

Caractérisation génétique des saumons atlantique capturés dans la rivière Romaine en 2017

Rapport d'activités 2017 présenté à la
Société saumon de la rivière Romaine (SSRR)



Alysse Perreault-Payette, Bérénice Bougas, Cécilia Hernandez et Louis Bernatchez

IBIS
(Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes)
Université Laval
Québec, QC
G1V 0A6

Auteur pour correspondance :
Dr Louis Bernatchez

05 juillet 2018
Tél: 1-418-656-3402; Téléc.: 1-418-656-7176
Courriel: louis.bernatchez@bio.ulaval.ca

Résumé

Dans le cadre du projet de restauration du saumon de la rivière Romaine financé par la Société saumon de la rivière Romaine (SSRR), 189 individus, échantillonnés en 2017, ont été analysés. Plus précisément, les analyses portent sur 33 tacons (0+) provenant de la rivière Romaine, 90 tacons (0+) provenant de la rivière Puyjalon, 18 saumoneaux d'origine inconnue, 30 saumoneaux provenant de la rivière Puyjalon et 18 saumons adultes d'origine inconnue dont trois issus de la pêche alimentaire. Cette étude a trois objectifs principaux : 1) identifier l'appartenance des individus d'origine inconnue (18 saumoneaux et 18 saumons adultes), à l'une ou l'autre des populations de référence, soit à la rivière Romaine ou à la rivière Puyjalon ; 2) identifier l'appartenance parentale des saumoneaux d'origine inconnue, des saumoneaux provenant de la Puyjalon et des tacons provenant de la rivière Romaine et Puyjalon, à des géniteurs sauvages ou des géniteurs provenant de la reproduction artificielle ; et 3) identifier le sexe des 189 individus.

Pour le présent projet, des 33 tacons (0+) provenant de la rivière Romaine, 9 individus (27.3%) ont été assignés au programme de repeuplement artificiel. De ces 33 tacons, une plus grande proportion de mâles (66.7%) a été identifiée. Pour les 90 tacons (0+) provenant de la rivière Puyjalon, 22 individus (24.4%) ont été assignés au programme de repeuplement artificiel. Parmi les 90 tacons échantillonnés, 51 ont été identifiés comme des mâles (56.7%) et 39 comme des femelles (43.3%). Dans le cas des saumoneaux d'origine inconnue échantillonnés en 2017, la grande majorité a été assignée à la rivière Puyjalon (94%) et a été identifiée comme des femelles (77.7%). De même, la majorité des 30 saumoneaux provenant de la rivière Puyjalon a été identifiée comme des femelles (66.7%). Aucun saumoneau d'origine inconnue ou provenant de la rivière Puyjalon n'a été assigné au programme de repeuplement artificiel. Les analyses ont permis d'assigner avec certitude 10 saumons adultes à la rivière Puyjalon, dont 5 mâles et 5 femelles, et 5 saumons adultes à la rivière Romaine dont uniquement des mâles. En ce qui a trait aux trois saumons adultes issus de la pêche alimentaire, tous ont été identifiés comme étant des femelles dont un seul individu a été assigné à la rivière Puyjalon et un seul à la rivière Romaine, le troisième n'ayant pas été assigné avec succès à l'une ou l'autre des rivières.

Table des matières

Résumé	2
1. Objectifs	4
2. Méthodologie.....	5
2.1 Échantillonnage	5
2.2 Analyses de laboratoire	5
2.2.1 Sélection des marqueurs génétiques.....	5
2.2.2 Extraction de l'ADN	6
2.2.3 Amplification des loci microsatellites.....	6
2.2.4 Migration et détermination du génotype	6
2.2.5 Détermination du sexe.....	7
2.3 Analyses des données.....	7
2.3.1 Assignment populationnelle.....	7
2.3.2 Assignment parentale	7
3. Résultats	8
3.1 Assignment populationnelle.....	8
3.2 Assignment parentale	8
3.3 Détermination du sexe.....	9
4. Conclusion.....	10
Tableau 1. Informations sur les loci utilisés pour la caractérisation génétique.....	11
Tableau 2. Assignment populationnelle avec valeur de vraisemblance (Log10) et sexe pour les individus d'origine inconnu échantillonnés en 2017.....	12
Tableau 3. Individus assignés avec succès à la reproduction artificielle.	13
Tableau 4. Sexe des tacons (0+) et saumoneaux échantillonnés en 2017 dans le cadre du projet sur le microbiote.....	14
Références bibliographiques	15
Annexe 1 : Protocole d'extraction de l'ADN des échantillons	17
Annexe 2 : Protocole d'amplification et de migration sur capillaires des loci microsatellites	19
Annexe 3 : Protocole de détermination du sexe	22

1. Objectifs

Dans le cadre du projet de restauration du saumon de la rivière Romaine financé par la Société saumon de la rivière Romaine (SSRR), la présente étude se divisait en deux volets. Le premier étant l'analyse de saumoneaux et de saumons adultes dont l'origine était inconnue et le deuxième, dans le cadre d'un projet sur le microbiote, de l'analyse de tacons et de saumoneaux dont l'origine était connue.

Plus précisément, pour les saumoneaux et les saumons adultes dont l'origine était inconnue, les objectifs spécifiques consistaient à :

- a) Déterminer la classification individuelle (population de la rivière Romaine ou population de la rivière Puyjalon) de 18 saumons adultes dont trois issus de la pêche alimentaire ainsi que de 18 saumoneaux capturés en 2017 dans la rivière Romaine en se basant sur l'analyse de 17 marqueurs microsatellites.
- b) Déterminer, à l'aide d'un logiciel d'assignation parentale, la proportion de saumons échantillonnés issue du programme de repeuplement artificiel en se basant sur l'analyse de 17 marqueurs microsatellites pour les 18 saumoneaux capturés en 2017 dans la rivière Romaine.
- c) Déterminer le sexe de chacun des 18 saumons adultes dont trois issus de la pêche alimentaire ainsi que des 18 saumoneaux capturés dans la rivière Romaine en 2017.

