

18 412

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



* 5 3 0 9 5 6 2 2 0 2 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA
VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES
ESPAÑOLAS DE TENCA**
(Tinca tinca)

M^a ANTONIA ELORRIETA JOVE

1993

Trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la
Universidad Complutense de Madrid realizado por
M^a Antonia Elorrieta Jove

Autora: M^a Antonia Elorrieta Jove



V^o B^o del Director de la Tesis: César Benito Jiménez



Madrid, Mayo 1.993

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. J. R. Lacadena, Director del Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, por las facilidades concedidas para la realización de este trabajo en el Departamento.

Quiero agradecer a César Benito Jiménez su dirección en este trabajo, sin la cual no se habría realizado.

De forma muy especial quiero agradecerle a Ana Margarita Figueiras Merino, que me brindó toda la ayuda y consejos necesarios en el desarrollo del trabajo, su infinita paciencia y confianza.

Igualmente agradezco a Juan Luis Santos Coloma su ayuda y valiosos consejos, así como el apoyo que me ha ofrecido durante todos estos años.

A Jose Manuel Franco Zorrilla le agradezco su firme colaboración y constante trabajo en esta investigación.

Debo mi agradecimiento a Guillermo Thode Mayoral, del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de Málaga, quien me ha introducido en el conocimiento de las técnicas citogenéticas de peces, así como me ha ofrecido sus consejos siempre que ha sido necesario.

Igualmente debo agradecer a Laura Sánchez y a todo el grupo de investigación del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de Lugo el haberme enseñado algunas técnicas citogenéticas de peces.

A Gonzalo Martínez le agradezco, aparte de la amistad incondicional que me ha brindado, sus valiosos consejos y comentarios sobre las técnicas electroforéticas de isoenzimas.

A D. José Manuel Campo, del Centro de Investigaciones Agropecuarias "Dehesón del Encinar" (Oropesa, Toledo) de la Comunidad de Castilla La Mancha, y a D. Eduardo Díez de la Lastra, por la ayuda aportada en la localización y obtención de las poblaciones

estudiadas, y al primero además por el aporte continuo y desinteresado de ejemplares para su estudio. A D. José Manuel Pérez de la piscifactoría "Vega del Guadiana" (Badajoz), D. Ángel Casanueva Madrazo de la "Laguna del Cristo" (Salamanca), a la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Navarra ("Embalse de Cintruénigo") y a los propietarios de las charcas de "La Generala" (Cáceres) y de Oropesa (Toledo), por la aportación de las poblaciones de tenca estudiadas en este trabajo.

Mi agradecimiento también a todos mis compañeros del Departamento de Genética por la ayuda y colaboración que en todo momento me han ofrecido, y en particular a Carlos Zaragoza, Javier Gallego y Juan Carlos del Pozo. En especial debo agradecerle a José Barrios la frecuente y valiosa ayuda prestada en este trabajo.

Por último, quiero agradecer de forma muy especial la ayuda y el apoyo recibido por parte de toda mi familia, quienes han colaborado, de una u otra forma, en la realización de este trabajo.

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. BIOLOGÍA DE LA TENCA..... | 2 |
| 2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y CULTIVO..... | 4 |
| 3. ICTIOGENÉTICA: PROBLEMÁTICA ACTUAL..... | 5 |
| 3.1. Conservación de la variabilidad genética..... | 7 |
| 3.2. Identificación y preservación de "stocks"..... | 9 |
| 4. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA..... | 11 |
| 4.1 Caracteres morfológicos..... | 11 |
| 4.2. Caracteres citogenéticos..... | 12 |
| 4.3. Caracteres bioquímicos..... | 13 |
| 4.4. Caracteres moleculares..... | 15 |
| a) Polimorfismos para fragmentos de restricción (RFLPs)..... | 15 |
| b) Reacción en cadena de la polimerasa..... | 16 |
| OBJETIVOS | 20 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 22 |
| I. MATERIAL..... | 23 |
| II. MÉTODOS..... | 28 |
| 1. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE CARACTERES CITOGENÉTICOS..... | 28 |
| 2. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE CARACTERES BIOQUÍMICOS..... | 29 |
| 2.1. Preparación de los extractos tisulares..... | 29 |
| 2.2. Electroforesis..... | 29 |
| 2.3. Sistemas enzimáticos..... | 30 |
| 3. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE CARACTERES MOLECULARES..... | 32 |
| 3.1. Aislamiento del ADN genómico..... | 32 |
| 3.2. Amplificación del ADN genómico..... | 32 |
| 3.2.1. Amplificación mediante oligonucleótidos de secuencia al azar..... | 33 |
| 3.2.2. Amplificación mediante parejas de oligonucleótidos de secuencias específicas (PCR)..... | 35 |
| 3.3. Electroforesis..... | 36 |
| 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. Estima de las frecuencias génicas y genotípicas. Ligamiento al sexo..... | 37 |
| 4.2. Estima de la variabilidad genética intrapoblacional: índice de polimorfismo y heterocigosidad génica media..... | 37 |
| 4.3. Estima de la variabilidad genética interpoblacional: Identidad y distancia genética..... | 38 |
| RESULTADOS | 40 |
| 1. ANÁLISIS DE CARACTERES CITOGENÉTICOS | 41 |
| 1.1. Cariotipo..... | 41 |
| 1.2. Patrón de bandeo C..... | 46 |
| 1.3. Regiones organizadoras nucleolares..... | 48 |
| 1.4. Tinción con cromomicina A3..... | 50 |
| 2. ANÁLISIS DE CARACTERES BIOQUÍMICOS | 52 |
| 2.1. INTERPRETACIÓN DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS | 52 |
| 2.1.1. Enzimas monoméricas..... | 52 |
| 2.1.1.1. Aconitasa (ACO), 3-hidroxi-butirato deshidrogenasa (HBDH) y fosfoglucomutasa (PGM)..... | 52 |
| 2.1.1.2. Esterasas (EST)..... | 55 |
| 2.1.1.3. Peroxidasas (PER)..... | 60 |
| 2.1.2. Enzimas diméricas..... | 61 |
| 2.1.2.1. Aspartato amino transferasa (AAT)..... | 61 |
| 2.1.2.2. Fosfatasas ácidas..... | 62 |
| 2.1.2.3. Alcohol deshidrogenasa..... | 64 |
| 2.1.2.4. Isocitrato deshidrogenasa..... | 65 |
| 2.1.2.5. α -Glicerofosfato deshidrogenasa (α -GPDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGD)..... | 67 |
| 2.1.2.6. Superóxido dismutasa (SOD)..... | 68 |
| 2.1.2.7. Fosfoglucosa isomerasa (PGI)..... | 69 |
| 2.1.2.8. Málico deshidrogenasa (MDH)..... | 71 |
| 2.1.3. Enzimas tetraméricas..... | 73 |
| 2.1.3.1. Láctico deshidrogenasa..... | 73 |
| 2.1.3.2. Enzima málica..... | 75 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ISOENZIMÁTICA | |
| INTRA E INTERPOBLACIONAL..... | 77 |
| 2.2.1. Distribución de frecuencias genotípicas y génicas..... | 77 |
| 2.2.2. Análisis de ligamiento al sexo..... | 80 |
| 2.2.3. Estima de la variabilidad genética intrapoblacional..... | 80 |
| 2.2.3.1. Índice de loci polimórficos..... | 81 |
| 2.2.3.2. Heterocigosidad génica media..... | 82 |
| 2.2.4. Estima de la variabilidad genética interpoblacional: | |
| Distancias genéticas. Dendrogramas..... | 83 |
| 3. ANÁLISIS DE CARACTERES MOLECULARES..... | 86 |
| 3.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO..... | 86 |
| 3.2. PATRONES ELECTROFORÉTICOS..... | 86 |
| 3.2.1. Productos de amplificación por RAPDs..... | 86 |
| 3.2.2. Productos de amplificación por PCR..... | 88 |
| 3.3. ESTIMA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA MOLECULAR | |
| INTRA E INTERPOBLACIONAL..... | 88 |
| 3.3.1. Frecuencia de la ausencia de las bandas..... | 88 |
| 3.3.2. Análisis de ligamiento al sexo..... | 90 |
| 3.3.2. Cuantificación de la variabilidad genética intrapoblacional: | |
| índice de polimorfismo..... | 91 |
| 3.3.3. Estima de la variabilidad genética interpoblacional: | |
| Distancia genética y árboles filogenéticos..... | 92 |
| 4. ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS CARACTERES | |
| BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES..... | 94 |
| DISCUSIÓN..... | 96 |
| 1. CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA..... | 97 |
| 1.1. Cariotipo..... | 97 |
| 1.2. Bando C. Tinción Argéntica. Tinción con cromomicina A3..... | 98 |
| 1.3. Regiones organizadoras nucleolares..... | 100 |
| 1.4. Cromosomas sexuales..... | 102 |
| 2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA..... | 103 |
| 3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR..... | 106 |

| | |
|---|-----|
| 4. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA..... | 108 |
| 4.1. Variabilidad genética intrapoblacional: índice de polimorfismo, Heterocigosidad génica media..... | 108 |
| 4.2. Identificación de poblaciones..... | 112 |
| 4.3. Variabilidad genética interpoblacional: Distancias genéticas. Dendrogramas..... | 113 |
| RESUMEN | 116 |
| CONCLUSIONES | 119 |
| BIBLIOGRAFÍA | 122 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|------------------------|----|
| Figura 1 | 2 |
| Figura 2 | 3 |
| Figura 3 | 18 |
| Figura 4 | 23 |
| Figura 5 | 24 |
| Figura 6 | 25 |
| Figura 7 | 34 |
| Figura 8 | 36 |
| Figura 9 | 41 |
| Figura 10 | 42 |
| Figura 11 | 47 |
| Figura 12 | 49 |
| Figura 13 | 51 |
| Figura 14 | 53 |
| Figura 15 | 55 |
| Figura 16 | 56 |
| Figura 17 | 60 |
| Figura 18 | 61 |
| Figura 19 | 63 |
| Figura 20 | 64 |
| Figura 21 | 66 |
| Figura 22 | 67 |
| Figura 23 | 69 |
| Figura 24 | 70 |
| Figura 25 | 72 |
| Figura 26 | 74 |
| Figura 27 | 75 |
| Figura 28 | 85 |
| Figura 29 | 87 |
| Figura 30 | 87 |
| Figura 31 | 89 |
| Figura 32 | 89 |
| Figura 33 | 93 |
| Figura 34 | 95 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|-----------------------|----|
| Tabla 1 | 26 |
| Tabla 2 | 31 |
| Tabla 3 | 33 |
| Tabla 4 | 34 |
| Tabla 5 | 35 |
| Tabla 6 | 44 |
| Tabla 7 | 45 |
| Tabla 8 | 46 |
| Tabla 9 | 49 |
| Tabla 10 | 76 |
| Tabla 11 | 79 |
| Tabla 12 | 80 |
| Tabla 13 | 81 |
| Tabla 14 | 82 |
| Tabla 15 | 84 |
| Tabla 16 | 85 |
| Tabla 17 | 88 |
| Tabla 18 | 92 |

INTRODUCCIÓN

1. BIOLOGÍA DE LA TENCA

La tenca (*Tinca tinca*) es una especie piscícola de agua dulce que pertenece a la familia de los ciprínidos. Se caracteriza por poseer un cuerpo corto y grueso, algo comprimido, con el dorso de color verdoso y el resto del cuerpo de color amarillo con destellos dorados. La boca está provista de labios gruesos, con una barbilla a cada lado del repliegue dérmico que cubre el maxilar. El cuerpo está cubierto de escamas muy pequeñas. La línea lateral está constituida por más de un centenar de estas escamas. Las aletas son grandes, de color asalmonado y con los ángulos redondeados (Fig. 1).



Figura 1: Vista lateral de la tenca

Los machos son fácilmente diferenciables de las hembras cuando se observan las aletas pelvianas, ya que en los primeros éstas son más grandes y presentan el radio sencillo

ostensiblemente más grueso que los ramificados, mientras que en las hembras todos los radios son igualmente delgados (Lozano, 1990) (Fig. 2).



Figura 2: Aletas ventrales con dimorfismo sexual.

La tenca es un animal euritermo, que habita en aguas templadas y profundas como charcas, embalses y lagunas, apareciendo también en los remansos que se forman en el curso lento de los ríos, aunque su presencia en estos últimos es más escasa (Muus y Dahlström, 1981). Son capaces de vivir en aguas con temperaturas de más de 35 °C y se adaptan muy bien a aguas con baja cantidad de oxígeno y valores de pH que oscilan entre 6,5 y 8 (Lucowicz y Proske, 1979).

Esta especie se alimenta activamente en verano, mientras que el invierno lo pasa en estado pasivo, semienterrada en los fondos cenagosos de charcas y lagunas.

El crecimiento de los alevines es lento: el primer año su peso está comprendido entre 5 y 10 g; el segundo entre 50 y 100 g y el tercero entre 250 y 300 g, alcanzando la madurez sexual a partir del tercer verano. Las hembras ponen entre 150.000-200.000 huevos/Kg de animal, en una puesta fraccionada que suele ser fecundada por más de un macho. Esta especie requiere elevadas temperaturas para su reproducción (20 °C mínimo), por lo que la época de la freza tiene lugar en España a partir de Mayo o Junio (Huet, 1983).

2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y CULTIVO

Según indican Lucowicz y Proske (1979), la tenca está ampliamente distribuida por Europa y Siberia Occidental. Además, ha sido introducida en Africa, Australia, Sureste de Asia y Norteamérica, donde parece estar adaptándose bien a las nuevas condiciones ambientales.

Esta especie es frecuente en lagos y charcas del centro y sur de España, encontrándose en diversas localidades de las Comunidades de Extremadura, Castilla-La Mancha, Castilla-León, Aragón, Navarra e incluso, Cataluña.

El interés económico de la tenca como especie de consumo humano ha aumentado progresivamente en las últimas décadas, si bien su cultivo intensivo sólo se realiza en determinados países centroeuropeos. En nuestro país, esta especie está cobrando gran importancia en las Comunidades antes mencionadas. Por otra parte, el cultivo extensivo de tenca, practicado tradicionalmente en charcas y lagunas, se ha incrementado con otro tipo de cultivos más racionales e intensivos en los que hay un control de la alimentación, reproducción, etc. (Campo et al., 1991).

3. ICTIOGENÉTICA: PROBLEMÁTICA ACTUAL

El abusivo aprovechamiento de los recursos naturales pesqueros, la contaminación, las alteraciones de los sistemas fluviales, etc.; están dando lugar a que muchas especies desaparezcan o presenten una drástica reducción de su diversidad genética.

Este abusivo aprovechamiento de los recursos pesqueros naturales, junto con el gran crecimiento de la población mundial y la escasez de alimentos baratos y ricos en proteínas, ha sido la causa de un gran desarrollo de la acuicultura en las últimas décadas (Claver, 1983).

Hasta ahora, los esfuerzos de mejora en acuicultura se han centrado en aspectos físicos de los cultivos, tales como la construcción de tanques, alimentación, temperatura y salinidad óptimas, disponibilidad de oxígeno, corrientes de agua, etc. Sin embargo, en la actualidad, la atención se centra en aspectos biológicos fundamentales que permitan una posterior mejora del cultivo, basada en aspectos genéticos del mismo. El conocer las bases cromosómicas de la determinación sexual, la variabilidad bioquímica, etc., puede contribuir a determinar las posibilidades de mejora de los cultivos (Wilkins, 1981; Pérez, 1987).

La F.A.O. (1984) elaboró un informe en el cual señaló la necesidad de conservar los recursos genéticos de los peces, especialmente en lo relativo a la "sobreexplotación de las poblaciones naturales, a los efectos de las alteraciones a gran escala de los sistemas fluviales y a la domesticación de las especies a través de la acuicultura".

Estos recursos genéticos, cuya base es la variabilidad genética, se generan en primera instancia por mutación y, posteriormente, son transformados por distintos fenómenos tales como la selección natural, migración, deriva genética, endogamia, etc.

La aplicación de la Genética a la producción de organismos acuáticos cultivables puede originar un progreso similar al obtenido en mamíferos y aves domésticos. Dado que los organismos acuáticos están todavía sin domesticar y que se sabe relativamente poco sobre su constitución genética básica, se espera que los estudios genéticos que se realicen

den óptimos rendimientos cuando los resultados obtenidos se apliquen a la mejora de peces (Pérez, l.c.). Dentro de este enfoque, un primer paso sería la determinación del nivel de variabilidad genética presente en las poblaciones naturales (Wilkins, 1981).

La adaptación de las poblaciones naturales al medio ambiente en que viven se deriva de una combinación de muchos caracteres heredables, que se ha desarrollado durante mucho tiempo a través de un conjunto complejo de procesos selectivos naturales. La variabilidad genética que existe entre y dentro de las poblaciones constituye la fuente genética que capacita a las especies a sobrevivir y adaptarse a los cambios ambientales (Phillip et al., 1986). La importancia de la variabilidad genética se detecta en muchas situaciones como, por ejemplo, es el hecho de que poblaciones con un alto grado de variabilidad genética tengan mayor capacidad de respuesta a las variaciones ambientales tales como cambios térmicos, osmóticos, o bien agentes patógenos (Allendorf y Leary, 1986). Ciertos trabajos muestran la especificidad adaptativa de las poblaciones piscícolas (Raleigh, 1971; Raleigh y Chapman, 1971; Ihssen y Tait, 1974). En ellos se llega a la conclusión de que, en los programas de producción que buscan la mayor productividad de las piscifactorías, se debe tener en cuenta la procedencia de la población y las características del agua de donde se va a tomar dicha población (Phillip et al., 1986).

Además, la introducción en aguas naturales de razas genéticas de peces no adaptados a ese ambiente, podría ser una amenaza genética irreversible para las poblaciones naturales propias de dichas aguas (Phillip et al., l.c.).

Por lo tanto, para conseguir una mejor producción piscícola y defender el patrimonio natural, hay dos problemas básicos: uno de ellos es conservar la variabilidad genética existente en las poblaciones naturales y el otro, conocer la estructura de las diferentes poblaciones para así determinar los "stocks" que interesa explotar y preservar, definiendo "stock" como "grupo intraespecífico de individuos que se aparean al azar, con integridad espacial y temporal" (Ihssen et al., 1981).

3.1 Conservación de la variabilidad genética

La conservación de las poblaciones piscícolas, tanto de las amenazadas por el peligro de extinción como de las que no lo están, debería ser compatible con los siguientes objetivos de preservación (Soulé, 1980):

- 1.-Mantener la población viable a corto plazo (es decir, evitar su extinción).
- 2.-Conservar la capacidad de los peces para adaptarse a los posibles cambios ambientales y en consecuencia poder evolucionar.

Evitar la extinción es, lógicamente, el objetivo primario, pero esto no es suficiente. Los programas de conservación deben buscar el mantenimiento de la capacidad de los peces para adaptarse a los cambios ambientales (últimamente más frecuentes debido a la acción humana). El problema central de la conservación genética es que la pérdida de la variación genética puede llevar aparejada una disminución de la flexibilidad evolutiva (Meffe, 1986).

El cultivo de peces puede jugar un papel importante en la conservación y rehabilitación de las poblaciones piscícolas en explotación o en peligro de extinción (Gile y Ferguson, 1990). Para una correcta conservación de estas poblaciones, los programas establecidos para conseguirlo deben tener como objetivo prioritario la preservación de la variación genética (Frankel y Soulé, 1981; Meffe, 1986; Allendorf y Ryman, 1987; Nelson y Soulé, 1987), sin olvidar que cuando se habla de la protección de las características genéticas asociadas, se hace referencia a los genes específicos, a las combinaciones génicas y a los conjuntos de poblaciones genéticamente diferenciadas (Altukhov, 1981; Frankel, 1983).

Por otro lado, el cultivo de peces puede ser una amenaza para la preservación de esta variación genética si no se realiza un control adecuado de los mismos. De hecho, una crítica que actualmente se hace a la gestión que realizan los piscicultores es la pérdida del sustrato necesario para la innovación de cultivos de peces y de programas de determinación o constitución de "stocks" (Phillip et al., 1986).

Tanto la F.A.O. (1984) como numerosos autores (Meffe, 1986; Davidson et al., 1989) señalan que la pérdida de variación genética por cualquier causa (selección prolongada, endogamia, etc.) daría lugar a la pérdida de la capacidad de adaptación de la población, así como de su riqueza potencial para obtener una mejor explotación de sus recursos a través de la selección artificial.

La variación genética estimada por heterocigosidad para genes enzimáticos se ha correlacionado en algunos trabajos con ciertos componentes de la eficacia biológica (Mitton y Grant, 1984; Allendorf y Leary, 1986; Zouros y Foltz, 1987). La baja heterocigosidad enzimática ha sido asociada a efectos deletéreos en piscifactorías (Leary et al., 1985). Además, ciertos estudios de consanguinidad en peces parecen indicar que la pérdida de variabilidad genética puede estar asociada a una disminución de la supervivencia, del crecimiento, de la eficacia en la conversión del alimento y a un aumento en las desviaciones morfológicas (Kincaid, 1983; Leary et al., 1985).

Recientemente, algunos autores han señalado el efecto de la reducción de la variabilidad genética en poblaciones criadas de mamíferos (Ralls y Ballou, 1983; O'Brien et al. 1985) y peces (Allendorf y Phelps, 1980; Ryman y Stahl, 1980; Cross y King, 1983; Leary et al., 1985). Uno de los factores más importantes que influyen en la cantidad de variabilidad genética y en la estabilidad de las frecuencias genotípicas en las poblaciones cultivadas es el tamaño efectivo de la población. Poblaciones con tamaños efectivos pequeños presentan, normalmente, una elevada tasa de consanguinidad. Esta tasa iría asociada a una mayor manifestación de los efectos de los genes deletéreos (Gile y Ferguson, 1990).

El mantener un tamaño efectivo adecuado es uno de los principales problemas genéticos con los que se encuentra la acuicultura ya que, normalmente, dada la elevada capacidad reproductiva de los peces, se utiliza un bajo número de reproductores (Gile y Ferguson, l.c.).

Todo lo mencionado anteriormente apoya a Winans (1989), quien señala que es importante saber la cantidad de variación genética presente en las poblaciones piscícolas para poder diseñar un apropiado programa de conservación y producción piscícola.

3.2 Identificación y preservación de "stocks"

Durante la última década se han realizado un gran número de trabajos con marcadores genéticos para poder estimar a partir de ellos las relaciones genéticas existentes entre diferentes grupos de peces: poblaciones, subespecies, especies, etc. El interés de estos trabajos se centra en la identificación de "stocks", entendidos éstos como grupos intraespecíficos con características genéticas comunes, y en la constitución de otros nuevos a partir de poblaciones naturales y cultivadas (Hallermann y Beckmann, 1988; Kapuscinski y Philipp, 1988).

Para los empresarios del campo de la acuicultura es vital determinar si los "stocks" que están siendo explotados en una piscifactoría son tales, o si, por el contrario, comprenden miembros de más de una población genéticamente diferenciada (Larkin, 1972; Mc. Lean y Evans, 1981, Grant y Utter, 1984).

Esto es especialmente problemático si las poblaciones difieren en características tales como crecimiento y maduración, ya que los sistemas de cultivo de estas poblaciones de peces se establecen en función de sus características vitales (Crozier, 1987).

Es tan importante el mantenimiento de la cantidad de variabilidad genética intrapoblacional como de la diversidad genética interpoblacional, la cual se ve frecuentemente amenazada como consecuencia de una gestión de protección errónea.

En numerosos casos, la protección de las especies piscícolas consiste en la propagación artificial de las mismas, seguida de una liberación masiva de alevines en las aguas naturales. La destrucción de las zonas de desove, causada principalmente por la construcción de plantas hidroeléctricas, la contaminación y la pesca masiva, han obligado a desarrollar programas de cría cuyo objetivo es minimizar el peligro o la amenaza ecológica y

económica originada por la drástica reducción numérica o completa erradicación de poblaciones piscícolas. Esto hace necesario proyectar programas de liberación de alevines de piscifactorías, pero con un control adecuado de los mismos (Moav et al., 1978).

Frecuentemente, un "stock" cultivado es el único remanente que existe de una población cuyas bases ecológicas para la supervivencia han sido amenazadas. En estos casos, una piscifactoría funciona como un banco de genes, conservando y multiplicando recursos biológicos únicos. Esto es de fundamental importancia para prevenir en los programas de mejora el peligro inadvertido de la pérdida de acervos genéticos (Ryman y Stahl, 1981).

Al pasar de la reproducción natural a la propagación artificial existe el riesgo de que aparezcan ciertos cambios genéticos, ya que las presiones de selección no son las mismas en el medio natural que en el ambiente altamente protegido de la piscifactoría. Además, la gran capacidad reproductiva de muchos peces, que potencialmente producen un gran número de descendientes por parental, puede dar lugar a que se produzca un cierto deterioro como consecuencia de la existencia de consanguinidad (Ryman y Stahl, l.c.).

Por otra parte, el continuo establecimiento de "stocks" de cultivo a partir de poblaciones naturales y cultivadas, da lugar, en muchos casos, a "stocks" bastante diferentes de las poblaciones originales. En consecuencia, la resiembra de estas poblaciones cultivadas en áreas de reproducción natural; por ejemplo, para pesca recreativa, afecta a la diversidad genética de las poblaciones nativas (Berg y Gall, 1988)

Estos problemas han sido reconocidos y discutidos por varios autores como Ryman (1970), Kincaid (1976a, b) y Allendorf y Utter (1979). Sin embargo, se han aportado pocos datos que describan el grado de diferenciación genética en la mayoría de las poblaciones de peces (Reisenbichler y Phelps, 1989) o entre poblaciones cultivadas y naturales (Ryman y Stahl, 1981). Berg y Gall (1988) señalan que en la situación actual "es prioritario obtener una apreciación de la distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones para

asegurar una conservación efectiva, una productividad continuada y una futura diversidad de la acuicultura".

4. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Un primer paso en la investigación a nivel genético de las especies piscícolas es la detección de la variabilidad genética existente en las diferentes poblaciones y su cuantificación.

La conservación de la variabilidad genética puede realizarse con éxito si se parte del conocimiento de la estructura genética de las especies en cuestión (Allendorf y Phelps, 1981). Igualmente, el conocimiento del patrón de distribución de la variabilidad genética entre las diferentes poblaciones de una especie puede permitir una correcta gestión de las poblaciones de cultivo. Por ello, a lo largo de las últimas décadas se han probado distintos métodos para analizar y cuantificar dicha variabilidad genética.

Una correcta evaluación de la variabilidad genética existente en las poblaciones debe reunir las siguientes premisas (Lewontin, 1974):

-El número de individuos estudiados debe ser suficiente y representativo de la población natural de la que procedan.

-El número de marcadores genéticos analizados debe ser lo suficientemente grande como para constituir una muestra representativa del genoma.

El análisis de la variación genética puede realizarse a través de caracteres muy diferentes como son los morfológicos, citogenéticos, bioquímicos y moleculares.

4.1 Caracteres morfológicos

Los intentos tradicionales de estimar la variabilidad genética y de discriminar poblaciones han estado basados en el análisis comparativo de caracteres merísticos y morfométricos (Crozier, 1987).

Estos caracteres son de fácil medición y análisis. Sin embargo, los grupos delimitados por tales métodos pueden no representar unidades poblacionales, ya que se desconocen las bases genéticas de los caracteres morfológicos (Grant y Utter, 1980). Además, una considerable porción de la variabilidad encontrada en los caracteres morfológicos está determinada por factores no genéticos y esto conlleva, en muchos casos, a sobreestimar la varianza genética, al incluir en la estima un valor de la variación exclusivamente atribuible al ambiente (Falconer, 1960).

Por todo ello, la valoración de las relaciones evolutivas y la estimación de la cantidad y distribución de la variación genética de las poblaciones no se puede basar sólo en el análisis de caracteres fenotípicos tales como: tamaño corporal, coloración, número de vértebras, etc. (Ryman y Stahl, 1981).

En muchos casos, los estudios morfológicos han ayudado a explicar la diversidad intraespecífica (Svärdson, 1979), pero la mayoría de los análisis de variación fenotípica han sido, estadísticamente hablando, inadecuados. Esta falta de datos reales ha llevado a errar, a menudo, en la identificación de poblaciones, subespecies, etc., y a sobreenfatizar el control genético de caracteres morfológicos que están influidos por el ambiente (Ryman y Stahl, 1981). Por lo tanto, como señalan Messiah y Tibbo (1971), para poder diferenciar con seguridad unidades poblacionales intraespecíficas se requiere una demostración a nivel genético.

4.2 Caracteres citogenéticos

Existen pocos estudios cariotípicos poblacionales cuyo objetivo sea estimar la variabilidad genética, a este nivel, entre poblaciones de especies piscícolas. La mayoría de los estudios citogenéticos se han centrado en la posible existencia de polimorfismos intra e interindividuales, sobre todo en lo referente al número de cromosomas y número de brazos cromosómicos, buscando un posible origen tetraploide y su posterior proceso de

diploidización (fenómeno frecuente en salmónidos y ciprínidos) (Zenzen y Voiculescu, 1975; Hartley y Horne, 1984, Martínez et al., 1991).

Hasta la fecha hay muy pocos estudios acerca de las diferencias cariotípicas entre formas ecológicas y geográficas, quizás principalmente debido a que los cariotipos obtenidos y los tamaños muestrales de estos estudios no permitían un análisis preciso de la variación encontrada (Martínez et al., 1991). Aun así, se han detectado polimorfismos cromosómicos importantes en poblaciones de salmónidos (Hartley y Horne, 1984; Hartley, 1987) y gobios (Thode et al., 1985a, Giles et al., 1985) que señalan la posible utilidad de los estudios citogenéticos en la diferenciación de poblaciones y morfos.

El heteromorfismo intra e interespecífico para las regiones organizadoras nucleolares (NORs) ha sido documentado en varios grupos de peces. La mayoría de estas variaciones se refieren al número absoluto de NORs por genoma, a su localización cromosómica, tamaño relativo y número de NORs activos por célula (Gold, 1984; Amemiya y Gold, 1988, 1990a, b). Estos autores han puesto de manifiesto la utilidad de esta región cromosómica en estudios taxonómicos.

4.3 Caracteres bioquímicos

Una herramienta poderosa en los estudios de identificación poblacional es el análisis de la variación genética basado en el estudio de isoenzimas o proteínas por electroforesis (Ferguson, 1989). Los datos electroforéticos permiten realizar estimas detalladas de variabilidad genética intra e interpoblacional, así como calcular índices de similitud genética (Wright, 1969; Nei, 1972).

Según Market y Möller (1959), las "isoenzimas" son distintas formas moleculares de una misma enzima, que presentan especificidad por el mismo sustrato y se observan en el mismo individuo.

En general, las enzimas y proteínas son productos de genes individuales, aunque algunas sean el resultado de polipéptidos codificados por dos o más genes. El hecho de que

la información genética codificada en una secuencia de nucleótidos (gen estructural) se traduzca a la secuencia de aminoácidos que constituye la cadena polipeptídica correspondiente, implica que la variación en la secuencia de aminoácidos de una proteína conlleva una variación alélica en el gen o los genes que codifican para ella.

La técnica de electroforesis permite detectar distintas isoenzimas y por tanto, variantes alélicas del mismo locus o de diferentes loci. No todas las variantes alélicas son detectadas por electroforesis. Generalmente, sólo las sustituciones que alteren la carga neta de la proteína cambiarán su movilidad electroforética. Si se considera la flexibilidad del código genético y las propiedades eléctricas de los aminoácidos se calcula que sólo un tercio de todos los cambios aminoacídicos son detectables por electroforesis (Lewontin, 1974).

A pesar del inconveniente de no detectarse todas las variantes isoenzimáticas por esta técnica, las isoenzimas presentan notables ventajas para estudiar la variabilidad genética, como pueden ser:

-La expresión de los alelos que las controlan suele ser codominante y sin efectos epistáticos. Como excepción podemos citar el que algunos cambios en el ADN llevan consigo la supresión o interrupción de la transcripción o traducción de modo que ocasionan la aparición de un alelo nulo o amorfo (recesivo) no detectable en heterocigosis.

- La expresión de los alelos no está, en general, sujeta a variaciones debidas al ambiente.

-La movilidad electroforética de las proteínas enzimáticas es un fenómeno repetitivo que proporciona diferencias claras y discretas entre genotipos.

La variación proteica, al estar libre de efectos ambientales, ha aportado una gran ayuda a la determinación de la estructura poblacional en muchas especies de peces tales como el salmón atlántico, *Salmo salar* (Stahl, 1983), arenque atlántico, *Clupea harengus* (Kornfield et al., 1982), bacalao, *Gadus morhua* (Cross y Payne, 1978) y merluza europea, *Merluccius merluccius* (Manglay y Jamieson, 1979).

A pesar de ser técnicas que proporcionan datos para caracterizar genéticamente las poblaciones de la misma especie, se hallan limitadas al número de tinciones histoquímicas conocidas. Además, el análisis con marcadores enzimáticos no detecta aquellas modificaciones nucleotídicas producidas en regiones no codificadoras del genoma.

4.4 Caracteres moleculares

Varios motivos avalan que el nivel de estudio ideal para cuantificar la variación genética sea la molécula de ADN (Bartlett y Davidson, 1991):

- El ADN es el mismo en todos los tipos celulares de un organismo mientras que, por ejemplo, las proteínas pueden presentar variación tisular.
- El ADN es considerablemente estable y la cantidad de información aportable para el análisis decrece del nivel de ADN al de proteínas.
- En el ADN es donde se produce la auténtica variación genética.

En la última década, el desarrollo de técnicas para la manipulación de fragmentos específicos de ADN ha permitido el descubrimiento de un gran número de marcadores, virtualmente ilimitados, basados en los polimorfismos para secuencias o fragmentos de ADN (Hallerman y Bekmann, 1988), con la ventaja adicional de estudiar directamente el material hereditario y no una manifestación fenotípica del mismo. Dentro de estas técnicas podríamos señalar el análisis de polimorfismos para las longitudes de fragmentos de restricción (RFLPs), bien de ADN genómico o de ADN mitocondrial, y otra técnica de reciente aparición llamada PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

a) Polimorfismos para fragmentos de restricción (RFLPs)

El análisis de variabilidad genética en poblaciones mediante la técnica de análisis de RFLPs es, en la actualidad, uno de los estudios más desarrollados para la estima de la variación genética poblacional.

El análisis de los RFLPs genómicos presenta, aparte de las ventajas ya mencionadas de no estar afectados por factores ambientales, el hecho de que virtualmente es analizable todo el genoma, con sus regiones codificadoras y no codificadoras.

Sin embargo, también presenta inconvenientes, como es lo largo y costoso del proceso, ya que aparte de la extracción del ADN, éste tiene que ser digerido con endonucleasas de restricción, separado en geles de agarosa, desnaturalizado, transferido a membranas y posteriormente hibridado con sondas radiactivas. Por otro lado, la cantidad de genes clonados para ser utilizados como sondas de hibridación, de momento, es muy limitada en todas las especies y más aun en las piscícolas (Hallerman y Beckman, 1988)

El estudio de RFLPs en el ADN mitocondrial (ADNmt) constituye actualmente la técnica principal para analizar relaciones filogenéticas en varios grupos de peces (Lansman et al., 1981; Avise y Lansman, 1983) debido a que la rápida tasa de evolución de este tipo de ADN permite detectar fácilmente diferencias entre grupos filogenéticamente muy próximos, o incluso entre poblaciones de una especie. Además, esta molécula presenta herencia materna (no existe recombinación) y, aparentemente, la mayoría de los cambios que se producen en la molécula son evolutivamente neutros (Bernatchez y Dodson, 1990). Entre los inconvenientes de esta técnica podemos citar el difícil aislamiento del ADN mitocondrial así como, en algunos casos, el requerimiento de ejemplares de un tamaño superior a aquellos cuya captura es posible.

b) Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye un importante paso en *Biología Molecular* (Mullis et al., 1986). Esta técnica, basada en la síntesis enzimática de secuencias de ADN comprendidas entre unos oligonucleótidos que actúan como cebadores, permite amplificar el número de copias de dichas secuencias hasta un nivel visualizable en electroforesis, sin necesidad del empleo de marcadores radiactivos. Es un proceso simple en el que el ADN genómico se desnaturaliza (90-95 °C) y se une a un par de

oligonucleótidos específicos (renaturalización) que suministran extremos 3'-OH a una polimerasa termoestable capaz de replicar el segmento de ADN comprendido entre las secuencias diana de los oligonucleótidos. (Saiki, 1989) (Fig. 3).

