



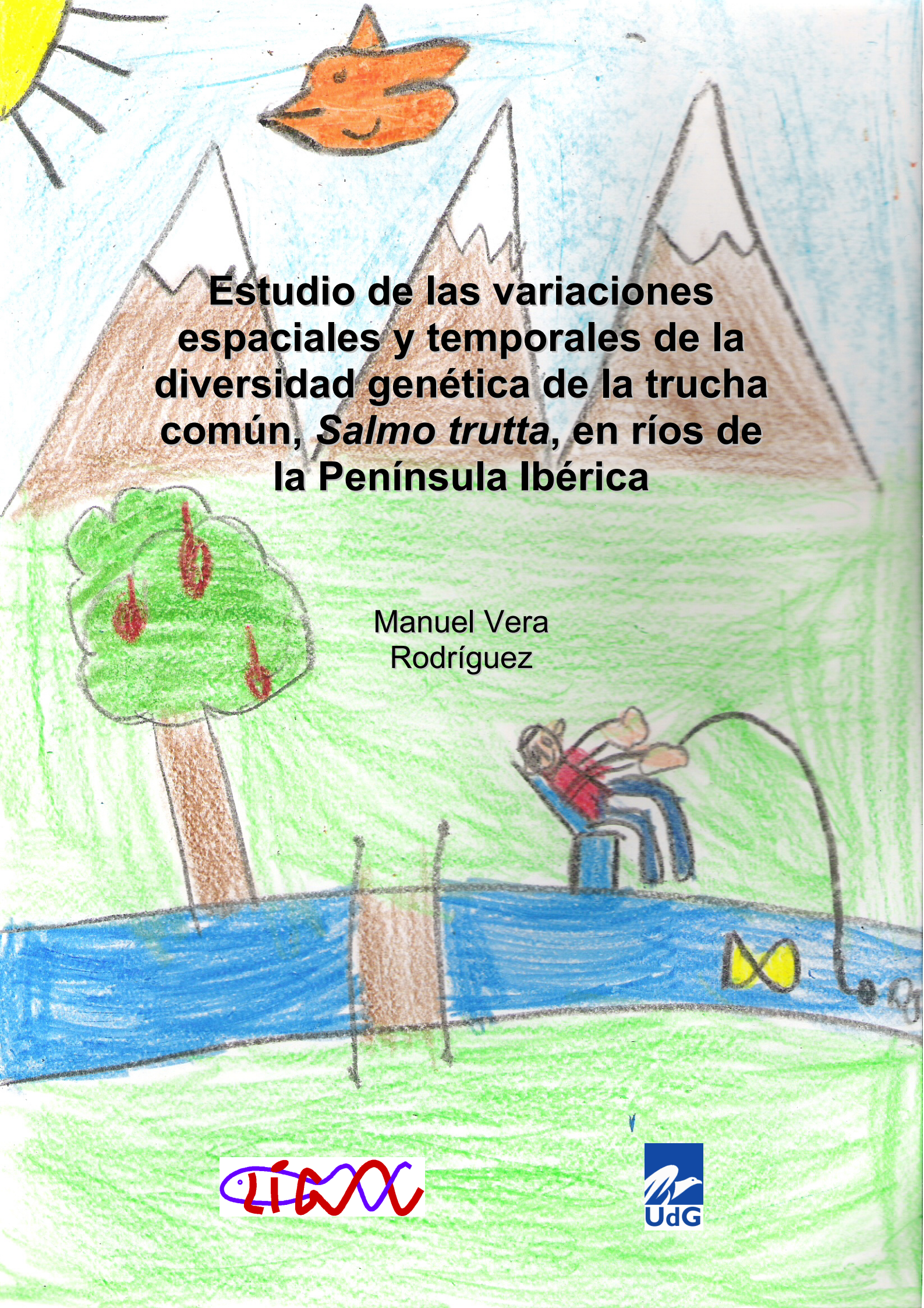
Universitat de Girona

**ESTUDIO DE LAS VARIACIONES ESPACIALES
Y TEMPORALES DE LA DIVERSIDAD
GENÉTICA DE LA TRUCHA COMÚN, SALMO
TRUTTA, EN RÍOS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA**

Manuel VERA RODRÍGUEZ

ISBN: 978-84-690-7477-0

Dipòsit legal: GI-773-2007

A child's drawing of a landscape. At the top left is a yellow sun with black rays. In the center is a brown mountain with a white peak. To the right is another brown mountain with a white peak. In the foreground, there is a green tree with a brown trunk and several red leaves. A person is sitting on a blue chair, fishing in a blue river. The river has a yellow fish in it. The background is a light blue sky with a single orange leaf falling from the top. The ground is green.

**Estudio de las variaciones
espaciales y temporales de la
diversidad genética de la trucha
común, *Salmo trutta*, en ríos de
la Península Ibérica**

Manuel Vera
Rodríguez





**Estudio de las variaciones
espaciales y temporales de la
diversidad genética de la trucha
común, *Salmo trutta*, en ríos de la
Península Ibérica**

Memoria de Tesis Doctoral

Manuel Vera Rodríguez

UdG-LIG



JOSÉ LUIS GARCÍA MARÍN, PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA DEL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSITAT DE GIRONA

CERTIFICA,

Que el trabajo titulado **Estudio de las variaciones espaciales y temporales de la diversidad genética de la trucha común, *Salmo trutta*, en ríos de la Península Ibérica**, presentado por **Manuel Vera Rodríguez** para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona, lo considera acabado y autoriza su presentación al tribunal evaluador.

Girona, 22 de Marzo de 2006

José Luis García Marín

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la beca de Formación de Personal Investigador (FPI) que recibí del Ministerio de Ciencia y Tecnología asociada al proyecto REN 2000-0740-C02-01 titulado “Uso sostenible, conservación y restauración de los endemismos moleculares de la trucha común (*Salmo trutta*) en España. Evaluación genética y ecológica de diferentes alternativas de gestión”, y a su continuación REN 2003-05931/GLO.

A mis padres, a José Luis y especialmente a Ana

Ipsa scientia potestas est

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Carles Pla, además de por todas sus historias que han amenizado mis viajes al trabajo este último año, toda su ayuda y su respeto desde mi incorporación al LIG. También quiero agradecer a la Dra. Marina Roldán todo su apoyo y la charla de una tarde de viernes.