Plus précisément, dans le cadre du projet sur le microbiote, pour les tacons et les saumoneaux dont l'origine était connue, les objectifs spécifiques consistaient à :

- a) Déterminer, à l'aide d'un logiciel d'assignation parentale, la proportion de saumons échantillonnés issue du programme de repeuplement artificiel en se basant sur l'analyse de 17 marqueurs microsatellites pour les 33 tacons (0+) provenant de la rivière Romaine, les 90 tacons (0+) provenant de la rivière Puyjalon et les 30 saumoneaux provenant de la rivière Puyjalon échantillonnés en 2017.
- b) Déterminer le sexe de chacun des 33 tacons (0+) provenant de la rivière Romaine, des 90 tacons (0+) provenant de la rivière Puyjalon et des 30 saumoneaux provenant de la rivière Puyjalon échantillonnés en 2017.

2. Méthodologie

2.1 Échantillonnage

Saumoneaux et adultes d'origine inconnue

Des échantillons de nageoire de 18 saumons adultes dont trois issus de la pêche alimentaire et de 18 saumoneaux capturés ont été échantillonnés dans la rivière Romaine au cours de l'été 2017. Pour l'échantillonnage des populations de référence, voir les détails dans le rapport 2014 (Côté et Bernatchez 2014).

Tacons et saumoneaux d'origine connue

Dans le cadre du projet sur le microbiote, des échantillons de nageoires de 90 tacons (0+) provenant de la rivière Romaine et 33 tacons (0+) provenant de la rivière Puyjalon ont été récoltés au cours de l'été 2017 par pêche électrique. De plus, des échantillons de nageoires de 30 saumoneaux ont été récoltés à l'aide d'un chalut lors de la dévalaison de la rivière Puyjalon au cours de l'été 2017.

2.2 Analyses de laboratoire

2.2.1 Sélection des marqueurs génétiques

La sélection des marqueurs génétiques utilisés est une étape déterminante pour l'atteinte des objectifs d'un projet. Chaque type de marqueur a ses forces et ses limitations et leur pertinence varie en fonction de la problématique. Avec l'objectif de caractériser la diversité génétique de populations en milieu naturel, les marqueurs microsatellites sont souvent utilisés. Les avantages des marqueurs microsatellites sont qu'ils présentent, entre autres, un degré de polymorphisme variable, ils sont relativement faciles à obtenir et leur analyse est robuste. Ces marqueurs sont en fait des régions du génome qui présentent des séquences de deux à quatre bases répétées en tandem un certain nombre de fois (ex. GATAGATAGATAGATA). Chaque région identifiée comme un microsatellite est un locus. Chaque individu possède deux copies distinctes de chaque locus, chacune de ces copies est appelée un allèle. Dans le cas des marqueurs microsatellites, c'est le nombre de répétitions de la séquence répétée en tandem qui fait varier la taille en paires de bases des allèles. C'est donc cette variabilité qui est utilisée afin de comparer les individus entre eux. Étant donné que le degré de variabilité est différent pour chaque locus, il est important de choisir des microsatellites ayant une variabilité suffisante pour arriver à caractériser adéquatement la diversité génétique des individus à l'étude, dans le but de pouvoir répondre correctement aux objectifs et d'apporter des réponses aussi solides et fiables que possible.

Les marqueurs utilisés pour la présente étude ont déjà été utilisés pour la caractérisation génétique des populations naturelles de saumon atlantique (King et coll., 2005; King, communication personnelle; Oreilly et coll., 1996; Slettan et coll., 1995; Paterson et coll., 2004; Presa et Guyomard, 1996) et présentent un degré de variabilité amplement suffisant. Au total, dix-sept loci ont été utilisés. Les informations relatives à ces loci sont présentées au tableau 1.

2.2.2 Extraction de l'ADN

L'ADN génomique des échantillons de saumon atlantique a été extrait (mis en solution aqueuse) selon un protocole d'extraction aux sels (Annexe 1; Aljanabi et Martinez, 1997), puis quantifié (contrôle de quantité et de qualité) à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

2.2.3 Amplification des loci microsatellites

Une fois l'ADN isolé, une réaction de polymérisation en chaîne (PCR pour « polymerase chain reaction ») a été effectuée. La PCR consiste à sélectionner et amplifier une région précise du génome permettant, dans ce cas-ci, la visualisation des fragments des loci microsatellites. La région d'intérêt est sélectionnée grâce à deux oligonucléotides (courts segments d'ADN synthétisés, appelés aussi amorces à laquelle une molécule fluorescente a été fixée), dont la séquence est complémentaire à une des deux extrémités du fragment d'ADN recherché. Par la suite, une réaction enzymatique est utilisée afin de créer une copie du fragment compris entre ces deux amorces. Les étapes de sélection et d'amplification sont répétées jusqu'à ce qu'un nombre suffisant de fragments soient ainsi créés permettant de visualiser adéquatement la région amplifiée. Les détails techniques pour cette étape sont présentés à l'annexe 2.

2.2.4 Migration et détermination du génotype

Les fragments obtenus lors de la PCR ont été migrés sur le séquenceur 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Life technologies Corporation) afin de les visualiser et déterminer leur taille. Le principe consiste à faire migrer par électrophorèse les fragments d'ADN à travers une matrice de polymère en y appliquant un champ électrique. Puisque les molécules d'ADN sont chargées négativement, elles vont se déplacer au travers du polymère. Les fragments d'ADN sont séparés au cours de la migration en fonction de leur longueur, les fragments plus courts migrant plus rapidement que les fragments plus longs. Ceux-ci sont ensuite visualisés à l'aide d'un laser qui détecte les molécules fluorescentes présentes sur les fragments amplifiés. En plaçant un standard de taille (solution avec différents fragments de tailles connues) dans chaque puits, la taille des différents allèles peut être déterminée de façon précise. Les informations relatives aux résultats de migration sont ensuite exportées sous différents formats compatibles avec les logiciels utilisés.

