

UTILIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES DE PECES

C. Pla Zanuy & J.L. García-Marín

Institut d'Ecologia Aquàtica. EGG-UAB. 17071 Girona.

Departament de Genètica i Microbiologia. UAB. 08190-Bellaterra. Barcelona.

RESUM

És necessari un bon coneixement dels principals principis biològics sobre els recursos pesquers, per tal de portar a terme un programa de gestió òptim. Fins fa relativament poc temps, els estudis de les poblacions piscícoles han estat dominats per l'Ecologia i la dinàmica de poblacions, però actualment la Genètica despunta com una nova i eficaç eina per ser utilitzada en aquest camp. Dos mètodes, morfològic i molecular, poden utilitzar-se per a l'anàlisi genètica de les poblacions. L'alt nivell de variació fenotípica observat en poblacions de peixos no es correlaciona amb la variació genètica. Per tant, els mètodes moleculars són més útils per a l'estudi genètic d'una població. En els darrers vint anys, l'electroforesi de proteïnes ha estat la tècnica més emprada per detectar variacions al·lèliques en locus simple per a qualsevol classe d'organisme viu. Aquesta tècnica té dos nivells diferents d'aplicació: dintre i entre poblacions. Es presenta una comparació entre una població salvatge de truita (*Salmo trutta*, L.) i una altra provinent d'una piscifactoria, com a exemple d'utilització d'aquesta tècnica.

ABSTRACT

It is necessary a good knowledge of the main biological principles about fish resources in order to carry out an optimal management program. Fish population studies have been dominated by ecology and population dynamics until a short time ago, but genetics is raising as a new and useful tool to be used on this field now. Two methods, morphological and molecular, can be used for genetic analysis of fish populations. The high level of phenotypic variation observed in fish populations is not correlated with genetic variation. Hereby, molecular methods are more usefull for the genetic study of a population. Protein electrophoresis has been the most used technique to detect allelic variation in simple locus in any kind of living organism in the last 20 years. This technique has 2 different levels of application: within and between populations. As an exemple of its use we present herein a comparison between a wild population and a hatchery stock of brown trout (*Salmo trutta*, L.).

El concepto de gestión piscícola puede ser definido como la aplicación del conocimiento científico en la resolución de problemas tales como la obtención de ren-

dimientos óptimos en los productos piscícolas comerciales o para mejorar el placer de la pesca deportiva (Everhart & Young, 1981). La gestión piscícola requiere una comprensión de los principios biológicos esenciales del recurso a gestionar. Clásicamente, estos principios biológicos han estado relacionados con los caracteres de mayor interés en la explotación pesquera, como son la abundancia y tamaño de los peces disponibles como capturas. Desde esta perspectiva, el campo de la gestión ha estado dominado, hasta hace pocos años, por la ecología y la dinámica de poblaciones. Muy poco esfuerzo se había empleado para lograr tener un mejor conocimiento genético de estas poblaciones, y sólo recientes conferencias han puesto de manifiesto la importancia de la genética como una poderosa herramienta en la gestión piscícola: International Symposium of Fish Gene Pools: Preservation of Genetic Resources in Relation to Wild Fish Stocks, Stockholm 1980 (Ryman, 1981a); the FAO/UNEP Expert Consultation on the Conservation of Genetic Resources of fish, Roma 1980 (FAO/PNUMA, 1984); The Stock Concept International Symposium, Ontario 1980 (Berst & Simon 1981) e Identifying Fish Subpopulations, California Sea Grant Workshop, 1984 (Hedgecock, 1986).

Si pensamos que las capturas en poblaciones naturales representan la principal forma de explotación pesquera, el problema más clásico y frecuente que aparece en un programa de gestión piscícola es el de la identificación de los grupos o unidades con los que se va a trabajar. En muchas especies existe una aparente estructura en subpoblaciones más o menos distintas y discretas. Así, especies marinas como el bacalao y el arenque están frecuentemente divididas en grupos que desovan en lugares y tiempos distintos, y que presentan también diferencias morfológicas y ecológicas. Este hecho ha conducido a la denominación diferencial de los grupos y a la asunción de que junto a su homogeneidad genética conespecífica, existen también unas acentuadas diferencias. Para la diferenciación de estas poblaciones de peces, tradicionalmente se ha usado el análisis comparativo de caracteres morfológicos, tales como el número de escamas de las series laterales o el tamaño relativo del cuerpo. Ahora bien, los conocimientos obtenidos sugieren que la relación genotipo-fenotipo puede ser algo diferente de como es en los otros vertebrados (Purdom, 1979; Kirpichnikov, 1981; Gjedrem, 1983). La variabilidad fenotípica es mucho más amplia en peces que en otros vertebrados, pero no está necesariamente asociada con una gran variabilidad genética, lo que ha contribuido a confundir las ideas sobre el papel que podía jugar la genética en gestión piscícola.