A mis compañeras de despacho Nuri, Rosa y Raquel. A la Dra. Nuri Sanz por su “moobing” y por las batallas libradas juntos con el Ne. A Rosa por su ayuda en la docencia, sin la cual habría naufragado en esa experiencia. A ambas gracias por prestarme sus datos alozímicos. A Raquel por haber traído un soplo de aire fresco al laboratorio. También quiero agradecer a Sandra, mi crítica más implacable, todos sus comentarios al respecto de mi trabajo porque siempre han sido de gran ayuda. Al Dr. Oriol Vidal por su “cumbayismo” y por ayudarme con algunos aspectos teóricos de los loci microsatélites. A todos muchas gracias por vuestro afecto y por haberme aguantado durante la realización de esta tesis. Nunca os olvidaré.

Al resto de compañeros que están o han estado en el LIG, especialmente a Alexandra y Marta, por los buenos momentos vividos y que han amenizado el trabajo diario.

Al equipo de vicerrectorado de investigación de la UdG del año 2001 por la no concesión de una “beca predoctoral UdG”, lo cuál me permitió conseguir una beca FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología (actual Ministerio de Educación y Ciencia), al cual le estoy muy agradecido, que supera ampliamente a la primera tanto a nivel económico como de formación.

Al Dr. Paulino Martínez por cederme muestras del río Duero y a la Dra. Ana Almodóvar por la cesión de datos ecológicos de las campañas de muestreo del Pirineo oriental. También al Dr. P.E. Jorde por su ayuda en el cálculo y la interpretación del Ne.

I wish to thanks Dr. Michael Möller Hansen and the population genetics group of Danish Institute for Fisheries Research (DIFRES) for all their help with microsatellite analyses during my two stays in Silkeborg (Denmark). Moreover, I wish to thanks Karen-Lise, Uffe and Søren Mensberg to be my Danish family in these periods.

A todos mis profesores del Colegio Cultural, del I. E. S. Isaac Albéniz y de la Facultat de Ciències de la UdG, ya que sin su ayuda y enseñanza yo no estaría escribiendo ahora estas letras.

A mi hermana Isabel y a Alejandro, a los que les deseo que sean muy felices, por toda su ayuda en mis peores momentos y por apoyarme en todas mis decisiones. Mil gracias a los dos.

A toda mi familia por su gran apoyo, sobretudo a mis primos Luis y Joaquín por preocuparse siempre de lo que hacía y a mi primo Miguel por volver. También a mi prima Laura por ser como es y a mi primo David por hacerme vivir un sueño paralelo a la realización de esta tesis. A ambos gracias por vuestro cariño y por regalarme a mis sobrinos Dani y Álvaro, el primero de ellos creador de la portada de esta tesis, porque su sola presencia me hace feliz. Finalmente, y de la manera más especial, a mi abuelo Domingo porque allí donde esté seguro que ahora

tiene una sonrisa de oreja a oreja y porque su recuerdo me ha ayudado a seguir en muchos momentos de este trabajo.

A mi familia política, los Fle Alierta. Especialmente a Visita y Valentín por tratarme como un nieto desde el primer día que pisé su casa. También a Javier, por sus buenos consejos y porque espero que este trabajo sea motivo de su alegría después de una época un poco complicada. A todos ellos muchas gracias.

A Xavi por estar siempre a mi lado y porque nunca tiene un no para mí. A Fernando y Ana, Rubén y Raquel, Eduardo y Sandra, David y Sara, César y Eli, Luís y Javichu, porque como dice Amaral “son mis amigos por encima de todas las cosas”. También quiero agradecer de manera especial su amistad a Peña. A veces el destino juega malas pasadas y se lleva a las personas más entrañables y queridas antes de tiempo. Siempre te llevaré en mi corazón.

Esta tesis está dedicada a las personas responsables de que esté escribiendo estos agradecimientos. A mi padre, al que admiro profundamente, por demostrarme que con constancia y esfuerzo uno puede llegar adónde se proponga. A mi madre porque hace años hipotecó su felicidad a costa de la mía. A los dos porque son los mejores padres del mundo. A mi “padre científico” el Dr. José Luís García Marín, por toda su ayuda en este trabajo, por hacer que creyese en mí mismo cuando estuve a punto de rendirme y por hacer todo lo posible para que mi situación fuese la más placentera, incluso pensando que me ha mimado demasiado. Nunca olvidaré todo lo que ha hecho por mí. Finalmente, a la persona más importante y que más ha padecido los altibajos de esta tesis doctoral, a Ana. Quiero agradecerle su apoyo incondicional para que cumpliera mi sueño de finalizar esta tesis, incluso en los malos momentos siempre ha tenido palabras de ánimo. Hace casi tres años contraí una deuda con ella, para ahora poder decirle: “Esta tesis es tuya, Ana”.

ÍNDICE

	Página
Resumen	5
Resum	6
Summary	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Diferenciación poblacional	12
1.2. Contactos secundarios y zonas híbridas	14
1.3. Evaluación molecular de la diversidad genética	16
1.3.1. Loci microsatélites	17
1.3.2. El ADN mitocondrial (ADN mt)	18
1.4. La trucha común (<i>Salmo trutta</i>)	20
1.4.1. Biología de la especie	20
1.4.2. Estudios filogenéticos y patrones de diversidad	22
1.4.3. Estructura poblacional en la Península Ibérica	24
1.5. Objetivos	28
2. MATERIAL Y MÉTODOS	29
2.1. Análisis de la estructura poblacional en el río Duero	31
2.1.1. Muestras analizadas	32
2.1.2. Extracción de ADN	34
2.1.3. Amplificación de la región de control del ADN mitocondrial	34
2.1.4. Secuenciación de la región de control del ADN mitocondrial	35
2.1.5. Análisis filogenéticos entre los haplotipos	36
2.1.5.1. <i>Máxima verosimilitud</i>	36
2.1.5.2. <i>Análisis mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ)</i>	37
2.1.5.3. <i>Método de máxima parsimonia</i>	38
2.1.6. Diversidad génica intrapoblacional	38
2.1.7. Diferenciación entre las poblaciones	39
2.1.7.1. <i>Distancia genética entre las poblaciones.</i>	39
2.1.7.2. <i>Análisis jerárquico de la varianza molecular AMOVA</i>	40
2.1.7.3. <i>Análisis de Clados Encajados (NCA)</i>	41
2.1.7.4. <i>Demografía histórica (Mismatch distribution)</i>	42
2.2. Análisis de la estructura poblacional en los Pirineos orientales	44
2.2.1. Muestras analizadas	44