Après la migration, la taille des allèles (en paire de bases) est déterminée en les comparant au standard de taille utilisé à l'aide du logiciel GeneMapper version 4.1. Ce programme permet de déterminer le génotype multilocus des individus, c'est-à-dire la composition allélique des individus pour chacun des loci utilisés.

2.2.5 Détermination du sexe

Le sexe a été déterminé à l'aide de l'amplification PCR du locus SDY selon la méthode proposée par Yano et ses collaborateurs (2012). Les amorces SDY_E2_AS4 et SDY_E2_S2 ont été utilisées afin d'amplifier le locus SDY qui est présent seulement chez les mâles. Par la suite, le produit de la réaction PCR a été migré sur gel d'agarose 2% à l'aide d'un gel d'électrophorèse avec un marqueur de taille (Low DNA Mass Ladder (LDML) de @Invitrogen). La présence d'une bande à 200 paires de bases sur le gel est associée à un mâle, tandis que l'absence de bande indique une femelle. Des témoins négatifs et positifs ont été utilisés et la réaction de PCR a été faite en duplicata afin de valider les résultats des analyses. Les détails techniques pour cette étape sont présentés à l'annexe 3.

2.3 Analyses des données

2.3.1 Assignation populationnelle

L'assignation des échantillons d'origine inconnue de la rivière Romaine à l'une ou l'autre des populations de référence (rivière Romaine ou rivière Puyjalon) a été effectuée à l'aide du logiciel GeneClass2 (Piry et coll., 2004). Les paramètres suivants ont été utilisés: un seuil d'affectation des scores de 0.05 et la méthode bayésienne de Rannala & Mountain pour le calcul des critères. La valeur seuil du paramètre D utilisée pour assigner les individus est de 1 (exprimée en valeur logarithmique), ce qui correspond donc à une probabilité 10 fois supérieure de provenir d'une population que de l'autre (voir le rapport 2014 (Côté et Bernatchez 2014) pour les détails sur la puissance d'assignation de nos populations de référence). Dans le cas où la valeur du paramètre D est inférieure à 1, l'assignation «Indéterminé» a été attribuée.

2.3.2 Assignation parentale

L'assignation parentale des échantillons à des géniteurs sauvages ou provenant de la reproduction artificielle a été effectuée à l'aide du logiciel Cervus 3.0.7 (Kalinowski et coll., 2007). Ce programme assigne un couple de parents potentiel en se basant sur une valeur de vraisemblance calculée à partir des fréquences des différents allèles présents. En outre, ce programme inclut un calcul de vraisemblance prenant en compte les erreurs de génotypage présents dans le jeu de données et utilise un jeu de données simulé afin d'estimer une valeur de confiance en l'assignation. Plus précisément, lors des simulations, des génotypes de parents potentiels, de parents non reliés ainsi que de progénitures possibles sont générés à partir des fréquences alléliques présentes dans le jeu de données à l'étude. La progéniture ainsi créée est comparée aux parents associés et non associés afin de déterminer une valeur de vraisemblance seuil pour laquelle la progéniture peut être assignée avec confiance à un couple de parents. Lors de l'assignation parentale des individus inconnus, Cervus assigne un parent (mâle ou femelle) de manière indépendante en se basant sur la femelle ou le mâle ayant la valeur de vraisemblance la plus élevée. Puis, il calcule la vraisemblance que ce couple soit les deux parents de la progéniture en question. Un ratio de vraisemblance est calculé pour chaque assignation à un couple de parents, celui-ci représente la vraisemblance que ce couple soit les vrais parents sur la vraisemblance que ce couple ne soit pas les vrais parents. Donc, une valeur positive et élevée indique que les parents candidats sont plus probables d'être les vrais parents que de ne pas être les vrais parents.

Pour la présente étude, 65 mâles et 90 femelles candidats issus de la reproduction effectuée en 2014 à la station piscicole Baldwin et ensemencé en 2015, de la reproduction effectuée au LARSA en 2015 et ensemencée en 2016 ainsi que celle effectuée en 2016 et ensemencée en 2017 ont été utilisés.

3. Résultats

3.1 Assignation populationnelle

Saumoneaux d'origine inconnue

Les résultats des analyses d'assignation populationnelle sont présentés au tableau 2. Des 18 saumoneaux analysés, un individu seulement a été assigné avec confiance à la rivière Romaine et les 17 autres ont été assignés à la rivière Puyjalon.

Saumons adultes

Les résultats des analyses d'assignation populationnelle sont présentés au tableau 2. Des trois saumons issus de la pêche alimentaire, un a été assigné avec confiance à la rivière Romaine et un à la rivière Puyjalon. Le troisième individu n'a pu être assigné avec confiance à l'une ou l'autre des populations ($D < 1$). Pour les 15 autres saumons adultes, 5 ont été assignés avec confiance à la rivière Romaine et 10 à la rivière Puyjalon.

Dans le cadre du projet sur le microbiote

Comme la rivière d'origine des 123 tacons (0+) et des 30 saumoneaux échantillonnés était connue, aucune analyse d'assignation populationnelle n'a été effectuée sur ces individus.

3.2 Assignation parentale

Les résultats des assignations parentales sont présentés dans le tableau 3. La puissance d'assignation ainsi que le niveau de confiance des assignations a été évaluée à l'aide de simulations. Au total, 10 000 descendants ont été simulés avec un nombre de parents potentiels variant de 40 à 300 ainsi qu'une proportion de parents échantillonnés variables (de 10% à 80%). Ces simulations ont permis d'allouer un niveau de vraisemblance et de confiance à chaque parent ainsi qu'au couple de parents potentiel. Seulement les assignations avec un niveau de confiance de 95% pour chaque parent ainsi qu'au couple de parents ont été considérées.