La importancia de la variabilidad genética en el estudio diferencial de poblaciones surge como consecuencia del proceso de mutación asociado al fenómeno de la recombinación genética. Ambos proporcionan la base sobre la que los diferentes agentes evolutivos (selección natural, migración y deriva) actuarán, provocando los cambios genéticos en las poblaciones. De ahí que el estudio de la variabilidad genética presente en el seno de una población es esencial tanto para saber cuál es la base de su variación fenotípica, como para conocer el grado de divergencia genética entre poblaciones. Asimismo, algunas de las estadísticas utilizables permiten describir el estado de la población y sus causas cuando se las com-

para con valores de otras poblaciones o especies. Por todo esto, el conocimiento de la distribución de la variabilidad genética dentro de la especie es indispensable para su eficiente utilización como recurso biológico y su conservación (Allendorf & Utter, 1979; Smith & Chesser, 1981; Ryman, 1983; Nelson & Soulé, 1987).

METODOLOGÍA

Los métodos de análisis genético de poblaciones piscícolas pueden ser de tipo morfológico o molecular, pero, en cualquier caso, la muestra a analizar debe cumplir las premisas de ser representativa y precisa. Los métodos de análisis morfológico sólo son eficaces para loci individuales y referidos en su mayoría a caracteres discontinuos o cualitativos. Por tanto, dejan fuera del estudio a la gran parte de la variabilidad genética presente en una población. La determinación genética de los caracteres cuantitativos, ya sean métricos o merísticos, que son frecuentemente utilizados en la descripción de variedades piscícolas, es todavía bastante desconocida. Esta clase de caracteres hereditarios es difícil de estudiar a causa de la ya mencionada especial relación fenotipo-genotipo que se da en los peces.

Tres son, actualmente, los métodos moleculares más comúnmente utilizados para identificar grupos distintos de peces: 1) electroforesis de proteínas, 2) secuenciación de genes, y 3) análisis del ADN mitocondrial (ADN-mt).

La electroforesis de proteínas permite detectar la variabilidad en loci proteicos individuales a partir del análisis de los productos proteicos por ellos codificados. En los últimos 20 años ha sido el principal método utilizado para detectar la variación en genes sencillos (mendelianos) en todos los tipos de organismos vivientes (Nevo et al. 1984). Ésta es la técnica que estamos utilizando actualmente en nuestro laboratorio de una manera rutinaria, tanto por su potencia como por el rendimiento que ofrece respecto a la relación resultados obtenidos y coste.

Ahora bien, no debemos olvidar que las proteínas son el producto final de los procesos de transcripción y traducción del ADN. En estos procesos existen fenómenos tales como el procesamiento del ARN nuclear hasta ARN mensajero, la degeneración del código genético o la sustitución silenciosa de aminoácidos, que hacen que los cambios ocurridos en la secuencia de ADN de un gen no tengan por qué reflejarse en cambios en la movilidad electroforética de la proteína producto de este gen. La posibilidad de acceder directamente al material hereditario, mediante las técnicas de genética molecular y ADN recombinante, permite una mayor resolución de los estudios genéticos. Así, la identificación de mutaciones en el ADN que no comportan cambios en la proteína codificada por el gen, mediante la técnica de la secuenciación, permite obtener resultados de mayor precisión y resolución. Sin embargo, la secuenciación total del genoma de las especies eucariotas para su utilización en estudios de genética de poblaciones es, hoy por hoy, irrealizable debido al enorme tamaño de este ADN (10^9 pares de bases). Esta razón, y el elevado coste de la técnica, han conducido a limitar la secuenciación a unos pocos genes, reduciéndose su uso en estudios de identificación de subpoblaciones.