Esta técnica ha abierto nuevas perspectivas en los estudios poblacionales pues permite amplificar genes, tanto nucleares como mitocondriales, y facilitar así su posterior comparación y secuenciación (Kocher y White, 1989).

Un inconveniente de la técnica es, al igual que en el caso de RFLPs genómicos, el que hay un bajo número de genes secuenciados que permitan diseñar oligonucleótidos utilizables como cebadores para amplificar dichas secuencias.

Este problema ha sido solventado parcialmente por Williams et al. (1990), quienes han introducido una variación en la técnica consistente en la amplificación del ADN genómico a partir de oligonucleótidos de secuencia arbitraria que permiten amplificar regiones de ADN al azar. Por ello, a esta técnica modificada se le denomina RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA).

En esta última técnica, el hecho de que los cebadores utilizados sean cortos y que las condiciones de anillamiento sean relajadas (Williams et al., l.c.) permite la amplificación de un mayor número de segmentos de ADN y, por tanto, la probabilidad de detectar polimorfismos genéticos aumenta considerablemente.

La técnica de la PCR, independientemente del tipo de oligonucleótido cebador que se emplee, permite además estudiar un gran número de individuos en poco tiempo, reduciendo considerablemente con respecto a los RFLPs la complejidad y el coste del proceso. Sin embargo, presenta el inconveniente de que los fragmentos amplificados se comportan como dominantes.

A pesar de todo lo dicho anteriormente respecto a la importancia del estudio de la variabilidad genética existente en las poblaciones piscícolas y de su conservación, apenas se dispone de datos genéticos referentes a la tenca, los cuales están además restringidos exclusivamente al nivel citogenético (Hafez et al., 1978a,b; Hafez et al., 1979; Mayr et al., 1986).

Dado el auge actual del cultivo de la tenca en España y el desconocimiento absoluto que se tiene acerca de la estructura genética de las poblaciones españolas, consideramos la necesidad de iniciar un estudio genético de las poblaciones autóctonas de tenca a nivel citogenético, bioquímico y molecular.

OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en este trabajo son:

1.- Estudio de la variabilidad genética existente en varias poblaciones españolas de tenca a nivel:

a) Citogenético: Obtención del cariotipo. Análisis de los patrones de bandeo C y fluorescencia con cromomicina A3 y de las regiones organizadoras nucleolares (NORs).

b) Bioquímico: Estudio del control genético, estructura cuaternaria y especificidad tisular de varios sistemas enzimáticos.

c) Molecular: A nivel de ADN, mediante técnicas de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando cebadores específicos (PCR propiamente dicha) y oligonucleótidos de secuencia al azar (RAPDs).

2.- Estima de las distancias genéticas entre las diferentes poblaciones estudiadas y establecimiento de sus correspondientes dendrogramas a partir de los datos obtenidos con los marcadores bioquímicos y moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

I/ MATERIAL

Los peces analizados en este trabajo fueron recolectados en siete poblaciones de tenca, cuya localización geográfica aparece representada en la Figura 4:

- "Embalse de Citruénigo" (NC) (Navarra).
- Charca de "Las Bárdenas Reales" (NB) (Navarra)
- "Laguna del Cristo" (CR) (Salamanca) (Fig. 5).
- Charca de "Oropesa" (ORO) (Toledo).
- Charca de "La Generala" (GRL) (Cáceres).
- Piscifactoria "Vega del Guadiana" (VG) (Badajoz).
- Charcas del Centro de Investigaciones Agropecuarias "Dehesón del Encinar" (DEH) (Toledo) (Fig 5).



Figura 4: Localización geográfica de las diferentes poblaciones muestreadas.



Figura 5: Vista general de la "Laguna del Cristo" (CR) (arriba) y de una charca del "Dehesón del Encinar" (DEH) (abajo).

Las poblaciones procedentes de la piscifactoría "Vega del Guadiana" (VG) y de la charca de "La Generala" (GRL) son poblaciones cultivadas. La población procedente de las charcas del "Dehesón del Encinar" (DEH) es realmente una muestra de la población de la piscifactoría "Vega del Guadiana", ya que se ha constituido con la liberación de alevines procedentes de dicha piscifactoría. Además, la muestra poblacional obtenida en las charcas del "Dehesón del Encinar" no es el resultado de la reproducción natural en estas aguas. El resto de las muestras poblacionales de peces jóvenes pueden considerarse resultantes de la reproducción natural.

Como sistema de pesca se emplearon trasmallos de 1,5 cm de ancho de malla (Fig. 6). Los peces recién capturados fueron transportados vivos al laboratorio en el que, según el análisis que se fuera a realizar con ellos, eran congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o mantenidos vivos en acuarios.



Figura 6: Vista general de un trasmallo con tencas.

En la Tabla 1 aparecen las diferentes poblaciones analizadas junto con la fecha de captura y el número de individuos estudiados por población para los caracteres citogenéticos, bioquímicos y moleculares.

Los individuos analizados a nivel bioquímico son los mismos que los empleados para los estudios moleculares. Los estudios citogenéticos se realizaron con otros peces que fueron mantenidos vivos en acuarios hasta el momento de ser analizados.

Tabla 1: Individuos analizados para el estudio de los diferentes caracteres.

| Población | Fecha de captura | Caracteres | | | | |
|-----------|------------------|---------------|-------------------------|----------------------|-------------|-------|
| | | Citogenéticos | Bioquímicos * | | Moleculares | |
| | | | Caracterización enzimas | Análisis poblacional | PCR | RAPDs |
| NC | Agosto 1991 | 15 | -- | 33 | 14 | 32 |
| NB | Agosto 1991 | 12 | -- | 22 | -- | -- |
| ORO | Julio 1989 | 15 | -- | 44 | 14 | 32 |
| CR | Julio 1989 | 7 | -- | 107 | 14 | 32 |
| | Julio 1991 | 10 | -- | -- | -- | -- |
| GRL | Noviembre 1988 | 20 | -- | 170 | 14 | 32 |
| VG | Noviembre 1988 | 15 | 21 | 118 | 14 | 32 |
| | Diciembre 1990 | 10 | 26 | -- | -- | -- |
| DEH | Septiembre 1988 | 20 | 40 | 94 | -- | -- |
| | Julio 1989 | 5 | -- | -- | -- | -- |
| | Julio 1990 | 20 | -- | -- | -- | -- |

*Bioquímicos: Caracterización enzimas: número de individuos estudiados para la determinación del control genético y estructura cuaternaria de las enzimas. Análisis poblacional: número de individuos utilizados en los estudios de polimorfismo.

NC: "Embalse de Citruénigo". NB: "Las Bárdenas Reales", ORO: "Oropesa", CR: "Laguna del Cristo", GRL: "La Generala", VG: "Vega del Guadiana", DEH: "Dehesón del Encinar".

Las placas metafásicas mitóticas se obtuvieron a partir de riñón. Además, en el caso de la población de Salamanca recogida en 1989, se obtuvieron placas metafásicas meióticas a partir de las gónadas masculinas.

Para la interpretación del control genético, la estructura cuaternaria y la especificidad tisular de los diferentes sistemas isoenzimáticos estudiados, se han analizado hasta ocho tejidos u órganos diferentes: ojo, músculo, hígado, riñón, bazo, corazón, cerebro y gónada. Para el análisis de la variabilidad genética poblacional sólo se estudiaron el hígado y el corazón, por ser los dos órganos que presentaban actividad para un mayor número de loci.

La técnica de la PCR, ya sea con oligonucleótidos de secuencia al azar (RAPDs) como con cebadores procedentes de genes concretos (PCR), se ha realizado con ADN genómico obtenido a partir de músculo dorsal, en cantidades que oscilan entre 0,5 y 3 g de músculo, manteniéndose este tejido a -80 °C hasta el momento de la extracción del ADN. Una vez realizada dicha extracción, el ADN se conservó disuelto a -4 °C y precipitado a -20 °C.

II/ MÉTODOS

1. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE CARACTERES CITOGENÉTICOS

Las placas metafásicas mitóticas y meióticas se obtuvieron a partir de riñón y testículo respectivamente, según el método descrito por Álvarez et al. (1980).

Los individuos, que habían permanecido en acuarios desde el momento de su captura, fueron inyectados intraperitonealmente con una solución de colchicina al 0,0075% en una proporción de 1,4cc/100g de peso del animal, 2 horas antes de la disección. La homogeneización del tejido se realizó con una solución hipotónica de KCl 0,083M.

Una vez obtenidas las placas metafásicas mitóticas se realizaron diferentes tratamientos:

a) Tinción convencional: Para el estudio del cariotipo se realizó una tinción convencional con Giemsa al 10% (Álvarez et al., 1980). Las placas metafásicas meióticas se teñieron de la misma forma.

b) Bando C: Con el objeto de obtener el patrón de bando C, se aplicó la técnica de tinción para heterocromatina constitutiva descrita por Giráldez y Orellana (1979).

c) Tinción con nitrato de plata: Las placas metafásicas mitóticas fueron teñidas con nitrato de plata según el método de Thode et al. (1983a), para caracterizar las regiones organizadoras nucleolares.

d) Tinción con cromomicina A3: Esta tinción de fluorescencia se realizó según la técnica de Schweizer (1981), para caracterizar regiones ricas en pares G-C.

Para la determinación del número diploide de la especie se han contado como mínimo diez placas metafásicas por individuo (Tabla 1). En el cariotipo, los cromosomas se han clasificado inicialmente en función de su morfología y después se han ordenado de mayor a menor.

La morfología cromosómica se estableció según la clasificación de Levan et al. (1964), por la que los cromosomas se clasifican, atendiendo a los valores resultantes de dividir la longitud del brazo largo por la del corto, en:

-Cromosomas metacéntricos: Aquellos en los que la relación entre el brazo largo y el corto no es superior a 1,7.

-Cromosomas submetacéntricos: Aquellos cuya relación está comprendida entre 1,7 y 3.

-Cromosomas acrocéntricos: Aquellos en los que la relación entre brazos es mayor de 3.

Para la determinación de la relación entre brazos y las longitudes cromosómicas en las diferentes poblaciones, se ha medido la longitud y los brazos de todos los pares cromosómicos en al menos cinco metafases por individuo y en cinco individuos por población. Las medias poblacionales se han comparado entre sí por medio de una *t* de Student.

2. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE CARACTERES BIOQUÍMICOS

2.1. Preparación de los extractos tisulares

Los diferentes materiales empleados para el estudio electroforético (ojo, músculo, hígado, riñón, bazo, corazón, cerebro y gónada), son diseccionados y almacenados a -80 °C hasta el momento en que se va a realizar la electroforesis. Las muestras descongeladas se homogeneizan con la solución tampón Tris-ClH 0,1 M pH 7 mediante un rotor del tipo Ultraturrax T-25 . El extracto obtenido se absorbe con un papel Whatman 3MM.

2.2. Electroforesis

Para el análisis de los distintos sistemas isoenzimáticos se ha empleado la técnica de electroforesis horizontal discontinua a voltaje constante, en geles de almidón al 10% (Figueiras et al., 1985). Se han utilizado tres sistemas tampón diferentes: Poulik, Histidina y Ridway, cuya composición se describe a continuación:

- Tampón Poulik (Poulik, 1957): Tampón del gel: 0,015M Tris; 0,0035M Ácido Cítrico, pH 7,75. Tampón de los electrodos: 0,1M Hidróxido Sódico, 0,3M Ácido Bórico, pH 8,6.

-Tampón Histidina (Brewer y Sing, 1970): Tampón del gel: 0,005M L-Histidina HCl, pH 7,0 con Hidróxido Sódico 1N. Tampón de los electrodos: 0,135M Tris; 0,043M Ácido Cítrico pH 7,0.

-Tampón Ridgway (Ridgway et al., 1970): Tampón del gel: 0,03M Tris; 0,005M Ácido Cítrico, pH 8,5. Tampón de los electrodos: 0,06M Hidróxido de Litio; 0,3M Ácido Bórico, pH 8,1. Los geles se preparan con un 99% del tampón para el gel y un 1% del tampón para los electrodos.

Para los sistemas Poulik y Ridway, la electroforesis se realizó a un voltaje constante de 250 V durante 3 horas, mientras que para el sistema Histidina se hizo a 150 V durante 5 horas. La temperatura fue de 4 °C en todos los casos.

2.3. Sistemas enzimáticos

Las enzimas analizadas se indican en la Tabla 2, en la que también aparece su abreviatura y código internacional, así como las referencias correspondientes a los sistemas de tinción histoquímicos utilizados.

La nomenclatura enzimática seguida en este trabajo es la propuesta por Allendorf y Utter (1979), pero basada en las recomendaciones de Shaklee et al. (1989, 1990a). Una abreviatura en mayúsculas designa las distintas enzimas y, en minúsculas, salvo la primera letra, representa el gen o locus que codifica para la proteína. En el caso de formas múltiples de la misma enzima se añade un número, de tal forma que a la de menor migración anódica se le asigna un 1, a la siguiente un 2 y así sucesivamente. Las variantes alélicas se designan de acuerdo con la movilidad electroforética relativa. A un alelo, generalmente el más común, se le denomina arbitrariamente 100. En el caso de que la movilidad sea hacia el cátodo se indica con un signo menos. Esta unidad representa la distancia de migración de la isoenzima codificada por este alelo desde el punto donde se realizó la inserción. Al resto de los alelos

se les asigna un valor numérico que representa su movilidad relativa con respecto a esta unidad de distancia.

Tabla 2: Sistemas isoenzimáticos analizados.

| Enzima | Abreviatura | Código de enzima (E.C.)* | Referencia |
|--|--------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Aconitasa | ACO | 4.2.1.3 | Harris y Hopkinson (1977) |
| Fosfatasas ácidas | ACPH | 3.1.3.2 | Shaw y Koen (1968) |
| Alcohol deshidrogenasa | ADH | 1.1.1.1 | Brewer y Sing (1970) |
| Aspartatoamino transferasa | AAT | 2.6.1.1 | Selander et al. (1971) |
| Esterasas | EST | 3.1.1. | Shaw y Koen (1968) |
| α-Glicerofosfato deshidrogenasa | α -GPDH | 1.1.1.8 | Brewer y Sing (1970) |
| 3-Hidroxi butirato deshidrogenasa | HBDH | 1.1.1.30 | Brewer y Sing (1970) |
| Isocitrato deshidrogenasa | IDH | 1.1.1.42 | Brewer y Sing (1970) |
| L-Lactato deshidrogenasa | LDH | 1.1.1.27 | Brewer y Sing (1970) |
| Malato deshidrogenasa | MDH | 1.1.1.37 | Brewer y Sing (1970) |
| Enzima málico | ME | 1.1.1.40 | Brewer y Sing (1970) |
| Peroxidasas | PER | 1.11.1.7 | Brewer y Sing (1970) |
| 6-Fosfogluconato deshidrogenasa | PGD | 1.1.1.44 | Brewer y Sing (1970) |
| Fosfogluosa isomerasa | PGI | 5.3.1.9 | Brewer y Sing (1970) |
| Fosfogluosa mutasa | PGM | 5.4.2.2 | Brewer y Sing (1970) |
| Superóxido dismutasa | SOD | 1.15.1.1 | Brewer y Sing (1970) |

* Los códigos de enzimas siguen las recomendaciones de IUBNC (1984).

3. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE CARACTERES MOLECULARES

3.1. Aislamiento del ADN genómico

La obtención del ADN genómico se realizó según el método descrito por Dellaporta et al. (1983) con modificaciones.

El tejido muscular se homogeneiza en tampón de extracción (Tris-ClH 100mM, pH 8; EDTA 50mM, pH 8 y NaCl 500mM) con un rotor del tipo Ultraturrax T-25. Tras un tratamiento con SDS 20% a 65 °C se añade Acetato Potásico 5M incubando a 0 °C. Tras centrifugar a 25.000 xg, el ADN se purifica con Alcohol Isopropílico durante toda una noche a -20 °C. Se precipita el ADN a 20.000 xg para eliminar el sobrenadante. El ADN sedimentado se resuspende con Tris 50mM, EDTA 10mM. Se centrifuga una vez más para eliminar las impurezas que puedan quedar y se precipita después el ADN contenido en el sobrenadante con Acetato Sódico 3M pH 5,2 y CTAB 1% (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio). Se eliminan las sales del ADN lavando con Etanol 70% y posteriormente se resuspende con TE 10:1 pH 8 (Tris 10mM, EDTA 1mM). Esta solución se precipita con Acetato Sódico 3M y dos volúmenes de Etanol absoluto, manteniéndose a -20 °C.

Para la determinación de la concentración de ADN se mide la densidad óptica a 260 nm de longitud de onda según el método espectrofotométrico de Sambrook et al. (1989). Se obtuvo una estima de la pureza del ADN mediante la estima de la relación de la densidad óptica medida a 260 y 280 nm de λ .

3.2 Amplificación del ADN genómico

Para las reacciones de polimerización en cadena se utilizó la enzima "ADN polimerasa Replitherm Termoestable" (Epicentre Technologies).

Aunque la técnica de la reacción de polimerización en cadena (PCR), realizada tanto con oligonucleótidos de secuencia al azar como con oligonucleótidos seleccionados a partir de genes específicos, es básicamente la misma, nosotros la diferenciaremos como RAPDs para el primer caso y como PCR para el segundo con el fin de simplificar la lectura de este

trabajo. Los distintos componentes empleados en la reacción de amplificación figuran en la Tabla 3.

Tabla 3: Composición de las mezclas de reacción de amplificación por RAPDs y PCR

| | RAPDs | PCR |
|-------------------------|--------------|------------|
| dATP | 0,40 mM | 40 mM |
| dTTP | 0,40 mM | 40 mM |
| dGTP | 0,40 mM | 40 mM |
| dCTP | 0,40 mM | 40 mM |
| Cebador | 0,18 M | - |
| Cebador D* | - | 1,8 M |
| Cebador I* | - | 1,8 M |
| ADN polimerasa | 0,25 U | 1,25 U |
| ADN molde | 25,00 ng | 0,5 g |
| Tris-ClH pH 8,3 | 10,00 mM | 10,00 mM |
| MgCl₂ | 1,50 mM | 1,50 mM |
| KCl | 50,00 mM | 50,00 mM |
| Twcen 20 | 0,005% | 0,005% |
| NP-40 | 0,005% | 0,005% |
| Gelatina | 0,001% | 0,001% |

* Cebador D y Cebador I son los oligonucleótidos flanqueantes del segmento amplificado.

3.2.1 Amplificación mediante oligonucleótidos de secuencia al azar (RAPDs)

El método empleado es el descrito por Williams et al. (1990). La amplificación se llevó a cabo en un aparato termociclador PHC-2 (Techne).

Para el análisis de variabilidad genética se emplearon seis oligodesoxinucleótidos decámeros (10-A, 1-B, 5-B, 13-B, 7-F y 18-F) cuyas secuencias aparecen en la Tabla 4. Estos seis oligodesoxinucleótidos fueron seleccionados entre 50 cebadores en función de la actividad y resolución electroforética obtenida en la amplificación. Todos estos oligonucleótidos estaban formados por el mismo número de bases.

Tabla 4: Descripción de los oligonucleótidos empleados en RAPDs.

| Nombre | Secuencia (5'-3') |
|--------|-------------------|
| 10-A | GTGATCGCAG |
| 1-B | CTTTCGCTCC |
| 5-B | TGCGCCCTTC |
| 13-B | TTCCCCGCT |
| 7-F | CCGATATCCC |
| 18-F | TTCCCGGGTT |

Los programas de amplificación utilizados fueron (Fig. 7)

- Un ciclo de 4 minutos a 94 °C,
- 45 ciclos que constan de tres partes cada uno:
 - a) Desnaturalización a 92 °C durante 1 minuto.
 - b) Anillamiento a 36 °C, 1 minuto.
 - c) Polimerización a 72 °C, 2 minutos.
- Ciclo de terminación a 72 °C, 4 minutos.

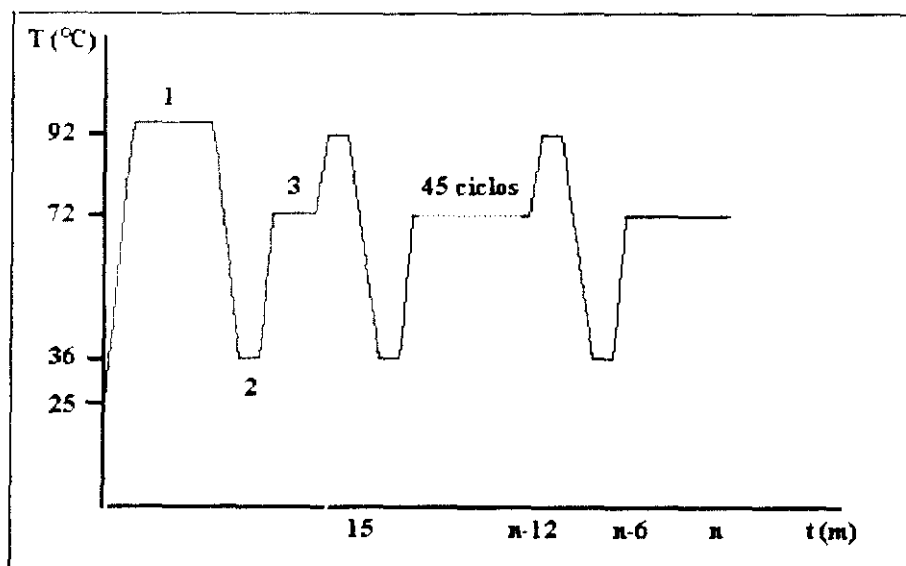


Figura 7: Representación de los programas de amplificación por RAPDs

3.2.2 Amplificación mediante parejas de oligonucleótidos de secuencias específicas (PCR)

Se ha llevado a cabo un estudio de los productos de amplificación de ADN genómico a partir de cuatro parejas de oligonucleótidos cebadores. Debido a la ausencia de información para la especie en estudio, los cebadores fueron seleccionados a partir de la secuencia de distintos genes de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*), empleando el programa OLIGO (Rychlik, 1990). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, así como los genes de los que proceden figuran en la Tabla 5.

Tabla 5: Descripción de los oligonucleótidos empleados en la PCR.

| Nombre | Secuencia (5'-3') | Segmento amplificado | Referencia |
|--------------------|---|--|--------------------------|
| MAE-1U MAE-1L | GGTCAAGGTGGCTCCCC CCAAACCAACCCCTCCT | ADNc del componente C9 del complemento. 699 pb. | Stanley y Hertz (1987) |
| MAE-5U MAE-5L | CCAAGGAAGCCGAGGGG TTGGCGGGTGC GGCGGC | ADNc para la proteína HMG-T (Grupo de alta movilidad electroforética). 527 pb. | Pentecost et al. (1985) |
| MAE-6U MAE-6L | CGCTGGGCTGAATGTGC GCCCGTAGCCGACCGCC | ADNc de la proteína "heat shock" de 70 Kd. 626 pb. | Rashmikant et al. (1984) |
| MAE-10U MAE-10L | TGGTTCATTGGGTTGGC GAGGGGGCGGATAGGTC | ADNc del gen del componente c-ii de protamina. 547 pb. | States et al. (1982) |

Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador DNA Thermal Cycler 480 (Perkin- Elmer Cetus). La mezcla de reacción figura en la Tabla 3 y los programas empleados son los siguientes (Fig. 8).

-Un ciclo de 4 minutos a 94 °C.

-35 ciclos con tres partes cada uno:

a) Desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto.

b) Anillamiento a 45 °C, 1 minuto.

c) Polimerización a 72 °C, 2 minutos.

-Ciclo de terminación a 72 °C, 4 minutos.

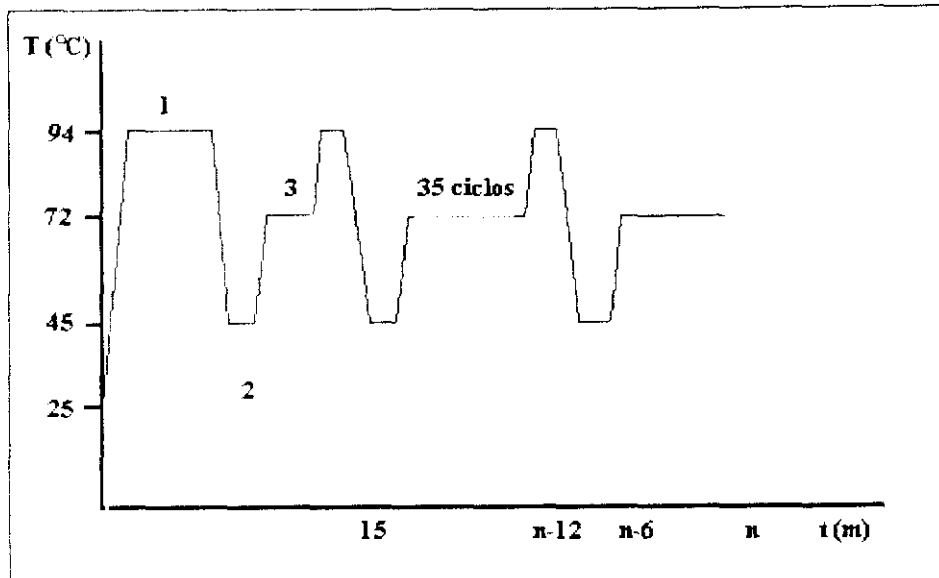


Figura 8. Representación de los programas de amplificación por PCR

3.3 Electroforesis

La separación de los productos de amplificación se realizó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,4% (Sambrook et al., 1989).

El sistema tampón empleado para las electroforesis es TAE (Tris-Acetato 0,04M, EDTA 0,001M). Las condiciones de electroforesis son de 3-4 V/cm (medido como la distancia entre los electrodos) durante 2-3 horas. La detección de los productos de amplificación se hizo por tinción con Bromuro de Etidio.

Los geles se fotografiaron con una cámara Polaroid DS-34 y película Polaroid 667.

El tamaño de los fragmentos separados por electroforesis se calculó con el programa GEL, que compara los fragmentos de tamaño desconocido con la migración y tamaño de un

ADN de alto peso molecular, que en nuestro caso es el ADN del bacteriófago λ , tratado con la endonucleasa de restricción HindIII.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.1 Estima de las frecuencias genotípicas y génicas. Ligamiento al sexo.

En aquellos casos en los que se observaron polimorfismos cromosómicos se han analizado las frecuencias de los distintos cariomorfos.

En los caracteres bioquímicos, las frecuencias génicas y genotípicas se infieren directamente a partir de las fenotípicas en aquellos casos en que los alelos son codominantes. En el caso de loci polimórficos con dominancia completa, las frecuencias genotípicas y génicas se estiman suponiendo la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg.

En el estudio de polimorfismos para fragmentos de amplificación sólo se puede determinar la frecuencia de presencia o ausencia de bandas en electroforesis. Dado que se desconoce el origen de los fragmentos amplificados, y es imposible diferenciar los individuos heterocigotos de los homocigotos para la presencia de las bandas, el análisis de estos polimorfismos se ha basado en la frecuencia de presencia o ausencia del fragmento.

Además, se hizo un análisis de ligamiento al sexo mediante una prueba de independencia χ^2 para todos los caracteres polimórficos.

4.2 Estima de la variabilidad genética intrapoblacional: Índice de polimorfismo y heterocigosidad génica media

Como parámetros representativos de la variabilidad genética a nivel isoenzimático en las poblaciones, consideraremos el "índice de loci polimórficos" (P) y la "heterocigosidad génica media" (Hm). El índice de loci polimórficos se define, en este apartado, como la proporción estimada de loci que son variables, y viene dado por el cociente entre el número de loci polimórficos y el número total de loci analizados. Se admite que un locus es variable

cuando la frecuencia del alelo más común es inferior a 0,99 (criterio del 99%) o a 0,95 (criterio del 95%).

El índice de polimorfismo (P) se define para fragmentos de amplificación como la proporción estimada de fragmentos que son variables. Se calcula como el cociente entre el número de fragmentos amplificados polimórficos y el número total de fragmentos analizados. Los criterios empleados son los mismos que para los caracteres bioquímicos.

La heterocigosidad media para caracteres isoenzimáticos se define como la proporción de individuos heterocigotos observados por locus en el total de los loci estudiados.

Esta estima de la variabilidad genética no puede obtenerse para caracteres moleculares dado que no es posible distinguir a los individuos heterocigotos.

4.3 Estima de la variabilidad genética interpoblacional: Identidad y distancia genética

Estos parámetros se emplean para estimar el grado de diferenciación genética entre poblaciones. La identidad genética (I) se define como la proporción de genes idénticos en estructura entre dos poblaciones y se calcula a partir del índice de identidad de Nei (1972), cuya fórmula es:

$$I = \frac{\sum X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}}$$

La distancia genética (D), definida por el mismo autor, se expresa como:

$$D = -\ln I$$

La estima de la diversidad genética entre poblaciones mediante el análisis de los fragmentos de amplificación se ha determinado aplicando estos mismos índices en los que se ha considerado la proporción de fragmentos idénticos entre las poblaciones.

La elaboración de los dendrogramas correspondientes a los valores estimados de D , tanto para caracteres bioquímicos como moleculares, entre las diferentes poblaciones, se realizó según el método UPGMA (unweighted-pair group method) (Sneath y Sokal, 1973). Los errores de los puntos de ramificación se calcularon siguiendo el método de Nei (1985).

La estimación de los valores de distancia genética así como la construcción del árbol filogenético, se realizó con la ayuda del programa informático NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System; Rohlf, 1990).

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE CARACTERES CITOGÉNETICOS

1.1 Cariotipo

El número cromosómico obtenido en todas las placas metafásicas mitóticas analizadas es $2n=48$ (Fig. 9).

Al establecer el cariotipo de la tenca se han definido tres grupos morfológicos. El primero de ellos está constituido por ocho pares cromosómicos metacéntricos (del par 1 al 8), cuya longitud varía entre 2,3 y 1,1 μ . El segundo grupo lo forman once pares submetacéntricos (del par 9 al 19) con longitudes comprendidas entre 2,1 y 1,1 μ . El tercero incluye cinco pares cromosómicos acrocéntricos (del par 20 al 24) que miden entre 1,9 y 0,8 μ (Fig. 10, Tablas 6 y 7). Dentro del primer grupo, el par 3 presenta una constricción secundaria correspondiente a la región organizadora nucleolar, como se verá más adelante (Figs. 9 y 10)

El número de brazos cromosómicos o número fundamental de la especie es $NF=86$, considerando la existencia de un solo brazo en los cromosomas acrocéntricos y dos para el resto.

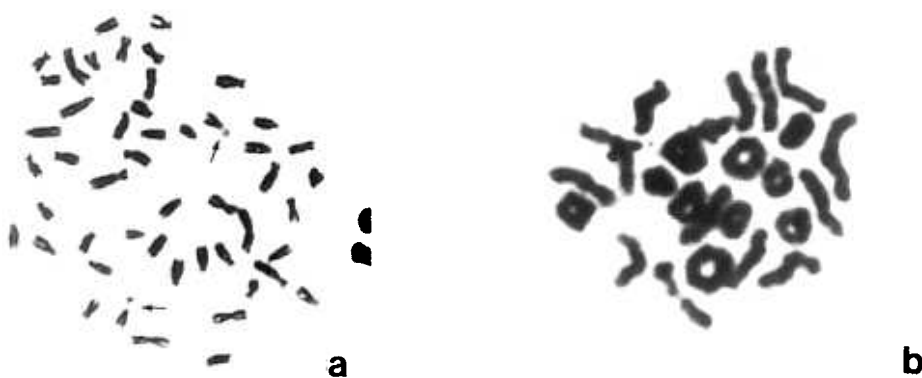


Figura 9: a) Metafase mitótica ($2n=48$), b) Metafase I (10 II cerrados y 14 II abiertos). La flecha señala la constricción secundaria correspondiente a la región organizadora nucleolar.

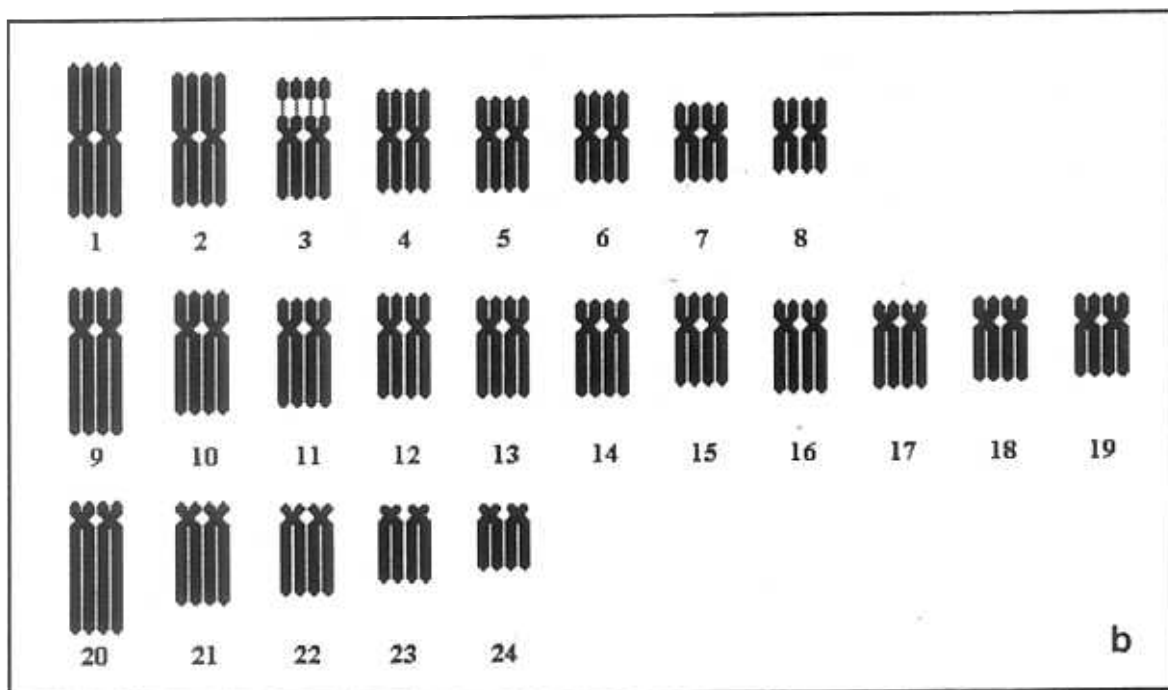
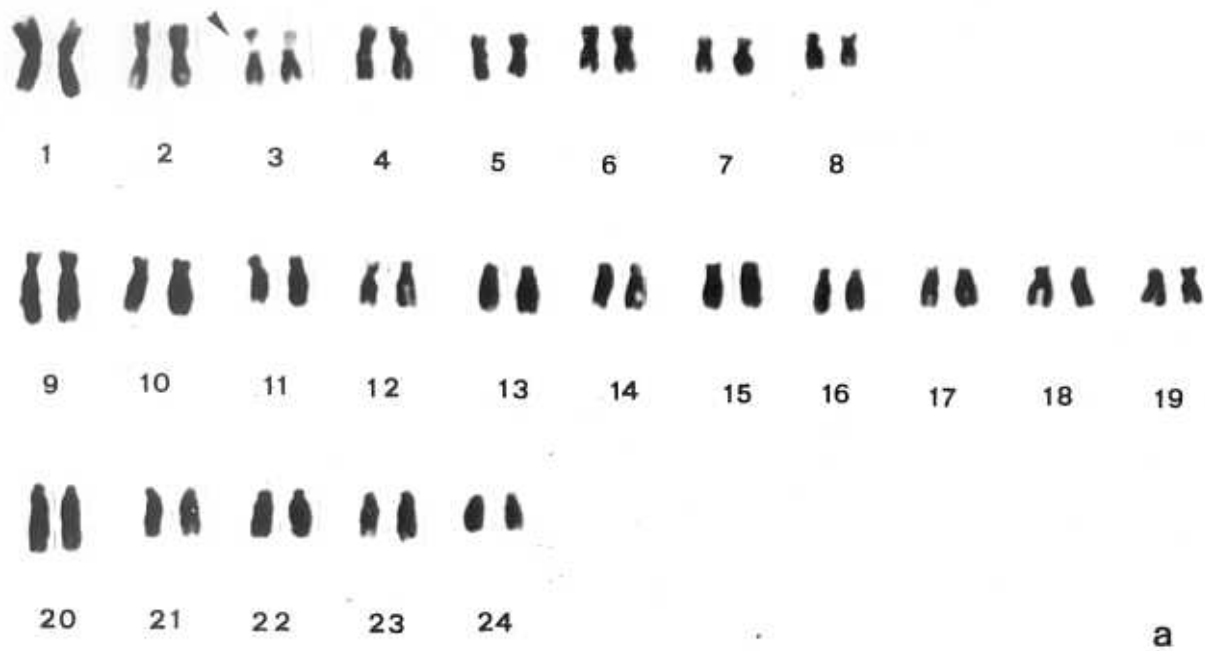


Figura 10: a) Cariotipo de *Sinca lincei*, b) Idiograma del cariotipo. La flecha señala la constricción secundaria correspondiente a la región organizadora nucleolar.