Étant donné que les premiers ensemencements ont eu lieu en 2015, les premiers saumons de retour en rivière pour la reproduction pouvant être issus de la reproduction artificielle sont attendus à partir de l'été 2018. Les analyses d'assignation parentale n'ont donc pas été effectuées sur les adultes échantillonnés en 2017.

Saumoneaux d'origine inconnue

Aucun des 18 saumoneaux d'origine inconnue échantillonnés en 2017 n'a été assigné à la reproduction artificielle.

Dans le cadre du projet sur le microbiote

Tacon (0+) de la Romaine

Les individus assignés avec succès à la reproduction artificielle sont présentés au tableau 3. Des 33 tacons (0+) provenant de la rivière Romaine, 9 individus sur 33 ont été assignés avec un niveau de confiance de 95% à des géniteurs provenant de la reproduction artificielle. Ces individus proviennent tous de la reproduction effectuée au LARSA en 2016 ensemencés en 2017 et de géniteurs assignés à la rivière Romaine. Au total, ces 9 tacons ont été assignés à 7 croisements différents incluant 7 femelles et 4 mâles différents. De plus, trois de ces 9 individus sont issus du même croisement (mâle 985120011369616 et femelle 985120011325956).

Tacon (0+) de la Puyjalon

Les individus assignés avec succès à la reproduction artificielle sont présentés au tableau 3. Des 90 tacons (0+) échantillonnés dans la rivière Puyjalon, 22 individus (22/90) ont été assignés avec un niveau de confiance de 95% à des géniteurs provenant de la reproduction artificielle. L'ensemble de ces individus proviennent de la reproduction effectuée au LARSA en 2016 ensemencés en 2017 et de géniteurs assignés à la rivière Puyjalon. Au total, ces 22 tacons ont été assignés à 15 croisements différents incluant 12 femelles et 11 mâles différents. De plus, plusieurs individus proviennent des mêmes croisements dont 2 individus du croisement mâle 985120011326432 et femelle 985120011382355, 2 individus du croisement mâle 985120011318508 et 985120011377716 femelle, 3 individus du croisement mâle 985120011366633 et femelle 985120011372191 et 4 individus du croisement mâle 985120011326309 et femelle 985120011377716.

Saumoneaux de la Puyjalon

Aucun des 30 saumoneaux provenant de la rivière Puyjalon échantillonnés en 2017 n'a été assigné à la reproduction artificielle.

3.3 Détermination du sexe

Saumoneaux d'origine inconnue

L'identification du sexe des 18 saumoneaux d'origine inconnue capturés à l'été 2017 est présentée au tableau 2. Au total, 14 femelles et 4 mâles ont été identifiés. Parmi les individus assignés avec confiance à la rivière Puyjalon (N=17), 14 femelles et 3 mâles ont été identifiés. L'unique individu assigné avec confiance à la rivière Romaine a été identifié comme étant un mâle.

Saumons adultes

L'identification du sexe des 3 saumons adultes provenant de la pêche alimentaire ainsi que des 15 autres capturés à l'été 2017 est présentée au tableau 2. Les 3 saumons provenant de la pêche alimentaire ont été identifiés comme étant des femelles. Au total, 5 femelles et 10 mâles ont été identifiés parmi les 15 autres saumons adultes échantillonnés. Parmi les 10 individus assignés à la rivière Puyjalon, 5 ont été identifiés comme des femelles et 5 comme des mâles. Finalement, tous les individus assignés à la rivière Romaine ont été identifiés comme étant des mâles.

Dans le cadre du projet sur le microbiote

Tacon (0+) de la Romaine

L'identification du sexe des 33 tacons provenant de la rivière Romaine échantillonnés à l'été 2017 est présentée au tableau 4. Au total, 11 femelles et 22 mâles ont été identifiés.

Tacon (0+) de la Puyjalon

L'identification du sexe des 90 tacons provenant de la Puyjalon échantillonnés à l'été 2017 est présentée au tableau 4. Au total, 39 femelles et 51 mâles ont été identifiés.

Saumoneaux de la Puyjalon

L'identification du sexe des 30 saumoneaux provenant de la Puyjalon échantillonnés à l'été 2017 est présentée au tableau 4. Au total, 20 femelles et 9 mâles ont été identifiés. Un seul individu n'a pu être sexé avec succès.

4. Conclusion

Pour les 18 saumoneaux d'origine inconnue capturés en 2017, les analyses d'assignation populationnelle ont permis d'assigner avec confiance la grande majorité des saumoneaux (17/18) à la rivière Puyjalon. De plus, une plus grande proportion de ces saumoneaux a été identifiée comme étant des femelles (14/18). Par contre, aucun de ces individus n'a été assigné au programme de repeuplement artificiel. En ce qui a trait aux 15 saumons adultes échantillonnés en 2017, une plus grande proportion a été assignée à la rivière Puyjalon (10/15) dont un nombre égal de mâle et de femelle alors que les 5 individus assignés à la rivière Romaine ont tous été identifiés comme des mâles. Pour les 3 saumons adultes issus de la pêche alimentaire, tous ont été identifiés comme étant des femelles dont une assignée à la rivière Puyjalon, une à la rivière Romaine et aucune assignation n'a pu être obtenue pour la troisième femelle.