2.2.2. Extracción ADN	47
2.2.3. Identificación de los haplotipos y sus relaciones filogenéticas	47
2.2.4. Diversidad génica intrapoblacional	48
2.2.5. Diferenciación entre las poblaciones	49
2.2.6. Estudios con loci microsatélites en la Noguera de Vallferrera	50
2.2.6.1. <i>Relación y genotipado de los loci microsatélites</i>	50
2.2.6.2. <i>Diversidad intrapoblacional</i>	51
2.2.6.3. <i>Test de equilibrio de Hardy-Weinberg</i>	52
2.2.6.4. <i>Efecto de las repoblaciones</i>	53
2.2.6.5. <i>Diferenciación interpoblacional</i>	54
2.2.6.6. <i>Distancia genética entre las poblaciones</i>	54
2.2.7. Estimación del tamaño efectivo	55
2.2.7.1. <i>Estimación de censos (N)</i>	55
2.2.7.2. <i>Estimación del tamaño efectivo de las poblaciones (Ne)</i>	57
3. ESTRUCTURA POBLACIONAL EN LA CUENCA DEL RÍO DUERO	61
3.1. RESULTADOS	63
3.1.1. Análisis haplotípicos	63
3.1.2. Análisis poblacionales	69
3.1.2.1. <i>Diversidad genética dentro de las poblaciones</i>	69
3.1.2.2. <i>Diferenciación genética entre las muestras</i>	70
3.2. DISCUSIÓN	80
3.2.1. Relación filogenética entre los haplotipos detectados	80
3.2.2. Estructura poblacional de la trucha en el río Duero	81
3.2.3. Congruencia con estudios alozímicos	87
3.2.4. Evidencias de selección	89
4. PATRÓN DE DIVERSIDAD GÉNÉTICA DE LA TRUCHA EN LOS PIRINEOS ORIENTALES	95
4.1. RESULTADOS	97
4.1.1. Relaciones filogenéticas entre los haplotipos mitocondriales	97
4.1.2. Variabilidad genética entre y dentro de cuencas fluviales	104
4.1.3. Estabilidad temporal de la estructura geográfica	111
4.1.4. Diferenciación microgeográfica en los Pirineos	115
4.1.4.1. <i>Diferenciación interpoblacional mediante loci microsatélites</i>	121
4.1.4.2. <i>Diferenciación matriarcal</i>	123
4.1.4.3. <i>Estabilidad temporal</i>	124

4.1.4.4. <i>Estimación del censo y el tamaño efectivo</i>	126
4.2. DISCUSIÓN. La cuenca Pirenaica Oriental	133
4.2.1. Relaciones entre los haplotipos	133
4.2.2. Variabilidad intrapoblacional	133
4.2.3. Diferenciación interpoblacional	134
4.2.4. Flujo génico	137
4.2.5. Tamaño efectivo	142
4.2.6. Impacto de las repoblaciones	148
5. COMPARACIÓN ENTRE CUENCAS	153
6. CONCLUSIONES	163
7. BIBLIOGRAFÍA	167
8. APÉNDICE	191

RESUMEN

Se ha analizado las causas de la distribución espacial de la variabilidad genética del ADN mitocondrial en poblaciones de trucha común de la cuenca del Duero y de los Pirineos Orientales. En total se han analizado de novo 49 localidades, 13 en la cuenca del río Duero y 36 en los principales ríos del Pirineo oriental. Además se analizaron las fluctuaciones temporales en 14 de las localidades del Pirineo Oriental. Estudios previos indican un marcado contraste de los patrones de diversidad entre ambos territorios.

En la cuenca del río Duero los análisis confirmaron la presencia de los dos linajes matriarcales descritos previamente, el linaje Atlántico (AT) y el linaje Duero (DU). Los análisis de la varianza molecular (AMOVA) siguiendo una jerarquía hidrográfica sugirieron una alta estructuración de las poblaciones coincidente con los patrones ictiológicos observados en la cuenca. El linaje DU parece haber estado presente permanentemente en la cuenca interior del Duero, mientras que las zonas más próximas a la desembocadura han padecido diversas colonizaciones de trucha del linaje AT, que reflejarían los cambios climáticos ocurridos en el Cuaternario. Se ha detectado una discrepancia en el límite entre ambos grupos definidos por genes nucleares (alozimas) y el ADN mitocondrial. Estas discrepancias pueden ser debidas a un efecto más severo de la deriva genética en el ADN mitocondrial que en los marcadores nucleares. Sin embargo, en este trabajo se han observado evidencias a favor de selección en el ADN mitocondrial del linaje DU que también explicaría estas discrepancias.

El análisis más exhaustivo en las cuencas de los Pirineos orientales, permitió detectar nuevos haplotipos mitocondriales de los linajes Adriático (AD) y Mediterráneo (ME). En esta región, los AMOVAs confirmaron que las diferencias entre poblaciones dentro de río son más importantes que las diferencias entre ríos. No obstante se observó un patrón de aislamiento por distancia en toda la zona, reflejo de la estructuración de las poblaciones en la cuenca del río Ebro. Además, aunque los AMOVAs mostraron que el componente temporal de la variación es inferior al espacial, las fluctuaciones temporales en la comparación matriarcal de las poblaciones resultaron estadísticamente significativas. Estas fluctuaciones están asociadas tanto a la deriva genética como a procesos de flujo génico entre poblaciones próximas. Dentro de las cuencas, los componentes de diferenciación entre afluentes son, en general, superiores a los obtenidos dentro de cada afluente, patrón que parece estar extendido en la trucha común. Los estudios a escala microgeográfica en la Noguera Vallferrera y Noguera Cardós (afluentes del Noguera Pallaresa) reprodujeron este patrón de diferenciación. Los tamaños efectivos y la tasa de migración entre ambos ríos fueron similares a los descritos en poblaciones noratlánticas. Los tamaños efectivos de las hembras (N_{ef}), calculados a partir del ADN mitocondrial fueron menos de la mitad del tamaño efectivo total tanto en la Noguera Vallferrera como en el resto de localidades pirenaicas estudiadas. Estos bajos tamaños efectivos de las hembras serían también responsables de las fluctuaciones temporales observadas. Los ejemplares repoblados parecen hibridar poco con los nativos, pero su presencia podría intensificar indirectamente los procesos de deriva genética y complicar la conservación de los patrimonios genéticos nativos.