No se han observado diferencias, ni inter ni intraindividuales, en la morfología de los cromosomas y por lo tanto en el número fundamental, que sugieran la existencia de polimorfismos cromosómicos estructurales o numéricos en las poblaciones analizadas, excepto para la región organizadora nucleolar, polimorfismo que se comentará más adelante.

Las placas metafásicas de la primera división meiótica analizadas en la población CR mostraron 24 bivalentes. En ningún caso se observó la existencia de bivalentes heteromorfos (Fig. 9).

Dado que no se han observado polimorfismos cromosómicos estructurales o numéricos, así como bivalentes heteromorfos o univalentes, no hay evidencia de que existan heterocromosomas sexuales que se puedan identificar mediante tinción convencional.

Las medias poblacionales obtenidas para la longitud de cada uno de los 24 pares cromosómicos aparecen en la Tabla 6. La comparación de estas medias entre sí no mostró diferencias significativas al 99% en ningún caso, por lo que se ha empleado la media global para ordenar los cromosomas dentro de cada uno de los grupos establecidos en el cariotipo. Además, se ha calculado la longitud de los cromosomas en μ , que está comprendida entre 2,3 y 0,8 μ (Tabla 6).

Las medias poblacionales obtenidas para la relación entre las longitudes de los brazos cromosómicos se dan en la Tabla 7. Los valores medios correspondientes a los pares cromosómicos acrocéntricos no se calcularon, ya que la pequeña longitud del brazo corto hace imposible su medición en numerosas ocasiones. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las medias poblacionales.

El hecho de haber agrupado los cromosomas por su morfología se debe a que no se han podido establecer grupos de cromosomas de diferente longitud, ya que todos ellos tienen entre 2,3 y 0,8 μ . Además, este sistema de clasificación es el mismo que se ha empleado en todos los cariotipos establecidos hasta el momento para esta especie.

Tabla 6: Medias poblacionales de las longitudes de los 24 pares cromosómicos.

| Par cromosómico* | DEH | VG | GRL | CR | ORO | NC | \bar{X} | \bar{X} (μ) |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------|
| 1 | 6,46±0,07 | 6,48±0,05 | 6,51±0,09 | 6,52±0,11 | 6,38±0,12 | 6,79±0,11 | 6,52±0,03 | 2,3±0,01 |
| 2 | 5,37±0,07 | 5,38±0,07 | 5,38±0,06 | 5,46±0,11 | 5,53±0,12 | 5,58±0,10 | 5,43±0,03 | 2,0±0,01 |
| 3 | 4,99±0,10 | 4,80±0,08 | 4,65±0,09 | 4,73±0,08 | 4,74±0,09 | 4,79±0,11 | 4,79±0,04 | 1,7±0,01 |
| 4 | 4,26±0,06 | 4,39±0,05 | 4,23±0,03 | 4,36±0,12 | 4,42±0,10 | 4,35±0,10 | 4,36±0,03 | 1,5±0,01 |
| 5 | 4,04±0,06 | 4,00±0,04 | 3,90±0,05 | 4,08±0,05 | 4,00±0,07 | 3,90±0,07 | 3,99±0,02 | 1,4±0,01 |
| 6 | 3,76±0,05 | 3,82±0,05 | 3,67±0,08 | 3,81±0,06 | 3,74±0,10 | 3,65±0,07 | 3,74±0,03 | 1,3±0,01 |
| 7 | 3,37±0,04 | 3,42±0,01 | 3,36±0,07 | 3,48±0,08 | 3,31±0,06 | 3,39±0,08 | 3,39±0,02 | 1,2±0,01 |
| 8 | 3,18±0,05 | 3,21±0,05 | 3,08±0,06 | 3,23±0,10 | 3,12±0,07 | 3,03±0,10 | 3,15±0,03 | 1,1±0,01 |
| 9 | 5,82±0,06 | 5,85±0,07 | 5,96±0,06 | 5,99±0,09 | 5,79±0,12 | 5,80±0,16 | 5,87±0,03 | 2,1±0,01 |
| 10 | 4,96±0,04 | 5,03±0,06 | 5,07±0,05 | 5,10±0,13 | 5,07±0,10 | 5,20±0,12 | 5,06±0,03 | 1,8±0,01 |
| 11 | 4,50±0,04 | 4,45±0,07 | 4,52±0,05 | 4,38±0,08 | 4,33±0,07 | 4,47±0,07 | 4,44±0,03 | 1,6±0,01 |
| 12 | 4,31±0,04 | 4,27±0,05 | 4,29±0,04 | 4,32±0,05 | 4,32±0,07 | 4,27±0,09 | 4,30±0,02 | 1,5±0,01 |
| 13 | 4,14±0,04 | 4,07±0,04 | 4,17±0,04 | 4,06±0,06 | 4,11±0,06 | 4,16±0,07 | 4,12±0,02 | 1,5±0,01 |
| 14 | 3,98±0,03 | 3,93±0,03 | 3,98±0,04 | 3,91±0,05 | 3,83±0,04 | 3,98±0,04 | 3,92±0,02 | 1,4±0,01 |
| 15 | 3,89±0,03 | 3,88±0,04 | 3,89±0,04 | 3,84±0,06 | 3,90±0,05 | 3,96±0,06 | 3,89±0,02 | 1,4±0,01 |
| 16 | 3,80±0,03 | 3,80±0,03 | 3,77±0,04 | 3,74±0,05 | 3,75±0,04 | 3,78±0,05 | 3,78±0,02 | 1,3±0,01 |
| 17 | 3,68±0,03 | 3,68±0,03 | 3,61±0,03 | 3,53±0,06 | 3,63±0,07 | 3,49±0,04 | 3,61±0,02 | 1,3±0,01 |
| 18 | 3,48±0,04 | 3,56±0,05 | 3,51±0,04 | 3,37±0,07 | 3,45±0,07 | 3,38±0,06 | 3,50±0,02 | 1,2±0,01 |
| 19 | 3,20±0,07 | 3,29±0,05 | 3,28±0,05 | 3,15±0,06 | 3,23±0,10 | 3,14±0,08 | 3,20±0,03 | 1,1±0,01 |
| 20 | 5,50±0,08 | 5,29±0,09 | 5,52±0,09 | 5,29±0,14 | 5,43±0,16 | 5,37±0,16 | 5,40±0,04 | 1,9±0,01 |
| 21 | 4,14±0,07 | 4,20±0,05 | 4,13±0,06 | 4,27±0,09 | 4,29±0,14 | 4,26±0,08 | 4,20±0,03 | 1,5±0,01 |
| 22 | 3,73±0,06 | 3,69±0,07 | 3,78±0,05 | 3,80±0,08 | 3,90±0,12 | 3,94±0,10 | 3,81±0,03 | 1,4±0,01 |
| 23 | 3,07±0,09 | 3,12±0,06 | 3,23±0,09 | 3,19±0,10 | 3,27±0,15 | 3,19±0,12 | 3,18±0,04 | 1,1±0,01 |
| 24 | 2,30±0,06 | 2,47±0,05 | 2,42±0,06 | 2,55±0,09 | 2,44±0,16 | 2,25±0,08 | 2,40±0,04 | 0,8±0,01 |

*Pares metacéntricos: 1-8. Pares submetacéntricos: 9-19. Pares acrocéntricos: 20-24.

DEH: "Dehesón del Encinar". VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "La Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo", NB: "Las Bârdenas Reales".

Tabla 7: Medias poblacionales de la relación entre las longitudes de los brazos cromosómicos.

| Par cromosómico* | DEH | VG | GRL | CR | ORO | NC | \bar{X} |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1,03±0,01 | 1,02±0,01 | 1,03±0,01 | 1,03±0,02 | 1,01±0,01 | 1,01±0,01 | 1,02±0,01 |
| 2 | 1,11±0,01 | 1,07±0,02 | 1,09±0,02 | 1,10±0,03 | 1,06±0,02 | 1,06±0,02 | 1,08±0,01 |
| 3 | 1,14±0,03 | 1,20±0,04 | 1,20±0,05 | 1,10±0,03 | 1,29±0,07 | 1,07±0,03 | 1,17±0,02 |
| 4 | 1,26±0,03 | 1,25±0,04 | 1,24±0,04 | 1,23±0,05 | 1,26±0,05 | 1,19±0,04 | 1,24±0,02 |
| 5 | 1,54±0,03 | 1,46±0,02 | 1,47±0,03 | 1,43±0,01 | 1,53±0,04 | 1,49±0,03 | 1,49±0,01 |
| 6 | 1,16±0,02 | 1,15±0,03 | 1,18±0,04 | 1,13±0,02 | 1,12±0,03 | 1,16±0,03 | 1,15±0,01 |
| 7 | 1,43±0,04 | 1,51±0,03 | 1,51±0,03 | 1,51±0,04 | 1,44±0,03 | 1,48±0,03 | 1,48±0,01 |
| 8 | 1,19±0,02 | 1,19±0,04 | 1,20±0,02 | 1,16±0,04 | 1,13±0,03 | 1,15±0,03 | 1,17±0,03 |
| 9 | 2,59±0,07 | 2,39±0,06 | 2,51±0,05 | 2,46±0,07 | 2,47±0,07 | 2,57±0,08 | 2,50±0,03 |
| 10 | 2,35±0,06 | 2,39±0,05 | 2,39±0,05 | 2,40±0,09 | 2,39±0,11 | 2,54±0,06 | 2,41±0,03 |
| 11 | 2,70±0,07 | 2,64±0,08 | 2,76±0,07 | 2,86±0,09 | 2,77±0,06 | 2,68±0,07 | 2,74±0,03 |
| 12 | 2,08±0,05 | 2,11±0,07 | 2,14±0,05 | 2,07±0,06 | 2,00±0,03 | 2,03±0,07 | 2,07±0,02 |
| 13 | 2,45±0,06 | 2,51±0,06 | 2,53±0,07 | 2,44±0,07 | 2,35±0,04 | 2,54±0,07 | 2,47±0,02 |
| 14 | 2,91±0,05 | 2,89±0,06 | 2,89±0,06 | 2,94±0,05 | 2,88±0,03 | 2,95±0,05 | 2,92±0,02 |
| 15 | 1,92±0,04 | 1,88±0,03 | 1,84±0,08 | 1,84±0,05 | 1,85±0,07 | 1,88±0,05 | 1,87±0,02 |
| 16 | 2,70±0,06 | 2,52±0,04 | 2,61±0,06 | 2,58±0,04 | 2,64±0,10 | 2,60±0,12 | 2,60±0,03 |
| 17 | 2,99±0,08 | 2,97±0,08 | 2,99±0,03 | 2,99±0,03 | 2,94±0,07 | 2,92±0,07 | 2,97±0,04 |
| 18 | 2,20±0,05 | 2,03±0,06 | 2,15±0,07 | 2,04±0,04 | 2,11±0,07 | 2,04±0,08 | 2,09±0,03 |
| 19 | 1,93±0,03 | 1,88±0,04 | 1,95±0,05 | 1,84±0,04 | 1,82±0,05 | 1,80±0,04 | 1,87±0,02 |

*Pares metacéntricos: 1-8. Pares submetacéntricos: 9-19.

DEH: "Dehesón del Encinar", VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "La Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo", NB: "Las Bárdenas Reales".

1.2. Patrón de bandeo C

El patrón de distribución de la heterocromatina constitutiva se analizó en las poblaciones DEH, VG, GRL, NC y CR, encontrándose que su localización es básicamente centromérica y telomérica (Fig. 11).

Las bandas centroméricas están presentes en todos los pares cromosómicos y las teloméricas se observan en el brazo largo de casi todos ellos. Además se observan bandas intersticiales en los pares cromosómicos 3, 9, 10, 12, 20, 21 y 22. Por otro lado, los pares 2, 6, 8, 11, 15 y 19 presentan grandes bloques heterocromáticos. En el caso del par 2 se localizan pericentroméricamente y en el resto abarcan la práctica totalidad de uno de sus brazos. Si los cromosomas son submetacéntricos, el bloque se localiza en el brazo corto de los mismos. Los cromosomas acrocéntricos, excepto el par 24, presentan sus brazos cortos como heteropicnóticos positivos. La región organizadora nucleolar se comporta como heteropicnótica negativa (Fig. 11).

El análisis del patrón de bandeo C muestra la existencia de un polimorfismo para los bloques heterocromáticos de los pares 6 y 8 (Fig. 11). Estos polimorfismos se han analizado en las poblaciones DEH, VG y NC por tener un mayor número de individuos en los que se obtuvieron buenas placas metafásicas con bandeo C. Los resultados obtenidos son muy similares en las tres poblaciones salvo para la banda presente en el cromosoma 8 de la población NC, cuya frecuencia de aparición (0,77) es mayor que en las otras dos (0,50).

Tabla 8: Frecuencia de bloques heterocromáticos en los pares cromosómicos 6 y 8.

| Población | Par cromosómico 6 | | | | | Par cromosómico 8 | | | | |
|-----------|-------------------|------|------|------|------|-------------------|------|------|------|------|
| | N | ++ | +- | -- | p | N | ++ | +- | -- | p |
| DEH | 18 | 0,61 | 0,22 | 0,17 | 0,72 | 13 | 0,31 | 0,38 | 0,31 | 0,50 |
| VG | 11 | 0,64 | 0,27 | 0,09 | 0,77 | 10 | 0,30 | 0,40 | 0,30 | 0,50 |
| NC | 9 | 0,56 | 0,33 | 0,11 | 0,72 | 9 | 0,67 | 0,22 | 0,11 | 0,77 |

N: Número de individuos analizados; ++: frecuencia de individuos homocigóticos para la presencia del bloque heterocromático, +-: heterocigóticos, --: homocigóticos para la ausencia del bloque heterocromático. p: frecuencia del bloque heterocromático. DEH: "Dehesón del Encinar"; VG: "Vega del Guadiana", NC: "Embalse de Citruénigo".

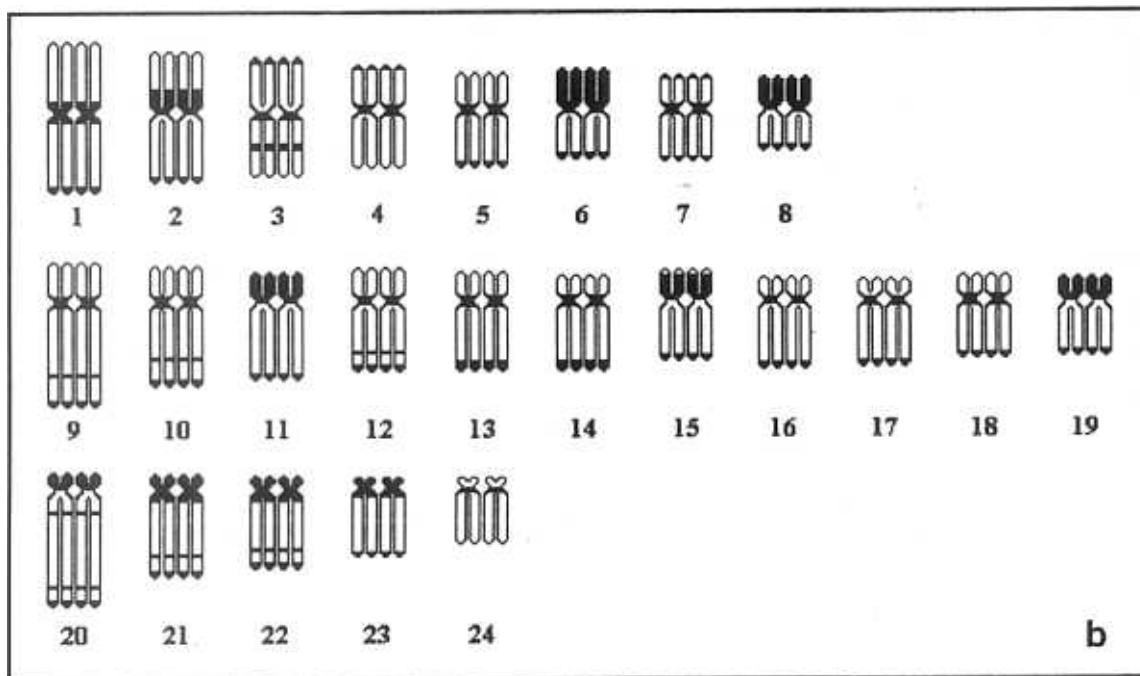
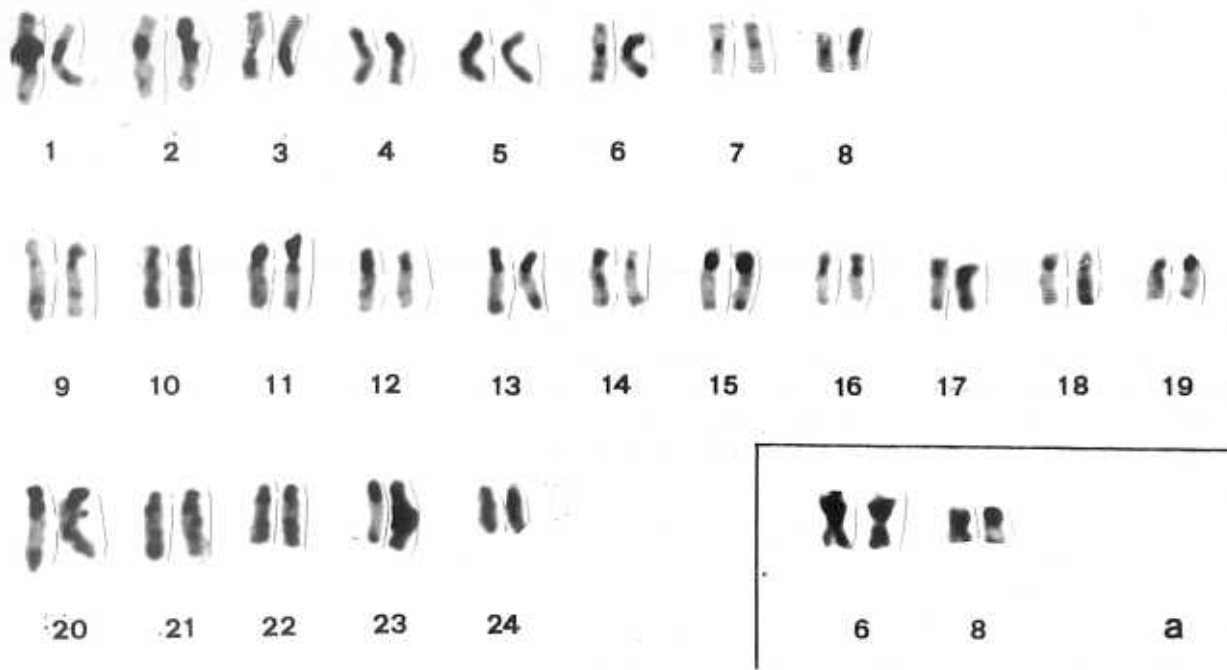


Figura 11: a) Cariotipo con bandeo C. En la esquina inferior derecha se observan los pares cromosómicos 6 y 8 con uno de sus brazos heteropícnóticos positivos. b) Diagrama del cariotipo con bandeo C.

1.3. Regiones organizadoras nucleolares

Mediante la técnica de impregnación argéntica se ha podido determinar la existencia de un único par cromosómico organizador nucleolar, que se corresponde con el par 3, el cual presentaba una *constricción secundaria intersticial detectable por tinción convencional* (Figs. 9 y 10). La existencia de un único par cromosómico organizador nucleolar se manifiesta también por la presencia de un par de nucleolos en los núcleos interfásicos.

Se ha observado la existencia de polimorfismo para el tamaño y la localización de la región organizadora nucleolar (Fig. 12). Estas variaciones se manifiestan mediante tinción convencional por la modificación del tamaño de la constricción secundaria así como de su posición. Estas modificaciones son la causa de que la morfología del par cromosómico 3, portador de dicha constricción, sea variable. Este par cromosómico, que es metacéntrico, aparece por ello frecuentemente como submetacéntrico. Estas variaciones se han observado tanto en heterocigosis como homocigosis. Los resultados obtenidos con la tinción argéntica permiten explicar, en algunas ocasiones, esta diferencia en la longitud relativa de los brazos cromosómicos y en el tamaño de la constricción secundaria como el resultado de la duplicación de la región organizadora nucleolar (Fig. 12b, c). En otras ocasiones, el tamaño de la región organizadora nucleolar teñida con nitrato de plata es el mismo para ambos homólogos, pero su posición en el cromosoma (Fig. 12d). Varios procesos podrían explicar esta variación, tales como una inversión, aunque con los datos obtenidos no se puede determinar cuál es el responsable de dicha modificación.

Se realizó una estima de la frecuencia de los individuos que presentaban algún tipo de polimorfismo para la región organizadora nucleolar con respecto al fenotipo normal (Tabla 9). Dichas frecuencias se estimaron a partir del análisis simultáneo de los datos obtenidos con tinción convencional y tinción argéntica. En dicha Tabla se puede observar que el porcentaje de individuos que presentan polimorfismo para dicha región cromosómica en el total de las poblaciones analizadas es del 52%, sin tener en cuenta ni el origen del

polimorfismo ni si su presencia se da en heterocigosis u homocigosis. La población que presenta una mayor frecuencia de individuos polimórficos fue la de "Oropesa" (ORO). La población de "Las Bárdenas Reales" (NB) presentó la frecuencia menor.

Tabla 9: Frecuencia de individuos con fenotipo normal y polimórfico para la región organizadora nucleolar.

| Población | DEH | VG | GRL | CR | ORO | NC | NB | X |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| N | 28 | 14 | 14 | 5 | 8 | 8 | 8 | 85 |
| Normal | 0,54 | 0,36 | 0,36 | 0,60 | 0,25 | 0,62 | 0,75 | 0,48 |
| Polimórfico | 0,48 | 0,64 | 0,64 | 0,40 | 0,75 | 0,38 | 0,25 | 0,52 |

N: Número de individuos. DEH: "Dehesón del Encinar", VG: "Vega del Guadiana, GRL: "La Generala", CR: "Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo", NB: "Las Bárdenas Reales".

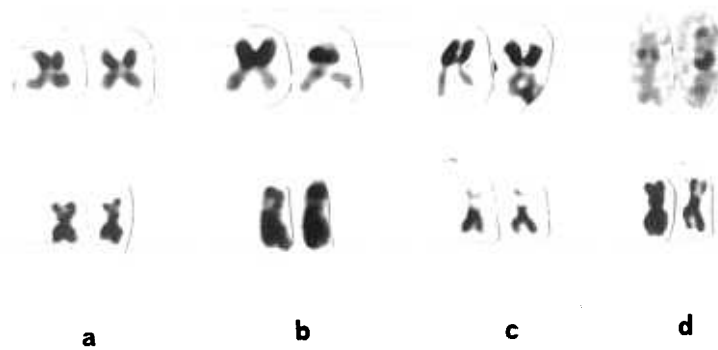


Figura 12: a-d) Región organizadora nucleolar teñida con nitrato de plata (arriba) y con Giemsa (abajo). a) Región organizadora nucleolar normal. b) Región organizadora nucleolar duplicada en heterocigosis. c) Región organizadora nucleolar duplicada en el par de homólogos. d) Región organizadora nucleolar con diferente posición en el par de homólogos.

1.4. Tinción con cromomicina A3

El patrón de fluorescencia obtenido mediante esta tinción sólo permite la identificación de los pares cromosómicos 3, 11 y 15. En el par cromosómico 3 se observa una banda fluorescente en la región cromosómica correspondiente a la región organizadora nucleolar. Los pares 11 y 15 presentan diferencialmente teñido el brazo corto (Fig. 13) al igual que lo observado mediante la tinción de bandeado C. En Me I se observan bandas fluorescentes en tres bivalentes, que podrían corresponders a dichos pares. Por otra parte, también parecen observarse bandas tenues en las regiones centroméricas de algunos pares cromosómicos.

Los núcleos en interfase teñidos con cromomicina A3 mostraron siempre dos nucleolos, lo que está de acuerdo con la existencia de un único par cromosómico organizador nucleolar.

Los resultados obtenidos con cromomicina A3 están de acuerdo con los de tinción argéntica en cuanto a las diferencias de tamaño de la región organizadora nucleolar así como en lo que a su posición cromosómica respecta. Dado que la tinción con plata tiñe proteínas asociadas a dichas regiones, y este fenómeno se produce en aquellas zonas que han sido activas en la interfase previa, parte de las diferencias observadas en el tamaño de la región organizadora nucleolar mediante la tinción con plata podrían justificarse como diferencias funcionales. Sin embargo, las diferencias observadas con fluorescencia en el tamaño de dichas regiones sólo pueden ser estructurales, ya que esta técnica tiñe directamente el ADN.

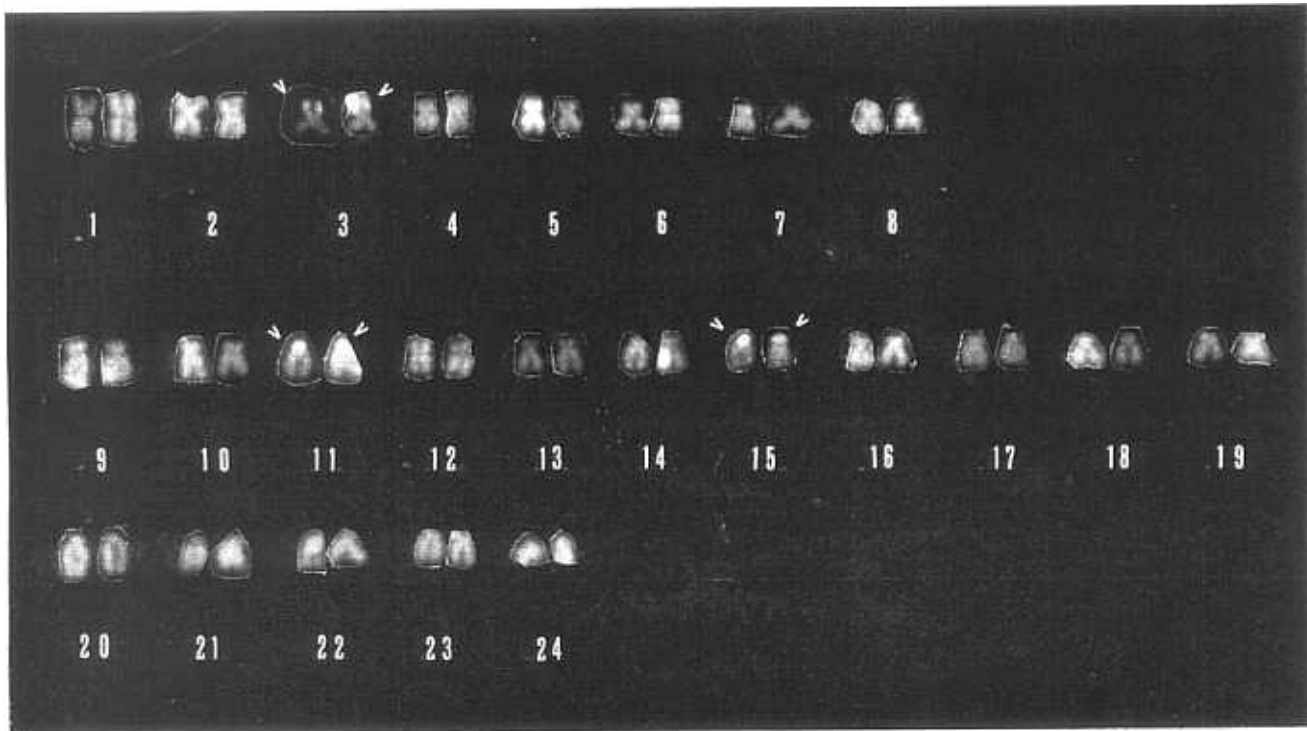


Figura 13 a) Cariotipo con bandeo de fluorescencia por tinción con cromomicina A3. Las flechas de los pares cromosómicos 3, 11 y 15 señalan las bandas fluorescentes.

2. ANÁLISIS DE CARACTERES BIOQUÍMICOS

2.1. INTERPRETACIÓN DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS

Se ha obtenido el patrón electroforético de los 16 sistemas enzimáticos siguientes: AAT, ACO, ACPH, ADH, HBDH, EST, α -GPDH, IDH, LDH, MDH, ME, PER, PGD, PGI, PGM y SOD.

Con los sistemas tampón probados (Ridway, Poulik, e Histidina) se obtuvieron buenos resultados en Poulik para las enzimas: ACPH, AAT, EST, α -GPDH, PER, PGI, PGM y SOD; en Histidina para ACO, ADH, HBDH, IDH, LDH, MDH y PGD y en Ridway para ME.

A continuación se describen los patrones obtenidos para cada sistema enzimático analizado, agrupados en función de su estructura cuaternaria en enzimas monoméricas, diméricas y tetraméricas.

2.1.1. Enzimas monoméricas

2.1.1.1. Aconitasa (ACO), 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa (HBDH) y fosfoglucomutasa (PGM).

Estas tres enzimas presentan dos bandas anódicas que llamaremos: ACO-1 y ACO-2 para aconitasa, HBDH-1 y HBDH-2 para 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa y PGM-1 y PGM-2 para fosfoglucomutasa (Fig. 14).

Las enzimas aconitasa y 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa se han detectado exclusivamente en hígado (la aconitasa sólo fue examinada en hígado, músculo y ojo). Las dos bandas que constituyen el patrón de ambas enzimas están presentes en todos los individuos analizados.

Las isoenzimas de PGM se observan en todos los extractos, aunque su actividad enzimática no es la misma en todos ellos, como puede apreciarse en la Figura 14. En hígado,

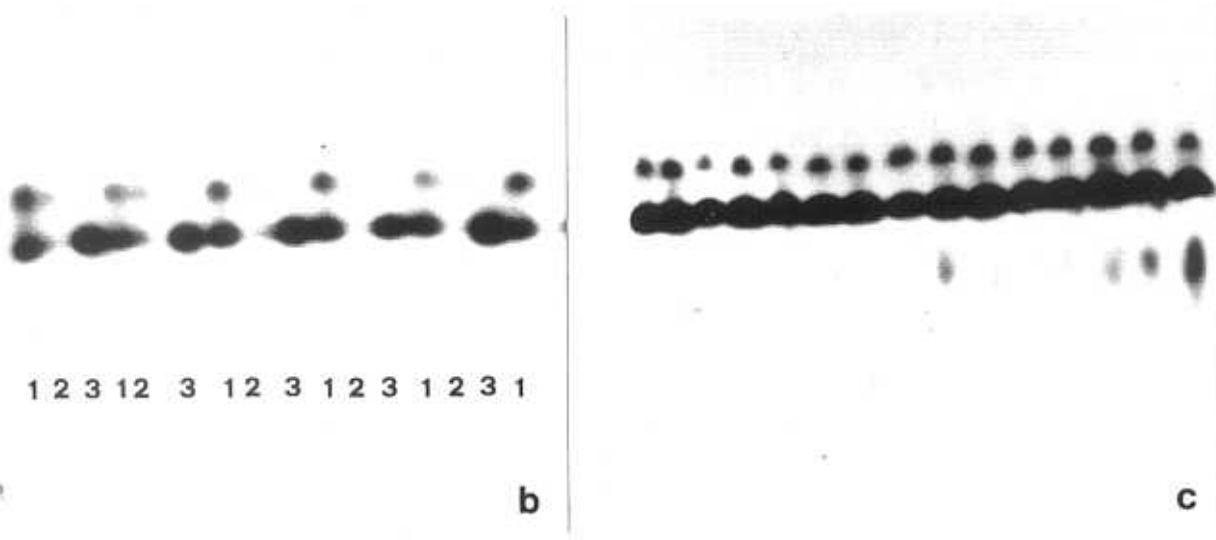
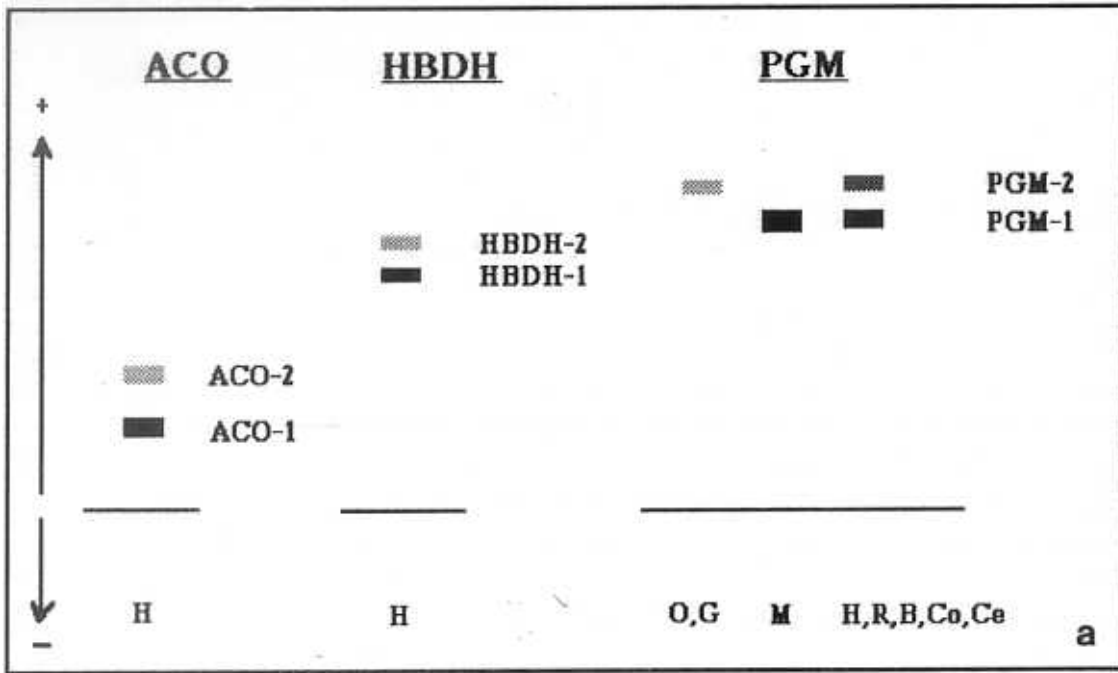


Figura 14: a) Patrón electroforético de aconitasa (ACO), 3-hidroxi-butirato deshidrogenasa (HBDH) y fosfoglucomutasa (PGM). O: ojo, H: hígado, M: músculo, R: riñón, B: bazo, Co: corazón, Ce: cerebro, G: gónada. b) Electroforesis de fosfoglucomutasa de: 1: hígado; 2: ojo; 3: músculo. c) Electroforesis de corazón de fosfoglucomutasa.

riñón, bazo, corazón y cerebro se observan las dos bandas, PGM-1 y PGM-2. En ojo y gónada sólo la de mayor migración, PGM-2, y en el músculo la de menor migración, PGM-1. Este patrón resultó idéntico en todos los individuos analizados.

Para estas tres enzimas, las dos bandas presentes en todos los individuos no son el producto de un solo locus, ya que esto implicaría que todos los individuos fueran heterocigotos, hecho que parece muy improbable ya que esta situación se observa en todas las poblaciones analizadas. Por ello, se postula que cada banda sería el producto de, al menos, un solo locus monomórfico; es decir, las bandas ACO-1 y ACO-2 serían el producto de los loci A_{co-1} y A_{co-2} , respectivamente; las bandas HBDH-1 y HBDH-2 lo serían de los loci H_{bdh-1} y H_{bdh-2} , y los loci P_{gm-1} y P_{gm-2} controlarían las isoenzimas PGM-1 y PGM-2, respectivamente. A veces aparecen unas bandas adicionales para la enzima fosfogluco mutasa que corresponden a modificaciones postranscripcionales de las bandas PGM-1 y PGM-2, al igual que se ha descrito en *Salvelinus alpinus* (Andersson et al., 1981).