Dans le cadre du projet sur le microbiote, aucun saumoneau provenant de la rivière Puyjalon n'a été assigné au programme de repeuplement artificiel. De ces 30 individus, plus de la moitié a été identifiée comme étant des femelles (20/30). En ce qui a trait aux tacons provenant de la rivière Puyjalon, une plus grande proportion de mâles a été identifiée (51/90). De plus, 22 individus (14 mâles et 8 femelles) ont été assignés avec confiance au programme de repeuplement artificiel, plus précisément à des individus issus de la reproduction effectuée au LARSA en 2016 et qui ont étéensemencés en 2017. De même, pour les tacons provenant de la rivière Romaine, une plus grande proportion de mâles a été identifiée (22/33). Seulement 9 individus, dont 6 mâles et 3 femelles ont été assignés avec confiance au programme de repeuplement artificiel, plus précisément à des individus issus de la reproduction effectuée au LARSA en 2016 et qui ont étéensemencés en 2017.

Tableau 1. Informations sur les loci utilisés pour la caractérisation génétique. L'astérisque (*) indique l'amorce à laquelle est fixée la molécule fluorescente.

Locus	Séquence des amorces (5'-3')	Molécule fluorescente	Température d'appariement (°C)	Référence
Ssa85	F : AGGTGGGTCTCCAAGCTAC R : ACCCGTCTCTCACTTAATC*	-- HEX (Vert)	58	(Oreilly et coll., 1996)
Ssa171	F : TTATTATCCAAAGGGGTCAAAA R : GAGGTCGCTGGGGTTTACTAT*	-- NED (Jaune)	58	(Oreilly et coll., 1996)
Ssa197	F : GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG R : TGGCAGGGATTGACATAAC*	-- VIC (Vert)	58	(Oreilly et coll., 1996)
Ssa202	F : CTTGGAATATCTAGAATATGGC R : TTCATGTGTTAATGTTGCGTG*	-- VIC (Vert)	58	(Oreilly et coll., 1996)
SsaD58	F : TAGAGTTTGTCTCTGGCTTTG* R : AGACCCTAGGACTGGCTACTG	HEX (Vert) --	58	(King et coll., 2005)
SsaD71	F : AACGTGAAACATAAATCGATGG* R : TAAGAATGGGTTGCCTATGAG	PET (Rouge) --	58	(King et coll., 2005)
SsaD85	F : CTTTGGCTGTTTCAGGTATGAC* R : CACTGCTCTACAACAGAAGTCTC	FAM (Bleu) --	58	(King, comm. pers.)
SsaD144	F : TTGTGAAGGGGCTGACTAAC* R : TCAATTGTTGGGTGCACATAG	FAM (Bleu) --	58	(King et coll., 2005)
SsaD486	F : TCGCTGTGTATCAGTATTTTGG* R : ACTCGGATAACACTCACAGGTC	FAM (Bleu) --	58	(King et coll., 2005)
Ssosl417	F : TTGTTCAAGTGTATATGTGTCCCAT* R : GATCTTCACTGCCACCTTATGACC	FAM (Bleu) --	58	(Slettan et coll., 1995)
SsspG7	F : CTTGGTCCCGTTCTTACGACAACC* R : TGCACGCTGCTTGGTCCTTG	NED (Jaune) --	58	(Paterson et coll., 2004)
Sssp1605	F : CGCAATGGAAGTCAGTGGACTGG* R : CTGATTTAGCTTTTTAGTGCCCAATGC	NED (Jaune) --	58	(Paterson et coll., 2004)
Sssp2201	F : TTTAGATGGTGGGATACTGGGAGGC* R : CGGGAGCCCCATAACCCTACTAATAAC	NED (Jaune) --	58	(Paterson et coll., 2004)
Sssp2210	F : AAGTATTCATGCACACACATTCAGTGC* R : CAAGACCTTTTTCCAATGGGATTC	FAM (Bleu) --	58	(Paterson et coll., 2004)
Sssp2215	F : ACTAGCCAGGTGTCCTGCCGGTC* R : AGGGTCAGTCAGTCACACCATGCAC	NED (Jaune) --	58	(Paterson et coll., 2004)
Sssp2216	F : GGCCAGACAGATAAACAACACGC* R : GCCAACAGCAGCATCTACACCCAG	VIC (Vert) --	58	(Paterson et coll., 2004)
MST-3	F : CCCTGGTTTGACTTTGTCTCA* R : AGGCACTCTACCAGCTAAAGATG	HEX (Vert) --	58	(Presa et Guyomard, 1996)

Tableau 2. Assignation populationnelle avec valeur de vraisemblance (Log10) et sexe pour les individus d'origine inconnu échantillonnés en 2017. Les individus pour lesquels l'assignation populationnelle n'a pu être effectuée avec succès sont assignés comme «Indéterminée». Le sexe de chaque individu est présenté sous la forme «F» pour femelle et «M» pour mâle.

# de référence	Valeur de vraisemblance (Log10)			Assignation	Sexe
	Romaine	Puyjalon	D		
Saumoneaux à des fins de reproduction					
985114000040584	54,2	36,6	17,6	Puyjalon	F
985114000040594	46,5	34,4	12,1	Puyjalon	F
985114000040599	43,7	38,5	5,2	Puyjalon	F
985114000040603	47,1	39,7	7,4	Puyjalon	F
985114000040616	51,3	39,3	12,0	Puyjalon	F
985114000040617	51,5	40,1	11,4	Puyjalon	F
985114000040627	47,0	37,8	9,2	Puyjalon	F
985114000040792	47,4	34,7	12,8	Puyjalon	F
985114000040974	45,8	37,4	8,4	Puyjalon	F
985114000041066	43,7	37,9	5,8	Puyjalon	F
985114000041122	48,7	40,7	8,1	Puyjalon	M
985114000041131	51,0	38,6	12,5	Puyjalon	M
985114000041170	52,0	35,1	16,9	Puyjalon	F
985114000041210	51,3	38,2	13,1	Puyjalon	F
985114000041227	51,7	39,6	12,1	Puyjalon	F
985114000041228	46,4	32,9	13,5	Puyjalon	M
985114000041235	53,7	39,4	14,3	Puyjalon	F
985114000041246	37,9	46,4	8,5	Romaine	M
Saumons adultes issus de la pêche alimentaire					
2017-20	40,8	54,2	13,5	Romaine	F
2017-36	52,3	36,4	15,9	Puyjalon	F
2017-37	57,3	57,9	0,6	Indéterminée	F
Saumons adultes					
01	49,8	36,8	13,0	Puyjalon	F
02	44,2	35,8	8,4	Puyjalon	F
03	52,6	36,1	16,5	Puyjalon	M
04	45,8	40,1	5,7	Puyjalon	M
05	54,9	43,6	11,3	Puyjalon	M
06	49,6	39,4	10,2	Puyjalon	F
07	45,5	39,3	6,1	Puyjalon	F
08	38,7	52,1	13,4	Romaine	M
09	46,3	56,3	10,0	Romaine	M
10	53,4	52,4	1,0	Puyjalon	M
11	36,1	49,4	13,2	Romaine	M
12	39,2	47,3	8,2	Romaine	M
13	48,7	36,3	12,4	Puyjalon	M
14	51,4	40,3	11,1	Puyjalon	F
15	38,8	49,5	10,7	Romaine	M