Los trabajos de Hutchinson et al. (1974), Potter et al. (1975) y Upholt y Dawid

(1977) pusieron de manifiesto la utilidad del ADN-mt para los estudios de genética de poblaciones. El ADN-mt de animales tiene una serie de características que lo hacen adecuado para estos estudios: es pequeño, no recombina, su herencia es vía materna, tiene elevadas tasas de evolución y, además, es fácilmente aislable y purificable. Su caracterización puede realizarse mediante el patrón de restricción. Numerosos trabajos han ratificado la validez de esta técnica de análisis del ADN-mt, aunque son todavía pocos los trabajos que se han realizado con especies piscícolas, pudiendo destacarse los de Avise et al. (1984), Avise y Saunders (1984), Berg y Ferris (1984), Bermingham y Avise (1984), Graves et al. (1984) y Gyllenstein y Wilson (1987). Esta técnica es menos costosa que la de secuenciación y permite obtener resultados de similar precisión, aunque es más cara y laboriosa que la electroforesis y frecuentemente la mejora en los resultados no es mucho mayor.

Una técnica reciente, la «Polymerase Chain Reaction» (PCR), ha estado incorporada al análisis del ADN-mt en estudios de identificación de subpoblaciones piscícolas. Esta técnica permite la amplificación rápida de fragmentos específicos del ADN para su posterior secuenciación y su uso en análisis comparativos filogenéticos. Es una técnica costosa pero de utilización muy adecuada para su aplicación al estudio de poblaciones muy relacionadas y que presentan dificultades para ser estudiadas con los métodos moleculares clásicos (Pla, Bermingham & Aquadro, en preparación).

ELECTROFORESIS

Los protocolos de uso de esta metodología varían un poco respecto a los tipos de tampones y métodos de tinción, según los marcadores que se utilicen, pero, básicamente, la técnica consiste en la separación de las diferentes variantes de una proteína a partir del tejido biológico deseado.

El procedimiento consiste en provocar un campo eléctrico en un medio de soporte, generalmente un gel de almidón, en el que se han depositado las muestras. Se dejan correr las proteínas de las muestras durante un cierto tiempo y después se tiñen con un producto químico que permite detectar su posición en el medio de soporte (Fig. 1). La movilidad relativa es, generalmente, una función del tamaño, forma y carga eléctrica de la molécula. Dos proteínas con igual función y diferente secuencia aminoácida presentarán diferencias en su movilidad electroforética a consecuencia de cambios en su tamaño o carga eléctrica. De esta forma, estas dos proteínas aparecerán como dos bandas distintas en el gel de electroforesis.

La tinción del gel puede ser de tipo general o específica. En el primer caso se utilizan sales inespecíficas, con lo que se obtienen muchas bandas correspondientes a más de una proteína. Los resultados obtenidos con este tipo de tinción no son satisfactorios para ser utilizados en análisis genéticos al no permitir diferenciar las distintas proteínas. Por dicha causa, la mayor parte de proteínas estudiadas por electroforesis han sido las enzimas, porque es más fácil desarrollar procedimientos específicos de tinción para éstas cuando se conoce cuál es su actividad catalí-