Estos resultados no permiten saber con certeza cuál es la estructura cuaternaria de ninguno de los sistemas isoenzimáticos mencionados. Sin embargo, proponemos la estructura monomérica de estas enzimas de acuerdo con la mayoría de los datos procedentes de otras especies piscícolas, tanto de ciprínidos como de teleósteos en general (Allendorf et al., 1977; Ferris y Whitt, 1977a; Buth, 1983; Andersson et al., 1983; Buth, 1984; Woods y Buth, 1984; Rainboth et al., 1986; Crabtree y Buth, 1987; Machordom, 1992). Los resultados obtenidos en estos trabajos en cuanto al número de loci que controlan los sistemas isoenzimáticos analizados coinciden con los aquí descritos.

La aconitasa es la única enzima, de las tres comentadas hasta ahora, que no ofrece una buena resolución para ser estudiada en el análisis poblacional. En el caso de las enzimas HBDH y PGM se estudiaron todos los loci.

2.1.1.2. Esterasas (EST)

En el patrón electroforético de esta enzima se pueden diferenciar cinco zonas anódicas, denominadas I, II, III, IV y V, en las que se observan, como mínimo, diez bandas (Figs. 15 y 16).

Las zonas I, III y V están representadas por las bandas invariables EST-1, EST-5 y EST-10, respectivamente. Estas bandas estarían controladas, como mínimo, por un locus cada una ($Est-1$, $Est-5$ y $Est-10$). Los dos primeros loci se expresan en todos los extractos analizados, mientras que el locus $Est-10$ no es activo en ojo ni riñón.

La zona II no siempre se resuelve con claridad, pero se puede decir que al menos se observan tres bandas diferentes. La banda EST-2, que estaría controlada por el locus $Est-2$, se detecta en riñón y bazo. El control genético de las bandas EST-3 y EST-4, que se observan en hígado, riñón y bazo, correspondería a los loci $Est-3$ y $Est-4$.

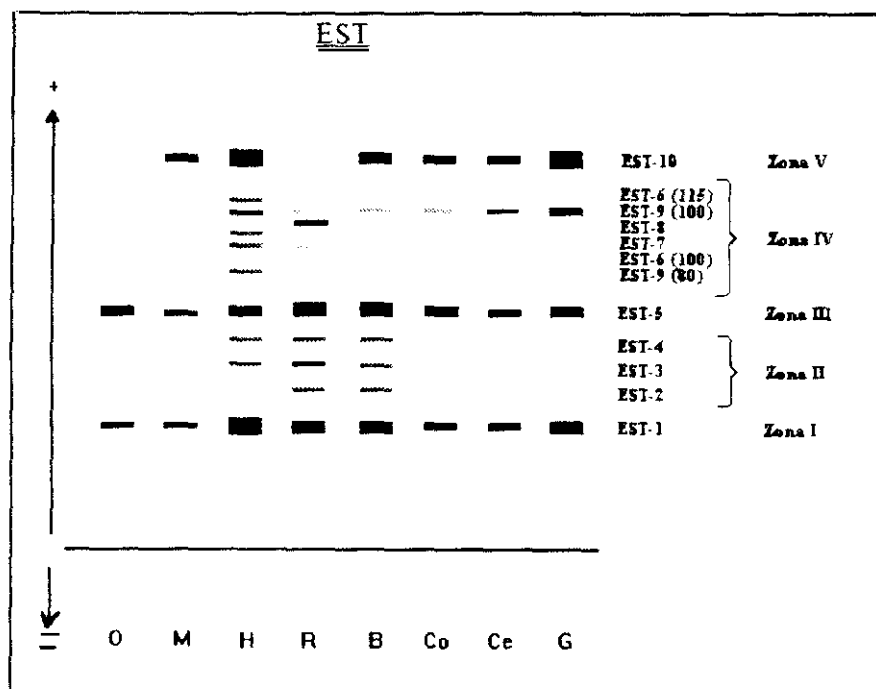


Figura 15: Patrón electroforético de esterazas (EST). O: ojo, M: músculo, H: hígado, R: riñón, B: bazo, Co: corazón, Ce: cerebro, G: gónada.

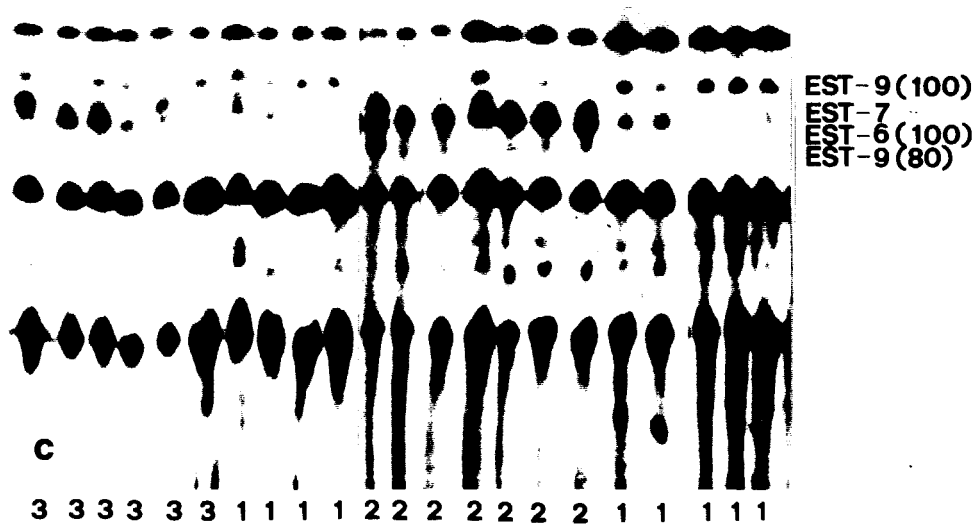
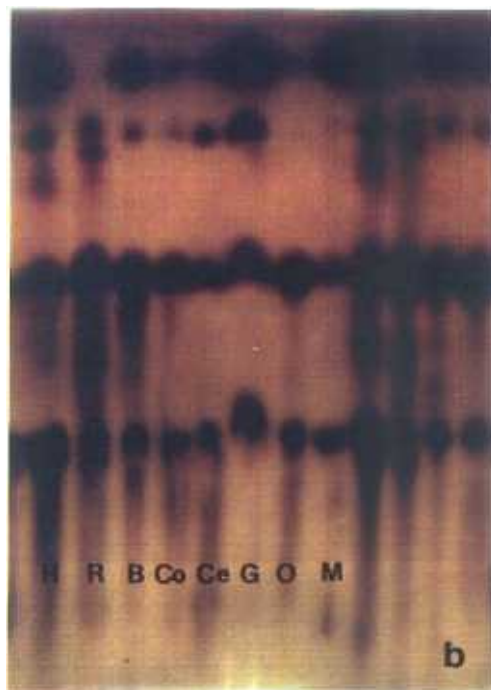
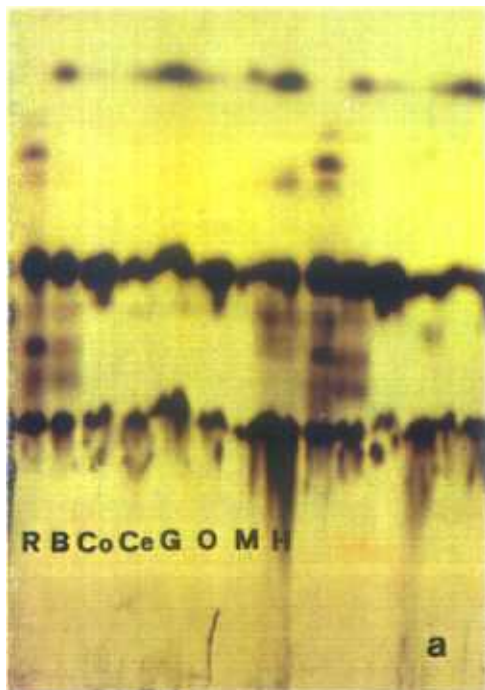


Figura 16: Electroforesis de esterazas. a) Zonas I, II y III. b) Zonas III, IV, V c) Zona IV analizada en hígado de diferentes poblaciones. 1: "Vega del Guadiana", 2: "La Generala", 3: "Oropesa". O: ojo; M: músculo; H: hígado, R: riñón; B: bazo; Co: corazón; Ce: cerebro; G: gónada.

La zona IV de esterasas presenta seis bandas, una de las cuales es exclusiva de riñón (EST-8), mientras que el resto se observa preferentemente en hígado (Figs. 15 y 16). Esta zona, analizada a nivel poblacional en hígado, resultó ser variable (Fig. 16c). La variabilidad detectada se basa principalmente en la presencia o ausencia de bandas. No aparecen formas heterodiméricas entre las mismas, por lo que su estructura cuaternaria sería monomérica, coincidiendo con lo señalado en otras familias de peces tales como ciprínidos (Machordom, 1992) y salmónidos (Andersson et al., 1983).

El control genético de la zona IV en la que en hígado se han llegado a observar las cinco bandas simultáneamente, requiere como mínimo la existencia de tres loci, pero dado que puede haber alelos nulos y se carece de cruzamientos que permitan dilucidar claramente cuál es el número de loci implicados, vamos a considerar la posible existencia de tres, cuatro, o cinco loci. Además, en el capítulo correspondiente a los análisis de variabilidad poblacional se hará un estudio de la frecuencia de aparición de dichas bandas, sin asignarles ningún tipo de control genético.

a) Tres loci codifican para la zona IV de esterasas en hígado.

El número mínimo de loci que explican la existencia simultánea de cinco bandas, suponiendo una estructura cuaternaria monomérica, es tres. Para determinar qué isoenzimas podrían estar codificadas por alelos del mismo locus, se analizaron todas las posibles combinaciones posibles de las cinco bandas tomadas de dos en dos. De estas combinaciones se rechazaron aquellas que mostraban en todas las poblaciones un exceso muy significativo de heterocigotos, ya que para explicarlas habría que considerar que en todas las poblaciones hay una mayor frecuencia de cruzamientos entre machos homocigóticos para un alelo y hembras homocigóticas para el otro y, por lo tanto, no existiría panmixia.

Además, en la elección de qué bandas podrían estar controladas por el mismo locus se supuso que los loci sólo tienen dos alelos, bien los dos activos, o bien uno activo y otro nulo debido a que:

- no pueden existir loci con tres alelos activos, ya que se han observado individuos con todas las combinaciones posibles de tres bandas.

- en las combinaciones analizadas que podían ser explicadas por el control de un locus con dos alelos activos y uno nulo, se ha observado que las intensidades relativas observadas entre las bandas no se corresponden con las esperadas para isoenzimas controladas por alelos de un mismo locus.

- aquellas combinaciones explicables por la existencia de un locus con dos alelos activos y uno nulo, el más frecuente, y en muchas poblaciones el único, sería el nulo.

De acuerdo con estos supuestos, la explicación más factible para el control genético de esta zona sería la siguiente: El locus *Est-6* tendría dos alelos activos, *Est-6 (100)* y *Est-6 (115)*, que codificarían para las isoenzimas EST-6 (100) y EST-6 (115), respectivamente. Dicho locus se expresa preferentemente en hígado, aunque a veces también lo hace en riñón.

El locus *Est-7*, que se expresa únicamente en hígado, tendría un alelo activo y otro nulo, apareciendo sólo la banda EST-7. Por otra parte, el locus *Est-9* tendría dos alelos activos, *Est-9 (100)* y *Est-9 (80)*, que controlarían las bandas EST-9 (100) y EST-9 (80), respectivamente. Dicho locus se expresa en todos los extractos, salvo en ojo y músculo, y preferentemente en hígado, cerebro y gónada.

Las bandas EST-6 (115) y EST-9 (80) no se han observado en riñón probablemente debido a que los individuos en los que se analizó dicho órgano eran monomórficos para las bandas EST-6 (100) y EST-9 (100).

Aparte de estas bandas observadas en hígado, hay otra banda, EST-8, que se expresa exclusivamente en riñón de forma invariable, y que estaría codificada por el locus *Est-8*.

La nomenclatura establecida en esta hipótesis es la que se va a mantener en las hipótesis siguientes con la única intención de no complicar la comprensión del patrón electroforético de esterasas.

b) Cuatro loci codifican para la zona IV de esterasas en hígado.

En el caso de ser cuatro loci, se mantendría el locus $Est-9$ con dos alelos activos, a los que llamaremos al igual que en el caso anterior, $Est-9(100)$ y $Est-9(80)$, que controlarían las isoenzimas EST-9 (100) y EST-9 (80). El locus $Est-7$ tendría igualmente un alelo activo y otro nulo, según los mismos supuestos de la hipótesis anterior.

En el caso de las bandas EST-6 (100) y EST-6 (115), que en la hipótesis anterior se habían considerado como la expresión de dos alelos del locus $Est-6$, ahora pasarían a ser la expresión de dos alelos pertenecientes a dos loci distintos, que además tendrían un alelo nulo cada uno, denominándose los nuevos $Est-6(100)$ y $Est-6(115)$.

En esta hipótesis se ha desdoblado el locus $Est-6$ y no $Est-9$ debido a que la alta frecuencia del alelo $Est-9(80)$ en algunas poblaciones nos permite observar que las bandas que hemos asignado a este locus presentan el comportamiento típico de una enzima monómera con dos alelos. Esto no se observa tan claramente en el caso del locus $Est-6$ ya que la banda EST-6 (115) es muy poco frecuente mientras que EST-6 (100) está en todos los individuos analizados.

c) Cinco loci codifican para la zona IV de esterasas en hígado.

En el caso de considerar cinco loci, todos tendrían un alelo activo y otro nulo. En este caso llamaremos a los loci: $Est-6(100)$, $Est-6(115)$, $Est-7$, $Est-9(100)$ y $Est-9(80)$ que controlarían las bandas EST-6 (100), EST-6 (115), EST-7, EST-9 (100) y EST-9 (80), respectivamente.

Para el análisis de variación genética poblacional se empleó el hígado por ser el órgano que presenta mayor número de bandas. No se tuvieron en cuenta las bandas correspondientes a la zona II ya que no siempre aparecen con nitidez. En el caso de la zona IV el análisis de la variabilidad genética se hizo de acuerdo con las cuatro situaciones anteriormente señaladas.

2.1.1.3. Peroxidasas (PER)

Esta enzima, analizada en todos los extractos, es activa en corazón, ojo, bazo, músculo, hígado y riñón. Salvo en el corazón, la actividad observada en todos los demás tejidos es baja.

En corazón se observan claramente seis bandas (Fig. 17) que están, probablemente, controladas por al menos seis loci ya que: todas ellas son invariables, ninguna de ellas parecen ser el resultado de la combinación dimérica de cadenas polipeptídicas codificadas por alelos de distintos loci y además, los datos descritos previamente sobre esta enzima señalan una clara estructura monomérica de la misma (García et al., 1982).

Estas bandas (PER-1, PER-2, PER-3, PER-4, PER-5 y PER-6) estarían codificadas por los loci *Per-1*, *Per-2*, *Per-3*, *Per-4*, *Per-5* y *Per-6*.

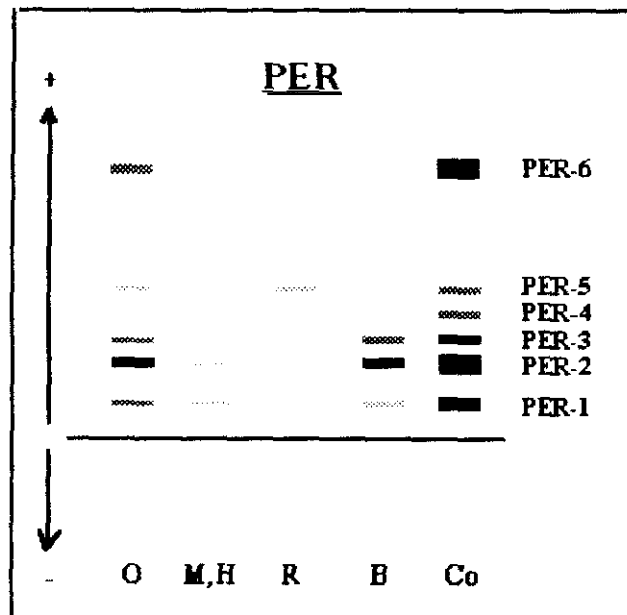


Figura 17: Patrón electroforético de peroxidasas (PER). O: ojo, M: músculo, H: hígado; R: riñón; B: Bazo, Co: corazón.

2.1.2. Enzimas diméricas

2.1.2.1. Aspartato amino transferasa (AAT)

La enzima AAT muestra dos zonas de actividad, una catódica o zona I y otra anódica o zona II (Fig. 18), al igual que lo descrito en otros ciprinidos tales como *Nettiona steinitz*, *Labeo rohita* y *Tilapia zilli*, en los que se relacionan las zonas catódicas y anódicas con las fracciones subcelulares citosólicas y mitocondriales, respectivamente (Ferris y Whitt, 1977a, Woods y Buth, 1984).

La zona de actividad catódica se expresa en todos los tejidos y órganos, pero debido a que no se obtuvo una correcta resolución no se analizó en este trabajo, aunque se puede decir que al menos hay una banda (AAT-1) controlada como mínimo por un locus, *aat-1* (Fig. 18).

La zona anódica presenta un patrón invariable constituido por tres bandas en músculo e hígado. También se observa una débil actividad en riñón y cerebro (Fig. 18).

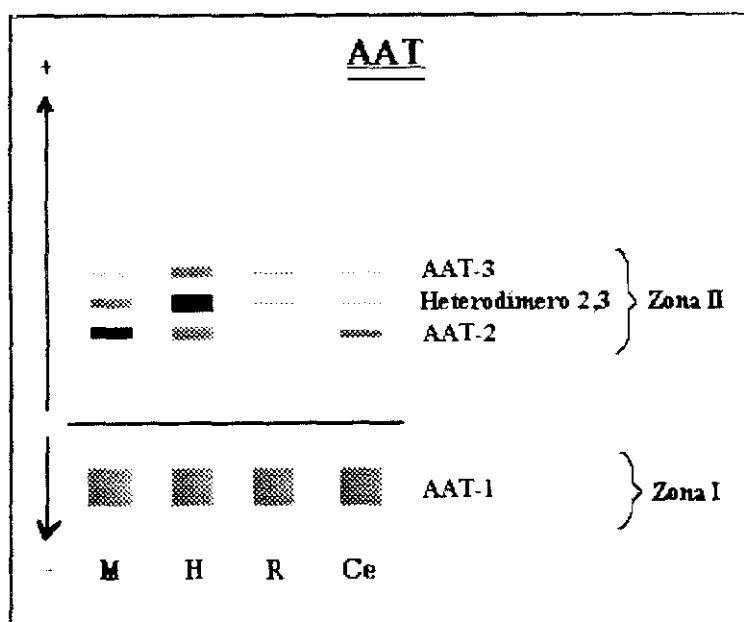


Figura 18: Patrón electroforético de aspartato amino transferasa (AAT). M: músculo, H: hígado; R: riñón; Ce: cerebro.

En músculo y cerebro se observa que las tres bandas presentan diferentes intensidades entre sí, siendo la más intensa la situada más cerca de la inserción (banda AAT-2), y la menos intensa la más alejada de la misma (banda AAT-3). El riñón presenta un patrón similar al anterior, pero con las intensidades distribuidas de manera inversa a la anteriormente descrita. En el hígado, la mayor intensidad corresponde a la banda central, siendo el doble que la de las bandas extremas (Fig. 18). El patrón obtenido para los diferentes extractos se mantiene constante en todos los individuos analizados.

Debido a los diferentes patrones de intensidades observados en esta zona anódica en los distintos extractos analizados, el control génico más probable correspondería a la expresión de dos loci monomórficos, *Aat-2* y *Aat-3*, que codificarán para dos cadenas polipeptídicas distintas las cuales se asociarían al azar para formar dímeros, siendo las bandas AAT-2 y AAT-3 homodímeros y la banda intermedia un heterodímero formado por dichas cadenas polipeptídicas (Fig. 18). También podría pensarse que fuera una enzima monomérica, en cuyo caso esta zona estaría controlada por tres loci, pero esto es poco probable debido a que tanto las intensidades relativas de las bandas como los datos existentes al respecto en otras especies de teleósteos, confirman la estructura dimérica de ésta enzima (Ferris y Whitt, 1977a, b, c; Buth, 1979; Woods y Buth, 1984).

2.1.2.2. Fosfatasas ácidas (ACPH)

Las fosfatasas ácidas (ACPH) fueron analizadas en ojo, músculo e hígado. El ojo mostró, al igual que el patrón de la enzima AAT en hígado, tres bandas anódicas equidistantes, siendo la central de una intensidad superior a las dos extremas, que eran iguales. El hígado sólo mostró la banda de mayor migración, mientras que el músculo no presentó una actividad clara para esta enzima (Fig. 19).

Este patrón, que se mantiene de forma constante para todos los extractos en todos los individuos analizados, se puede explicar, al igual que en el caso de la enzima AAT, como el resultado de la actividad de una enzima dimérica. En el ojo se expresarían dos loci: *AcpH-1*

y $\delta\beta-1$, los cuales codificarían para las cadenas polipeptídicas que dan lugar a los homodímeros ACPH-1 y ACPH-2, respectivamente; correspondiendo la banda intermedia a la forma heterodimérica. En cambio, en el hígado sólo se expresaría el locus $\delta\beta-2$. Esta enzima ha sido también señalada como dimérica en otros ciprínidos (Ferris y Whitt, 1977a, b; Buth y Burr, 1978; Crabtree y Buth, 1981), en los que se ha observado un solo locus.

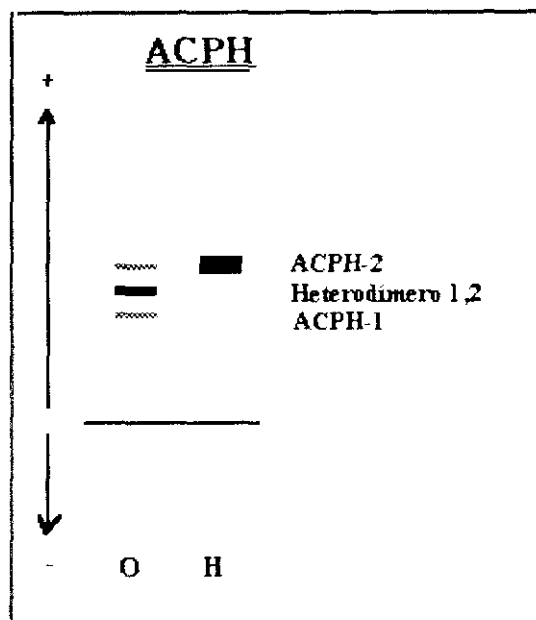


Figura 19: Patrón enzimático de fosfatasas ácidas (ACPH). O: ojo; H: hígado.

Estos dos sistemas isoenzimáticos, AAT y ACPH, no se consideraron adecuados para los análisis de variación genética poblacional ya que, al ser muy lábiles, se ven frecuentemente afectados por la congelación del material para su conservación, procedimiento que causa su inactivación.

2.1.2.3. Alcohol deshidrogenasa (ADH)

La enzima ADH se ha detectado sólo en hígado, presentando una zona catódica, zona I, y otra anódica, zona II. En la zona catódica se observa una banda invariable, ADH-1, que estaría controlada como mínimo por un locus monomórfico llamado *Adh-1* (Fig. 20).

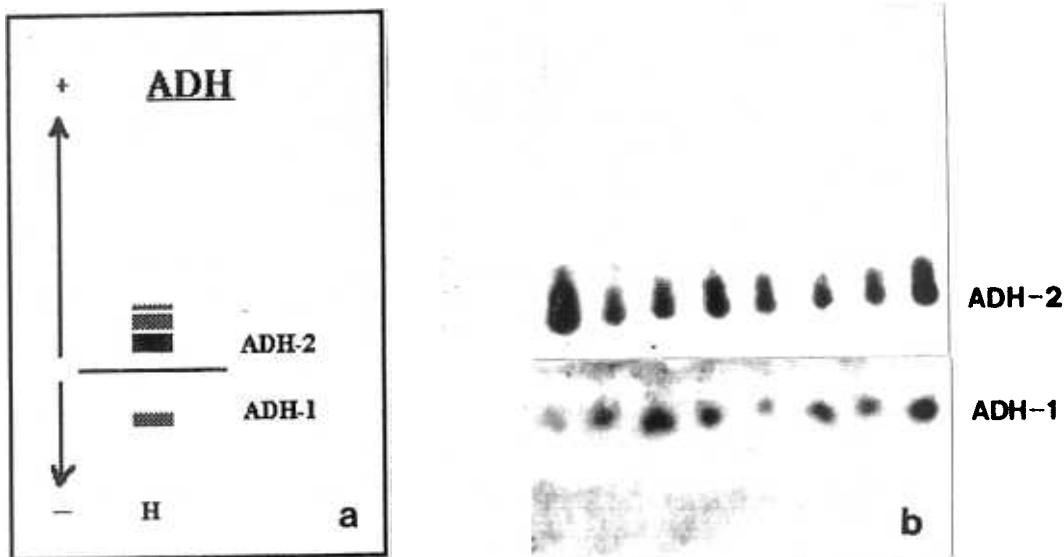


Figura 20: a) Patrón electroforético de la alcohol deshidrogenasa (ADH), b) Electroforesis de hígado. H: hígado

En la zona anódica se observa una banda invariable, ADH-2. Un locus monomórfico, *Adh-2*, explicaría su control genético (Fig. 20). Acompañando a esta banda aparecen frecuentemente una o dos bandas adicionales que podrían ser modificaciones postranscripcionales o postraduccionales de la banda ADH-2 (Fig. 20), ya que no siempre se observa el mismo número de bandas adicionales, pudiendo aparecer dos, una o ninguna. También podrían ser el resultado de la expresión de un tercer locus, normalmente muy poco activo. En este caso, las tres bandas anódicas corresponderían a un fenotipo dimérico, con expresión diferencial de los dos loci y formación del heterodímero. Dado que con los datos obtenidos no se puede aseverar la existencia de este tercer locus, consideraremos que el

patrón isoenzimático encontrado proviene de la expresión de dos loci. En otros ciprínidos se ha observado actividad exclusivamente para un locus (Ferris y Whitt, 1977a, b; Buth, 1979; Woods y Buth, 1984) lo que nos hace suponer que seguramente esta enzima esté codificada como máximo por los dos loci descritos.

Con los resultados obtenidos para esta enzima, no es posible establecer su estructura cuaternaria, si bien numerosos estudios realizados en otras especies, entre los que se incluyen los arriba mencionados, sugieren una estructura dimerica de la misma.

Sólo se ha considerado adecuada para el análisis poblacional la isoenzima ADH-2, ya que la ADH-1 presenta muy poca actividad y no siempre es detectable.

2.1.2.4. Isocitrato deshidrogenasa (IDH)

La isoenzima IDH sólo ha mostrado una clara actividad en corazón e hígado. En corazón se observa la zona I de actividad y en hígado la zona II. Estas zonas pueden corresponder a la forma citosólica y mitocondrial del sistema enzimático, tal y como han señalado algunos autores en otras especies piscícolas (Ferris y Whitt, 1977a, b, c; Woods y Buth, 1984; Crabtree y Buth, 1987) (Fig. 21).

En el corazón se observa una banda anódica, IDH-1, normalmente asociada a una, dos y hasta tres bandas adicionales (Fig. 21a, b), al igual que ocurría en el patrón electroforético de hígado para la isoenzima ADH-2, por lo que podrían ser modificaciones postranscripcionales o postraduccionales de dicha banda IDH-1. El patrón podría explicarse por la existencia de al menos un locus monomórfico, *Idh-1*.

En el hígado se observan, en la zona II, tres bandas anódicas equidistantes, de mayor migración que la banda IDH-1, y con distintas intensidades, de tal forma que la banda intermedia presenta una intensidad doble que la de las bandas extremas (Fig. 21a). Este patrón se puede explicar por el control genético de dos loci monomórficos, *Idh-2* e *Idh-3*, que codificarían para las cadenas polipeptídicas que conforman las bandas homodiméricas IDH-2 e IDH-3, respectivamente, mientras que la banda de migración intermedia entre estas

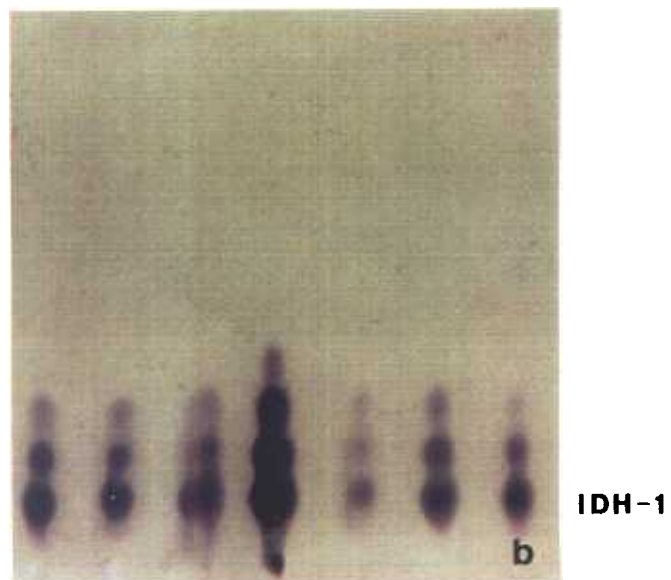
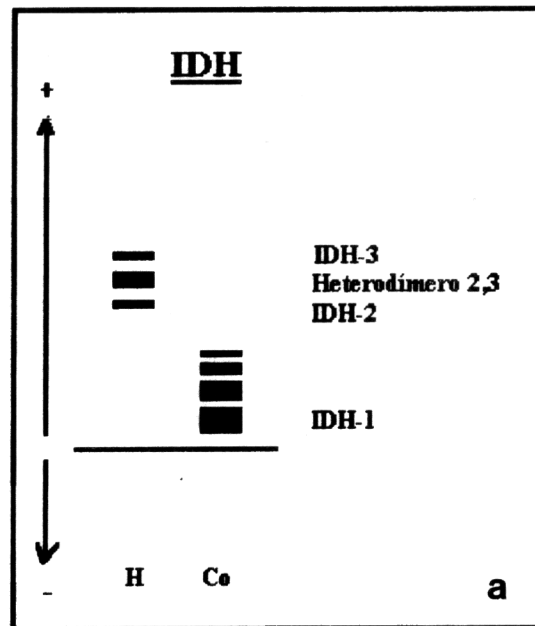


Figura 21: a) Patrón electroforético de isocitrato deshidrogenasa (IDH). b) Electroforesis de corazón. Co: corazón, H: hígado.

dos sería el heterodímero correspondiente. Este patrón apoya la estructura dimerica de la enzima descrita en otros ciprinidos (Woods y Buth, 1984) en los que se ha detectado la actividad de dos loci

2.1.2.5. α -Glicerofosfato deshidrogenasa (α -GPDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGD)

La enzima α -GPDH mostró actividad en músculo presentando una banda de migración anódica, que estaría controlada por el locus α -*gab*⁻¹, con un solo alelo ya que su patrón fue invariable en todos los individuos analizados (Fig. 22). Esta banda aparece generalmente acompañada de otras dos, que probablemente corresponden a modificaciones postranscripcionales, al igual que en el caso de la enzima ADH.

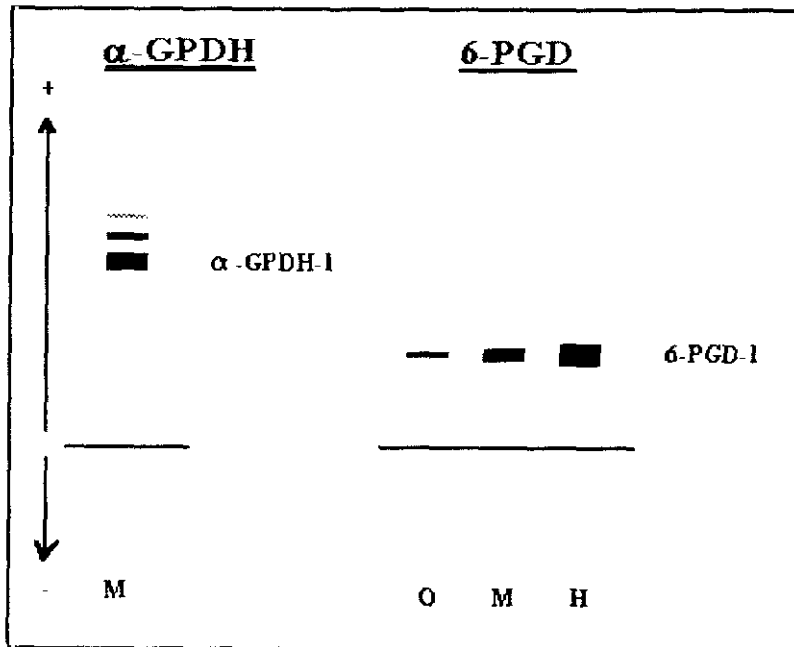


Figura 22: Patrón electroforético de α -glicerofosfato deshidrogenasa (α -GPDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGD). O: ojo, M: músculo, H: hígado.

La enzima PGD ha sido estudiada exclusivamente en ojo, músculo, hígado y riñón. En todos los extractos excepto en el de riñón, que no mostró ninguna actividad, apareció únicamente una banda anódica, PGD-1, con mayor actividad en el hígado (Fig. 22). Siguiendo la pauta marcada por Allendorf et al. (1977), este patrón invariable es explicable por un solo locus monomórfico, *Pgd-1*.

Los resultados obtenidos no ponen de manifiesto la estructura cuaternaria de estas enzimas, las cuales serían diméricas de acuerdo con lo observado en otros ciprínidos, en los que también se ha descrito la existencia de un solo locus para cada una de ellas (Ferris y Whitt, 1977a, b; Buth, 1983; Woods y Buth, 1984; Machordom, 1992).

2.1.2.6. Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima SOD, al igual que las enzimas ADH en hígado e IDH en corazón, se expresa en todos los tejidos como una banda invariable, que puede presentar asociadas otras tenues, que probablemente son modificaciones postranscripcionales o postraduccionales. Esta banda, a la que llamaremos SOD-1, estará controlada por al menos un locus monomórfico, *Sod-1* (Fig. 23).

Además, en músculo y a veces también en riñón parece observarse al menos otra banda adicional, SOD-2, que nos permite considerar la existencia de un segundo locus, *Sod-2*, aunque no se obtuviera una buena resolución para la misma.

La estructura cuaternaria dimérica de esta enzima ha sido descrita previamente en otras especies de teleósteos (Allendorf et al., 1977; Ferris y Whitt, 1977 a ,b, c; Buth, 1979; Woods y Buth, 1984; Machordom, 1992). Según lo descrito en otros ciprínidos, existen dos loci que controlan una forma citosólica que se observa en todos los tejidos y otra mitocondrial, exclusiva de músculo, que podrían corresponder a las bandas SOD-1 y SOD-2, respectivamente.