Tableau 3. Individus assignés avec succès à la reproduction artificielle. Une valeur de vraisemblance est attribuée à chaque mâle et femelle candidat. Une valeur de vraisemblance ainsi qu'un niveau de confiance est aussi attribuée à chaque couple. Plus la valeur de vraisemblance est élevée, plus la probabilité que ce soit les vrais parents est élevée. Les parents mâle et femelle sont identifiés par leur «Pit Tag» respectif.

# de référence	Femelle		Mâle		Couple	
	# de référence	Valeur de vraisemblance	# de référence	Valeur de vraisemblance	Valeur de vraisemblance	Confiance (%)
Tacons (0+) de la Puyjalon						
NA-510	985120011378537	13.473370008584	985120011316978	17.7337374707095	34.4414226107389	95
NA-515	4265756B7A	17.576863010728	985120011435713	18.3770842298454	44.0011455510532	95
NA-517	985120011369580	15.951221006624	985120011366633	16.5140371287525	40.0816366531038	95
NA-518	985120011372191	19.918911278641	985120011366633	16.6484154633036	43.6580687719494	95
NA-520	985120011400023	18.141219178903	985120012221423	16.6633215162372	39.9999394299305	95
NA-526	985120011372191	23.535609042206	985120011366633	16.0168392632156	46.3294031722706	95
NA-527	985120011372191	23.906696138788	985120011366633	13.3697696183266	45.0145670880698	95
NA-529	985120012208027	14.694050066110	985120011318508	21.4481649467509	42.8637678235218	95
NA-533	985120012204965	19.960528281492	985121021187004	18.0006928475693	45.9256837038876	95
NA-537	985120011382355	15.352589794733	985120011326432	20.8063725640253	42.7327460107188	95
NA-545	985120011378537	15.553225025569	985161000987868	14.7066260318656	36.7582245372676	95
NA-548	985120011377716	17.120840084108	985120011318508	11.6410399773643	32.8080068946855	95
NA-549	985120011377716	12.295887186698	985120011326309	19.8100060882089	40.1572318416944	95
NA-551	985120011377716	15.691410574389	985120011318508	23.0697904648817	43.2132272610991	95
NA-552	985120011382355	3.261170691280	985120011326432	23.4542008336689	31.4623039100977	95
NA-553	985120011377716	14.869593066052	985120011326309	19.1562078574791	41.1494331766595	95
NA-560	985120011366231	18.438319620653	985120012211302	12.4784765231346	35.7366980778087	95
NA-563	985120011377716	13.667518708912	985120011326309	23.9894079532921	45.2955330209347	95
NA-564	985120011377716	15.006942325808	985120011326309	22.2895967554435	44.5603325635824	95
NA-567	985120012205729	14.714206532629	985120011379769	17.4607241409738	41.5571483894278	95
NA-578	985120011379704	17.727988593892	985161000987868	15.2036768361500	34.6156029550536	95
NA-580	985120012205729	15.740044576218	985120011316978	14.9035536978748	37.0039215388670	95
Tacons (0+) de la Romaine						
NA_606	985120011325956	23.4882770838158	985120011369616	15.7224976751389	41.7937174188991	95
NA_610	985120012205610	16.6896767720807	985120012206648	23.4072902715971	46.1669000825537	95
NA_611	985120011325956	20.7871608852450	985120011369616	20.5195821413332	43.4147549571873	95
NA_612	985120011403105	20.2672785975840	985120011374809	13.4039888623708	40.9249854538478	95
NA_613	985120011356704	26.4414146581091	985120011315418	25.4244264435798	52.9278678650596	95
NA_617	985120011314932	22.5690789090930	985120011315418	18.8959207010991	48.1131708056191	95
NA_621	985120011317470	20.9062733898829	985120012206648	24.7699996947047	53.3167819657052	95
NA_623	985120011367487	23.3385159814792	985120011374809	13.4769766780491	42.9301541867526	95
NA_627	985120011325956	18.8996751881159	985120011369616	22.0108322495742	42.7470213295088	95

Tableau 4. Sexe des tacons (0+) et saumoneaux échantillonnés en 2017 dans le cadre du projet sur le microbiote. Le sexe de chaque individus est présenté sous la forme «F» pour femelle et «M» pour mâle. Les individus pour lesquels la détermination du sexe n'a pu être effectuée avec succès sont assignés comme «Indéterminé».