Con la salvedad de la existencia de selección que favorece a los haplotipos del linaje DU, los procesos poblacionales que regulan la distribución de la variabilidad genética en la cuenca del Duero y en los Pirineos Orientales podrían ser parecidos y caracterizados por la existencia de múltiples demes interconectados a lo largo del curso fluvial.

RESUM

S'han analitzat les causes de la distribució espacial de la variabilitat genètica al ADN mitocondrial en poblacions de truita comuna de la conca del riu Duero i dels Pirineus Orientals. En total s'han analitzat per primer cop 49 localitats, 13 a la conca del Duero i 36 als Pirineus Orientals. A més es van estudiar mostres temporals en 14 de les localitats del Pirineus Oriental per a analitzar l'estabilitat temporal de l'estructura geogràfica. Estudis previs indiquen un marcat contrast dels patrons de diversitat entre els dos territoris.

A la conca del riu Duero es va confirmar la presència dels dos llinatges matriarcals descrits prèviament, el llinatge Atlàntic (AT) i el llinatge Duero (DU). Les anàlisis de la varianza molecular (AMOVA) seguint una jerarquia hidrogràfica suggereixen una elevada estructuració de les poblacions coincident amb els patrons ictiològics observats a la conca. El llinatge DU sembla que s'ha conservat permanentment a la conca interior del Duero però les zones més properes a la desembocadura han patit diverses colonitzacions de truita del llinatge AT, que reflexarien els canvis climàtics del Quaternari. S'han detectat discrepàncies en els límits per ambdós grups definits pels gens nuclears (al·lozims) i el ADN mitocondrial. Aquestes discrepàncies poden ser degudes a un efecte més sever de la deriva genètica al ADN mitocondrial que als gens nuclears. En aquest treball s'han observat evidències a favor de la selecció al ADN mitocondrial del llinatge DU, que també explicaria aquestes discrepàncies.

L'anàlisi més exhaustiva de les conques dels Pirineus Orientals, va permetre detectar nous haplotips mitocondrials dels llinatges Adriàtic (AD) i Mediterrani (ME). En aquesta regió, els AMOVAs confirmaren que les diferències entre poblacions dins de riu són més importants que les diferències entre rius. No obstant es va observar un patró d'aïllament per distància a tota la zona, reflex de l'estructuració de les poblacions a la conca del riu Ebre. A més, els AMOVAs van mostrar que la component temporal de la variació tot i ser inferior a la espacial era estadísticament significativa. Aquestes fluctuacions estan associades tant a la deriva genètica com a processos de flux gènic entre poblacions properes. Dins de les conques, les components de diferenciació entre els afluents són, en general, superiors als obtinguts dins de cada afluent, patró que sembla estar estès a la truita comuna. Els estudis a escala microgeogràfica a la Noguera Vallferrera i la Noguera de Cardós (afluents del Noguera Pallaresa) van reproduir aquest patró de diferenciació. Les grandàries efectives i la taxa de migració entre els dos rius van ser similars a les descrites a poblacions nord-atlàniques. Les grandàries efectives de les femelles (Nef), calculats a partir del ADN mitocondrial van ser menys de la meitat de la grandària efectiva total tant a la Noguera Vallferrera com a la resta de localitats pirenaïques estudiades. Aquestes baixes grandàries efectives de les femelles contribueixen també a les fluctuacions temporals observades. Els exemplars repoblats semblen hibridar poc amb els nadius, però la seva presència podria intensificar indirectament els processos de deriva genètica i complicar la conservació dels patrimonis genètics nadius.

Amb la diferència de l'existència de selecció que afavoreix als haplotips del llinatge DU, els processos poblacionals que regulen la distribució de la variabilitat genètica a la conca del Duero i als Pirineus Orientals podrien ser semblants i caracteritzats per l'existència de múltiples demes interconnectats al llarg del curs fluvial.

SUMMARY

Brown trout populations from the River Duero basin and from Eastern Pyrenees rivers were analyzed to assess the reasons for contrasting patterns of genetic diversity. Altogether genetic diversity has been analyzed in 49 new collections, 13 from the River Duero basin and 36 from the main rivers of Eastern Pyrenees. Moreover, temporal samples from 14 Pyrenean locations were sampled to analyse temporal stability of the described structure. In these two areas previous studies indicated a strong contrast among diversity patterns in both territories.

Results in the Duero basin confirmed the presence of the Atlantic (AT) and the Duero (DU) matriarchal lineages both previously described in this river basin. The analyses of molecular variance (AMOVA) based on the hydrographical hierarchy indicated a high level of population structuring, in accordance with the ichthyological pattern observed in this basin. The DU lineage permanently occupied the internal area of the River Duero basin, whereas zones close to the mouth of the river have suffered diverse waves of colonisations of trout belonging to the AT lineage, which would reflect the changes happened in the Quaternary. Discrepancies in the limits between both groups defined by nuclear genes (allozymes) and mitochondrial DNA have been detected. These discrepancies could be due to a more intense effect of genetic drift in mitochondrial DNA than in nuclear markers. Nevertheless, evidences in favour of selection in the mitochondrial DNA of the DU lineage have been described in this work, which also would explain this discrepancy.