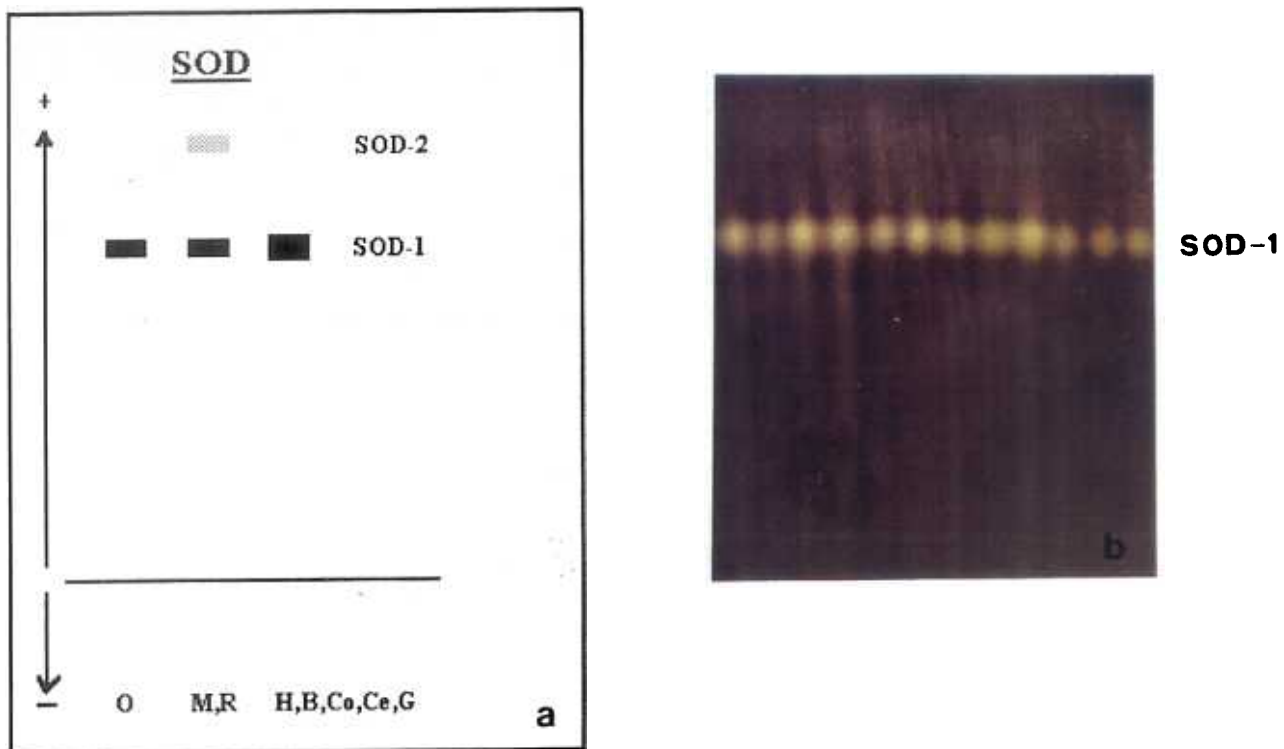


Figura 23: a) Patrón electroforético de superóxido dismutasa (SOD). b) Electroforesis de corazón. O: ojo, M: músculo, H: hígado, R: riñón, B: bazo, Co: corazón, Ce: cerebro, G: gónada.

2.1.2.7. Fosfoglucoasa isomerasa (PGI)

En este sistema isoenzimático se diferencian tres zonas de actividad, una catódica y dos anódicas (Fig. 24). El patrón de bandas observado para la zona catódica y la anódica de menor migración es similar: en ambas zonas se expresan una (músculo), dos (ojo) o tres (corazón) bandas invariables, que consideramos como una banda y sus modificaciones postranscripcionales al igual que ocurría para IDH y ADH. La tercera zona, de mayor migración, se manifiesta como una banda muy intensa en todos los tejidos (Fig. 24).

Dado que la zona de migración anódica lenta presenta una migración intermedia entre la catódica y la anódica rápida, creemos que la explicación más lógica de este patrón sería

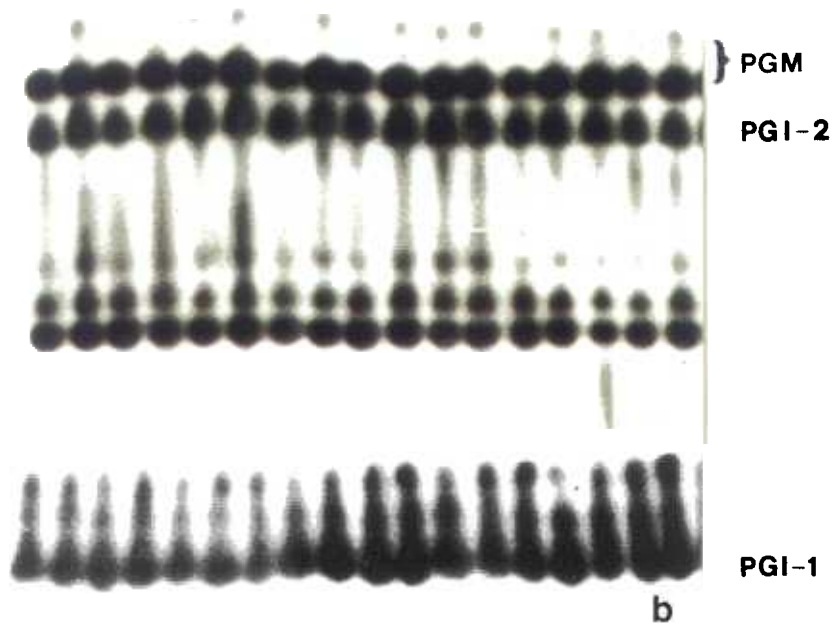
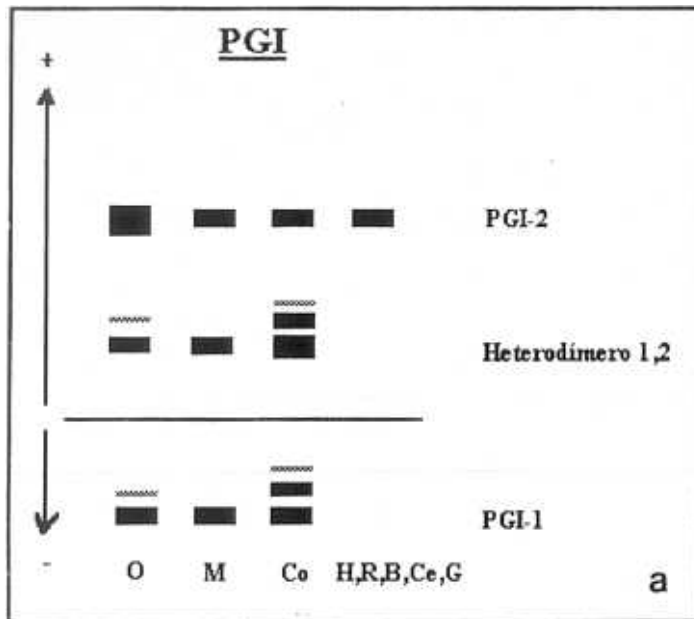


Figura 24: a) Patrón electroforético de fosfoglucoasa isomerasa (PGI). b) Electroforesis de corazón. O: ojo, M: músculo, H: hígado, R: riñón, B: bazo, Co: corazón, Ce: cerebro, G: gónada.

suponer la existencia de dos loci, P_{gi-1} y P_{gi-2} , que codificarían para las cadenas que forman las bandas PGI-1 y PGI-2. Esta explicación, que se corresponde con una enzima dimérica que forme heterodímeros entre las cadenas codificadas por diferentes loci, es la misma que se ha presentado en general para esta enzima en las otras especies de teleósteos analizadas, tales como ciprínidos (Ferris y Whitt, 1977a, b; Ferris et al., 1982; Buth, 1982; Machordom, 1992), catostómidos (Buth, 1979), cobítidos (Ferris y Whitt 1977c), salmónidos (Allendorf et al., 1977; Okazaki, 1986), etc.. Las bandas que acompañan a PGI-1 serían el resultado de modificaciones postranscripcionales o postraduccionales, y las bandas observadas en la zona de migración intermedia serían el resultado de la combinación heterodimérica de las cadenas codificadas por ambos loci y de sus modificaciones postranscripcionales (Fig. 24).

2.1.2.8 Mállico deshidrogenasa (MDH)

En esta enzima podemos diferenciar dos zonas de actividad anódica (zonas I y II) que se observan en todos los tejidos (Fig. 25).

La zona I está representada por una banda invariable, MDH-1, controlada por al menos un locus denominado $Mdh-1$. Esta banda invariable está siempre acompañada de otras bandas que corresponden a modificaciones postranscripcionales o postraduccionales de la misma (Fig. 25) al igual que lo descrito en barbos (Berrebi et al., 1988; Machordom, 1992).

En la zona II, si bien con poca resolución, se distinguen dos bandas muy juntas, MDH-2 y MDH-3. En ojo y corazón se observa casi exclusivamente la banda MDH-3, en músculo la banda MDH-2 y en el resto de los órganos las dos bandas. El control genético de esta zona correspondería a los loci $Mdh-2$ y $Mdh-3$ (Fig. 25). En esta zona, dado que las bandas MDH-2 y MDH-3 tienen una migración muy parecida, no es posible distinguir si se forman heterodímeros entre ellas.

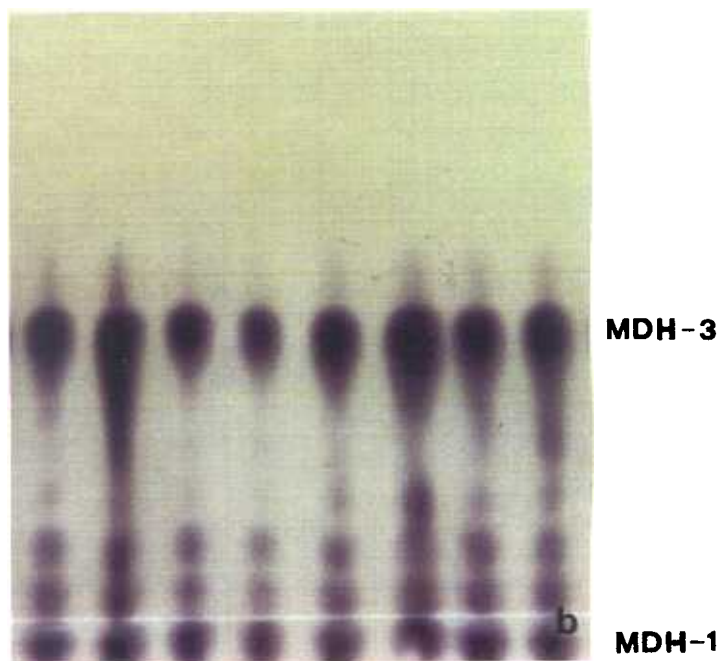
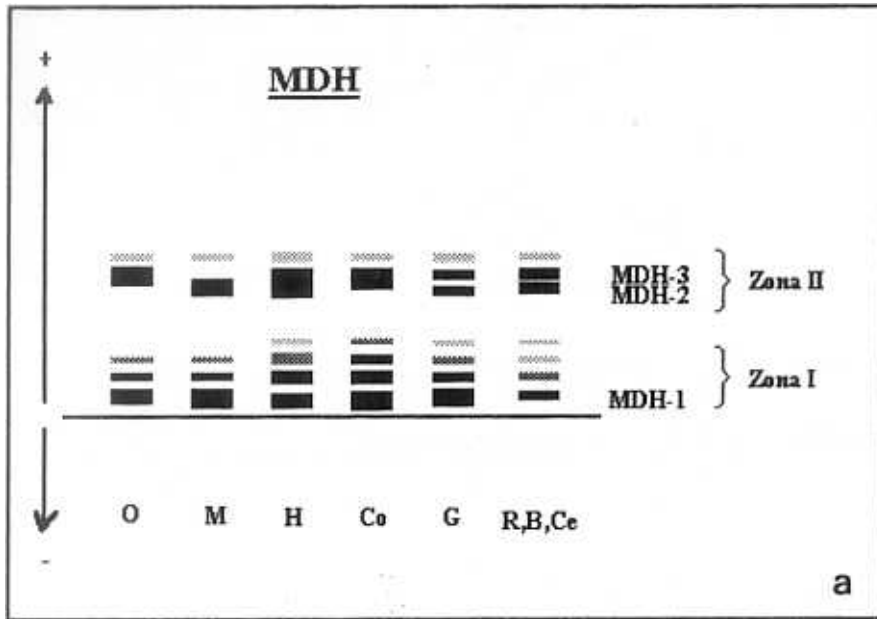


Figura 25: a) Patrón electroforético de la enzima málico deshidrogenasa (MDH). b) Electroforesis de corazón. O: Ojo; M: músculo; H: hígado; R: riñón; B: bazo; Co: corazón; Ce: cerebro; G: gónada.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, los cuales coinciden con los obtenidos para otras especies de ciprínidos (Ferris y Whitt, 1977a, b; Woods y Buth, 1984), no se puede conocer la estructura cuaternaria de esta enzima, aunque su estructura dimérica ha sido demostrada en otras especies piscícolas (Andersson et al., 1983; Rainboth et al., 1986; Berrebi et al., 1988, Machordom, 1992).

Para el análisis poblacional sólo se consideraron los loci *Mdh-1* y *Mdh-5* que son los que presentaban una mayor resolución electroforética en corazón (Fig. 25).

2.1.3. Enzimas tetraméricas

2.1.3.1. Láctico deshidrogenasa (LDH)

En esta enzima se observan dos zonas de actividad, una catódica (zona I) y otra anódica (Zona II) (Fig. 26). La zona I tiene una única banda que aparece sólo en músculo, y estaría controlada por el locus *Ldh-1*. En la zona II hay cinco formas isoenzimáticas anódicas invariables, que se observan en todos los tejidos pero con diferente intensidad (Figs. 26).

En el caso de esta enzima, hay trabajos en otras especies piscícolas que describen la existencia de tres loci y una estructura tetramérica de la enzima (Allendorf et al., 1977; Andersson et al., 1983; Heinonen, 1988; Brulé, 1989; Van der Bank et al., 1989; Renno et al., 1989). Dado que las cinco formas anódicas de la zona II se expresan en todos los tejidos con un patrón invariable para todos los individuos analizados, nosotros sugerimos que la enzima LDH de tenca es también tetramérica y que hay dos loci para la zona anódica: *Ldh-2* y *Ldh-3*. La combinación tetramérica de las mismas genera las cinco formas enzimáticas diferentes (Figs. 26)

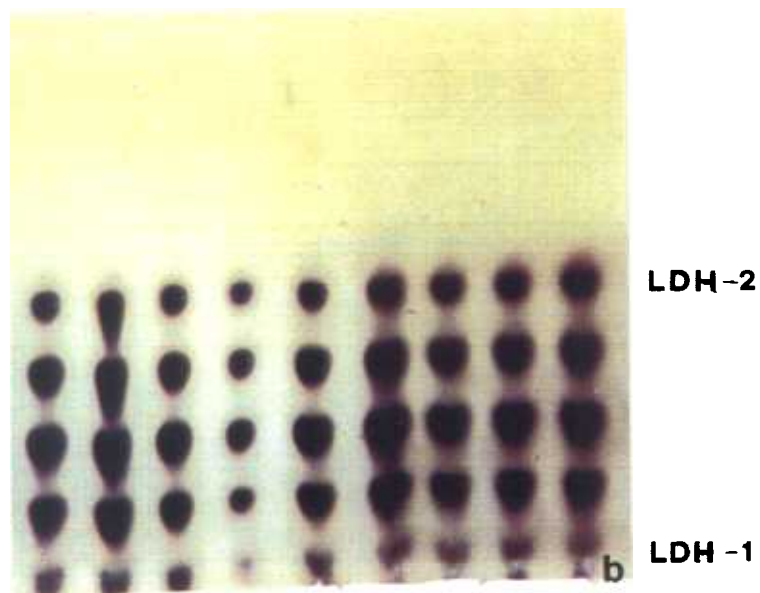
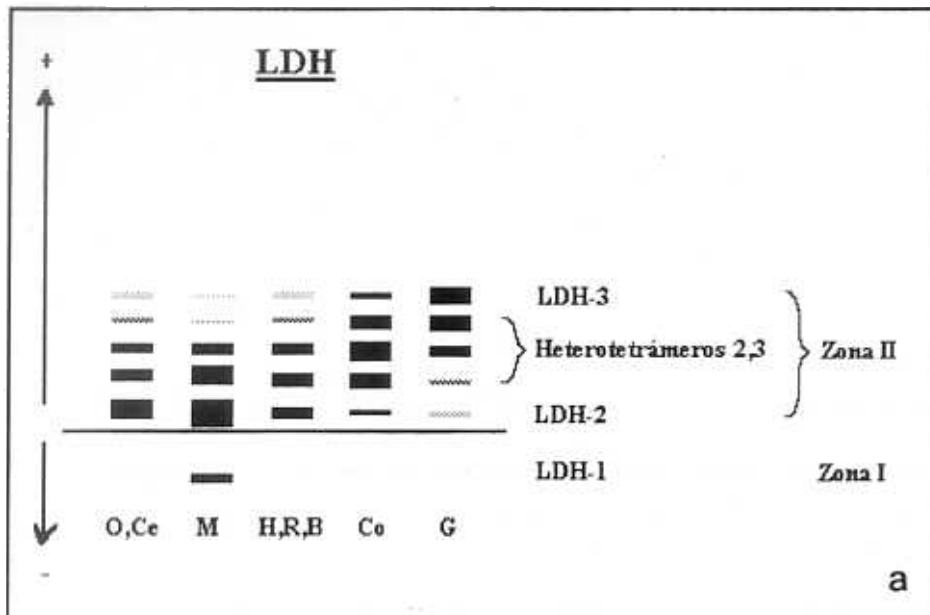


Figura 26: a) Patrón electroforético de láctico deshidrogenasa (LDH). b) Electroforesis de corazón de láctico deshidrogenasa. O:Ojo; M: músculo; H: hígado; R: riñón; B:bazo; Co: corazón; Ce: cerebro; G: gónada.

2.1.3.2. Enzima málica (ME)

Esta enzima sólo mostró buena resolución en ojo, músculo e hígado, observándose una sola banda, ME-1, en todos ellos, con mayor intensidad en el hígado (Fig. 27). De acuerdo con Allendorf et al. (1977), este patrón puede explicarse con un solo locus monomórfico, M_e^1 .

Al observarse una sola banda invariable, no se puede saber cuál es la estructura cuaternaria de esta enzima, que según numerosos autores sería tetramérica (Allendorf, 1977; Andersson et al., 1981, 1983; Renno et al., 1989; Shakle et al., 1990b). Para esta enzima se ha descrito la existencia de dos loci en otros ciprínidos (Woods y Buth, 1984).

Su empleo en el análisis poblacional no es recomendable debido a que este sistema isoenzimático no siempre se tiñe correctamente.

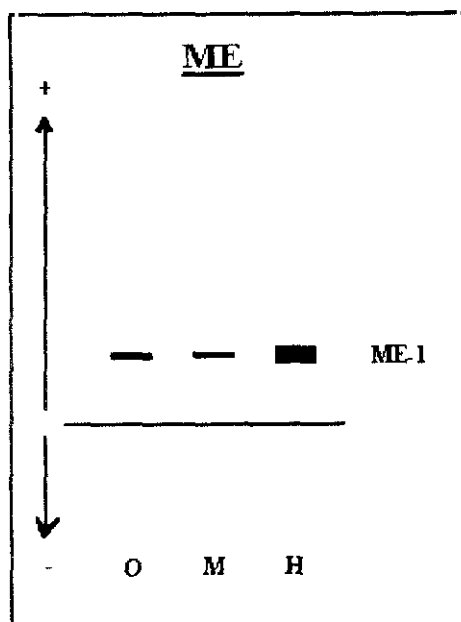


Figura 27: Patrón electroforético de ME. O: ojo, M: músculo, H: hígado

En la Tabla 10 se resumen los resultados establecidos para las distintas isoenzimas en cuanto a su estructura cuaternaria, control genético, tipo de migración (catódica o anódica) y tejidos u órganos en los que se expresan. También se indican aquellos loci que se han utilizado en los análisis poblacionales.

Tabla 10: Resultados electroforéticos de los diferentes sistemas isoenzimáticos.

| Enzima | Estructura | Locus | Migración | Tejidos | Utilizado en el análisis poblacional |
|---------------------------------|-------------|------------|------------|-------------------|--------------------------------------|
| AAT | Dimérica | 1 | C | O,M,H,R,B,Co,Ce,G | No |
| | | 2 | A | M,H,R, Ce | No |
| | | 3 | A | M,H,R, Ce | No |
| ACO | Monomérica | 1 | A | H | No |
| | | 2 | A | H | No |
| ACPH | Dimérica | 1 | A | O | No |
| | | 2 | A | O,H | No |
| ADH | Dimérica | 1 | C | H | No |
| | | 2 | A | H | Sí |
| HBDH | Monomérica | 1 | A | H | Sí |
| | | 2 | A | H | Sí |
| EST | Monomérica | 1 | A | O,M,H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| | | 2 | A | R,B | No |
| | | 3 | A | H,R,B | No |
| | | 4 | A | H,R,B | No |
| | | 5 | A | O,M,H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| | | 6 | A | H,R | Sí |
| | | 7 | A | H | Sí |
| | | 8 | A | R | No |
| | | 9 | A | H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| | | 10 | A | M,H,B,Co,Ce,G | Sí |
| α-GPDH | Dimérica | 1 | A | M | No |
| IDH | Dimérica | 1 | A | Co | Sí |
| | | 2 | A | H | No |
| | | 3 | A | H | No |
| LDH | Tetramérica | 1 | C | M | No |
| | | 2 | A | O,M,H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| MDH | Dimérica | 3 | A | O,M,H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| | | 1 | A | O,M,H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| | | 2 | A | M,H,R,B,Ce,G | No |
| ME | Tetramérica | 3 | A | O,H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| | | 1 | A | O,M,H | No |
| | | PER | Monomérica | 1 | A |
| 2 | A | O,M,H,B,Co | | Sí | |
| 3 | A | O,B,Co | | Sí | |
| 4 | A | B,Co | | Sí | |
| 5 | A | O,M,H,R,Co | | No | |
| 6 | A | O,Co | | Sí | |
| PGD | Dimérica | 1 | A | O,M,H | No |
| PGI | Dimérica | 1 | C | O,M,Co | Sí |
| | | 2 | A | O,M,H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| PGM | Monomérica | 1 | A | M,H,R,B,Co,Ce | Sí |
| | | 2 | A | O,H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| SOD | Dimérica | 1 | A | O,M,H,R,B,Co,Ce,G | Sí |
| | | 2 | A | M,R | No |

O: Ojo, M: Músculo, H: Hígado, R: Riñón, B: Bazo; Co: Corazón, Ce: Cerebro, G: Gónada.
A: anódica, C: catódica.

2.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ISOENZIMÁTICA INTRA E INTERPOBLACIONAL

2.2.1. Distribución de frecuencias genotípicas y génicas

El análisis de la variabilidad isoenzimática poblacional se realizó únicamente en muestras procedentes de hígado y corazón, ya que son las que presentan una mayor resolución y expresión enzimática. De los diez sistemas isoenzimáticos estudiados en el análisis poblacional (Tabla 10), sólo uno, el de esterasas, presentó variabilidad.

Como ya se indicó en el apartado correspondiente, la variabilidad se observó únicamente en la zona IV de esterasas. Las cinco bandas que aparecen en esta zona en hígado podrían ser el producto de la expresión de: a) tres loci dialélicos; b) cuatro loci, siendo uno de ellos monomórfico; c) cinco loci, de los cuales cuatro serían variables. En el caso de considerar la primera hipótesis, los loci analizados en total en el análisis poblacional serían 24. Si se considera la segunda hipótesis, se habrán analizado 25 y si se considera la tercera, 26 loci. Los análisis hechos en los casos anteriores fueron realizados también considerando la presencia o ausencia de las bandas de la zona IV de esterasas, sin tener en cuenta el control genético de las mismas. Los resultados obtenidos no se expondrán en este trabajo ya que son muy similares a los de cinco loci y las diferencias que se han observado se deben exclusivamente al tratamiento matemático de los datos.

A continuación se describen los resultados obtenidos según la hipótesis consideradas en cada caso.

a) Tres loci dialélicos:

En las Tablas 11 y 12 se muestran las frecuencias fenotípicas y génicas de los loci *Est-6*, *Est-7* y *Est-9*, en las distintas poblaciones analizadas. En el caso del locus *Est-7*, no se pueden diferenciar los heterocigotos de los homocigotos para el alelo activo, por lo que las frecuencias se estiman suponiendo la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg. Todas las poblaciones estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus *Est-9*, ya que la prueba

de χ^2 realizada no mostró diferencias significativas en ningún caso. En el caso del locus *Est 6*, esta prueba no se pudo realizar ya que en todas las poblaciones se obtenían valores esperados inferiores a 5.

b) Cuatro loci, uno de ellos monomórfico:

En este caso, como ya se indicó anteriormente, el locus *Est 6* es el que se modifica, de tal forma que ahora las bandas EST-6 (100) y EST-6 (115) serían el resultado de la expresión de diferentes loci. El primero, *Est-6 (100)*, sería monomórfico para un alelo activo, ya que todos los individuos presentan la banda. El segundo, *Est 6 (115)*, tendría un alelo activo y otro nulo. En este último caso, las frecuencias génicas y fenotípicas, que aparecen reflejadas en las Tablas 11 y 12, se estiman suponiendo la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg.

c) Cinco loci, uno de ellos monomórfico:

Si se supone que los responsables del control génico de esterazas son cinco loci, hay que considerar que las bandas controladas por el locus *Est 9*, que anteriormente era un locus con dos alelos activos, pasan ahora a ser productos de dos loci separados, *Est-9 (100)* y *Est 9 (80)*, cada uno de ellos con un alelo activo y otro nulo. Los alelos activos se corresponderían con las bandas EST-9 (100) y EST-9 (80), respectivamente. Para la estima de las frecuencias génicas y genotípicas de dichos loci se ha considerado la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg (Tablas 11 y 12).

En las Tablas 11 y 12 se indican además las frecuencias fenotípicas así como las de la ausencia de las bandas en el caso de no considerar el control genético de esta zona.

Tabla 11: Frecuencias fenotípicas para las esterases de la zona IV según existan tres, cuatro o cinco loci.

| Hipótesis | Locus | Fenotipo | Población | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------|------------|--------------|------------|-------------|------------|------------|-------|
| | | | DEH N=40 | VG N=76 | GRL N=129 | CR N=97 | ORO N=43 | NC N=22 | NB N=16 | |
| 3 loci | <i>Est 6</i> | 100,100 | 1,000 | 0,987 | 0,992 | 0,938 | 0,837 | 1,000 | 1,000 | |
| | | 100,115 | 0,000 | 0,015 | 0,008 | 0,062 | 0,163 | 0,000 | 0,000 | |
| | | 115,115 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | |
| | <i>Est 7</i> | 100* | 0,625 | 0,631 | 0,752 | 0,969 | 0,907 | 0,954 | 0,437 | |
| | | - , - | 0,375 | 0,369 | 0,248 | 0,031 | 0,093 | 0,046 | 0,563 | |
| | <i>Est 9</i> | 100,100 | 0,975 | 1,000 | 0,318 | 1,000 | 0,535 | 0,636 | 0,750 | |
| | | 100,80 | 0,025 | 0,000 | 0,442 | 0,000 | 0,442 | 0,273 | 0,250 | |
| | | 115,80 | 0,000 | 0,000 | 0,240 | 0,000 | 0,023 | 0,125 | 0,000 | |
| | 4 loci | <i>Est 6 (115)</i> | 115* | 0,000 | 0,013 | 0,008 | 0,062 | 0,163 | 0,000 | 0,000 |
| - , - | | | 1,000 | 0,987 | 0,992 | 0,938 | 0,837 | 1,000 | 1,000 | |
| <i>Est 7</i> | | 100* | 0,625 | 0,631 | 0,752 | 0,969 | 0,907 | 0,954 | 0,437 | |
| | | - , - | 0,375 | 0,369 | 0,248 | 0,031 | 0,093 | 0,046 | 0,563 | |
| <i>Est 9</i> | | 100,100 | 0,975 | 1,000 | 0,318 | 1,000 | 0,535 | 0,636 | 0,750 | |
| | | 100,80 | 0,025 | 0,000 | 0,442 | 0,000 | 0,442 | 0,273 | 0,250 | |
| | | 115,80 | 0,000 | 0,000 | 0,240 | 0,000 | 0,023 | 0,125 | 0,000 | |
| 5 (bandas)^o | | <i>Est 6 (115)</i> | 115* | 0,000 | 0,013 | 0,008 | 0,062 | 0,163 | 0,000 | 0,000 |
| | | | - , - | 1,000 | 0,987 | 0,992 | 0,938 | 0,837 | 1,000 | 1,000 |
| | <i>Est 7</i> | 100* | 0,625 | 0,631 | 0,752 | 0,969 | 0,907 | 0,954 | 0,437 | |
| | | - , - | 0,375 | 0,369 | 0,248 | 0,031 | 0,093 | 0,046 | 0,563 | |
| | <i>Est 9 (100)</i> | 100* | 1,000 | 1,000 | 0,760 | 0,000 | 0,977 | 0,909 | 1,000 | |
| | | - , - | 0,000 | 0,000 | 0,240 | 1,000 | 0,023 | 0,091 | 0,000 | |
| | <i>Est 9 (80)</i> | 80* | 0,025 | 0,000 | 0,682 | 0,000 | 0,465 | 0,364 | 0,250 | |
| | | - , - | 0,075 | 1,000 | 0,318 | 1,000 | 0,535 | 0,636 | 0,750 | |

* Genotipos heterocigóticos y homocigóticos para el alelo activo.

^o Fenotipos en el caso de no asignar control génico a las esterases de la zona IV.

N: número de individuos analizados.

DEH: "Dehesón del Encinar", VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo", NB: "Las Bardenas Reales".

Tabla 12: Frecuencias génicas de las esterasas de la zona IV según existan tres, cuatro o cinco loci.

| Hipótesis | Loci | Alelos (bandas) | Población | | | | | | |
|-----------------|--------------------|--------------------|-------------|------------|--------------|------------|-------------|------------|------------|
| | | | DEH N=40 | VG N=76 | GRL N=129 | CR N=97 | ORO N=43 | NC N=22 | NB N=16 |
| 3 loci | <i>Est 6</i> | 115 | 0,000 | 0,007 | 0,004 | 0,031 | 0,081 | 0,000 | 0,000 |
| | <i>Est 7</i> | | 0,612 | 0,607 | 0,498 | 0,176 | 0,305 | 0,214 | 0,750 |
| | <i>Est 9</i> | 80 | 0,013 | 0,000 | 0,461 | 0,000 | 0,244 | 0,227 | 0,250 |
| 4 loci | <i>Est 6 (100)</i> | | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | <i>Est 6 (115)</i> | | 1,000 | 0,993 | 0,996 | 0,969 | 0,915 | 1,000 | 1,000 |
| | <i>Est 7</i> | | 0,612 | 0,607 | 0,498 | 0,176 | 0,305 | 0,214 | 0,750 |
| | <i>Est 9</i> | 80 | 0,013 | 0,000 | 0,461 | 0,000 | 0,244 | 0,227 | 0,250 |
| 5 loci | <i>Est 6 (100)</i> | | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | <i>Est 6 (115)</i> | | 1,000 | 0,993 | 0,996 | 0,969 | 0,915 | 1,000 | 1,000 |
| | <i>Est 7</i> | | 0,612 | 0,607 | 0,498 | 0,176 | 0,305 | 0,214 | 0,750 |
| | <i>Est 9 (100)</i> | | 0,000 | 0,000 | 0,490 | 0,000 | 0,152 | 0,302 | 0,000 |
| | <i>Est 9 (80)</i> | | 0,987 | 1,000 | 0,564 | 1,000 | 0,731 | 0,797 | 0,866 |
| 5 bandas | Est-6 (100) | | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | Est-6 (115) | | 1,000 | 0,987 | 0,992 | 0,938 | 0,837 | 1,000 | 1,000 |
| | Est-7 | | 0,375 | 0,369 | 0,248 | 0,031 | 0,093 | 0,046 | 0,563 |
| | Est-9 (100) | | 0,000 | 0,000 | 0,240 | 0,000 | 0,023 | 0,091 | 0,000 |
| | Est-9 (80) | | 0,975 | 1,000 | 0,318 | 1,000 | 0,535 | 0,636 | 0,750 |

: Alelo nulo o ausencia de banda. N: número total de individuos analizados. DEH: "Dehesón del Encinar", VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo", NB: "Las Bârdenas Reales".

2.2.2 Análisis de ligamiento al sexo

Se ha realizado una prueba de χ^2 de independencia, para estudiar la posible relación de estos loci con el sexo, considerando las hipótesis de un control genético de tres, cuatro o cinco loci para la zona IV de esterasas. En ningún caso se han observado relaciones de

ligamiento significativas, por lo que podemos considerar que estos loci se comportan como independientes del sexo.

2.2.3 Estima de la variabilidad genética intrapoblacional

2.2.3.1 Índice de loci polimórficos (P)

Como estima de la cantidad de variación existente en cada población hemos calculado el índice de loci polimórficos según los criterios del 95% y el 99%, según las distintas posibilidades de control génico de esta zona.

Los valores de polimorfismo obtenidos según ambos criterios aparecen en la Tabla 13. Independientemente de la hipótesis que se considere, las poblaciones DEH, VG y CR son las que mostraron un valor de P inferior, alrededor de un 4% según el criterio del 95% y aproximadamente un 8% para el criterio del 99%, excepto para la población "Vega del Guadiana" (VG), en la que el valor del 4% permanece invariable. La población con un mayor nivel de polimorfismo es la de "Oropesa" (ORO): entre 12% y 15,4% según las hipótesis.

Tabla 13: Índice de loci polimórficos en % en el caso de tres, cuatro y cinco loci.

| Hipótesis | Índice | DEH | VG | GRL | CR | ORO | NC | NB | X |
|-------------------------|-------------------|-----|-----|------|-----|------|------|-----|-----|
| 3 loci (n=24) | P _{0,95} | 4,2 | 4,2 | 8,3 | 4,2 | 12,5 | 8,3 | 8,3 | 7,1 |
| | P _{0,99} | 8,3 | 4,2 | 8,3 | 8,3 | 12,5 | 8,3 | 8,3 | 8,3 |
| 4 loci (n=25) | P _{0,95} | 4,0 | 4,0 | 8,0 | 4,0 | 12,0 | 8,0 | 8,0 | 6,9 |
| | P _{0,99} | 8,0 | 4,0 | 8,0 | 8,0 | 12,0 | 8,0 | 8,0 | 8,0 |
| 5 loci (n=26) | P _{0,95} | 3,8 | 3,8 | 11,5 | 3,8 | 15,4 | 11,5 | 7,6 | 8,2 |
| | P _{0,99} | 7,6 | 3,8 | 11,5 | 7,6 | 15,4 | 11,5 | 7,6 | 9,3 |

n: número total de loci analizados. DEH: "Dehesón del Encinar", VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo", NB: "Las Bárdenas Reales".

En términos generales podríamos decir que el valor de polimorfismo para la especie se halla entre 6,9 y 8,2% para el criterio del 95% y entre 8 y 9,8% para el del 99%.

2.2.3.2. Heterocigosidad génica media

La heterocigosidad génica media, entendida como la media del número de individuos heterocigóticos observados por loci, en el conjunto de todos los loci analizados, es una de las estimas más frecuentemente empleadas para analizar la variabilidad genética existente entre las poblaciones. En todos aquellos casos en los que no se podían diferenciar los individuos heterocigóticos de los homocigóticos para los alelos activos, se supuso la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg y por lo tanto, la heterocigosidad génica considerada es la heterocigosidad génica esperada.

Los valores obtenidos para todas las poblaciones son muy similares aunque se puede resaltar que la población de la "Laguna del Cristo" (CR) tiene los valores de heterocigosidad génica media más bajos (1,4%), mientras que las poblaciones de "Oropesa" (ORO) y "La Generala" (GRL) serían las más variables (Tabla 14).

Tabla 14: Heterocigosidad génica media en % suponiendo la existencia de tres, cuatro y cinco loci.

| | 3 loci (n=24) | 4 loci (n=25) | 5 loci (n=26) |
|--------------|---------------|---------------|---------------|
| DEH | 2,08±1,97 | 1,99±1,89 | 1,93±1,83 |
| VG | 2,04±2,71 | 1,96±1,89 | 1,83±1,82 |
| GRL | 3,96±2,71 | 3,80±2,59 | 5,77±3,15 |
| CR | 1,46±1,22 | 1,40±1,17 | 1,34±1,13 |
| ORO | 4,29±2,53 | 4,05±2,43 | 4,74±2,36 |
| NC | 2,53±1,71 | 2,44±1,64 | 4,13±2,24 |
| NB | 2,59±1,81 | 2,50±1,77 | 2,33±1,70 |
| Total | 2,71±0,76 | 2,59±0,73 | 3,140,79 |

n: número total de loci analizados. DEH: "Dehesón del Encinar", VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo", NB: "Las Bárdenas Reales".

2.2.4. Estima de la variabilidad genética interpoblacional: Distancias genéticas.

Dendrogramas

Utilizando el índice de Nei (1972) se ha calculado la distancia genética entre todas las poblaciones para cada una de las hipótesis propuestas sobre el control genético de la zona IV de esterasas (Tabla 15).

Los resultados obtenidos en los casos de considerar la existencia de tres o cuatro loci para la zona IV de esterasas son muy similares, observándose algunas diferencias cuando se comparan con los resultados obtenidos para cinco loci o en el caso de no asignar ningún control genético a la zona IV de esterasas.