Tacons (0+) de la Puyjalon				Tacons (0+) de la Romaine		Saumoneaux de la Puyjalon	
# de référence	Sexe	# de référence	Sexe	# de référence	Sexe	# de référence	Sexe
NA-506	F	NA-552	M	NA_601	F	PU-401	F
NA-507	M	NA-553	F	NA_602	M	PU-402	F
NA-508	M	NA-554	M	NA_603	M	PU-403	F
NA-509	M	NA-555	M	NA_604	F	PU-404	F
NA-510	M	NA-556	M	NA_605	M	PU-405	F
NA-511	F	NA-557	M	NA_606	M	PU-406	F
NA-512	M	NA-558	M	NA_607	M	PU-407	F
NA-513	M	NA-559	M	NA_608	M	PU-408	F
NA-514	F	NA-560	M	NA_609	F	PU-409	F
NA-515	M	NA-561	M	NA_610	F	PU-410	F
NA-516	F	NA-562	M	NA_611	F	PU-411	F
NA-517	M	NA-563	M	NA_612	M	PU-412	M
NA-518	M	NA-564	M	NA_613	M	PU-413	F
NA-519	F	NA-565	F	NA_614	M	PU-414	F
NA-520	M	NA-566	M	NA_615	F	PU-415	M
NA-521	F	NA-567	M	NA_616	M	PU-416	M
NA-522	M	NA-568	M	NA_617	F	PU-417	F
NA-523	F	NA-569	M	NA_618	F	PU-418	F
NA-524	M	NA-570	M	NA_619	M	PU-419	M
NA-525	F	NA-571	F	NA_620	M	PU-420	M
NA-526	F	NA-572	F	NA_621	M	PU-421	F
NA-527	M	NA-573	M	NA_622	M	PU-422	M
NA-528	F	NA-574	M	NA_623	M	PU-423	Indéterminé
NA-529	M	NA-575	F	NA_624	M	PU-424	M
NA-530	F	NA-576	F	NA_625	F	PU-425	F
NA-531	M	NA-577	M	NA_626	M	PU-426	F
NA-532	M	NA-578	F	NA_627	M	PU-427	M
NA-533	F	NA-579	M	NA_628	M	PU-428	F
NA-534	F	NA-580	F	NA_629	M	PU-429	M
NA-535	F	NA-581	F	NA_630	M	PU-430	F
NA-536	F	NA-582	M	NA_631	M		
NA-537	M	NA-583	M	NA_632	F		
NA-538	F	NA-584	F	NA_633	F		
NA-539	M	NA-585	M				
NA-540	F	NA-586	M				
NA-541	F	NA-587	M				
NA-542	F	NA-590	M				
NA-543	M	NA-591	M				
NA-545	F	NA-592	F				
NA-546	F	NA-593	M				
NA-547	F	NA-594	F				
NA-548	F	NA-595	M				
NA-549	F	NA-596	F				
NA-550	F	NA-599	M				
NA-551	M	NA-604	F				

Références bibliographiques

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25 : 4692-4693.
- Côté G. et L. Bernatchez (2014) Caractérisation génétique des saumons atlantique des rivières Romaine et Puyjalon en élevage au LARSA (Laboratoire de Recherche en Sciences Aquatiques) et des adultes reproducteurs utilisés pour le frai artificiel. Rapport présenté par l'Université Laval à la Société Saumon de la Rivière Romaine (SSRR). 48 p. et 2 annexes
- Kalinowski, ST, Taper, ML & Marshall, TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- King TL, Eackles MS, Letcher BH (2005) Microsatellite DNA markers for the study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) kinship, population structure, and mixed-fishery analyses. *Molecular Ecology Notes* 5 : 130-132.
- Oreilly PT, Hamilton LC, Mcconnell SK, Wright JM (1996) Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53 : 2292-2298.
- Paterson S, Piertney SB, Knox D, Gilbey J, Verspoor E (2004) Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites. *Molecular Ecology Notes* 4 : 160-162.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2 : a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Hered.* 95 : 536-9.
- Presa P, Guyomard R (1996) Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *Journal of Fish Biology* 49 : 1326-1329.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 9197-9201.
- Slettan A, Olsaker I, Lie O (1995) Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Microsatellites at the Ssosl25, Ssosl85, Ssosl311, Ssosl417 Loci. *Animal Genetics* 26 : 281-282.
- Yano AY, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Fostier A, Guyomard R, Guiguen Y (2013) The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific

Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications* 6: 486-496.

Annexe 1 : Protocole d'extraction de l'ADN des échantillons

Protocole d'extraction d'ADN par la méthode aux sels

Tiré de Salah M. Aljanabi & Icar Martinez, 1997 : Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 25(22): 4692-4693.

Tampon d'extraction salin :	250 ml
2 mM EDTA	1 ml de 0,5 M EDTA
10 mM Tris-HCl	2,5 ml de 1 M Tris-HCl (pH 8)
0.4 M NaCl	20 ml de 5 M NaCl
	226,5 ml dH ₂ O

SDS 20 % :

20 g de SDS + 80 ml de dH₂O, mélanger et ajuster le volume à 100 ml final

Solution saline 6 M :

Dissoudre 29 g de NaCl dans 100 ml dH₂O

Dissoudre 6.06 g de NaCl additionnel (on peut le faire chauffer au micro-ondes)

Procédure :

- 1- Couper des bouts de tissu d'environ 0,05 à 0,25 cm², nettoyer ses instruments entre chaque échantillon.
- 2- Déposer chaque échantillon dans un tube 1,5 ml pré identifiés.
- 3- Laisser les morceaux de tissu sécher (pour enlever tout l'éthanol résiduel) environ 30 minutes. Mettre une Kimtech sur les échantillons afin d'éviter la contamination durant le séchage.
- 4- Ajouter 440 µl de tampon d'extraction salin + 44 µl de SDS 20 % + 12 µl de Protéinase K (20 mg/ml).
- 5- Vortexer quelques secondes.
- 6- Incuber toute la nuit à 50 °C en mettant en mouvement à 250.
- 7- Si le tissu n'est pas suffisamment digéré, ajouter 20 µl de Protéinase K et laisser agir au minimum 2h à 50 °C en mettant en mouvement à 250 (étape à éviter).
- 8- Centrifuger quelques secondes pour faire descendre la buée qui se retrouve sur les parois des tubes.
- 9- Ajouter 4 µl de RNase A dans chaque tube. Vortexer et laisser agir 1 h à 20 °C (température ambiante).
- 10- Ajouter 300 µl de la solution saline 6 M.
- 11- Vortexer quelques secondes pour chaque tube.
- 12- Centrifuger à 10300 rpm pendant 30 minutes.
- 13- Transférer 600 µl de surnageant dans un nouveau tube 1,5 ml pré identifié.