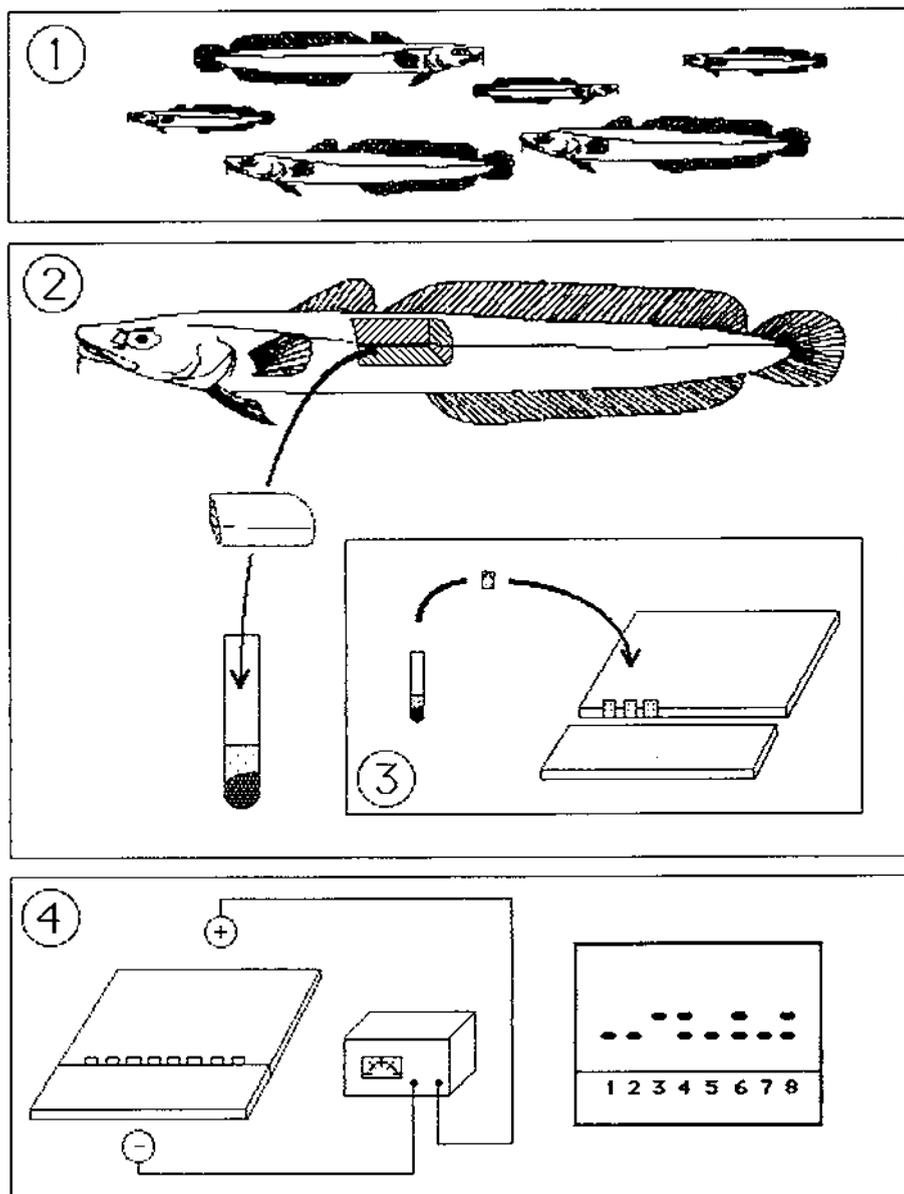


Figura 1. Diagrama de la técnica de electroforesis. El análisis se inicia con la captura de una muestra representativa de la población (1); esta muestra se almacena congelada a menos de 70 °C hasta el momento de la extracción y preparación de los tejidos (2). A continuación se prepara el gel (3) y se hace la separación en el campo eléctrico

tica. En este caso, las distintas bandas que se obtienen corresponden a diferentes variedades de la enzima analizada. Es un hecho generalmente aceptado el que, en cada zona de actividad, cada banda representa un alelo distinto de un determinado locus.

Así pues, el resultado final de una electroforesis después de una tinción enzimática es un conjunto de bandas que nos permiten identificar las posiciones de las distintas formas de una proteína en el gel. El patrón de bandas de un determinado individuo se denomina zimograma y contiene información de su genotipo respecto al locus (o loci) que codifica para esta proteína. La interpretación de los zimogramas obtenidos se realiza teniendo en cuenta los siguientes criterios (Allendorf y Utter, 1979): 1) las variaciones electroforéticas son interpretadas en concordancia con la estructura molecular conocida de la proteína, 2) la observación de fenotipos idénticos en un mismo tejido para análisis repetidos sobre un mismo individuo y 3) idéntica o similar expresión en los diferentes tejidos de un mismo individuo. Se debe considerar que la expresión génica de las distintas variedades alélicas de una enzima es generalmente de tipo codominante.