Todas las distancias obtenidas son en general muy pequeñas, siendo nula entre el "Dehesón del Encinar" (DEH) y "Vega del Guadiana" (VG), en todos los casos. Las distancias mayores obtenidas en todos los casos están próximas a 0,01. Las distancias medias son del orden de 0,004 ó 0,005.

En la Figura 28 están representados los dendrogramas obtenidos a partir de las distancias estimadas. En el caso de que tres o cuatro loci controlen la zona IV de esterasas el dendrograma fue el mismo. En el caso de cinco loci se altera la posición "La Generala" (GRL).

Aunque todas las poblaciones son muy similares, hemos de destacar que independientemente de la hipótesis considerada, hay dos grupos definidos y separados entre sí que son los formados por VG, DEH y NB por un lado y ORO y NC por otro (Fig. 28).

Tabla 15: Distancias genéticas interpoblacionales estimadas suponiendo que tres, cuatro o cinco loci controlan la zona IV de esterasas.

| Hipótesis | | DEH | VG | GRL | CR | ORO | NC | NB |
|------------------|------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 3 loci | DEH | 0,0000±0,0000 | | | | | | |
| | VG | 0,0000±0,0000 | 0,0000±0,0000 | | | | | |
| | GRL | 0,0050±0,0002 | 0,0053±0,0002 | 0,0000±0,0000 | | | | |
| | CR | 0,0045±0,0002 | 0,0044±0,0002 | 0,0074±0,0003 | 0,0000±0,0000 | | | |
| | ORO | 0,0036±0,0001 | 0,0037±0,0001 | 0,0021±0,0001 | 0,0019±0,0001 | 0,0000±0,0000 | | |
| | NC | 0,0048±0,0002 | 0,0048±0,0002 | 0,0032±0,0001 | 0,0013±0,0000 | 0,0004±0,0000 | 0,0000±0,0000 | |
| | NB | 0,0017±0,0001 | 0,0019±0,0001 | 0,0025±0,0001 | 0,0092±0,0004 | 0,0047±0,0002 | 0,0067±0,0003 | 0,0000±0,0000 |
| | X = | 0,0038±0,0005 | | | | | | |
| 4 loci | DEH | 0,0000±0,0000 | | | | | | |
| | VG | 0,0000±0,0000 | 0,0000±0,0000 | | | | | |
| | GRL | 0,0048±0,0002 | 0,0050±0,0002 | 0,0000±0,0000 | | | | |
| | CR | 0,0043±0,0002 | 0,0042±0,0002 | 0,0071±0,0004 | 0,0000±0,0000 | | | |
| | ORO | 0,0035±0,0001 | 0,0035±0,0001 | 0,0020±0,0001 | 0,0018±0,0001 | 0,0000±0,0000 | | |
| | NC | 0,0046±0,0002 | 0,0046±0,0002 | 0,0030±0,0001 | 0,0012±0,0000 | 0,0004±0,0000 | 0,0000±0,0000 | |
| | NB | 0,0017±0,0001 | 0,0018±0,0001 | 0,0024±0,0001 | 0,0087±0,0004 | 0,0045±0,0002 | 0,0064±0,0003 | 0,0000±0,0000 |
| | X = | 0,0036±0,0004 | | | | | | |
| 5 loci | DEH | 0,0000±0,0000 | | | | | | |
| | VG | 0,0000±0,0000 | 0,0000±0,0000 | | | | | |
| | GRL | 0,0093±0,0003 | 0,0096±0,0004 | 0,0000±0,0000 | | | | |
| | CR | 0,0041±0,0002 | 0,0040±0,0002 | 0,0117±0,0005 | 0,0000±0,0000 | | | |
| | ORO | 0,0040±0,0002 | 0,0040±0,0002 | 0,0041±0,0002 | 0,0025±0,0001 | 0,0000±0,0000 | | |
| | NC | 0,0061±0,0002 | 0,0062±0,0002 | 0,0037±0,0001 | 0,0029±0,0001 | 0,0009±0,0000 | 0,0000±0,0000 | |
| | NB | 0,0007±0,0000 | 0,0008±0,0000 | 0,0085±0,0003 | 0,0075±0,0003 | 0,0052±0,0002 | 0,0083±0,0003 | 0,0000±0,0000 |
| | X = | 0,0050±0,0007 | | | | | | |

DEH: "Dehesón del Encinar", VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo", NB: "Las Bârdenas Reales".

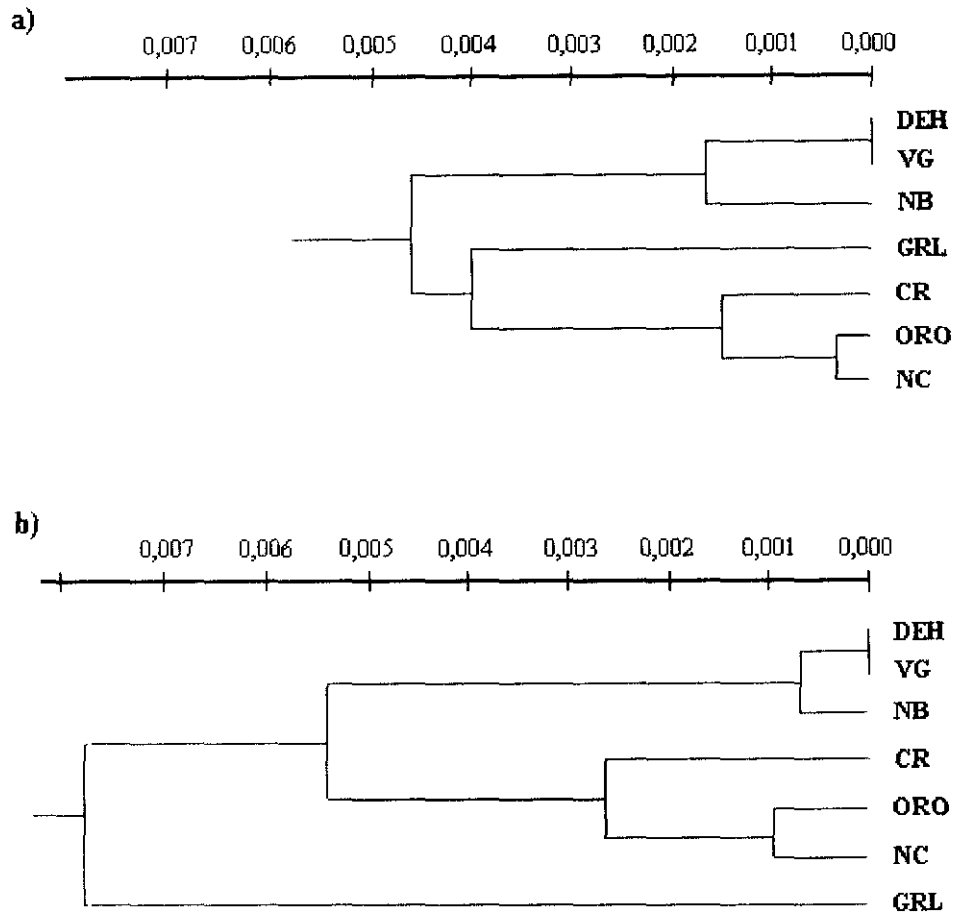


Figura 28: Dendrogramas obtenidos por el método UPGMA, en el caso de que la zona IV de esterasas esté controlada por: a) tres y cuatro loci, b) cinco loci.

DEH: "Dehesón del Encinar", VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "Laguna del Cristo"
ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo", NB: "Las Bârdenas Reales".

3. ANÁLISIS DE CARACTERES MOLECULARES

3.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

La extracción de ADN genómico según el método de Dellaporta et al. (1983) ha dado buenos resultados, ya que la cantidad de ADN obtenida es del orden de 0,6-1,4 µg/ml y su pureza del orden de 2, valor bastante próximo al de pureza ideal que es de 1,5.

3.2. PATRONES ELECTROFORÉTICOS

3.2.1. Productos de amplificación por RAPDs

Los patrones electroforéticos de los productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos 10-A, 1-B y 18-F fueron invariables en todas las poblaciones analizadas. Con el resto de los cebadores (5-B, 13-B y 7-F) los patrones fueron variables para al menos una banda. Estos patrones aparecen en las Figuras 29 y 30.

El oligonucleótido 10-A proporciona la amplificación de ocho fragmentos definidos con tamaños comprendidos entre 2.400 y 650 pb. Con el oligonucleótido 1-B se obtienen 12 fragmentos, de los que ocho, de 1.975 a 750 pb, ofrecen una buena resolución. La amplificación con el oligonucleótido 18-F proporciona hasta siete fragmentos, de los que se analizaron tres por presentar una mayor resolución (Figs. 29 y 30).

Con el oligonucleótido 5-B se han obtenido nueve fragmentos definidos, presentando variabilidad únicamente la banda 6 de 1.275 pb (Figs. 29 y 30).

El oligonucleótido 13-B sirve de cebador para la amplificación de al menos 14 bandas, aunque sólo ocho de ellas ofrecieron una buena resolución, con tamaños comprendidos entre 1.800 y 100 pb (Figs. 29 y 30). En este caso fueron variables las bandas 2, 3, 5 y 8 de 1.700, 1.625, 1.400 y 1.000 pb, respectivamente.

De todos los fragmentos obtenidos con el oligonucleótido 7-F, sólo se han considerado los de 1.550, 1.275, 1.200 y 900 pb. La banda 2, de 1.275 pb, resultó igualmente variable (Figs. 29 y 30).

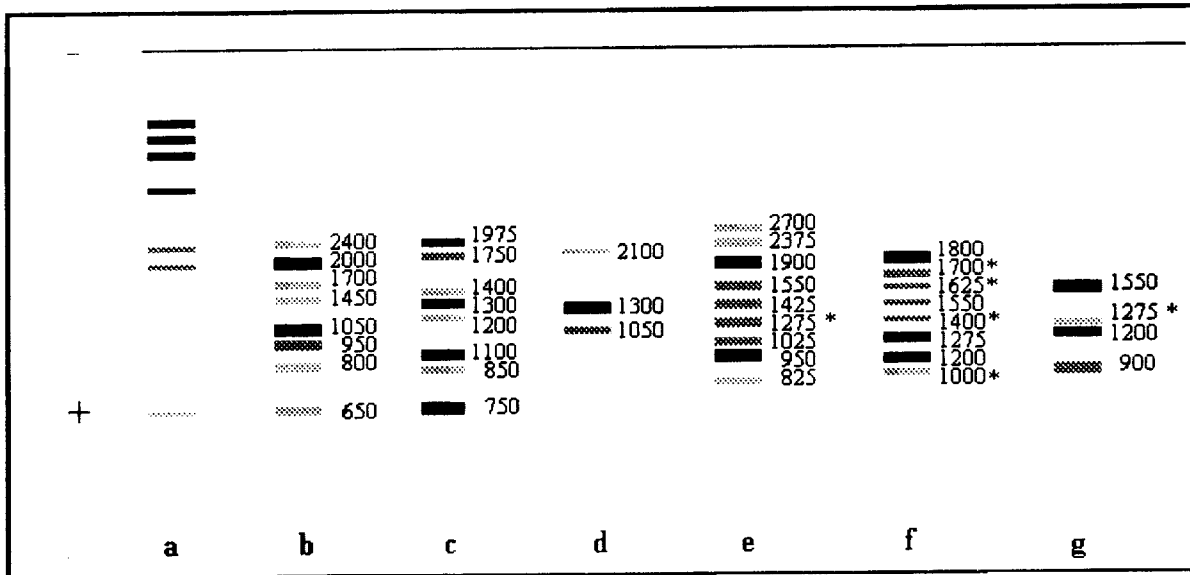


Figura 29: a) Marcador de peso molecular: ADN del fago λ digerido con Hind-III. Patrón electroforético de los productos de amplificación de ADN con los oligonucleótidos, b) 10-A, c) 1-B, d) 18-F, e) 5-B, f) 13-B, g) 7-F. * Fragmentos polimórficos.

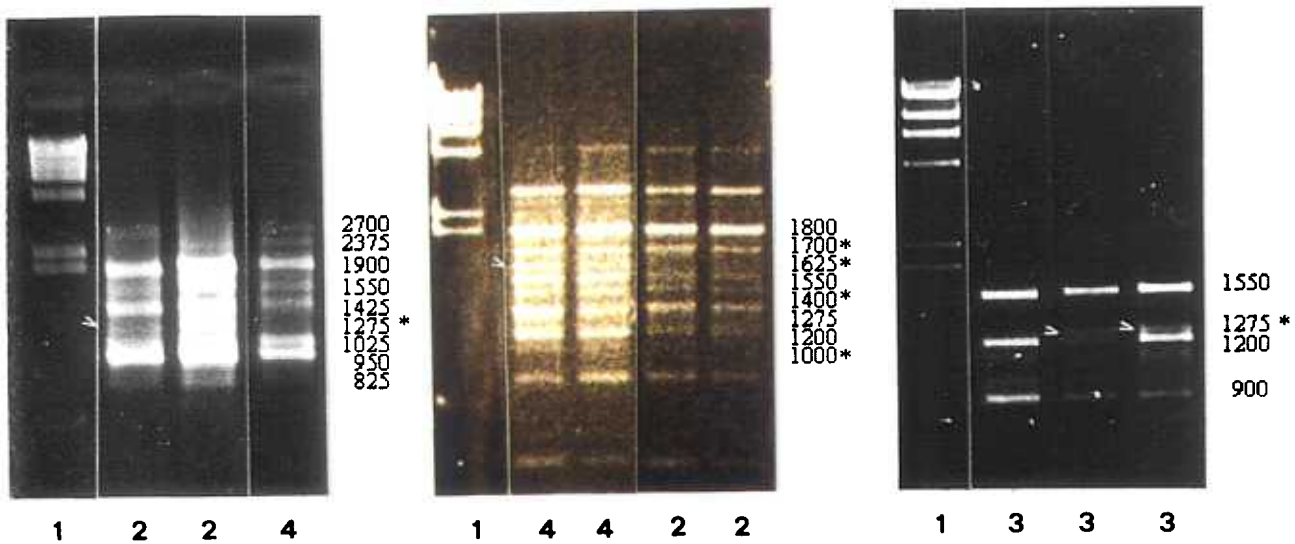


Figura 30: Electroforesis de los productos de amplificación de ADN con los oligonucleótidos: a) 5-B; 13-B; c) 7-F. 1. Marcador de peso molecular: ADN del fago λ digerido con Hind-III. 2. "Oropesa" (ORO). 3. "La Generala" (GRL). 4. "La Laguna del Cristo" (CR). * Fragmentos polimórficos.

3.2.2 Productos de amplificación por PCR

De la serie de bandas electroforéticas originadas con la pareja de oligonucleótidos MAE 1U-1L (ADNc del componente C9 del complemento) se analizaron las siete que mostraron una mayor resolución. Se ha observado la existencia de polimorfismo en las poblaciones de "Oropesa" (ORO) y "Embalse de Citruénigo" (NC) para los fragmentos 1, 2, 3 y 4 de 780, 700, 650 y 600 pb, respectivamente (Figs. 31 y 32).

El empleo de la pareja de oligonucleótidos MAE 6U-6L (ADNc de la proteína "heat shock" de 70Kd) ha originado cuatro fragmentos definidos presentes en todos los individuos de las cinco poblaciones analizadas y por lo tanto, monomórficos (Figs. 31).

En el caso de los oligonucleótidos MAE 10U-10L (ADNc del gen del componente c-ii de la protamina) se han obtenido seis fragmentos de tamaños comprendidos entre los 850 y los 420 pb que fueron resultaron invariables en todas las poblaciones (Figs. 31).

La pareja de cebadores MAE 5U-5L (ADNc de la proteína HMG-T) no dio lugar a una amplificación apreciable de ningún segmento de ADN por lo que fue desestimada para este estudio.

3.3. ESTIMA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA MOLECULAR INTRA E INTERPOBLACIONAL

3.3.1 Frecuencia de la ausencia de las bandas

Las frecuencias de ausencia de los diferentes fragmentos polimórficos amplificados por RAPDs y PCR se muestran en la Tabla 16.

Como ya se mencionó previamente, los patrones obtenidos para los oligonucleótidos 10-A, 1-B y 18-F son invariables, mientras que para los tres restantes se ha observado variación en algunos fragmentos. En total son variables seis regiones de ADN con respecto a las 40 estudiadas.

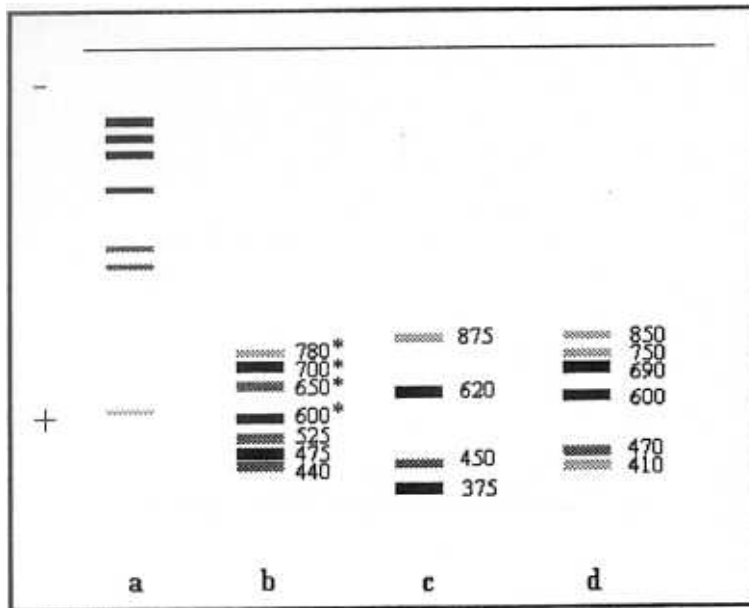


Figura 31: a) Marcador de peso molecular: ADN del fago λ digerido con Hind-III. Patrón electroforético de los productos de amplificación de ADN con los oligonucleótidos: b) MAE 1U-1L; c) MAE 6U-6L; d) MAE 10U-10L
*Fragmentos polimórficos

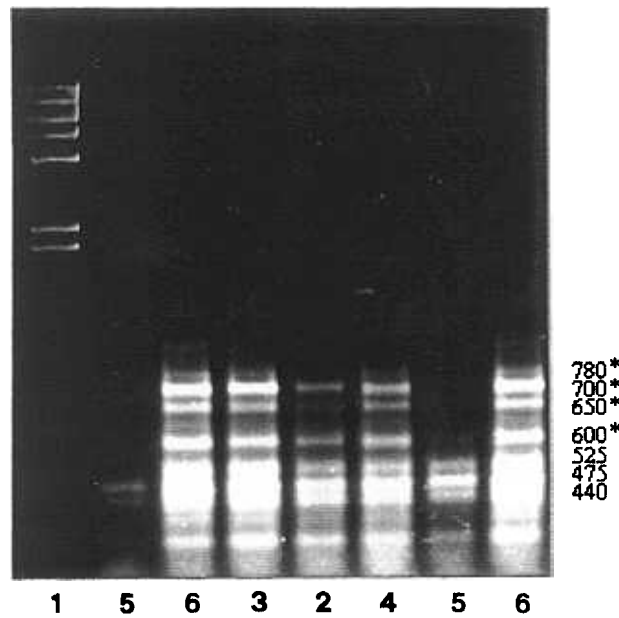


Figura 32: Electroforésis de los productos de amplificación de ADN con los oligonucleótidos MAE 1U-1L. 1. Marcador de peso molecular: ADN del fago λ digerido con Hind-III 2. "Vega del Guadiana" (VG). 3. "La Generala" (GRL). 4. "Embalse de Citruénigo" (NC). 5. "Oropesa" (ORO). 6. "La Laguna del Cristo" (CR).
*Fragmentos polimórficos

Respecto a los fragmentos amplificados por PCR, sólo se ha observado variabilidad en cuatro de los 17 analizados, dándose la circunstancia de que todos ellos provienen de la amplificación obtenida a partir del ADNc del componente C9 del complemento.

Tabla 16: Frecuencia de ausencia de los fragmentos amplificados polimórficos por RAPDs y PCR.

| Oligonucleotido | Nº fragmento | Tamaño (pb) | VG | GRL | CR | ORO | NC |
|------------------------|---------------------|--------------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| 5-B | 6 | 1.275 | 0,80 | 0,49 | 0,75 | 0,62 | 0,20 |
| 13-B | 2 | 1.700 | 0,29 | 0,36 | 0,28 | 0,21 | 1,00 |
| | 3 | 1.625 | 0,08 | 0,04 | 0,31 | 0,29 | 1,00 |
| | 5 | 1.400 | 0,04 | 0,14 | 0,24 | 0,00 | 0,81 |
| | 8 | 1.000 | 0,00 | 0,04 | 0,00 | 0,04 | 0,06 |
| 7-F | 2 | 1.275 | 0,07 | 0,27 | 0,00 | 0,10 | 0,15 |
| MAE 1U-1L | 1 | 780 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,54 | 0,15 |
| | 2 | 700 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,54 | 0,15 |
| | 3 | 650 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,54 | 0,15 |
| | 4 | 600 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,39 | 0,08 |

VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "La Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo".

3.3.2. Análisis de ligamiento al sexo

Se ha estudiado si el polimorfismo para los fragmentos de amplificación se encuentra relacionado con el sexo de los individuos analizados mediante una prueba χ^2 de independencia. Los valores de χ^2 que se obtuvieron en todos los casos resultaron no significativos para un valor de $p < 0,05$, de manera que podemos considerar que tales polimorfismos no se encuentran ligados al sexo.

3.3.2 Cuantificación de la variabilidad genética intrapoblacional: Índice de polimorfismo

Como valor para la cuantificación de la variabilidad genética intrapoblacional se ha empleado el "índice de polimorfismo", calculado como la proporción de fragmentos polimórficos según los criterios del 95% y el 99%. En la Tabla 17 se muestran los valores obtenidos por oligonucleótido, por tipo de amplificación y en conjunto.

En el caso de los RAPDs y según el criterio del 95%, todas las poblaciones son igualmente polimórficas, con un índice del 10%, aunque no todas presenten variabilidad para los mismos fragmentos. Este índice es algo superior si se considera el criterio del 99%, llegando a ser del 15% para la población de "La Generala" (GRL).

En el caso de la PCR únicamente son polimórficas las poblaciones del "Embalse de Citruénigo" (NC) y "Oropesa" (ORO), con un 23,5% de media, tanto al 95 como al 99%. Además sólo lo son para los fragmentos originados al emplear la pareja de cebadores MAE 1U-1L. El resto de las poblaciones fueron totalmente monomórficas, y por lo tanto su índice de polimorfismo estimado fue 0%.

El índice de polimorfismo obtenido para el conjunto de todos los datos es del 9,8% , siendo del 10% para RAPDs (12% según el criterio del 99%) y del 9,4% para PCR. Teniendo en cuenta el criterio del 95% para los resultados globales, las poblaciones más polimórficas son ORO y NC (P=14,0%), mientras que al 99% las poblaciones de "Oropesa" (ORO) y la "Laguna del Cristo" (CR) serían la más y menos variable, respectivamente.

Tabla 17: Índice de fragmentos polimórficos por RAPDs y PCR al 95 y 99 %.

| Técnica | Oligonucleótido | VG | GRL | CR | ORO | NC | X | |
|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|
| RAPDs | 10-A | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| | 1-B | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| | 5-B | 11,1 | 11,1 | 11,1 | 11,1 | 11,1 | 11,1 | |
| | 13-B | 25,0 | 25,0 | 37,5 | 25,0 | 25,0 | 27,5 | |
| | | | *(37,5) | *(50,0) | *(37,5) | *(37,5) | *(25,0) | *(37,5) |
| | 7-F | 25,0 | 25,0 | 0,0 | 25,0 | 25,0 | 20,0 | |
| | 18-F | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| | P | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | |
| | | *(12,5) | *(15,0) | *(10,0) | *(12,5) | *(10,0) | *(12,0) | |
| PCR | MAE 1U-1L | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 57,0 | 57,0 | 22,8 | |
| | MAE 6U-6L | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| | MAE 10U-10L | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| | P | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 23,5 | 23,5 | 9,4 | |
| PCR y RAPDs | Todos | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 14,0 | 14,0 | 9,8 | |
| | | *(8,8) | *(10,5) | *(7,0) | *(15,8) | *(14,0) | *(11,2) | |

* Porcentaje de fragmentos polimórficos al 99%.

3.3.3 Estima de la variabilidad genética interpoblacional. Distancias genéticas y árboles filogenéticos

Como medida de la variabilidad genética interpoblacional se han estimado las distancias genéticas por medio del índice de Nei (1972) considerando los resultados del conjunto (PCR y RAPDs) de los 58 fragmentos amplificados (Tabla 18).

Las distancias obtenidas van desde 0,0011 a 0,0258, con una media de 0,0129. Estos valores son, en general, mayores a los obtenidos con marcadores isoenzimáticos.

Según estos resultados, la población más alejada es la del "Embalse de Citruénigo" (NC) y las más próximas "Vega del Guadiana" (VG) y la "Laguna del Cristo" (CR) (0,0011) (Fig. 33).

Tabla 18: Distancias genéticas obtenidas por el índice de Nei para fragmentos de amplificación

| | VG | GRL | CR | ORO | NC |
|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| VG | 0,0000±0,0000 | | | | |
| GRL | 0,0017±0,0000 | 0,0000±0,0000 | | | |
| CR | 0,0011±0,0000 | 0,0025±0,0000 | 0,0000±0,0000 | | |
| ORO | 0,0116±0,0002 | 0,0123±0,0002 | 0,0116±0,0002 | 0,0000±0,0000 | |
| NC | 0,0246±0,0004 | 0,0199±0,0003 | 0,0176±0,0003 | 0,0258±0,0005 | 0,0000±0,0000 |

X = 0,0129±0,0029

VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo".

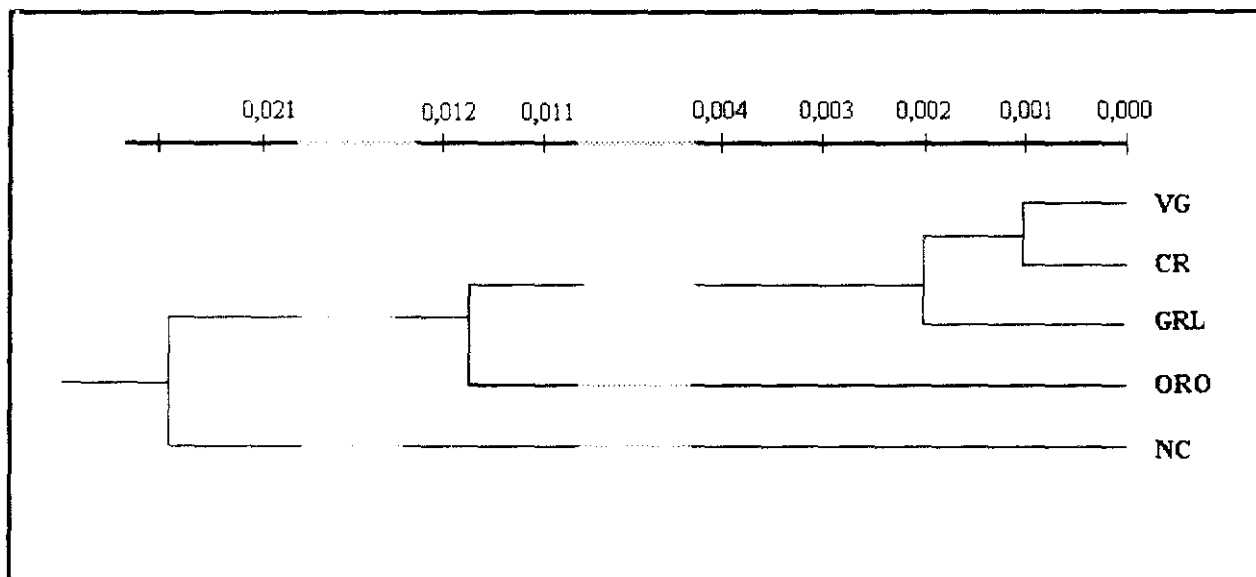


Figura 33: Dendrograma obtenido por el método UPGMA para los fragmentos de amplificación.

4. ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS CARACTERES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES

Con la finalidad de obtener una visión del conjunto de los resultados, se han calculado las distancias genéticas considerando todos los marcadores analizados tanto a nivel bioquímico como molecular. Tanto las distancias genéticas como los dendrogramas obtenidos, según las diferentes hipótesis consideradas para la zona IV de esterasas, han resultado muy similares, por lo que sólo presentamos una tabla de las distancias genéticas obtenidas, así como su dendrograma correspondiente (Tabla 19, Fig. 34). Las poblaciones del "Dehesón del Encinar" (DEH) y "Las Bárdenas Reales" (NB) no han sido consideradas en este apartado debido a que no fueron analizadas con caracteres moleculares.

Los resultados obtenidos en este apartado son parecidos a los obtenidos sólo con RAPDs. Las distancias genéticas van de 0,0021 a 0,0186. La distancia media estimada es del orden de 0,0100. Las poblaciones más próximas son "Vega del Guadiana" (VG) y la "Laguna del Cristo" (CR), que a su vez están más próximas a "La Generala" (GRL) que al resto. La población del "Embalse de Citruénigo" (NC) es la que presenta una mayor distancia al resto de las poblaciones. Estas relaciones son claramente visibles en el dendrograma de la Figura 34.

Tabla 19: Distancias genéticas obtenidas con el índice de Nei para todos los caracteres isoenzimáticos y moleculares analizados, en el caso de un control génico de tres loci para la zona IV de esterasas.

| | VG | GRL | CR | ORO | NC |
|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| VG | 0,0000±0,0000 | | | | |
| GRL | 0,0028±0,0000 | 0,0000±0,0000 | | | |
| CR | 0,0021±0,0000 | 0,0040±0,0000 | 0,0000±0,0000 | | |
| ORO | 0,0092±0,0001 | 0,0092±0,0001 | 0,0087±0,0001 | 0,0000±0,0000 | |
| NC | 0,0186±0,0002 | 0,0149±0,0002 | 0,0127±0,0001 | 0,0181±0,0002 | 0,0000±0,0000 |

$$X = 0,0100 \pm 0,0011$$

VG: "Vega del Guadiana", GRL: "La Generala", CR: "Laguna del Cristo", ORO: "Oropesa", NC: "Embalse de Citruénigo".

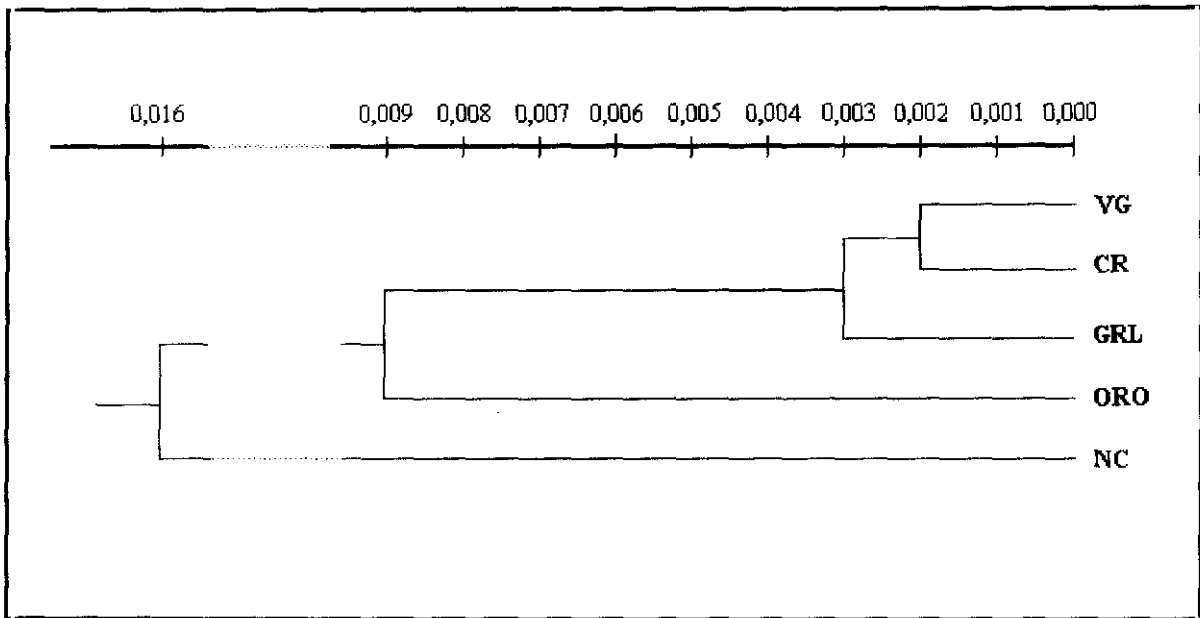


Figura 34: Dendrograma obtenido por el método UPGMA para el conjunto de los caracteres isoenzimáticos y moleculares en el caso de un control génico de tres loci para la zona IV de esterasas.

DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA

1.1. Cariotipo

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el número cromosómico de la especie es $2n=48$ (Fig. 9) coincidiendo con lo señalado por otros autores (Nygren et al., 1975; Cataudella et al., 1977; Berberovic et al., 1978; Hafez et al., 1978a).

El número fundamental (NF=86) y la morfología de los cromosomas descritos (8 pares metacéntricos, 11 submetacéntricos y 5 acrocéntricos) no coinciden con los de otros autores. Se han estimado valores de NF que van desde 90 (Mayr et al., 1986) hasta 80 (Wolf et al., 1969). Hafez et al. (1978a) estiman un número de brazos cromosómicos de 86 en un cariotipo que, salvo en la clasificación de un par cromosómico, es idéntico al de este trabajo. Varios autores justifican estas contradicciones en los cariotipos de las especies piscícolas por la dificultad de obtener buenas placas metafásicas, ya que suelen tener números cromosómico elevados y cromosomas de pequeña longitud (Gold, 1984; Hafez et al., 1978a).

La poliploidía es un fenómeno raro en vertebrados superiores, pero no en los inferiores, sobre todo en peces, donde se ha observado una gran diversidad en cuanto al tamaño del genoma (Ohno et al., 1967; Wolf et al., 1969). Hay especies poliploides en ciprínidos, cipriniformes (que incluyen a los anteriores) y teleósteos en general. Todos los datos existentes hasta el momento, tanto cariotípicos como de apareamiento meiótico y de análisis cuantitativos sobre el contenido nuclear de ADN, permiten clasificar los cariotipos con 100 cromosomas como tetraploides, mientras que los diploides muestran, en general, 48-50 cromosomas (Ohno et al., 1967; Schmidtke et al., 1975). Todos estos datos permiten asumir que la tenca pertenece al grupo de las especies diploides de la familia *Cyprinidae*. La naturaleza diploide de la tenca está avalada además por los valores del contenido nuclear en ADN obtenidos por Wolf et al. (1969) y Hafez et al. (1978b).

La ausencia de polimorfismos cromosómicos numéricos o estructurales, sobre todo de fusiones o fisiones céntricas, observada en esta especie, coincide con lo descrito en otros ciprinidos. Amemiya y Gold (1988, 1990) observan que, en contraste con la gran diversidad morfológica que presentan los ciprinidos, los cambios en el cariotipo son mínimos. Este tipo de polimorfismos cromosómicos son, sin embargo, un proceso frecuente en otros teleósteos como los salmónidos, familia en la que, junto con la poliploidía, juegan un importante papel evolutivo (Hartley, 1987). El monomorfismo observado en tenca puede deberse, entre otras razones, a una gran proximidad o similitud genética entre las poblaciones analizadas, como ya se discutirá en los apartados dedicados a los caracteres bioquímicos y moleculares.

1.2. Bando C. Tinción argéntica. Tinción con cromomicina A3

El patrón de bando C de la tenca muestra una gran uniformidad, con una distribución de la heterocromatina fundamentalmente centromérica y telomérica. También se observa en posición intersticial en unos pocos brazos largos cromosómicos, así como algunos brazos cortos completamente heterocromáticos (Fig. 11). La región organizadora nucleolar es heteropicnótica negativa, como en otras especies piscícolas (Almeida-Toledo et al., 1981; Moreira-Filho et al., 1984).