A detailed analysis of brown trout populations from rivers in the Eastern Pyrenees detected new mitochondrial haplotypes of the Adriatic (AD) and the Mediterranean (ME) lineages. In this region, the AMOVAs indicated that differences between populations within river were larger than differences between rivers. Nevertheless, a pattern of isolation by distance was observed in the whole zone, reflecting population structure within the River Ebro. The AMOVAs showed that the temporal component of the variation is lower than the spatial component, but the temporal fluctuations in the matriarchal comparison of the populations were statistically significant. These fluctuations were associated to both genetic drift and gene flow among close populations. Generally in the river basins, higher differentiation between than within stream was observed. This pattern seems to be widespread in brown trout. The studies on microgeographical scale undertaken in the Noguera Vallferrera and Noguera Cardós (tributaries of Noguera Pallaresa) reproduced the above pattern of differentiation. Effective population sizes and migration rate between both rivers were similar to those described in North-Atlantic populations. In the Noguera Vallferrera as well as in the rest of Pyrenean populations, the female effective sizes (N_{ef}), calculated from mitochondrial DNA were less than a half of the total effective sizes detected. These low female effective sizes also contribute to the observed temporal fluctuations. Hatchery individuals hybridise poorly with the native one, but its presence could indirectly intensify genetic drift and complicate the conservation of the native genetic resources.

In spite of selection favouring haplotypes of the DU lineage, population processes controlling the distribution of genetic variability in the Duero and the Eastern Pyrenees river basins could be similar and characterized by the existence of interconnected multiple demes throughout the fluvial course.

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad genética de las especies es crucial para mantener sus expectativas evolutivas y representa la base que asegura su capacidad reproductiva, su resistencia a enfermedades y su capacidad de adaptación a los cambios ambientales (Frankham 1995a, Hedrick 2001, Wang *et al.* 2002). Trabajos clásicos ponen de manifiesto esta relación entre variabilidad genética y capacidad evolutiva de las especies. Por ejemplo, una revisión de variabilidad electroforética en 106 especies de teleósteos marinos detectó que se podía relacionar el tipo de explotación del hábitat por la especie (especialista-generalista) con la variabilidad (Smith y Fujio, 1982). Nevo *et al.* (1984) detectaron correlación entre la cantidad de heterocigosidad alozímica y las variables ecológicas. También se ha relacionado la heterocigosidad alozímica con la resistencia a la contaminación ambiental (Nevo 1986) o la estabilidad durante el desarrollo (Leary *et al.* 1984, Blanco *et al.* 1990), e incluso en *Oncorhynchus mykiss* se ha relacionado esta estabilidad con alelos específicos (Allendorf *et al.* 1983). En el salmón atlántico (*Salmo salar*), los individuos con mayor variabilidad genética compiten más eficientemente por el alimento (Pimmer *et al.* 2003). Una población sin variabilidad genética no puede evolucionar ni adaptarse a los cambios producidos en el ambiente, lo que aumenta su riesgo de extinción (Frankham *et al.* 2002).

A partir de la década de los 80 del siglo pasado los gestores se percataron de las aplicaciones de los datos genéticos para la gestión piscícola (Utter 1991). Los recursos pesqueros han disminuido durante los últimos años, provocando incluso el colapso de grandes caladeros marinos como los de bacalao o arenque en los últimos años (Hutchings 2000). Según el informe sobre el estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA) de la organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) del año 2004, el 25% de las poblaciones marinas se encuentran sobreexplotadas y en el 52% se realizan capturas de dimensiones cercanas a los límites máximos sostenibles. Con respecto a las especies de aguas continentales, el informe remarca que, aunque los resultados son orientativos debido a la dificultad de conseguir informaciones reales de estas especies, estos recursos están infravalorados y sometidos a la amenaza por la alteración de hábitat, la degradación y actividades pesqueras insostenibles. Los análisis genéticos

pueden contribuir a la mejora de la gestión de estos recursos identificando las poblaciones existentes, resolviendo la estructura poblacional e incertezas taxonómicas, definiendo unidades de conservación dentro de las especies, detectando hibridación, y eligiendo las mejores poblaciones para las reintroducciones (Frankham *et al.* 2002).

La cantidad de diversidad genética que pueden mantener las especies depende del censo de sus poblaciones o, más concretamente, del tamaño efectivo de éstas (Frankham 1996). Introducido por Wright (1931), el tamaño efectivo (N_e) se puede definir como el número de individuos ideales que mostrarían los mismos niveles de variabilidad genética que los mostrados por la población analizada. En una población ideal se espera el mismo número de machos y hembras, que el apareamiento sea aleatorio, y que todos los individuos tengan la misma eficacia reproductiva. Si en una población todos los individuos fuesen ideales, el tamaño efectivo (N_e) sería igual al censo (N), pero es evidente que estas características no se cumplen en la mayoría de poblaciones naturales y como consecuencia, en general se tiene un tamaño efectivo inferior al censo. El tamaño efectivo permite sin embargo estudiar los procesos genéticos en poblaciones con diferentes características demográficas y es un concepto angular en los estudios de genética evolutiva y en los encaminados a la conservación de la diversidad biológica (véase por ejemplo Frankham 1996, Turner *et al.* 1999, Nunney 2000, Waples 2002). Generalmente, en poblaciones con tamaños efectivos pequeños, la actuación de la deriva genética y la consanguinidad se hacen más severas. Como resultado se produce una pérdida gradual de variación genética y un aumento de la homocigosis en la población, lo que reduce su potencial evolutivo, y posiblemente conduce a la extinción (Lande 1988, Frankham 2005).

1.1. Diferenciación poblacional

En los peces de agua dulce una parte importante de la diversidad es el reflejo de la diferenciación poblacional (Ward *et al.* 1994, Waples 1998). La diferenciación entre las poblaciones es a menudo la consecuencia de una restricción en el flujo génico entre ellas, de manera que los diferentes grupos poblacionales se aíslan reproductivamente los unos de los otros, parcial o totalmente, permitiendo la acumulación por mutación, deriva genética o

selección de las diferencias genéticas. A pesar de su reconocida capacidad de dispersión, los salmónidos manifiestan elevadas diferenciaciones entre las poblaciones por su fidelidad a las zonas de puesta (Fontaine *et al.* 1997, Bernatchez *et al.* 1998, Castric y Bernatchez 2003). En tal situación se pueden hacer más evidentes los procesos provocados por la deriva genética, pero se favorecen también los procesos de adaptación local (Hansen *et al.* 2002).