APLICACIÓN

A partir de los datos obtenidos por electroforesis es posible inferir, como hemos visto, los distintos genotipos presentes en una muestra de una población para una determinada proteína y poder determinar las frecuencias genotípicas y alélicas. A partir de estas frecuencias podemos calcular diversas estadísticas que nos permitirán evaluar la variabilidad genética de la población. Estadísticas como el porcentaje de locus polimórficos, el número de alelos por locus o la heterozigosidad media por locus nos permiten saber la diversidad genética intrapoblacional. Otros, como la distancia genética de Nei (1972), o la diversidad genética entre poblaciones (*Dst*) y la diversidad total (*Ht*) definidas por Nei (1975), nos permiten conocer la estructura entre poblaciones. Asimismo, los índices de distancia pueden usarse para la construcción de dendrogramas, por ejemplo por aglomeración jerárquica UPGMA (Sneath & Sokal, 1973), que nos dan idea de las relaciones filogenéticas entre poblaciones.

Conocer la estructura poblacional de la especie nos da idea de su comportamiento como una única unidad panmíctica o su subdivisión en distintos demes con un cierto grado de aislamiento. Cuando la especie se comporta como un único stock, su desaparición en una zona puede ser reparada adoptando las medidas oportunas que permitan la recolonización a partir de otras zonas. Sin embargo, cuando lo que se pierde es un stock determinado, aislado de los otros, se pierde también con él el genoma que conservaba la historia evolutiva de la especie en esa área y, por tanto, la posible adaptación genotipo-ambiente; en consecuencia la recuperación es mucho más difícil ya que podría tratarse de un stock único e irreemplazable.

La supervivencia de un stock depende del mantenimiento de un adecuado número de individuos, por debajo del cual el resultado puede ser la extinción. Una

reducción en el tamaño de la población puede disminuir la heterozigosis de los individuos o de la población por efecto de la consanguinidad y la deriva genética. Como es sabido, la heterozigosis está estrechamente asociada con caracteres relacionados con la fitness del individuo (véase revisión en Allendorf & Leary, 1986). De esta manera podemos considerar que la heterozigosis media por locus puede ser un indicador del estado de la población. Sin embargo, un valor puntual o aislado de heterozigosis no es suficiente para poder emitir un juicio sobre una población. Sólo cuando se analizan varias poblaciones podemos suponer, de la comparación de todos sus valores, que, por ejemplo, las poblaciones que presentan una menor variabilidad pueden haber sufrido recientemente una reducción importante en su tamaño o ser descendientes de unos pocos individuos fundadores de la población.

Las consideraciones anteriores sobre el número adecuado de individuos en una población son también válidas en el momento de la fundación de stocks para repoblación. Tales stocks deben reflejar la composición genética de la población natural y eso sólo es posible a partir de un número suficiente de individuos fundadores. Aunque los cambios genéticos en los stocks de piscifactorías son inevitables (Hynes et al., 1981), ya que como mínimo se produce selección en contra de los genotipos de lento desarrollo, son numerosos los ejemplos que manifiestan que las diferencias entre las poblaciones naturales y los stocks para su repoblación son el resultado de una desacertada gestión (Allendorf & Phelps, 1980; Ryman & Stahl, 1980, 1981; Ryman, 1981b; Stahl, 1983; Krieg & Guyomard, 1985; García, Jorde, Ryman & Pla, en preparación). Es, pues, del todo aconsejable que en los programas de repoblación se incorporen medidas para el control y seguimiento de la variabilidad genética presente en los stocks.

Una política distinta merecen los stocks que se utilizan en programas de selección para la obtención de mejores productos comerciales. En estos casos, la dinámica de substituir alelos desfavorables por los favorables para el carácter deseado comporta un fenómeno de arrastre para otros loci, con lo que se aumenta la homozigosis en los individuos y por tanto la pérdida de variabilidad genética es inevitable.

EJEMPLO

Acorde con el tema de estudio de este Congreso sobre Limnología, vamos a presentar y comentar algunos de los datos obtenidos en nuestro trabajo sobre las poblaciones de trucha común (*Salmo trutta*) en los ríos españoles y que demuestran la utilidad de los análisis genéticos en la identificación de poblaciones de peces.