El patrón de distribución de la heterocromatina obtenido en este trabajo es básicamente el mismo que el descrito por Hafez (1979) y además coincide con el patrón general de vertebrados establecido por Gold et al. (1986). Para estos autores la mayoría de las especies de peces poseen cantidades relativamente pequeñas de heterocromatina, principalmente centromérica y también telomérica. El patrón obtenido por nosotros muestra pequeñas variaciones cuantitativas y cualitativas con respecto al de Hafez (l.c.), variaciones que pueden ser el resultado de la elevada variabilidad que presenta la heterocromatina constitutiva en todos los seres vivos estudiados hasta el momento (John, 1988).

Sólo se ha observado variación en el patrón de bando C para la presencia del bloque heterocromático de los pares cromosómicos 6 y 8 (Fig. 11). Como era de esperar, las

frecuencias de los distintos cariomorfos fueron muy similares en las poblaciones de "El Dehesón del Encinar" (DEH) y "Vega del Guadiana" (VG), ya que la primera es una muestra de la segunda. La población del "Embalse de Cintruénigo" (NC) presentó una frecuencia génica similar a la de estas dos poblaciones para el bloque heterocromático del par 6, estando en todos los casos próxima a un valor de 0,75. Sin embargo, para el bloque del par cromosómico 8, las poblaciones DEH y VG presentaban una frecuencia de 0,5 mientras que en NC era 0,77 (Tabla 8). La población NC es diferente también a nivel bioquímico y molecular.

La tinción argéntica sólo ha teñido diferencialmente la región organizadora nucleolar localizada en el par cromosómico 3, como ya se discutirá en el siguiente apartado.

La tinción con cromomicina A3 sólo permite identificar tres pares cromosómicos: 3, 11 y 15. La banda del par 3 se corresponde con la región organizadora nucleolar. Esta diferenciación de la región organizadora nucleolar con cromomicina A3 es frecuente en peces, a diferencia de lo que sucede en mamíferos (Amemiya y Gold, 1986). Las bandas de los pares 11 y 15 eran también heteropicnóticas para el bandeo C. Esto, junto con el hecho de que algunos centrómeros mostraron también pequeñas bandas fluorescentes, está de acuerdo con la similitud existente entre algunos patrones de bandeo C y cromomicina A3 (Schmid y Guttenbach, 1988).

La cromomicina A3 se liga preferencialmente a regiones cromosómicas ricas en pares de bases G-C. El hecho de que sólo se hayan observado tres pares cromosómicos con una banda fluorescente podría indicar que los pares G-C están homogéneamente distribuidos por el genoma, como se ha observado en numerosas especies de peces y anfibios (Schmid y Guttenbach, l.c.).

Se ha dado mucha importancia al hecho de que la cromomicina A3 permite el estudio de las regiones organizadoras nucleolares ya que, a diferencia de la tinción argéntica que sólo tiñe aquellas regiones que hayan sido activas en la interfase previa, la cromomicina tiñe

directamente la molécula de ADN y por tanto es más representativa del número y tamaño de dichas regiones.

1.3. Regiones organizadoras nucleolares

Con las diferentes técnicas de tinción empleadas en este trabajo, sólo ha aparecido el par 3 como organizador nucleolar (Figs. 9, 10, 12 y 13), situándose la región NOR intersticialmente, como ya señalaron Mayr et al. (1986) con tinción argéntica y cromomicina A3. La observación de un par de nucleolos en núcleos interfásicos, tanto con la tinción argéntica como de fluorescencia, es otro indicio de la existencia de un único par organizador nucleolar. Mayr et al. (1986) observaron un bajo porcentaje (1,5%) de núcleos interfásicos con tres nucleolos, explicándolo por la aparición poco frecuente de células poliploides.

Amemiya y Gold (1986) consideran que el que haya un único par cromosómico organizador nucleolar es una condición primitiva en el grupo de los ciprinidos, de la que se ha derivado, en ciertas ocasiones, la presencia de algún par adicional. Esta hipótesis coincide con la de Schmid (1978), para quien un único par organizador nucleolar es una condición primitiva en la mayoría de los vertebrados.

El polimorfismo observado en cuanto al tamaño y la localización de la región NOR se ha puesto de manifiesto con las técnicas de tinción convencional, argéntica y de fluorescencia, lo que indica que son modificaciones estructurales y no funcionales; es decir, que no son variaciones debidas a que se exprese un mayor o menor número de cistrones de la región organizadora nucleolar. Estas variaciones, que se pueden presentar en heterocigosis u homocigosis, a diferencia de lo señalado por otros autores, para los que estas modificaciones se observan sólo en heterocigosis (Thode et al., 1985b; Martínez et al., 1991), pueden tener su origen en una duplicación de dicha región y/o en otro tipo de modificaciones, como pudiera ser una inversión o una translocación. En cualquier caso, son necesarios al menos dos fenómenos para explicar las variaciones observadas tanto en el tamaño del NOR (Figs. 12 b,c) como en su posición (Figs. 12 d). La frecuencia de

individuos con una constitución normal en el par 3 es del 48%. El 52% restante presentan un fenotipo diferente al establecido como normal e incluyen todos los tipos de modificaciones observadas para esta región, tanto si están presentes en heterocigosis como en homocigosis (Tabla 9). En otras especies se han estimado frecuencias de individuos polimórficos para esta región incluso más elevadas que las presentadas en este trabajo, por ejemplo un 69% para *Dabryia baltica* y *Dabryia farinosa* (Martínez et al., 1991).

La población que presentó un mayor porcentaje de individuos con polimorfismos para esta región fue la de "Oropesa" (ORO) (75%), población que además resultó ser la más variable para caracteres isoenzimáticos y moleculares. La población con un menor porcentaje fue la de "Las Bárdenas Reales" (NB) (25%) que también presentó un nivel de variabilidad bajo para caracteres isoenzimáticos. En general, los porcentajes obtenidos en las distintas poblaciones se corresponden con los valores de variabilidad obtenidos para caracteres bioquímicos y moleculares, excepto en el caso de la población "Vega del Guadiana" (VG) que presentó un elevado porcentaje de individuos polimórficos para esta región, cuando para los otros caracteres la estima de variabilidad fue baja.

Este polimorfismo para la región organizadora nucleolar, que no ha sido descrito anteriormente en esta especie, parece ser un fenómeno frecuente en peces. Actualmente existen datos suficientes como para apreciar la existencia de un comportamiento heterogéneo de estas regiones en peces (Moreira-Filho et al., 1984; Phillips e Ihssen, 1985a; Sánchez et al., 1990; Lozano et al., 1991). Las variaciones observadas suelen ser en cuanto al número de dosis, como se ha visto en *Astyanax* (Morelli, 1981); tamaño de la región, género *Lepomis* (Galetti et al., 1984) y localización del NOR, como ocurre en *Epiplatys* y *Morone* (Foresti et al., 1981). En ciprínidos no ha sido un fenómeno muy estudiado y de hecho sólo existen referencias a dichos polimorfismos en ciprínidos norteamericanos (Amemiya y Gold, 1986, 1988, 1990a, b).

Ritossa et al. (1966) consideran que la redundancia genética de las regiones de ADNr las hace más susceptibles a que se produzcan sobrecruzamientos desiguales y en consecuencia, duplicaciones y deleciones espontáneas, de tal manera que la cantidad de ADNr presente en estas regiones puede sufrir modificaciones. La tendencia de los cromosomas portadores de las regiones NOR a asociarse para organizar el nucleolo, puede facilitar el que se produzcan sobrecruzamientos desiguales contribuyendo a la variabilidad numérica observada en estos cistrones (Ruiz, 1982).

1.4. Cromosomas sexuales

Los resultados obtenidos en este trabajo no han mostrado la diferenciación de ningún par cromosómico como par sexual, tanto en células mitóticas como meióticas. No hay ningún indicio de la presencia de pares cromosómicos heteromórficos, tanto a nivel de la morfología cromosómica como de los patrones de bandeo de los mismos, que permitan apuntar la existencia de cromosomas sexuales. La ausencia de bivalentes heteromorfos o univalentes en metafase I es una confirmación adicional respecto a la ausencia de heterocromosomas sexuales.

En numerosas especies piscícolas la determinación del sexo parece ser completamente poligénica, sin evidencia genética ni citológica de heterogamia en cromosomas sexuales (Gold, 1979). El sistema de determinismo sexual poligénico en el que los genes sexuales están repartidos en los autosomas, parece ser el más frecuente en ciprínidos (Hafez et al., 1978a).

Aunque no se ha determinado la presencia de heterocromosomas sexuales mediante las técnicas de tinción cromosómica empleadas en este trabajo no se puede descartar su existencia. De hecho, con las técnicas de bandeo cromosómico se han podido detectar, en algunos casos, pequeñas diferencias estructurales entre cromosomas sexuales aparentemente homomórficos, como ha ocurrido en: *Hoplias* (Bertollo et al., 1978), *Apareidon affinis* (Moreira-Filho et al., 1980) o *Salvelinus namaycush* (Phillips y Ihssen, 1985b), etc..

2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Según Nei (1973), Nei y Roychodhury (1972, 1974) y Lewontin (1974), la obtención de una estima fiable de la variabilidad genética presente en las poblaciones naturales requiere el análisis de un elevado número de loci de una muestra tomada al azar del genoma. Por esto, uno de los objetivos de este trabajo ha sido describir e interpretar genéticamente el mayor número posible de loci detectables electroforéticamente, así como evaluar su capacidad potencial de ser utilizados en análisis poblacionales.

Dada la imposibilidad de realizar cruzamientos que nos permitan analizar la herencia de las diferentes bandas, la base genética de los sistemas enzimáticos estudiados debe inferirse de los patrones observados. Para su interpretación se usaron tres criterios: 1) comparación de la expresión de los loci en diferentes órganos y tejidos; 2) análisis de los datos poblacionales; 3) comparación de los patrones de bandas obtenidos con la estructura cuaternaria y control genético de proteínas análogas descritas en otros teleósteos.

En la determinación de la estructura cuaternaria de los sistemas isoenzimáticos se ha tenido en cuenta que la presencia de bandas heterodiméricas, constituidas por cadenas polipeptídicas codificadas por diferentes loci, pone de manifiesto la estructura dimérica de una enzima. Sin embargo, la ausencia de formas heterodiméricas no determina la estructura monomérica de la enzima, ya que el hecho de que no se detecten heterodímeros puede deberse a que la enzima sea monomérica o también a que, aun siendo dimérica, no se unan las cadenas polipeptídicas de diferentes loci por tener diferente localización subcelular, o porque el heterodímero, aunque exista, no sea funcional.

Tanto el control genético como la estructura cuaternaria de los diferentes sistemas isoenzimáticos analizados, coinciden con lo descrito en ciprínidos y teleósteos en general, excepto para AAT, ACPH, ADH, EST, IDH y ME.

Los resultados obtenidos para la enzima AAT con respecto a la existencia de una zona catódica y otra anódica (Fig. 18) son bastante similares a los de otros ciprínidos, en los que

se relacionan las zonas catódicas y anódicas con las fracciones subcelulares citosólicas y mitocondriales respectivamente (Ferris y Whitt, 1977a, b; Woods y Buth, 1984). Estos autores describen la existencia de un locus para la zona anódica en ciprínidos diploides, a diferencia de los dos loci descritos en tenca. Sin embargo, en numerosas especies tetraploides de la familia *Catostomidae* (del mismo orden que los ciprínidos), se observan hasta tres loci para esta zona anódica (Buth, 1979). Según este autor, la existencia de estos tres loci en todas las especies del género *Moxostoma* puede representar la expresión de una duplicación en tándem sobre uno de los loci duplicados previamente por poliploidía, duplicación que puede haberse dado en un ancestro común de la tribu Moxomastini y persistir en varias líneas.

Dada la proximidad de las familias *Cyprinidae* y *Catostomidae*, podemos suponer que la existencia de dos loci en la zona anódica de AAT en tenca provenga de una duplicación, directamente en dicha especie, o derivada de una que se haya producido en un ancestro común a estas dos familias y que permanezca en algunas especies de las mismas.

Las fosfatasa ácidas de la tenca parecen estar codificadas por dos loci según los resultados obtenidos en este trabajo (Fig. 19). En otros ciprínidos sólo se ha observado actividad para un locus (Ferris y Whitt, 1977a, b; Buth y Burr, 1978; Crabtree y Buth, 1981). Sin embargo, se han descrito dos loci en otra especie diploide, *Gyrinocheilus aymonieri*, cuya familia pertenece al mismo orden que los ciprínidos (Rainboth et al., 1986).

La enzima ADH ha sido descrita como dimérica y con un control genético caracterizado por la existencia de un único locus en la mayoría de los cipriniformes (Ferris y Whitt, 1977a, b, c; Buth, 1979; Woods y Buth, 1984), a diferencia de lo observado en este trabajo, donde se han descrito dos loci para ADH. En el género *Oreochromis* se ha observado un patrón de ADH similar al descrito en tenca para esta enzima (Van der Bank et al., 1989). Cruz et al. (1982) encuentran para estas especies del género *Oreochromis* una gran actividad

de la alcohol deshidrogenasa y atribuyen a esto la adaptación de las mismas a aguas con muy bajas concentraciones de oxígeno. Una situación similar podría estar ocurriendo en tenca, especie adaptada también a aguas con bajos niveles de oxígeno.

La enzima isocitrato deshidrogenasa tiene dos zonas de actividad con diferente expresión tisular en tenca. La zona más lenta, predominante en corazón, está codificada por un locus. La zona más rápida, específica de hígado, esta codificada por dos loci (Fig. 21). Estas dos zonas pueden corresponderse con las formas mitocondriales y citosólicas señaladas en otros ciprínidos, tales como *Richardsonius balteatus*, en el que se ha descrito la existencia de un solo locus para cada zona (Woods y Buth, 1984). El hecho de que se hayan descrito dos loci para la zona anódica de tenca puede deberse, al igual que en el caso de la enzima AAT, a que se haya dado una duplicación en esta especie, o bien a que exista una duplicación ancestral que se manifieste solo en algunas especies de la familia.

Los resultados obtenidos en este trabajo para la enzima ME, sólo permiten decir que al menos existe un locus para esta enzima. En otros ciprínidos se han descrito dos zonas codificadas por un locus cada una (Woods y Buth, 1984). La diferencia entre estos datos y los nuestros puede deberse a haber obtenido una mala resolución para este sistema isoenzimático o bien a que realmente sólo haya un locus activo en tenca.

Las esterasas son un sistema isoenzimático con baja especificidad de sustrato constituido por al menos diez isoenzimas, que se han agrupado en cinco zonas, siendo variables las correspondientes a la zona IV. Este patrón no se diferencia en gran medida de lo descrito anteriormente para esta enzima, si se tiene en cuenta que debido al elevado número de bandas y zonas que presenta este sistema isoenzimático, la mayoría de los autores sólo interpretan una o dos zonas de las tres o cuatro que suelen citarse en otros trabajos sobre peces como barbos (Machordom, 1992) o salmónidos (Andersson et al., 1983).

Además, conviene señalar que nosotros hemos teñido simultáneamente las α y β esterasas, mientras que en muchos de estos trabajos únicamente se tiñe uno de los dos sistemas.

Respecto a la variabilidad detectada en la zona IV de esterasas, en este trabajo se han considerado varias explicaciones posibles respecto a su control genético, entre otros motivos para comprobar como puede influir el que se de una u otra interpretación en las estimas finales de la variabilidad genética tanto intra como interpoblacional. Aun en el caso de considerar la hipótesis del número menor de loci que pueda explicar la variación de esta zona (tres loci), hay que considerar la existencia de un alelo nulo, lo que no se ha descrito en otras especies de peces, bien porque realmente no los hay, bien porque corresponden a los loci que controlan aquellas zonas de esterasas que no han sido interpretadas.

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

El análisis de los productos de amplificación del ADN genómico ha permitido estudiar un total de 57 fragmentos (40 con RAPDs y 17 con PCR). De estos 57 fragmentos, sólo 10 resultaron variables, correspondiendo a fragmentos amplificados con los oligonucleótidos 5-B, 13-B, 7-F y MAE 1U-1L. Esta variabilidad se detecta como presencia o ausencia de los fragmentos amplificados analizados.

Las ventajas de la amplificación por RAPDs para cuantificar la variabilidad genética serían: el número ilimitado de oligodecámeros de secuencia aleatoria que se pueden emplear así como el que los fragmentos de ADN amplificados serán una muestra más representativa del genoma, ya que corresponden, en principio, a cualquier región del genoma, sea o no codificadora, secuencias únicas o repetidas, debido a que los oligonucleótidos empleados como cebadores amplificarán todas aquellas regiones que presenten una secuencia bastante homóloga, si bien presenta el inconveniente de comportarse como caracteres dominantes..

Las parejas de oligonucleótidos de genes específicos corresponden a secuencias de genes estructurales de *Salmo gairdneri*. Evidentemente, el fragmento de ADN amplificado en

tenca no tiene por qué ser homólogo al de trucha arcoiris, dado que pertenecen a taxones diferentes. Además, dadas las condiciones poco restrictivas de anillamiento de los cebadores (45 °C), se pueden amplificar fragmentos de ADN no necesariamente homólogos, por lo que la identificación de la secuencia de trucha como uno de los fragmentos obtenidos de tenca se hace más difícil. Esto nos permite considerar la posibilidad de que el comportamiento en la amplificación del ADN a partir de estos cebadores se pueda asimilar al de los "RAPDs", ya que algunos de los fragmentos pueden corresponder a genes de secuencia específica y otros ser fragmentos de cualquier región del genoma que presenten una secuencia semejante a la del cebador empleado, aunque también puede suceder que estos genes estructurales tengan más de una copia.

Aun así, podríamos considerar la posibilidad de que el fragmento 2, de aproximadamente 700 pb, obtenido a partir de la pareja de oligonucleótidos MAE 1U-1L se corresponda a una secuencia homóloga a la de trucha arcoiris, dada la similitud de longitud y el que sea el fragmento más amplificado. Igualmente, el fragmento de 620 pb obtenido con la pareja de cebadores MAE 6U-6L, podría tener una secuencia homóloga a la correspondiente al ADNc de la proteína de choque térmico de 70 Kd de trucha arcoiris. Una situación similar se daría para la banda 5, con un tamaño aproximado de 600 pb, y procedente de la amplificación con MAE 10U-10L. No obstante, para confirmar la homología sería necesario realizar pruebas de hibridación y secuenciación.

En los patrones electroforéticos de los fragmentos amplificados de ADN que hemos considerado válidos para el análisis genético, se ha observado variación en cuanto a la presencia o ausencia de determinados fragmentos. Es probable que esta variación se produzca en la secuencia homóloga a la del cebador y no en la zona interna del fragmento amplificado. Es de esperar que aquellos cambios que se produzcan dentro del fragmento amplificado no afecten al proceso de reconocimiento de la región homóloga al cebador. Sin embargo, podrían ser detectables, por ejemplo, aquellas modificaciones que se den en la

región interna del fragmento y que afecten a su tamaño. En este caso se observaría la aparición de un fragmento amplificado con un tamaño mayor o menor que el original (variación que no se ha detectado en este trabajo), o también la desaparición de la banda debido a que el tamaño del fragmento fuera lo suficientemente grande como para no poder ser amplificado con la técnica empleada. Las modificaciones que se den en la región homóloga a la del cebador podrían deberse a deleciones o inserciones que afecten a la secuencia diana del ADN molde, a la sustitución de alguna base o incluso también a la existencia de alguna translocación o inversión que afecte a dicha zona, aunque esta última posibilidad no es tan probable debido a su pequeña longitud (10 ó 17 pb).

4. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

4.1. Variabilidad genética intrapoblacional: Índice de polimorfismo. Heterocigosidad génica media.

Los resultados obtenidos en este trabajo a nivel bioquímico muestran como de los diez sistemas isoenzimáticos estudiados en el análisis poblacional (Tabla 10), sólo uno, el de esterasas, presentó variabilidad. El hecho de que sólo haya variación para este sistema ha sido descrito en otras especies piscícolas, como *Barbus meridionalis*, (Berrebi et al., 1988) y *Salvelinus alpinus*, (Ferguson, 1981). Además, este sistema isoenzimático suele ser variable en la mayor parte de las especies en las que se ha analizado (Kornfield et al., 1981; Andersson et al., 1983; Hallerman et al., 1986; Hindar et al., 1986; Seeb et al., 1987; Ammerman y Morizot, 1989).

El que las esterasas constituyan un sistema enzimático normalmente polimórfico se explica por su naturaleza y actividad. En general, las restantes enzimas analizadas tienen una actividad catalítica muy específica, fundamental para la vida del organismo, correspondiendo a rutas bioquímicas concretas e importantes y además, suelen estar controladas por un bajo número de loci. Sin embargo, las esterasas presentan una baja especificidad de sustrato,

actúan en ciclos muy variados y dada su gran versatilidad están controladas por un gran número de loci. En cierto modo es lógico que este sistema, u otros similares, presenten más frecuentemente variantes alélicas neutras para el organismo. El hecho de que haya unos sistemas isoenzimáticos muy variables y otros monomórficos pone de manifiesto la necesidad de realizar las estimas de la variabilidad genética con el mayor número de loci posible (Nei, 1973; Lewontin, 1974), para disminuir el error que se puede tener en el muestreo de estos sistemas isoenzimático.

Respecto a los caracteres moleculares, de los seis RAPDs, tres mostraron variabilidad mientras que en el caso de las tres parejas de cebadores usadas en PCR sólo dio fragmentos polimórficos una de ellas, MAE 1U-1L (Tabla 16).

Los loci isoenzimáticos y los fragmentos de ADN examinados en el presente estudio no fueron seleccionados de acuerdo con ninguna información previa respecto a si son sistemas variables o no, por lo que se puede considerar que proporcionan una estima fiable de la variabilidad genética presente en poblaciones españolas de tenca.

Los valores de polimorfismo obtenidos en este trabajo para los caracteres isoenzimáticos y moleculares (Tablas 13 y 17) son, en general, bastante similares.

A la vista de los resultados, podría decirse que los índices de polimorfismo obtenidos con RAPDs son algo superiores al resto. Esto es lógico ya que, aparte de considerar un número mayor de marcadores (40 fragmentos), éstos pueden corresponder a secuencias no codificadoras (intrones, secuencias altamente repetidas, etc.) y por lo tanto ser una muestra más representativa del genoma y, en consecuencia, ofrecer una estima de la variabilidad genética más real. A pesar de esto, las diferencias observadas entre las estimas de polimorfismo obtenidas por RAPDs e isoenzimas son pequeñas, lo que podría deberse a:

- la variabilidad genética existente en las poblaciones estudiadas se corresponde con la estima obtenida en este trabajo, lo que implicaría que el aumentar el número de marcadores estudiados no conllevaría un aumento de las estimas.

- con RAPDs sólo se detectan aquellas variaciones que afecten a la secuencia homóloga al cebador (10pb) o al tamaño del fragmento a amplificar, mientras que con las isoenzimas se detectan todas las variaciones que puedan encontrarse en la secuencia codificadora y que afecten a la carga neta de los aminoácidos.

En el caso de las estimas obtenidas por PCR, es importante destacar que hubo dos poblaciones (ORO y NC) que presentaron un índice de polimorfismo muy elevado (22%) mientras que dicho valor fue nulo (0%) en el resto de las poblaciones, de tal forma que para las primeras poblaciones el valor estimado fue superior al de RAPDs e isoenzimas y para las últimas, inferior. Esta técnica amplifica teóricamente fragmentos que se corresponden con genes de secuencia única, de tal forma que se esperaría obtener estimas similares a las calculadas con isoenzimas, e incluso inferiores, debido al tipo de variaciones que permite detectar (indicadas en el párrafo anterior). Esto justificaría que con las parejas de oligonucleóticos MAE 6U-6L y MAE 10U-10L todas las poblaciones sean invariables y que para el par MAE 1U-1L haya tres poblaciones totalmente monomórficas. De hecho, si se hace una estima del polimorfismo considerando simultáneamente los fragmentos obtenidos por RAPDs y PCR, el resultado es prácticamente igual al obtenido por isoenzimas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que todos los fragmentos observados para PCR no tienen por qué corresponder a genes de secuencia única, ya que puede haberse dado algún anillamiento inespecífico de los cebadores a otras regiones del ADN, y por tanto, como ya se indicó anteriormente, comportarse de forma parecida a los "RAPDS", con lo que parte de la variabilidad detectada no correspondería a los genes de secuencia única.

El que para PCR haya dos poblaciones (ORO y NC) con un alto nivel de polimorfismo (22%) es explicable por ser dos poblaciones, sobre todo ORO, que mostraron un elevado valor de variabilidad genética para todos los caracteres analizados, incluso cuando se estima la heterocigosidad génica media para caracteres isoenzimáticos.

botella", favorecidos por el hábitat restringido de estas poblaciones. Lagunas de tamaño finito, aisladas de los sistemas de drenaje, son hábitat inestables, tendentes a sufrir desequilibrios ecológicos, tanto naturales (sequía) como artificiales (pesca masiva).

Las estimas obtenidas en este trabajo, tanto para los índices de polimorfismo como para la heterocigosidad génica media, son inferiores a las descritas para este taxón: un índice de loci polimórficos del 15,2% y una heterocigosidad génica media de 5,13% (Nevo, 1978) ó 5,4% (Avisé y Aquadro, 1982). Sin embargo, los valores observados para tenca están dentro del rango descrito en ciertas especies de teleósteos, sobre todo en las de agua dulce: entre un 0 y un 4% en varias especies de ciprinidos (Avisé, 1977a, b); un 12% en *Barbus* (Machordom, 1992) y entre el 0 y el 9% en varias poblaciones francesas de *Barbus meridionalis* (Berrebi et al., 1988). Respecto a la heterocigosidad génica, Avisé (1977a, b) estima en ciprinidos una heterocigosidad del 0 al 15,4% con una media del 5,2%. Cataudella et al. (1986) observan una heterocigosidad génica del 2% en *Cyprinus carpio* y Cross y Ward (1980) del 3% en poblaciones norteamericanas de salmones, estima que según Andersson et al. (1981) es del orden del 1 ó 2% en el norte de Europa.

Además, en este trabajo no se han encontrado diferencias muy marcadas entre el índice de polimorfismo al 95% y al 99 %, a diferencia de lo observado en otras especies (*Clupea harengus*), donde el porcentaje de polimorfismo varía del 13,9% a 38,9%. (Andersson et al., 1981).

4.2. Identificación de poblaciones

Entre todos los loci isoenzimáticos y fragmentos de ADN amplificados no se ha podido identificar ningún marcador que esté exclusivamente en alguna población, pero si hay caracteres que al menos permiten rechazar la pertenencia de los individuos a algunas poblaciones, como es el caso de la banda EST-9 (80), que no aparece nunca en las poblaciones VG y CR, mientras que en el resto lo hace con una frecuencia lo suficientemente

grande como para considerar que si se estudia una muestra de estas poblaciones se detectaría dicha banda.

Respecto a los caracteres moleculares, la presencia en algún individuo de los fragmentos de 1700 y 1625 pb obtenidos con el oligonucleótido 13-B, permite rechazar la posibilidad de que la población sea la del "Embalse de Cintruénigo" (NC). Asimismo, aquellas muestras de poblaciones en las que se observe la ausencia de las bandas de 780 a 600 pb del oligonucleótido MAE 1U-1L permite rechazar la posibilidad de que pertenezcan a las poblaciones "Vega del Guadiana" (VG), "La Generala" (GRL) o "La Laguna del Cristo" (CR). La ausencia de la banda de 1400 pb del oligonucleótido 13-B indicaría que la muestra no pertenece a la población de "Oropesa" (ORO).

Estos caracteres pueden servir de diagnóstico para poder diferenciar unas poblaciones de otras, lo que es de gran importancia en la determinación de si la población que se está estudiando pertenece o no a diferentes "stocks".

4.3. Variabilidad genética interpoblacional: Distancias genéticas. Dendrogramas

En este trabajo se han obtenido las estimas de las distancias génicas medias interpoblacionales para caracteres isoenzimáticos (Tabla 15), moleculares (Tabla 18) y para el conjunto de todos los marcadores (Tabla 19). En el primer caso se obtiene una media del orden de 0,003 ó 0,005 según la hipótesis considerada para las esterasas, en el segundo caso de 0,0129 y en el tercero de 0,0100.

En el caso de las distancias genéticas estimadas para los caracteres isoenzimáticos, los valores globales obtenidos según las diferentes hipótesis de control genético de la zona IV de esterasas son, en general, muy similares, siendo del orden de 0,0000 a 0,0127 como máximo. Sin embargo, existen diferencias respecto a cuáles son las poblaciones que están más distanciadas, lo que se observa más claramente en los dendrogramas. Del mismo modo se observa que las distancias obtenidas con isoenzimas o fragmentos de ADN no son iguales, siendo además, en el último caso, mayores.

Estos resultados ponen de manifiesto las diferencias que pueden obtenerse con un tipo de marcadores u otro. Por esto consideramos que el resultado más fiable es el que considera el conjunto de todos los caracteres analizados, ya que las distancias y los dendrogramas obtenidos no varían con las distintas hipótesis consideradas para las esterasas. Se podría pensar, que al tener en cuenta todos los marcadores se reduce el error que conlleva una *interpretación errónea del control génico de las enzimas así como el considerar unos caracteres que realmente no constituyan una muestra al azar del genoma*. Además, las distancias y el dendrograma final son muy parecidos a las obtenidas para caracteres moleculares, lo que indica que cuanto mayor sea el número de marcadores estudiados (57 fragmentos de ADN frente a unos 24 loci isoenzimáticos), aparte de su mayor representación de una muestra del genoma, el error que se puede tener en las estimas confirma lo señalado por Nei (1987) respecto a que para realizar una estima correcta de las diferencias genéticas entre poblaciones muy relacionadas es necesario examinar un elevado número de marcadores.

Las distancias genéticas estimadas para caracteres isoenzimáticos están, en general, dentro del rango (0,002 a 0,065) indicado por Shaklee et al. (1982) para poblaciones de un gran número de especies piscícolas, tanto de agua dulce como salada. Por debajo de este rango, las poblaciones pueden ser consideradas de un mismo "stock". En cualquier caso, las estimas obtenidas en este trabajo pueden ser consideradas bajas, ya que, en general, están en el límite inferior de estas distancias. No se puede realizar una comparación similar con las estimas obtenidas para caracteres moleculares, ya que estos rangos se han establecido a partir de los estudios bioquímicos existentes hasta el momento, estudios que no existen para fragmentos de amplificación de ADN genómico en peces. Aun así, y a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, podríamos decir que las poblaciones DEH, VG, NB, GRL y CR pertenecen a un mismo grupo reproductor o "stock" mientras que las poblaciones

NC y ORO, que pueden pertenecer al grupo anterior, por precaución no deberían ser consideradas como un mismo "stock" de cultivo.

Distancias similares a las obtenidas en este trabajo para loci isoenzimáticos han sido descritas en otras especies de teleósteos: 0,003 en *Salvelinus alpinus* (Andersson et al., 1981) 0,001 en *Salmo trutta* (Ryman y Stahl, 1981), 0,002 en *Onchorhynchus masu* (Okazaki, 1986); *Lophius piscatorius* (Crozier, 1987), *Pleuronectes platessa* (Brulé, 1989) y *Clupea harengus* (Andersson et al., 1981).

Para finalizar, hay que resaltar que en el árbol obtenido para caracteres bioquímicos se puede observar la distancia de 0,000 obtenida para las poblaciones del "Dehesón del Encinar" (DEH) y "Vega del Guadiana" (VG), lo que es coherente con el hecho de ser la primera una muestra de la segunda. Además, estas poblaciones presentaron un índice de loci polimórficos y una heterocigosidad génica media similar, al igual que lo son las frecuencias génicas obtenidas para la zona IV de esterasas.

Como resumen podríamos decir que tanto los niveles estimados de variabilidad genética intrapoblacional como los de las distancias genéticas son en general bajos. Hay bastantes autores (Andersson et al., 1981; Berrebi et al., 1988;) que señalan que la baja variabilidad observada en las especies de ciprínidos y salmónidos puede deberse a efectos de la última glaciación, o a otros efectos ambientales naturales, pero que también puede deberse a la acción del hombre en las últimas décadas, tanto en cuanto a la explotación de las especies empleando un bajo número de reproductores, como al exterminio de las poblaciones naturales, bien por agresiones sobre el medio físico como sobre las mismas poblaciones, y consecuentemente a la repoblación a partir de alevines procedentes de piscifactorias. Todos estos factores pueden ser responsables de la pobreza genética que se observa en las poblaciones españolas de tenca.

RESUMEN

Con el fin de cuantificar la variabilidad genética intrapoblacional existente en varias poblaciones españolas de tenca y determinar su similitud genética, se ha realizado un estudio de las mismas a nivel citogenético, bioquímico (isoenzimas) y molecular (PCR y RAPDs). El estudio de la variación y diversidad genética de poblaciones naturales y cultivadas de tenca tiene una gran importancia para el conocimiento de la variabilidad genética de esta especie, ya que permite su aplicación a programas de mejora y al establecimiento de "stocks" de cultivo.

La caracterización citogenética ha permitido solucionar algunas contradicciones establecidas en cuanto al número de brazos de la especie e identificar la existencia de polimorfismos para la región organizadora nucleolar, si bien, éstos no se consideran adecuados para diferenciar poblaciones. La variabilidad observada para bandas C puede ser considerada muy baja comparada con la descrita en poblaciones naturales de la mayor parte de los organismos. Aun así, el polimorfismo detectado para los bloques heterocromáticos de los pares cromosómicos 6 y 8 podría ser considerado útil en el estudio de la variabilidad poblacional.

El análisis a nivel bioquímico ha permitido caracterizar 16 sistemas isoenzimáticos (con 45 loci implicados como máximo) aunque únicamente se han empleado diez sistemas (24-26 loci) para cuantificar la variabilidad. Sólo las esterasas fueron variables, poniendo de manifiesto el elevado monomorfismo de esta especie. Las estimas de variabilidad, índice de loci polimórficos y heterocigosidad génica, están dentro de lo descrito en otras muchas especies de peces, sobre todo de agua dulce.

El empleo de técnicas moleculares basadas en la amplificación de ADN (PCR y RAPDs) supone una nueva forma de cuantificar la variabilidad genética poblacional, ya que permite estudiar directamente el genoma de los individuos de una forma relativamente rápida y sencilla, ofreciendo la posibilidad de detectar marcadores moleculares que permitan la identificación genética de diferentes poblaciones o grupos (Williams et al., 1990). En este

trabajo se han caracterizado 57 fragmentos amplificados (40 por RAPDs y 17 por PCR), siendo variables diez (seis por RAPDs y cuatro por PCR). Las estimas de polimorfismo obtenidas con RAPDs han resultado ligeramente superiores a las de isoenzimas, mientras que con PCR esta estima ha sido inferior en algunas poblaciones. La estima para el conjunto de todos los caracteres moleculares es muy similar a la de isoenzimas.

Las distancias genéticas estimadas por cualquiera de los métodos empleados son en general bajas, siendo las de caracteres moleculares ligeramente más elevadas que las estimadas por isoenzimas. Las distancias más representativas son las que consideran todos los caracteres conjuntamente, obteniéndose un dendrograma en el que destaca la proximidad de las poblaciones "Vega del Guadiana", "Generala" y "Laguna del Cristo", y el mayor alejamiento de "Oropesa" y "Embalse de Cintruénigo", únicas poblaciones que podrían estar separadas del "stock" común formado por el resto ("Vega del Guadiana", "Dehesón del Encinar", "Las Bârdenas Reales", "La Generala" y "Laguna del Cristo", . De estas poblaciones, las que en general presentan una mayor variabilidad son "Oropesa", "Embalse de Cintruénigo" y "La Generala".

El peligro de la pérdida de la riqueza genética de las poblaciones naturales, ya sea por la acción del hombre, o por otros fenómenos naturales, se ponen de manifiesto en los resultados obtenidos en este trabajo, en el que se ha visto que la variabilidad genética tanto intra como interpoblacional, estimada en las poblaciones españolas de tenca es más baja de lo que se esperaría y sería deseable en poblaciones naturales.