Existen diversos modelos de flujo génico que pueden explicar la diferenciación genética entre poblaciones que, básicamente, se diferencian por el grado de proximidad geográfica entre las poblaciones. Wright (1943, 1969) propuso el modelo de isla (*Island Model*) y el de aislamiento por distancia (*Isolation by Distance*, IBD), que se pueden considerar en los extremos de los patrones de diferenciación. En el primero, la población original se divide en grupos locales separados o islas, dentro de los cuales los individuos se cruzan aleatoriamente, ocurriendo sólo una pequeña cantidad de inmigración al azar desde cualquiera de las otras islas. En el segundo modelo, las poblaciones se encuentran uniformemente repartidas en el espacio y la diferenciación entre ellas depende de la capacidad de dispersión de los individuos, de manera que el intercambio de individuos es inversamente proporcional a su distancia geográfica. En una posición intermedia se encontraría el modelo de *stepping stone* propuesto por Kimura (1953). En éste, las poblaciones están separadas pero linealmente ordenadas, de forma que básicamente la migración se produce entre poblaciones contiguas.

La separación geográfica puede prevenir la migración y el flujo génico entre las poblaciones permitiendo su diferenciación. Sin embargo la asociación entre diferenciación genética y distancia geográfica puede ser muy compleja para las especies piscícolas y, por ejemplo, en un mismo territorio las relaciones poblacionales no siempre pueden describirse en base a procesos de aislamiento por distancia (Fraser y Bernatchez 2005a). Además, es posible encontrar diferenciación genética sin aislamiento geográfico. Este es el caso de las poblaciones simpátricas descritas tanto en la trucha común en Suecia (Ryman *et al.* 1979), Irlanda (Ferguson y Mason 1981) o Noruega (Carlsson y Nilsson 2000), como en otros salmónidos (Bernatchez *et al.* 1996, Pigeon *et al.* 1998, Dynes *et al.* 1999, Westgaard *et al.* 2004, Fraser y Bernatchez 2005b).

Aunque tales poblaciones simpátridas parecen reflejar la colonización postglacial desde diversos refugios que divergieron en allopatria, resulta sorprendente que se mantengan en la actualidad (Bernatchez *et al.* 1996, Tessier and Bernatchez 1999).

En otras ocasiones, la restricción en el flujo genético no es el principal responsable de la divergencia entre las poblaciones, ya que dos poblaciones podrían divergir si los mecanismos de selección son diferentes en sus respectivos ambientes, aún a pesar de la existencia de un elevado flujo genético (Allendorf 1983, Schuller 2001). Por ejemplo, procesos selectivo-adaptativos parecen estar implicados en el origen y mantenimiento de poblaciones simpátridas, morfológicamente diferenciadas, del espinoso, *Gasterosteus aculeatus* (Hendry *et al.* 2002, Kristjansson 2005, Nosil y Reimchen 2005, Raeymaekers *et al.* 2005).

1.2. Contactos secundarios y zonas híbridas

Las fluctuaciones climáticas del Cuaternario han provocado importantes cambios en la distribución de las especies y la variabilidad genética de sus poblaciones (Bernatchez y Wilson 1998, Hewitt 2000, Taberlet y Cheddadi 2002), que han favorecido el contacto secundario entre grupos previamente diferenciados. En ocasiones, los grupos que entran en contacto hibridan y pierden su singularidad, como es el caso de algunos ciprínidos (Gilles *et al.* 1998a; Gilles *et al.* 1998b). En otros casos, los grupos permanecen diferenciados incluso en simpatria, como en algunos corégonos (Lu y Bernatchez 1999; Turgeon y Bernatchez 2003) o el osmero, *Osmerus mordax*, (Saint-Laurent *et al.* 2003). En otros se generan zonas híbridas. Estas zonas se definen como áreas donde grupos de individuos genéticamente diferentes interaccionan y resulta como mínimo alguna descendencia de ancestralidad mezclada, mientras que las poblaciones puras de los 2 grupos genéticamente diferentes se encuentran fuera de la zona de interacción (Harrison 1990, Nielssen *et al.* 2003).

Las zonas híbridas han merecido intensa atención durante las últimas tres décadas, lo que ha comportado un gran número de revisiones sobre la teoría de tales zonas (p.e. Endler 1977, Barton y Hewitt 1985, Harrison 1990, Harrison

1993). Básicamente, se consideran dos escenarios para la formación de zonas híbridas. En el primero, la zona híbrida se origina entre poblaciones que han divergido en simpatría o parapatría por selección diferencial de ambiente, mientras que en el segundo, la zona híbrida se origina entre poblaciones alopatridas que entran en contacto secundario. Existen también diferentes modelos que explican la permanencia temporal de la zona híbrida. En algunas situaciones, la zona híbrida podría intrínsecamente perpetuarse, sin necesidad de dispersión desde las poblaciones originales, debido a que los híbridos poseen una mejor adaptación al ecosistema que las formas parentales (Moore 1977). En otras, la zona se mantiene a pesar de la selección en contra de los genotipos híbridos intermedios, gracias a la continua dispersión desde las poblaciones puras y posterior hibridación. Este último caso es comúnmente conocido como zona de tensión y, a menudo, se distingue de la anterior por la existencia de desequilibrio gamético debido a la permanente dispersión de la combinación de genes parentales hacia el centro de la zona (Barton y Hewitt 1985). En resumen, las zonas híbridas se pueden formar o por cruzamiento de dos poblaciones puras que generan una zona con genotipos intermedios que se mantiene por reproducción intrínseca (la población híbrida se encontrará en equilibrio), o simplemente por la mezcla de individuos de las dos poblaciones puras y en este caso se observará un déficit de heterocigotos (efecto Wahlund).

Muchas de las zonas híbridas europeas son el resultado del contacto entre linajes consecuencia de la recolonización postglacial de los territorios noreuropeos liberados de la cobertura de hielo desde los diferentes refugios (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 2004). Dentro de la Península Ibérica se han descrito 2 zonas de sutura relacionadas con barreras físicas (Hewitt 2000). La primera de ellas está localizada en los Pirineos y la segunda situada más al sur, alrededor de los sistemas montañosos Ibérico y Central (Fig.1-1). La orientación Este-Oeste de los principales sistemas montañosos y cursos fluviales en la Península Ibérica, que han actuado como las principales barreras para la dispersión de las especies, ha provocado de manera general una distribución Norte-Sur de los diferentes grupos poblacionales tanto en animales como en vegetales (revisión en Gómez y Lunt 2006).