El Riutort es un arroyo afluente del río Llobregat, en los Pirineos catalanes. Riutort es un refugio de pesca, donde esta actividad y la repoblación están prohibidas, aunque desgraciadamente no hay ninguna barrera natural o artificial entre él y el Llobregat, que en esa zona es frecuentemente repoblado. En la primavera de 1988 se obtuvieron, para su análisis electroforético, dos muestras de *Salmo trutta*, una directamente del Riutort y otra del stock que, para repoblar, se conser-

Tabla 1. Frecuencias de los alelos más comunes en cada locus y en cada población. Se indica también el tamaño medio de muestra por locus, el porcentaje de loci polimórficos y el nivel de heterocigosis promedio por locus.

	Piscifactoría	Riutort
N	52,9 (\pm 0,1)	30,8 (\pm 0,1)
AAT-3	100 (0,925)	100 (0,986)
AAT-6	100 (0,808)	100 (1,000)
AGP-2	100 (0,755)	100 (0,952)
CPK-1	100 (0,698)	100 (1,000)
BGA	150 (0,520)	100 (0,983)
BGALA-2	100 (0,547)	100 (0,883)
IDH-2	100 (0,792)	100 (0,984)
LDH-2	100 (1,000)	less (0,856)
LDH-5	100 (1,000)	105 (0,774)
MAN	100 (1,000)	90 (0,828)
MDH-2	100 (0,745)	100 (0,935)
MDH-3	100 (0,519)	100 (0,967)
MEL	100 (0,755)	100 (0,984)
PEP-LT	100 (0,991)	100 (1,000)
PGI-3	100 (0,991)	100 (0,984)
PMI	100 (0,594)	100 (0,984)
SDH-1	100 (0,853)	100 (1,000)
SOD	100 (1,000)	100 (0,984)
P	25,9	25,9
H (%)	8,6 (\pm 2,3)	3,2 (\pm 1,0)

va en la piscifactoría de Bagà. El análisis electroforético se realizó sobre 54 loci enzimáticos, encontrándose que 18 de ellos presentaban algún tipo de variación genética (Tabla 1). Los niveles de variabilidad genética medidos como porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosis media por locus (H), se encuentran dentro de los rangos descritos en otras poblaciones de la especie (Ryman, 1983; Krieg & Guyomard 1985; Ferguson, 1989). Sin embargo, curiosamente, el nivel de heterocigosis es 150 veces superior en el stock que en la población natural, cuando los cambios descritos en la literatura indican que lo común es un descenso de la heterocigosis en los stocks (Allendorf & Phelps, 1980; Ryman & Stahl, 1980; Ryman, 1981b; Stahl, 1983; Vuorinen, 1984).

El ajuste de las frecuencias genotípicas observadas en los loci codominantes de cada población respecto a las esperadas según el equilibrio Hardy-Weinberg, se realizó mediante un test de probabilidades exactas. De 25 comparaciones, 4 dieron diferencias estadísticamente significativas: locus PMI en el stock de Bagà ($p=0,021$), y loci BGALA-2 ($p=0,015$), LDH-5 ($p=0,001$) y MAN ($p<0,001$) en la población natural. La heterogeneidad genética entre las 2 muestras se analizó

mediante el test de la X^2 de contingencia para las frecuencias alélicas; de 16 comparaciones, 13 dieron diferencias estadísticamente significativas.