CONCLUSIONES

1. La tenca es una especie diploide con un cariotipo monomórfico constituido por 48 cromosomas y un $NF=86$, con 8 pares cromosómicos metacéntricos, 11 submetacéntricos y 5 acrocéntricos y una longitud de 2,3 a 0,8 μ .
2. El patrón de bandeo C es fundamentalmente centromérico y telomérico, con algunas bandas intersticiales y algunos brazos completamente heteropicnóticos. Sólo se ha observado polimorfismo para los bloques heterocromáticos de los pares 6 y 8.
3. Existe un único par organizador nucleolar, par 3 en el que se localiza la región organizadora del nucleolo tanto por tinción convencional, como argéntica y cromomicina A3, detectándose la existencia de polimorfismo, tanto para el tamaño como para la posición, de dicha región.
4. Se han podido caracterizar 16 sistemas isoenzimáticos resultando monomórficos nueve de los diez empleados para cuantificar la variabilidad genética. Sólo las esterasas mostraron variabilidad.
5. De los seis oligonucleótidos decámeros empleados para obtener fragmentos amplificados por RAPDs, sólo mostraron variabilidad los generados por 5-B, 13-B y 7-F, mientras que mediante PCR sólo se detecta variabilidad con MAE 1U-1L.
6. Se han observado varios marcadores que permiten la identificación de poblaciones: isoenzima EST-9 (80), fragmentos de 1700 y 1625 pb obtenidos con el oligonucleótido 13-B y todos los fragmentos obtenidos con los oligonucleótidos MAE 1U-1L.
7. No existe ninguna evidencia cromosómica de la existencia de heterocromosomas sexuales, tanto a nivel de número, morfología o patrones de bandeo cromosómicos. Igualmente no se ha detectado ningún marcador, tanto isoenzimático como molecular, ligado al sexo.

BIBLIOGRAFÍA

ALLENDORF, F.W. y UTTER, F.M. (1979). "Population genetics". pg. 407-454. En W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett (eds.). **"Fish Physiology 8"**. Nueva York. Academic Press.

ALLENDORF, F.W. y PHELPS, S.R. (1980). "Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout". **Trans. Am. Fish. Soc.**, 109: 537-543.

ALLENDORF, F.W. y PHELPS, S.R. (1981). "Use of allele frequencies to describe population structure". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 38: 1.507-1.514.

ALLENDORF, F.W. y LEARY, R.F. (1986). "Heterozygosity and fitness in natural populations of animals". pg. 57-76. En M.E. Soulé (ed.). **"Conservation biology: the science of scarcity and diversity"**. Sinauer Association Sunderland, Massachusetts.

ALLENDORF, F.W. y RYMAN, N. (1987). "Genetic management of hatchery stocks". pg. 141-159. En N. Ryman y F. Utter (eds.). **"Population genetics and fishery management"**. University of Washington Press, Seattle, Washington.

ALLENDORF, F.W.; MITCHELL, N.; RYMAN, N. y STAHL, G. (1977). "Isozyme loci in brown trout (*Salmo trutta* L.): detection and interpretation from population data". **Hereditas** 86: 179-189.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. DE; FORESTI, F. y TOLEDO-FILHO, S.A. (1981). "Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region in the Knife fish, *Aploronotus albifrons* (Pisces, *Apleronotidae*)". **Experientia**, 37: 953-954.

ALTUKHOV, Y.P. (1981). "The stock concept from the viewpoint of population genetics". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 38: 1.523-1.538.

ALVAREZ, M.C.; CANO, J. y THODE, G. (1980). "DNA content and chromosome complement of *Chromis chromis* (Pomacentridae, Perciformes)". **Caryologia**, 33: 267-274.

AMEMIYA, C.T. y GOLD, J.R. (1986). "Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes". **Copeia**, 1: 226-231.

AMEMIYA, C.T. y GOLD, J.R. (1988). "Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes". **Genetica**, 76: 81-90.

- AMEMIYA, C.T. y GOLD, J.R.** (1990a). "Cytogenetic studies in North American minnows (*Cyprinidae*) XVII. Chromosomal NOR phenotypes of 12 species, with comments on cytosystematic relationships among 50 species". **Hereditas**, 112: 231-247.
- AMEMIYA, C.T. y GOLD, J.R.** (1990b). "Chromosomal NOR phenotypes of seven species of North American Cyprinidae, with comments on cytosystematic relationships of the *Notropis volucellus* species-group *Opsopoeodus emiliae*, and the genus *Pteronotopsis*". **Copeia**: 68-78.
- AMMERMAN, L.K. y MORIZOT, D.C.** (1989). "Biochemical genetics of endangered Colorado squawfish populations". **Trans. Am. Fish. Soc.**, 118: 435-440.
- ANDERSSON, L.; RYMAN, N.; ROSENBERG, R. y STAHL, G.** (1981). "Genetic variability in Atlantic herring (*Clupea harengus harengus* L.): description of protein loci and population data". **Hereditas**, 95: 69-78.
- ANDERSSON, L.; RYMAN, N. y STAHL, G.** (1983). "Protein loci in the Artic charr, *Salvelinus alpinus* L.: electrophoretic expression and genetic variability patterns". **J. Fish Biol.**, 23: 75-94.
- AVISE, J.C.** (1977a). "Genic heterozygosity and rate of speciation". **Paleobiology** 3: 422-432.
- AVISE, J.C.** (1977b). "Is evolution gradual or rectangular? Evidence from living fishes". **Proc. Natl. Acad. Sci.** 74: 5083-5087.
- AVISE, J.C. y AQUADRO, C.F.** (1982). "A comparative summary of genetic distances in the vertebrates" pg. 151-185. En Hech, Wallace y Prance (eds.). "**Evol. Biol.**", Vol. 15, Plenum Publishing Corporation.
- AVISE, J.C. y LANSMAN, R.A.** (1983). "Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals". pg 147-164. En M. Nei y R.K. Koehn (eds.). "**Evolution of Genes and Proteins**". Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- BARTLETT, S.E. y DAVIDSON, W.S.** (1991). "Identification of *Thunnus luna* species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome "b" genes". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 48: 309-317.
- BERBEROVIC, L.J.; SOFRADZIJA, A. y VAGNER, L.** (1978). "The chromosomes of tinch". **Acta Biol. Iugos.: Ichthyol.**, 10: 9-15.

- BERG, W.J. y GALL, G.A.E.** (1988). "Gene flow and genetic differentiation among California Coastal rainbow trout populations". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 45:
- BERNATCHEZ, L. y DODSON, J.J.** (1990). "Mitochondrial DNA variation among anadromous populations of cisco (*Coregonus artedii*) as revealed by restriction analysis". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 47: 533-543.
- BERREBI, P.; LAMY, G.; CATTANEO-BERREBI, G. y RENNO, J.F.** (1988). "Variabilité génétique de *Barbus meridionalis* Risso (Cyprinidae): une espèce quasi monomorphe". **Bull. Française Pêche Piscic.**, 310: 77-84.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S. y MOREIRA FILHO, O.** (1978). "Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdæ* (Pisces, Erythrinidae)". **Rev. Bras. Genet.** 1: 103-120.
- BREWER, G.J. y SING, C.F.** (1970). "An introduction to isozyme techniques" Academic Press. Nueva York, Londres. 186 págs.
- BRULE, T.** (1989). "Analysis of the enzyme polymorphism in a plaice, *Platessa platessa* L., population from the North-West coast of Brittany, France". **J. Fish Biol.**, 35: 607-620.
- BUTH, D.G.** (1979). "Duplicate gene expression in tetraploid fishes of the tribe Moxomastini (Cypriniformes, *Catostomidae*)". **Comp. Biochem. Physiol.**, 63B: 7-12.
- BUTH, D.G.** (1982). "Glucose phosphate isomerase expression in a tetraploid fish, *Moxostoma valenciennesi* (Cypriniformes, *Catostomidae*): Evidence for 'retetraploidization'?" **Genetica** 57: 171-175.
- BUTH, D.G.** (1983). "Duplicate isozyme loci in fishes: origins, distribution, phyletic consequences and locus nomenclature". pg. 381-400. En **Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research, Vol. 10: Genetics and Evolution.**
- BUTH, D.G.** (1984). "Allozymes of the Cyprinid Fishes. Variation and application". pg. 561-589. En B.J. Turner (ed.) **Evol. Genet. of Fish.** .
- BUTH, D.G. y BURR, B.M.** (1978). "Isozyme variability in the cyprinid genus *Campostoma*". **Copeia**, 298-311.

CAMPO, J.M.; MELENDEZ, J.M. y DE TORRES, M (1991). "Cultivo extensivo de la tenca (*Tinca tinca* L.) en la zona occidental de Castilla-La Mancha (Toledo)". **Servicio de Investigación y Experimentación Agraria. Serie: Area de Recursos Naturales. N° 2.**

CATAUDELLA, S.; SOLA, L.; ACCAME-MURATORI, R. y CAPANNA, E. (1977). "The chromosomes of 11 species of *Cyprinidae* and one *Cobitidae* from Italy, with some remarks on the problem of polyploidy in the cypriniforme". **Genetica**, 47:161-171.

CATAUDELLA, S.; SOLA, L.; CORTI, M.; ARCANGELI, R.; LA ROSA, G.; MATTOCIA, M.; COBOLLI-SBORDONI, M. y SBORDONI, V. (1986). "Cytogenetic, genic and morphometric characterization of groups of common carp, *Cyprinus carpio*" EIFAC/FAO Symp. on Selec., Hybrid. and Genet. Engenier. in Aquat. Fishes and Shellfish for Consump. and Stock. Bordeaux (France), 27-30 May, 1986.

CLAVER, I. y DÍAZ DE LA LASTRA, E. (1983). "Localización de areas para uso acuícola en la provincia de Badajoz (Facies léntica)". **CEOTMA. MOPU.**

CRABTREE, C.B. y BUTH, D.G. (1981). "Gene duplication and diploidization in tetraploid catostomid fishes *Catostomus fumiventris* and *C. santonae*". **Copeia**, 1981: 705-708.

CRABTREE, C.B. y BUTH, D.G. (1987). "Biochemical systematics of the catostomid genus *Catostomus*: assesment of *C. Clarki*, *C. plebeius* and *C. discobolus* including the zuni sucker, *C. d. yarrowi*". **Copeia**, 4: 843-854.

CROSS, T.F. y KING, J. (1983). "Genetic effects of hatchery rearing in Atlantic salmon". **Aquaculture**, 33: 33-40.

CROSS, T.F. y PAYNE, R.H. (1978). "Geographic variation in Atlantic cod, *Gadus morhua*, off eastern North America: a biochemical systematics approach". **J. Fish. Res. Board of Canada**, 35: 117-123.

CROSS, T.F. y WARD, R.D. (1980). "Protein variation and duplicate loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L.". **Genet. Res.**, 36: 147-165.

CROZIER, W.W. (1987). "Biochemical genetic variation and population structure in angler-fish *Lophius piscatorius* L. from the Irish Sea and West of Scotland". **J. Exper. Marine Biol. and Ecol.**, 106. 125-136.

CRUZ, T.A.; THORPE, J.P. y PULLIN, R.S.V. (1982). "Enzyme electrophoresis in *Tilapia zillii*: a pattern for determining biochemical genetic markers for use in *Tilapia* stock identification". **Aquaculture**, 29: 311-329.

DAVIDSON, W.S.; BIRT, T.P. y GREEN, J.M. (1989). "A review of genetic variation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and its importance for stock identification, enhancement programs and aquaculture". **J. Fish Biol.**, 34: 547-560.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J. y HICKS, J.B. (1983). "A plant DNA minipreparation: Version II". **Plant Molecular Biol. Report.**, 1: 19-21.

FAIRBURN, D.J. (1981). "Biochemical genetic analysis of population differentiation in Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) from the Northwest Atlantic, Gulf of St. Lawrence and Bering Sea". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 38: 669-677.

FALCONER, D.S. (1960). "**Introduction to quantitative genetics**". Longman, Nueva York. 365 págs.

FAO/PNUMA (1984). "Conservación de los recursos genéticos de los peces: problemas y recomendaciones". **Informe de la Consulta de Expertos sobre los recursos genéticos de los peces. F.A.O., Documento Técnico de Pesca**, 217 págs.

FERGUSON, A. (1981). "Systematics of Irish Charr as indicated by electrophoretic analysis of tissue proteins" **Biochem. System. and Ecol.**, 9: 225-232.

FERGUSON, A. (1989). "Genetic differences among brown trout, *Salmo trutta*, stocks and their importance for the conservation and management of the species". **Freshwat. Biol.**, 21: 35-46.

FERRIS, S.D. y WHITT, G.S. (1977a). "The evolution of duplicate gene expression in the carp (*Cyprinus carpio*)". **Experientia**, 33: 1.299-1.301.

FERRIS, S.D. y WHITT, G.S. (1977b). "Loss of duplicate gene expression after polyploidization". **Nature**, 265: 258-260.

FERRIS, S.D. y WHITT, G.S. (1977c). "Duplicate gene expression in diploid and tetraploid loaches (Cypriniformes, *Cobitidae*)". **Biochem. Genet.**, 15: 1097-1111.

FERRIS, S.D. y WHITT, G.S. (1979). "Evolution of the differential regulation of duplicate genes after polyploidization". **J. Molecular Evolution**, 12: 267-317.

FERRIS S. D.; BUTH, D.G. y WHITT, G.S. (1982). "Substantial genetic differentiation among populations of *Catostomus plebeius*". **Copeia** 1982: 444-449.

FIGUEIRAS, A.M.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T; SALINAS, J. y BENITO, C. 1985. "Association of isozymes with a reciprocal translocation in cultivated rye (*Secale cereale* L.). **Genetics**, 109: 177-193.

FISHER, S.E. ; SHAKLEE. J.B.; FERRIS, S.D. y WHITT, G.S. (1980). "Evolution of the five multilocus isozyme systems in the chordates" **Genetica**, 52/53: 73-85.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. DE y TOLEDO-FILHO, S.A. (1981). "Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes". **Cytogenet. and Cell Genet.**, 31: 137-144.

FRANKEL, O. H. (1983). "Foreword, p. xiii-xv. En C. Schonewald-Cox, S. M. Chambers, B. MacBryde y W.L. Thomas (eds.). **"Genetics and conservation; a reference for managing wild animal and plant populations"**. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. Londres.

FRANKEL, O.H. y SOULE, M.E. (1981). **"Conservation and evolution"**. Cambridge University Press, Nueva York. 327 págs.

GALETTI, P.M.Jr.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C. y MOREIRA-FILHO, O. (1984). "Characterization of eight species of *Anostomidae* Cypriniformes fish on the basis of nucleolar organizer region". **Caryologia**, 37: 401-406.

GILE, S.R. y FERGUSON, M.M. (1990). "Crossing methodology and genotypic diversity in a hatchery strain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 47: 719-724.

GILES, V.; THODE, G. y ALVAREZ, M.C. (1985). "A new robertsonian fusion in the multiple chromosome polymorphism of a mediterranean population of *Gobius pagannellus* (*Gobinius*, Perciformes)". **Heredity**, 55 (1985). 255-260.

GIRALDEZ, R y ORELLANA, J. (1979). "Metaphase I bonds, crossing over frequency and genetic length of specific chromosome arm of rye". **Chromosome**, 72: 327-385.

GOLD, J.R. (1979). "Cytogenetics". pg. 353-405. En W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett (eds.). "**Fish Physiology, Vol. III**". Academic Press, Nueva York.

GOLD, J.R. (1984). "Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American cyprinid fishes". **Copeia**, 1: 133-139.

GOLD, J.R.; AMEMIYA, C.T. y ELLISON, J.R. (1986). "Chromosomal heterochromatin differentiation in North American Cyprinid Fishes". **Cytologia** 51: 557-566.

GRANT, W.S. y UTTER, F.M. (1980). "Biochemical population genetic variation in walleye pollock, *Theragra halogramma*; population structure in the Southeastern Bering Sea and the Gulf of Alaska". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 36: 1.093-1.100.

GRANT, W. S. y UTTER, F.M. (1984). "Biochemical population genetics of Pacific herring (*Clupea pallasii*)". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 41:856-864.

HAFEZ, R.; LABAT, R. y QUILLIER, R. (1978a). "Etude cytogénétique chez quelques espèces de cyprinidés de la région midi-pyrénées". **Extrait du Bull. de la Soc. d'Histoire Naturelle de Toulouse**, 114 (1-2): 122-159.

HAFEZ, R.; LABAT, R. y QUILLIER, R. (1978b). "Teneurs nucléaires en ADN et relations évolutives dans la famille des cyprinides (Teleostei)". **Extrait du Bull. de la Soc. d'Histoire Naturelle de Toulouse**, 114 (1-2): 71-84.

HAFEZ, R. (1979). "Analyse du caryotype de la tanche (*Tinca tinca* L.) par l'obtention des bandes C et G". **Cybium** 3e série, (7): 15-26.

HALLERMAN, E.M.; SMITHERMAN, R.O.; REED, R.B.; TUCKER, W.H. y DUNHAM, R.A. (1986). "Biochemical genetics of largemouth bass in mesosaline and freshwater areas of the Alabama river system". **Trans. Am. Fish. Soc.**, 115: 15-20.

HALLERMAN, E.M. y BECKMAN, J.S. (1988). "DNA-level polymorphism as a tool in fisheries science". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 45: 1.075-1.087.

- HARTLEY, S.E. y HORNE, M.T.** (1984). "Chromosome polymorphism and constitutive heterochromatin in the Atlantic salmon, *Salmo salar*". **Chromosoma** 89: 377-380.
- HARTLEY, S.E.**(1987). "The chromosomes of salmonid fishes". **Biol. Rev.** 62: 197-214.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. y EDWARDS, Y.H.** (1977). "Polymorphism and the subunit structure of enzymes: a contribution to the neutralist-selectionist controversy". **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 74: 698-701.
- HEINONEN, M.** (1988). "Taxonomy and genetic variation of whitefish (*Coregonus* spp.) in Lake Saimaa". **Finnish Fish. Res.**, 9: 39-47.
- HINDAR, K; JONSSON, B; RYMAN, N y STAHL, G.** (1991). "Genetics relationships among landlocked, resident, and anadromous Brown Trout, *Salmo trutta* L.". **Heredity**, 66: 83-91.
- HUET, M.** (1983). "**Tratado de Piscicultura**". 3ª Edición. Ed. Mundi-Prensa.
- IHSSEN, P.E. y TAIT, J.S.** (1981). "Genetic differences in retention of swim-bladder gas between two populations of lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 37: 1630-1634.
- IHSSEN, P.E.; BOOKE, H.E.; CASSELMAN, J.M.; McGLADE, J.M.; PAYNE, N.R. y UTTER, F.M.** (1981). "Stock identification: material and methods". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 38: 1.838-1.855.
- IUBNC (International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee).** (1984). "Enzyme nomenclature". Academic Press, Orlando, Florida.
- JOHN, B.** (1988). "The biology of heterochromatin", pg 1-128. En R.S. Verma (ed). "**Heterochromatin: molecular and structural aspects**". Cambridge University Press.
- KAPUSCINSKI, A.R. y PHILLIP, D.P.** (1988). "Fisheries Genetics: issues and priorities for research and policy development". **Fisheries** 13: 4-10.
- KINCAID, H.L.** (1976a). "Inbreeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". **J. Fish. Res. Board of Canada**, 33: 2.420-2.426.

KINCAID, H.L. (1976b). "Inbreeding depression in rainbow trout". **Trans. Am. Fish. Soc.**, 105: 273-280.

KINCAID, H.L. (1983). "Inbreeding in fish populations used for genetics". **Aquaculture**, 33: 215-227.

KOCHER, T.D. y WHITE, T.J. (1989). "Evolutionary analysis via PCR". pg. 137-147. En H.A. Erlich (ed.). "**PCR Technology**". McMillan Publishers Ltd.

KORNFIELD, I.; BELAND, K.F.; MORING, J.R. y KIRCHEIS, F. (1981). "Genetic similarity among endemic arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and implications for their management". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 38:32-39.

LANSMAN, R.A.; SHADE, R.O.; SHAPIRO, J.F. y AVISE, J.C. (1981). "The use of restriction endonuclease to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations III. Techniques and potential applications". **J. Molecular Evolution**, 17: 214-226.

LARKIN, P.A. (1972). "The stock concept and management of Pacific salmon". pg. 11-15. En P.A. Larkin, R.C. Simon (eds.). "**The stock concept in Pacific salmon**". University of British Columbia, Vancouver, B.C.

LEARY, R.F.; ALLENDORF, F.W. y KNUDSEN, K.L. (1985). "Developmental instability as an indicator of reduced genetic variation in hatchery trout". **Trans. Am. Fish. Soc.**, 1/4: 230-235.

LEVAN, A.; FREDGA, K. y SANDBERG, A.A. (1964). "Nomenclature for centromeric position on chromosomes". **Hereditas**, 52: 201-220.

LEWONTIN, R.C. (1974). "**The genetic basis of evolutionary change**". Nueva York. Columbia University Press.

LOZANO, L. (1990). "Los peces fluviales de España". **Memorias de la Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid. Serie de Ciencias Naturales. Tomo V.**

LOZANO, R.; RUIZ-REJÓN, C. y RUIZ-REJÓN, M. (1991). "An analysis of coho salmon chromatin by means of C-banding, AG- and fluorochrome staining, and in situ digestion with restriction endonucleases". **Heredity**, 66: 403-409.

- LUCOWICZ, M. VON y PROSKE C.** (1979). "Production and reproduction of tench". **Riv. It. Piscic. Ittiop.** A. XIV- N. 4: 109-116.
- MACHORDOM, A.** (1992). "Filogenia y evolución del género *Barbus* en la península ibérica mediante marcadores moleculares". Tesis. **Universidad Complutense de Madrid.**
- MANGLAY, G. y JAMIESON, A.** (1979). "Genetic fags applied to the European hake; *Merluccius merluccius* (L.)". **Animal Blood Groups Biochem. Genet.**, 10: 39-48.
- MARKET, C.L. y MÖLLER, F.** (1959). "Multiple forms of enzyme: tissues, ontogenetic and species specific patterns". **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 45: 753-763.
- MARTÍNEZ, P.; VIÑAS, A.; BOUZA, C.; ARIAS, J.; AMARO, R. y SÁNCHEZ, L.** (1991). "Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of Sea and Brown Trout from Northwestern Spain". **Heredity**, 66: 9-17.
- MAYR, B.; RAB, P. y KALAT, M.** (1986). "NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Cyprinidae* of different ploidy level". **Genetica**, 69:111-118.
- McLEAN, J.A. y EVANS, D.O.** (1981). "The stock concept, discreteness of fish stocks and fisheries management". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 38: 1.889-1.898.
- MEFFE, C.H.** (1986). "Conservation genetics and the management of endangered fishes". **Fisheries** 11 (1): 14-23.
- MESSIAH, S.N. y TIBBO, S.N.** (1971). "Discreteness of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) populations in spring and autumn fisheries in the Southern Gulf of St. Lawrence". **J. Fish. Research Board of Canada**, 28: 1.009-1.014.
- MITTON, J.B. y GRANT, M.C.** (1984). "Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis". **Annual Rev. Ecol. System.**, 15: 479-499.
- MOAV, R.; BRODY, T. y HULATA, G.** (1978). "Genetic improvement of wild fish populations". **Science** 201: 1090-1094.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. y GALETTI, P.M.Jr.** (1980). "Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Aparnisodon affinis* (Pisces, *Aparnisodontidae*)". **Caryologia** 33: 83-91.

- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. y GALETTI, P.M.Jr.** (1984). "Structure and variability of nucleolar organizer regions in *Parodontidae* fish". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 26 (5): 564-568.
- MORELLI, S.** (1981). "Aspectos citogenéticos do gênero *Astyanax* (Pisces, *Characidae*)". **Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Sao Carlos.**
- MULLIS, K.B.; FALOONA, S.; SCHARF, R.; SAIKI, R.; HORN, G. y ERLICH, H.** (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction". **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, 51: 263-273
- MUUS, B.J. y DAHLSTRÖM, P.** (1981). "Los peces de agua dulce de España y de Europa". Ed. Omega.
- NEI, M.** (1972). "Genetic distance between populations". **The American Naturalist**, 106: 283-292.
- NEI, M.** (1973). "Analysis of gene diversity in subdivided populations". **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 70: 3321-3323.
- NEI, M.** (1987). "**Molecular Evolutionary Genetics**". Columbia University Press. Nueva York.
- NEI, M. y ROYCHODHURY, A.K.** (1972). "Gene differences between Caucasian, Negro, and Japanese populations". **Science**, 177: 434-436.
- NEI, M. y ROYCHODHURY, A.K.** (1974). "Sampling variances of heterozygosity and genetic distance". **Genetics**, 76: 379-390.
- NEI, M.; STEPHENS, J.C. y SAITOU, N.** (1985). Methods for computing the standard errors of branching points in evolutionary tree and their application to molecular data from humans and apes". **Mol. Biol. Evol.**, 2: 66-85.
- NELSON, K y SOULÉ, M.** (1987). "Genetical conservation of exploited fishes". pg. 345-368. En N. Ryman y F. Utter (eds.). "**Populations genetics and fishery management**". Washington State University Press, Seattle, Washington.

- NEVO, E. (1978).** "Genetic variation in natural populations: patterns and theory". **Theor. Population Biol.**, 13: 121-177.
- NYGREN, A.J.; ANDREASSON, J.; JONSSON, L. y JAHNKE, G. (1975).** "Cytological studies in Cyprinidae (Pisces)". **Hereditas**, 81: 165-172.
- O'BRIEN, S.J.; ROELKE, M.E.; MARKER, L.; NEWMAN, A.; WINKLER, C.A.; MELTZER, D.; COLLY, L.; EVERMAN, J.F.; BUSH, M y WILDT, D.E. (1985).** "Genetic basis for species vulnerability in the cheethat". **Science** 227: 1428-1434.
- OHNO, S.; STENIUS, C.; FAISST, E. y ZENZES, M.T. (1965).** "Postzigotic chromosomal rearrangements in rainbow trout (*Salmo irideus* Gibbons)". **Cytogenetics** 4: 117-129.
- OHNO, S.; MURAMOTO, J.; CHRISTIAN, L. y ATKIN, N.B. (1967).** "Diploid-tetraploid relationship among old-world members of the fish family *Cyprinidae*". **Chromosoma**, 23: 1-9.
- OKAZAKI, T. (1986).** "Genetic variation and population structure in Masou salmon *Oncorhynchus masou* of Japan". **Bull. Japan. Soc. Sci. Fishery**, 52 (8): 1.356-1.376.
- PENTECOST, B.T.; WRIGHT, J.M. y DIXON, G.H. (1985).** "Isolation and sequence of cDNA clones coding for a member of the family of high mobility group proteins (HMG-T) in trout and analysis of HMG-T-mRNA's in trout tissues". **Nucl. Acids Res.**, 13: 4.871-4.889.
- PÉREZ, J.E. (1987).** "Genética y acuicultura" **Rev. Lat. Acui. Lima-Perú**, 31: 43-56.
- PHILLIPS, R.B. y IHSEN, P.E. (1985a).** "Chromosome banding in salmonid fish: nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*". **Can. J. Genet. and Cytol.**, 27: 433-440.
- PHILLIPS, R.B. y IHSEN, P.E. (1985b).** "Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Cytogenet. and Cell Genet.**, 39: 14-18.
- PHILLIP, D.P.; KRUEGER, C.C.; THORGAARD, G.H.; WATTENDORF, R.J. y CLAUSSEN, J.E. (1986).** "Fisheries genetics: Where should we be going?". **Fisheries**, 11 (3): 14-17

POULIK, M.D. (1957). "Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffer". **Nature**, 180: 1.447-1.479.

RAINBOTH, W.J y WHITT, G.S. (1974). "Analysis of evolutionary relationships among shiners of the subgenus *Lucilus* (Teleostei, Cypriniformes, *Notropis*) with the lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme systems". **Compar. Biochem. and Physiol.**, 49B: 241-252.

RAINBOTH, W.J.; BUTH, D.G. y JOSWIAR, G.R. (1986). "Electrophoretic and kariological characters of the Gyrinocheilid fish, *Gyrinocheilus aymonieri*". **Biochem. System. and Ecol.**, 14 (5): 531-537.

RALEIGH, R.F. (1971). "Innate control of the migrations of salmon and trout fry from natal gravels to rearing areas". **Ecology**, 52: 291-297.

RALEIGH, R.F. y CHAPMAN, D.W. (1971). "Genetic control in lakeward migrations of cutthroat trout fry" **Trans. Am. Fish. Soc.**, 100: 33-40.

RALLS, K.; BALLOU, J. (1983). "Extinction: lessons from zoos". pg. 164-184. En C.M. Schonewald-Cox, S.M. Chambers, B. McBryde y L. Thomas (eds.). "**Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**". Benjamin-Cummings, Menlo Park, California.

RASHMIKANT, K.K.; JONES, D. y CANDIDO, E.P.M. (1984). "70 kilodalton heat shock polypeptides from rainbow trout: characterization of cDNA sequences". **Mol. Cell Biol.**, 4: 1.785-1.791.

REISENBICHLER, R.R. y PHELPS, S.R. (1989). "Genetic variation in steelhead (*Salmo gairdneri*) from the North Coast of Washington". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 46: 66-73.

RENNO, J.F.; GUYOMARD, R.; BOUJARD, T. y BASTIDE, C. (1989). "Evidence for genetic isolation among four morphological species of *Leporinus* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana". **Aquatic Living Resources**, 2: 127-134.

RIDGWAY, B.J.; SHERBURNE, S.W. y LEWIS, R.D. (1970). "Polymorphism in the esterases of Atlantic herring". **Trans. Am. Fish. Soc.**, 99: 147-151.

- RITOSSA, F.M.; ATWOOD, K.C.; LINDSLY, D.L. y SPIEGELMAN, S. (1966).** "On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA". **National Cancer. Institute Monographic**, 23: 448-472.
- ROHLF, J. (1990).** "NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System". Dept. Ecol. Evol. New York.
- RUIZ, I.R.G. (1982).** "Organizadores nucleolares e evolução cariotípica em anfíbios poliplóides". **Cienc. Cult.**, 34 (4): 470-473.
- RYCHLIK, W. (1990).** "OLIGO Version 3.4: Primer Analysis Software".
- RYMAN, N. (1970).** "A genetic analysis of recapture frequencies of released young of salmon (*Salmo salar* L.). **Hereditas** 65: 159-160.
- RYMAN, N. y STAHL, G. (1980).** "Genetic changes in hatchery stocks of brown trout (*Salmo trutta*)". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 37: 82-87.
- RYMAN, N. y STAHL, G. (1981).** "Genetic perspectives of the identification and conservation of Scandinavian stocks of fish". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 38: 1.562-1.575.
- SAIKI, R.K. (1989).** "The design and optimization of the PCR". **PCR Technology** 7-16. Editor Henry A. Erlich. McMillan Publishers Ltd.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989).** "Molecular cloning. A laboratory manual". 2nd ed. Ed. C. Nolan. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York.
- SÁNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, P.; VIÑAS, A. y BOUZA, C. (1990).** "Analysis of the structure and variability on nucleolar organizer regions of *Salmo trutta* by C-, Ag and restriction endonuclease banding". **Cytogenet. and Cell Genet.**, 54: 6-9.
- SCHMID, M. (1978)** "Chromosome Banding in amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*". **Chromosoma** 66: 361-388.
- SCHMID, M. y GUTTENBACH, M. (1988).** "Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates". **Chromosoma** 97: 101-114.

SCHMIDTKE, J.; ZENZES, M.T.; DITTES, H. y ENGEL, W. (1975). "Regulation of cell size in fish of tetraploid origin". **Nature**, 254: 426-427.

SCHWEIZER, D. (1981). "Counterstain-enhanced chromosome banding". **Human Genet.**, 57: 1-14.

SEEB, J.E.; SEEB, L.W.; OATES, D.W. y UTTER, F.M. (1987). "Genetic variation and postglacial dispersal of populations of northern pike (*Esox lucius*) in North America". **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 44: 556-561.

SELANDER, R.K.; SMITH, M.H.; YANG, S.Y.; JOHNSON, W.E. y GENTRY, J.B. (1971). "Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the oldfield mouse (*Peromyscus polionotus*). **Studies in Genetics, VI.** Texas University Publishers 7.103: 49-90

SHAKLEE, J.B.; TAMARUS, C.S. y WAPLES, R.S. (1982). "Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins". **Pac. Sci.**, 36: 141-157.

SHAKLEE, J.B.; ALLENDORF, F.W.; MORIZOT, D.C. y WHITT, G.S. (1989). "Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish: Proposed guidelines". **Trans. Am. Fish. Soc.**, 118: 218-227.

SHAKLEE, J.B.; ALLENDORF, F.W.; MORIZOT, D.C. y WHITT, G.S. (1990a). "Gene nomenclature for protein-coding loci in fish". **Trans. Am. Fish. Soc.**, 119: 2-15.

SHAKLEE, J.B.; BUSACK, C.; MARSHALL, A.; MILLER, M. y PHELPS, S.R. (1990b). "The electrophoretic analysis of mix-stock fisheries of Pacific Salmon". pg 235-265. En Z.I. Ogita y C.L. Market (eds.). **"Isozymes: structure, function, and use in Biology and Medicine. Progress in Clinical and Biological Research"** Wiley-Liss, Inc. Nueva York.

SHAW, C.R. y KOEN, A.L. (1968). "Starch gel zone electrophoresis of enzymes". pg. 325-364. En I. Smith (ed.) **"Chromatographic and electrophoretic techniques"**. Intescience Publ., Chichester, Sussex,

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. (1973). **"Numerical taxonomy"**. W. H. Freeman & Co., San Francisco.

SOULÉ, M.E. (1980). "Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential". pg. 151-169. En M.E. Soulé y B.A. Wilcox (eds.). "**Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective**". Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts.

STANLEY, K.K. y HERTZ, J. (1987). "Topological mapping of complement component C9 by recombinant DNA techniques suggest a novel mechanism for its insertion into target membranes". **EMBO Journal**, 6 (7): 1.951-1.957.

STATES, J.C.; CONNOR, W.; WOSNICK, M.A.; AIKEN, J.M.; GEDAMU, L. y DIXON, G.H. (1982). "Nucleotide sequence of a protamine component c-ii gene of *Salmo gairdneri*". **Nucl. Acid Res.**, 10: 4.551-4.563.

SVÄRDSON, G. (1979). "Speciation of scandinavian *Coregonus*". **Rep. Inst. Freshw. Res.. Drottningholm**, 57: 3-95.

THODE, G.; CANO, J. y ÁLVAREZ, M.C. (1983a). "Associations of nucleolus organizer chromosomes shown by silver staining in *Jobius fallax*". **J. of Heredity**, 74: 480-482.

THODE, G.; GILES, V. y ÁLVAREZ, M.C. (1985a). "Multiple chromosome polymorphism in *Jobius puyanellus* (Teleostei, Perciformes)". **Heredity**, 54: 3-7.

THODE, G.; ÁLVAREZ, M. C.; GILES, V. y GARCÍA, E. (1985b). "Chromosome complement, C-banding and Ag-NOR location in *Ophichthus serpens* (Ophichthidae, Anguilliformes)". **Cytobios**, 43: 73-77.

VAN DER BANK, F.H.; GRANT, W.S. y FERREIRA; J.T. (1989). "Electrophoretically detectable genetic data for fifteen southern African cichlids". **J. Fish Biol.**, 34: 465-483.

WILLIAMS, J.G.K.; CONNOR, W.; WOSNICK, M.A.; AIKEN, J.M.; GEDAMU, L. y DIXON, G.H. (1990). "DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". **Nucl. Acid R.**, 18 (22): 6.531-6.535.

WILKINS, N.P. (1981). "The rationale and relevance of genetics in aquaculture: an overview". **Aquaculture** 22: 209-228.

- WINANS, G.A.** (1989). "Genetic variability in Chinook salmon stocks from the Columbia River Basin". **North Am. J.o Fish. Manag.**, 9: 47-52.
- WOLF, U.; RITTER, H.; ATKIN, N.B. y OHNO, S.** (1969). "Polyploidization in the fish family *Cyprinidae*, Order Cypriniformes. I. ADN-content and chromosome sets in various species of *Cyprinidae*". **Humangenet.**, 7: 240-244.
- WOODS, T.D. y BUTH, D.G.** (1984). "High level of gene silencing in the tetraploid goldfish". **Biochem. System. and Ecol.**, 12 (4):415-421.
- WRIGHT, S.** (1969). "Evolution and the genetics of populations". Vol.2. "**The analysis of gene frequencies**". University Chicago Press, Chicago. Illinois.
- ZENZES, M.T. y VOICULESCU, I.** (1975). "C-banding patterns in *Salmo trutta*, a species of tetraploid origin". **Genetica**, 45: 531-536.
- ZOUROS, E. y FOLTZ, D.W.** (1987). "The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis". **Isozymes** 13: 1-59.