genotipos de los reproductores de Infiesto 31 a 54

Balsa	Alevín	Muestra	Genotipo	Tamaño
3,1	1	1	100/100	25
	2	2	100/100	25
	3	3	100/100	24
	4	4	100/100	24
	5	5	100/100	23
	6	6	100/100	25
	7	7	100/100	23
	8	8	100/100	24
	9	9	100/100	23
	10	10	100/100	23
	11	11	100/100	23
3,2	1	12	100/100	22
	2	13	90/100	24
	3	14	90/100	23
3,3	1	15	90/90	25
	2	16		25
	3	17	90/90	25
	4	18	90/90	25
	5	19		25
	6	20	90/90	25
	7	21		26
	8	22	90/90	26
4,2	9	23		24
	1	24	100/100	25
	2	25	100/100	22
	3	26	100/100	25
	4	27		26
	5	28	100/100	23
	6	29	100/100	26
	7	30	100/100	26
	8	31	100/100	25
9	32	100/100	22	
5,1	1	33	100/100	26
	2	34	100/100	21
	3	35	90/100	24
	4	36	100/100	22
	5	37	100/100	21
	6	38	100/100	23
	7	39	90/90	21
	8	40	100/100	21

Tabla 7.7: genotipos de los alevines vesiculados de Infiesto 1 a 40

Balsa	Alevín	Muestra	Genotipo	Tamaño
5,1	9	41	100/100	22
	10	42	90/100	20
	11	43	100/100	21
	12	44	90/90	20
	13	45	90/100	20
	14	46	90/90	21
	15	47	100/100	21
6,1	1	48	100/100	21
	2	49	90/100	22
	3	50	90/100	23
	4	51	90/90	22
	5	52		22
	6	53	90/100	20
	7	54	100/100	21
	8	55	100/100	22
	9	56	100/100	20
7,1	1	57	90/90	19
	2	58	90/100	19
	3	59	100/100	19
	4	60	90/100	19
	5	61	90/100	19
	6	62	90/100	20
	7	63	90/100	18
	8	64	90/100	20
	9	65	100/100	18
	10	66	100/100	20
	11	67	100/100	20
8,1	1	68		20
	2	69	90/90	20
	3	70	90/100	19
	4	71	90/100	20
	5	72	90/90	21
	6	73	90/90	20
	7	74	90/90	20
	8	75	90/90	21
	9	76	90/100	22
	10	77		22
	11	78		20
	12	79	90/100	19
	13	80	90/100	20
9,1	1	81	100/100	19
	2	82	100/100	20
	3	83	100/100	21
	4	84	100/100	21
	5	85	100/100	20

Tabla 7.8: genotipos de los alevines vesiculados de Infiesto 41 a 85

Balsa	Alevín	Genotipo	Tamaño
P19(E)	1	90/100	25
	2	90/100	27
	3	90/100	25
	4	90/100	26
	5	100/100	25
	6	100/100	26
	7	90/100	25
	8	100/100	24
	9	90/100	25
	10	90/100	27
P20(N)	11	100/100	27
	12	90/100	22
	13	100/100	26
	14	90/90	22
	15	90/100	24
	16	100/100	25
	17	100/100	26
	18	100/100	26
	19	100/100	28
	20	100/100	25
1	21	90/90	33
2	22	90/90	35
3	23	90/100	34
4	24	90/90	34
5	25	100/100	31
6	26	90/100	33
7	27	90/100	35
8	28	100/100	37

Tabla 7.9: genotipos de los juveniles de Infiesto 1 a 28

Balsa	Alevín	Genotipo	Tamaño
9	29	90/90	35
10	30	90/100	33
11	31	100/100	37
12	32	100/100	31
13	33	90/100	30
14	34	90/100	31
15	35	100/100	32
16	36	100/100	35
17	37	100/100	36
18	38	90/100	34
19	39	100/100	34
20	40	100/100	36
21	41	90/100	34
22	42		35
23	43	100/100	31
24	44	100/100	37
25	45	90/100	32
26	46	100/100	35
27	47	90/100	34
28	48	100/100	37
29	49	100/100	34
30	50	90/100	37
31	51	100/100	38
32	52	90/100	39
33	53	90/100	40
34	54	90/90	37
35	55	90/100	38
36	56	90/100	39

Tabla 7.10: genotipos de los juveniles de Infiesto 29 a 56