Extraordinariamente sorprendente resulta el comportamiento de los loci LDH-2, LDH-5 y MAN; para estos loci la población natural presenta en alta frecuencia los alelos LDH-2("Less"), LDH-5(105) y MAN(90), mientras que el stock presenta fijados los alelos LDH-2(100), LDH-5(100) y MAN(100), pudiendo considerarse que estos alelos actuarían en cada caso como marcadores diagnósticos de la población o del stock. El análisis genotípico de los individuos de la muestra del Riutort pone de manifiesto una gran deficiencia de individuos heterocigotos en el locus LDH-5 y la total ausencia de heterocigotos para el locus MAN, lo que explica la significación observada en el análisis del equilibrio Hardy-Weinberg (debido a la dominancia del alelo LDH-2(100) sobre el alelo LDH-2("Less"), en este locus no puede hacerse un análisis genotípico de los individuos). La deficiencia de heterocigotos es comúnmente un indicio genético de que se están considerando como una sola población individuos que, en realidad, constituyen dos grupos separados. Hay evidencia suficiente para suponer que la población natural ha sufrido un aporte de individuos desde la piscifactoría. En concreto, 5 individuos de la muestra del Riutort tienen el genotipo LDH-2(100/-), LDH-5(100/100) y MAN(100/100) típico de los individuos de la piscifactoría. Si nosotros medimos la variabilidad genética de la población natural sin considerar estos 5 individuos, el porcentaje de loci polimórficos se reduce a 7,4%, un valor más común en las poblaciones naturales de la trucha. La heterocigosidad media por locus disminuye también de 3,2% al 0,7%, y las frecuencias fenotípicas en los loci polimórficos (AGP-2, LDH-2, LDH-5 y MPI) se ajustan muy bien a las esperadas en condiciones de Hardy-Weinberg. Si no fuera porque el propio guarda de la piscifactoría reconoció que había practicado la repoblación directamente en el Riutort, no podríamos haber distinguido este hecho de una posible migración aguas arriba de individuos repoblados en el río Llobregat. Sin embargo, las consecuencias de uno u otro suceso son las mismas: la población de Riutort ha sufrido una introgresión de material genético extraño. Si las repoblaciones continúan, el resultado más probable será la pérdida de combinaciones génicas como los alelos LDH-2("Less") y MAN(90), únicos en la especie, y su sustitución por las combinaciones presentes en el stock de Bagà. Con ello se habrá limitado no sólo la respuesta adaptativa de esta especie, sino también su potencialidad como recurso biológico susceptible de explotación.

Resulta también dramático el hecho de que la piscifactoría, que en principio debería actuar como una reserva de la diversidad genética presente en los ríos de la zona que normalmente repuebla, no presente en su stock los alelos diagnósticos antes citados para la población natural. La distancia genética de Nei (1972) que se observa entre el stock de Bagà y el Riutort es de 0,061, muy superior a la 0,026, valor promedio entre poblaciones de *Salmo trutta* (Ferguson, 1989). La mayoría de los stocks de las piscifactorías españolas parecen tener un mismo origen a partir de material importado de otros países europeos (García, Jorde, Ryman & Pla, en preparación). Los propios guardas forestales reconocen que los ejemplares ac-

tualmente repoblados suelen perdurar poco en los ríos, bien como consecuencia de su incapacidad de resistir las condiciones ambientales, bien porque son más fácilmente capturados, ya que su estancia en la piscifactoría les ha hecho perder el miedo ante la presencia del hombre.

Agradecimientos

Queremos hacer público nuestro agradecimiento a la Direcció General de Política Forestal de la Generalitat de Catalunya por su ayuda en la captura de las muestras de *Salmo trutta* que aquí se citan, y en especial a su cuerpo de guardas forestales y técnicos de la piscifactoría de Bagà. Este trabajo ha estado parcialmente subvencionado por una beca de la CIRIT, de la Generalitat de Catalunya, a JLGM.

Bibliografía

- ALLENDORF, F.W. & LEARY, R.B. (1986.) Heterozigosity and fitness in natural populations of animals. En: *Conservation Biology: The science of scarcity and diversity*, (eds.). I. Soulé & E. Michael. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, pp 57-76.
- ALLENDORF, F.W. & PHELPS, S.R. (1980). Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 109: 537-543.
- ALLENDORF, F. W. & UTTER, F. M. (1979). Population genetics. En: *Fish Physiology*, (eds.). W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett, vol 8. Academic Press, New York, pp. 407-454.
- AVISE, J.C. & SAUNDERS, N.C. (1984). Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*). Analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*, 108: 237-255.
- AVISE, J.C., BERMINGHAM, E., KESSLER, L.G. & SAUNDERS, N.C. (1984). Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Evolution*, 38: 931-941.
- BERG W.J. & FERRIS, S.D. (1984). Restriction endonucleases analysis of salmonid mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41: 1041-1047.
- BERMINGHAM, E. & AVISE, J. (1984). Genetics of zoogeography of freshwater fishes in the Southern United States: Restriction analysis of mitochondrial DNA. *Genetics*, 113: 939-905.
- BERST, A.H. & SIMON, R.C. (eds.). Proceedings of the Stock Concept Symposium. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(12).
- EVERHART, W.H. & YOUNGS, W.D. (1981). *Principles of Fishery Science*, 2nd ed. Cornell University Press. Ithaca.
- 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. Documento Técnico de Pesca, vol. 217. FAO, Roma. 42 pp.
- FERGUSON, A. (1989). Genetic differences among brown trout, *Salmo trutta*, stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater Biology*, 21: 35-46.
- GJEDREM, T. (1983). Genetic variation in quantitative traits and selective breeding in fish and shellfish. *Aquaculture*, 33: 51-72.
- GRAVES, J.E., FERRIS, S.D. & DIZON, A.E. (1984). Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) demonstrated with restriction endonucleases analysis of mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 79: 315-319.
- GYLLENSTEN, U. & WILSON, A.C. (1987). Mitochondrial DNA of salmonids: Inter- and intraspecific variability detected with restriction enzymes. En: *Populations genetics and*