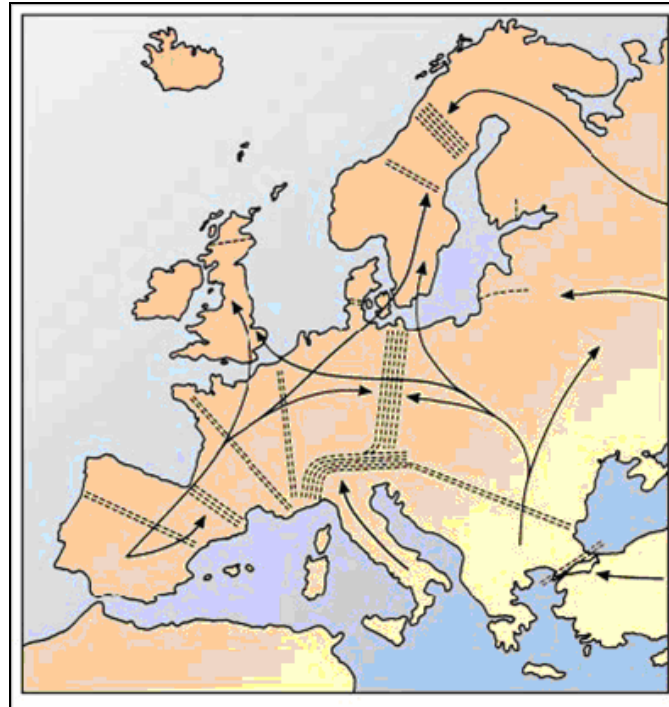


Figura 1-1. Posición de las principales zonas de sutura en Europa (Figura 3 en Hewitt 2000). Las líneas discontinuas indican las zonas de sutura. Las flechas indican las principales rutas de recolonización en los períodos interglaciares.

1.3. Evaluación molecular de la diversidad genética

Desde el desarrollo de la técnica electroforética en los años 60 del siglo pasado, muchos estudios para la determinación de la diversidad genética y la estructura poblacional de las especies están basados en el análisis de la variabilidad genética en marcadores moleculares (Utter 1991, Carvalho y Pitcher 1994, Ferguson *et al.* 1995). El principio básico de la metodología electroforética es que las mutaciones nucleotídicas producidas en los genes pueden desembocar en sustituciones aminoacídicas que pueden provocar cambios en la conformación y en la carga de las proteínas por ellos codificadas. De este modo, la electroforesis permite diferenciar entre diferentes formas de un determinado locus proteico (alozimas) y estimar el nivel de variación genética. La técnica es razonablemente fácil de realizar, no tiene un coste excesivo y permite analizar un gran número de loci (Carvalho y Hauser 1994).

A pesar de sus ventajas, el método también presenta algunos inconvenientes. Así, únicamente el 30% de los cambios nucleotídicos en el ADN resultan en

cambios de carga eléctrica, por lo que la técnica infraestima los niveles de variabilidad genética. Además, con la electroforesis de proteínas se analizan los diferentes tejidos de un ejemplar, por lo que los individuos normalmente son sacrificados. Estos inconvenientes han favorecido que en la actualidad, la electroforesis de proteínas haya sido reemplazada por técnicas no destructivas basadas en el estudio directo de los polimorfismos en las moléculas de ADN (Frankham *et al.* 2002). Entre estas técnicas destacan los estudios basados en loci microsatélites y el análisis del polimorfismo en el ADN mitocondrial (Ferguson *et al.* 1995). Las muestras para el análisis de ADN se pueden obtener a partir de biopsias no letales de tejido, excrementos, pelos, escamas e incluso de muestras de museo (Nielsen *et al.* 1997).

1.3.1. Loci Microsatélites

Los microsatélites son secuencias de ADN nuclear no codificante con motivos repetidos en tándem que se encuentran a lo largo de todo el genoma de los eucariotas (Jarne y Lagorda 1996). Normalmente los microsatélites utilizados en los estudios poblacionales contienen motivos de entre 2 y 4 pares de bases (pb) de longitud, que dependiendo de la estructuración de la secuencia de unidades repetidas pueden definirse como (i) “perfectos” si no se interrumpe la secuencia de unidades repetidas, como (ii) “compuestos” si se encuentran formados por secuencias con diferentes motivos repetidos y como (iii) “interrumpidos” cuando entre los motivos repetidos se intercala ADN no repetitivo (Hansen 2003). En general, la formación de nuevos alelos para un determinado locus microsatélite se debe a posibles fallos de la polimerasa durante su replicación, aumentando o disminuyendo en una o varias repeticiones la longitud del microsatélite. También se ha propuesto como fuerza conductora de la evolución de los microsatélites la inestabilidad del acoplamiento de las dos cadenas de ADN en individuos heterocigotos. Las mutaciones serían más frecuentes cuando las diferencias de tamaño entre los dos alelos fuesen más grandes (vease revisión en Chambers y MacAvoy 2000). Una de las ventajas de los loci microsatélites con respecto a otros marcadores nucleares como los alozimas, es su elevada tasa de mutación, con valores entre 10^{-5} y 10^{-3} , e incluso 10^{-2} (Ellegren 2000) y en consecuencia, muestran niveles de diversidad genética más elevados que los alozimas. Así, el número

de alelos por locus es normalmente alto, entre 5-20, mientras que la gran mayoría de loci polimórficos electroforéticos son dialélicos. La heterocigosidad en los microsatélites se encuentra entre 0.6-0.8, mientras que para alozimas es, como mucho, del 0.2-0.4 (Frankham *et al.* 2002).