- 14- Ajouter 600 μl isopropanol froid (conservé au congélateur -20°C).
- 15- Mélanger gentiment les tubes en les inversant quelques fois.
- 16- Incuber les tubes à -20°C pendant 1 heure ou toute la nuit (les échantillons peuvent rester dans l'isopropanol pour une longue période sans problème).
- 17- Centrifuger à 13000 rpm pendant 20 minutes.
- 18- Enlever le surnageant à la pipette.
- 19- Laissez sécher les tubes 10-15 minutes. Déposer une Kimtech dessus pour éviter la contamination.
- 20- Ajouter 500 μl d'éthanol 70 % froid (conserver au congélateur -20°C).
- 21- Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 minutes.
- 22- Enlever le surnageant à la pipette.
- 23- Ajouter 500 μl d'éthanol 70 % froid (conserver au congélateur -20°C).
- 24- Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 minutes.
- 25- Enlever le surnageant à la pipette.
- 26- Laisser le culot sécher 1 ou 2 heures à 60°C ou toute la nuit à 37°C .
- 27- Dissoudre le culot dans 100 μl d' H_2O

Annexe 2 : Protocole d'amplification et de migration sur capillaires des loci microsatellites

Solutions requises :

1. Multiplex PCR kit (Qiagen, numéro de produit: 206145)
2. Amorces R: 10 μ M
3. Amorces F: 10 μ M
4. ADN : ~10 ng/ μ l
5. Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, numéro de produit: 4311320)
6. GeneScan 500 ROX® (Applied Biosystems, numéro de produit: 401734)
7. GeneScan 500 LIZ® (Applied Biosystems, numéro de produit: 4322682)

Les 17 loci utilisés pour les analyses génétiques ont été amplifiés en trois réactions PCR. Les quantités en microlitres (μ l) des solutions de départ nécessaires aux réactions PCR sont présentées ci-dessous pour une réaction (1 échantillon). Pour chacune des réactions PCR, le volume final est de 10 μ l.

PCR Multiplex 1

Réactif		Volume (μ l)
Multiplex PCR kit		5
Amorce Ssa171	-R	0,2
	-F	
Amorce Ssa197	-R	0,05
	-F	
Amorce Ssa202	-R	0,3
	-F	
Amorce Ssosl417	-R	0,15
	-F	
Amorce SsaD85	-R	0,4
	-F	
Amorce SsaD71	-R	0,4
	-F	
ADN		2

PCR Multiplex 2

Réactif		Volume (µl)
Multiplex PCR kit		5
Amorce SsaD144	-R	0,6
	-F	
Amorce Sssp1605	-R	0,5
	-F	
Amorce Sssp2210	-R	0,1
	-F	
Amorce Sssp2215	-R	0,25
	-F	
Amorce Sssp2216	-R	0,05
	-F	
ADN		2

PCR Multiplex 3

Réactif		Volume (µl)
Multiplex PCR kit		5
Amorce Sssp2201	-R	0,9
	-F	
Amorce SsspG7	-R	0,1
	-F	
Amorce MST-3	-R	0,25
	-F	
Amorce Ssa85	-R	0,03
	-F	
Amorce SsaD58	-R	0,8
	-F	
Amorce SsaD486	-R	0,025
	-F	
ADN		2

Les conditions lors de la PCR étaient les suivantes :

Programme Multiplex 1, Multiplex 2 et Multiplex 3

15 min à 95°C (30 sec à 95°C; 3 min à 58°C; 1 min à 72°C)₃₅ 30 min à 72°C

Une fois les réactions terminées, on procède à la préparation de la plaque pour le séquençage et permettre la visualisation des loci migrés.

Pour les migrations - Multiplex 1, 2 et 3:

- 1- Pour chaque échantillon diluer 1 μl du produit PCR Multiplex 1 dans 10 μl d'eau.
- 2- Mélanger 2 μl de cette dilution et 10 μl d'un mélange de 10 μl de Formamide Hi-Di et 0.13 μl de GeneScan 500 LIZ.

Pour la migration - Multiplex 3:

- 1- Pour chaque échantillon diluer 1 μl du produit PCR Multiplex 1 dans 10 μl d'eau.
- 2- Mélanger 2 μl de cette dilution et 10 μl d'un mélange de 10 μl de Formamide Hi-Di et 0.13 μl de GeneScan 500 ROX.

Annexe 3 : Protocole de détermination du sexe

Solutions requises :

1. Accustart II Geltrack SuperMix 4000R (Quanta Biosciences, numéro de produit: CA89235-012)
2. Amorces R: 10 μ M
3. Amorces F: 10 μ M
4. ADN : \leq 60 ng/ μ l

Les quantités en microlitres (μ l) des solutions de départ nécessaires aux réactions PCR sont présentées ci-dessous pour une réaction (1 échantillon). Pour chacune des réactions PCR, le volume final est de 10.5 μ l.

Réactifs	Volume (μ l)
Accustart II	6.25
SDY_E2AS4	0.5
SDY_E2S2	0.5
Eau	3.25
ADN	2

Les conditions lors de la PCR étaient les suivantes :

60 sec à 94°C (30 sec à 94°C; 30 sec à 55°C; 45 sec à 72°C)₃₅

Une fois les réactions terminées, 8 μ l de la réaction per sont migrée sur un gel d'électrophorèse 2% et visualisée sur GeneSnap 6.08 (SynGene).