- fishery management. Ryman, N. & Utter, F.M. (eds.). University of Washington Press. Seattle and London, pp. 301-317.
- HEDGECOCK, D. (ed.). (1986). Identifying Fish Subpopulations. Proceedings of a California Sea Grant Workshop. A California Sea Grant College Program Publication.
- HUTCHINSON, C.A., NEWBOLD, J.E., POTTER, S.S. & EDGELL, M.H. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251: 536-537.
- HYNES, J.D., BROWN, E.H., HELLE, J.H., RYMAN, N. & WEBSTER, D.A. (1981). Guidelines for the culture of fish stocks for resource management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38: 1867-1876.
- KIRPICHNIKOV, V.S. (1981). *Genetic bases of fish selection*, translated by G.G. Gause. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 410 pp.
- KRIEG, F. & GUYOMARD, R. (1985). Population genetics of french brown trout (*Salmo trutta* L.): large geographical differentiation of wild populations and high similarity of domesticated stocks. *Génétique, Sélection et Evolution*, 17(2): 225-242.
- NEI, M. (1972). Genetic distances between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- NEI, M. (1975). *Molecular population genetics and evolution*. American Elsevier, New York.
- NELSON, K. & SOULÉ, M. (1987). Genetical conservation of exploited fishes. En: *Population genetics and fishery management*. RYMAN, N. & UTTER, F.M. (eds.). University of Washington Press. Seattle and London, pp. 345-368.
- NEVO, E., BEILES, A. & BEN-SHLOMO, R. (1984). The evolutionary significance of genetic diversity: Ecological, demographic and life history correlates. En: *Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity*, MANI, G.S. (ed.), vol.53: 133-173. Springer-Verlag, Berlin.
- POTTER S.S., NEWBOLD, J.E., HUTCHINSON, C.A. & EDGELL, M.H. (1975). Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 72: 4496-4500.
- PURDOM, C.E. (1979). Genetics of growth and reproduction in teleosts. Symposia of the Zoological Society of London, 44: 207-217.
- RYMAN, N. (ed). (1981a). Fish Gene Pools. *Ecological Bulletins*, 34. Stockholm.
- RYMAN, N. (1981b). Conservation of genetic resources: Experiences from the brown trout (*Salmo trutta*). En: Fish Gene Pools, RYMAN, N. (ed.). *Ecological Bulletins*, 34: 61-74.
- RYMAN, N. (1983). Patterns of distribution of biochemical genetic variation in salmonids: differences between species, *Aquaculture*, 33: 1-21.
- RYMAN, N. & STAHL, G. (1980). Genetic changes in hatchery stocks of brown trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 82-87.
- RYMAN, N. & STAHL, G. (1981). Genetic perspectives of the identification and conservation of Scandinavian stocks of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38: 1562-1575.
- SMITH, M.H. & CHESSER, R.K. (1981). Rationale for conserving genetic variation of fish gene pools. En: Fish Gene Pools, RYMAN, N. (ed.). *Ecological Bulletin*, 34: 13-30. Stockholm.
- SNEATH, P.H. & SOKAL, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco. 573 pp.
- STAHL, G. (1983). Differences in the amount and distribution of genetic variation between natural populations and hatchery stocks of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 33: 23-32.
- UPHOLT, W.B. & DAWID, I.B. (1977). Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D-loop region. *Cell*, 11: 571-583.
- VUORINEN, J. (1984). Reduction of genetic variability in a hatchery stock of brown trout, *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Biology*, 24: 339-348.