Inicialmente, se pensó que la mutación en los microsatélites seguía un estricto modelo de adición o eliminación de una única unidad repetitiva (SMM, *Stepwise Mutation Model*, Kimura y Otha 1978). No obstante, estudios posteriores han demostrado que la mutación de los loci microsatélites puede producirse añadiendo o eliminando más de una unidad de repetición. Así, el modelo más aceptado de mutación es el modelo de dos fases (TPM, *Two-Phase Model*) propuesto por Di Rienzo *et al.* (1994). Este modelo propone que hay un gran número de mutaciones donde tan sólo se ve involucrada una unidad repetitiva, pero que existe una fracción de mutaciones en las que participan diversas unidades. Además, la aparición de un nuevo alelo no se ajustaría al modelo mutacional de infinitos alelos (IAM, *Infinite Allele Model*; Kimura y Crow 1964), sino que estaría condicionada por como era el alelo antes del proceso mutacional. Se hace por tanto difícil discernir en cada caso el modelo mutacional que pueda albergar los diferentes tipos de microsatélites existentes (Angers and Bernatchez 1997), por lo que en el análisis poblacional se opta normalmente por la estimación de la diferenciación interpoblacional a partir de los estadísticos clásicos que no tienen en cuenta el modelo de mutación (F_{ST} , Wright 1951) y se comparan con otros coeficientes de diferenciación que sí tienen en cuenta un modelo mutacional como, por ejemplo, el R_{ST} (Slatkin, 1995) que considera el modelo SMM (Balloux y Lugon-Moulin 2002). Sin embargo, dado el elevado polimorfismo en estos loci, la utilización de coeficientes de diferenciación que no tienen presente el modelo de mutación alélica se considera que favorece los análisis de la estructura poblacional (Hedrick 1999).

1.3.2. El ADN mitocondrial (ADNmt)

Aunque la gran mayoría del contenido de ADN de los organismos eucariotas se encuentra en el núcleo, algunos orgánulos celulares como las mitocondrias

contienen su propio cromosoma. El genoma mitocondrial es una pequeña molécula de ADN circular de doble cadena, que en salmónidos tiene una longitud total de unos 16000 pares de bases (Shedlock *et al.* 1992). Normalmente se hereda vía materna y no manifiesta fenómenos de recombinación (Wilson *et al.* 1985) ya que aunque las células de los individuos poseen diversas mitocondrias, en general todas ellas tienen idéntica información genética. Estas propiedades únicas han convertido al ADN mitocondrial en la estrella de los estudios de evolución molecular y de filogeografía (Avise, 1994).

El genoma mitocondrial en vertebrados está formado por la región de control, 13 genes que codifican para subunidades de enzimas implicados en la respiración celular, dos genes que codifican para ARN ribosomales y 22 genes codificantes para ARN de transferencia. La región de control se encuentra flanqueada en su extremo 5' por el gen del ARN de transferencia de la prolina, y en el 3' por el gen del ARN de transferencia de la fenilalanina. Aunque se trata de la región no codificadora más grande dentro del ADN mitocondrial, de 1013 pares de bases (pb) en la trucha común, *Salmo trutta* (Cortey y García-Marín 2002), en su interior se encuentran secuencias reguladoras de la replicación y transcripción del cromosoma mitocondrial (Meyer 1993).

Las diversas regiones y genes del ADN mitocondrial evolucionan a velocidad diferente, y en general más rápidamente que el ADN nuclear, lo que permite elegir entre ellas la más adecuada al estudio que se desee realizar (Brown *et al.* 1982). Sin embargo, tradicionalmente, en los estudios de diversidad intraespecífica realizados con peces se ha utilizado el extremo 5' de la región de control (Lee *et al.* 1995, Bernatchez 2001). Este extremo fue el utilizado en los primeros estudios con trucha común (Bernatchez *et al.* 1992) aunque recientemente la secuenciación de toda la región han demostrado que su extremo 3' es más variable (Cortey y García-Marín 2002, Duftner *et al.* 2003, Cortey 2005).

El ADN mitocondrial ha sido, de manera general, considerado como un marcador molecular neutro. Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que en ocasiones se encuentra bajo presiones selectivas (Rand 2001, Ballard y Withlock 2004) y se tienen indicios de una posible selección térmica en

ciprínidos (Duvernell y Aspinwall 1995), salmónidos (Glémet *et al.* 1998), la liebre (Melo-Ferreira *et al.* 2005), e incluso humanos (Ruiz-Pesini *et al.* 2004).

1.4. La trucha común (*Salmo trutta*)

1.4.1. Biología de la especie

Una de las familias ícticas más importante a nivel comercial y recreativo es la de los salmónidos. Originaria del hemisferio norte, ha sido ampliamente introducida en otros lugares por su valor en la pesca deportiva y en la acuicultura. Muchas de las especies integrantes de la familia son anádromas, pasando parte de su vida en el mar, pero retornando a los ríos para reproducirse (Nelson 1994). El volumen mundial de las capturas de salmónidos en aguas continentales es de aproximadamente 134000 toneladas (FAO 2004). Dentro de la familia de los salmónidos las especies más representativas son el salmón atlántico (*Salmo salar*), los salvelinos (*Salvelinus sp.*) y la trucha común (*Salmo trutta*), que es la especie estudiada en este trabajo.

La trucha común, *Salmo trutta*, se encuentra distribuida de forma natural a lo largo de todo el continente Europeo desde la Península Ibérica hasta los Urales y el Mar Caspio, llegando a tener poblaciones aisladas en el Mar Aral. La especie ha sido introducida como mínimo en 24 países, pasando a tener en la actualidad una distribución cosmopolita (Elliott 1994). Las primeras introducciones se produjeron en el este de Rusia y continuaron en Nueva Zelanda entre 1867-1885, Estados Unidos en 1883, Canadá 1887, Australia 1888, Sudáfrica 1892, Japón 1892 y Sur América entre 1904 y 1938, convirtiéndose en menos de 90 años en una especie global (Klemetsen *et al.* 2003). Esta amplia distribución geográfica viene dada por su alta variabilidad ecológica y su extraordinaria habilidad de expansión y colonización de diferentes cursos fluviales. En la Península Ibérica normalmente habita en las aguas frías de las cabeceras fluviales y lagunas de montaña (Almodóvar 2001), donde es una de las especies de peces continentales más importantes, tanto económicamente como para la pesca deportiva (García-Marín *et al.* 1999).

Los factores limitantes en su distribución son la temperatura y la calidad del agua. Las temperaturas límite son los 0 °C de mínima y los 25-30 °C de máxima, pero su crecimiento óptimo se produce entre los 4 °C y los 19.5 °C

(Elliott 1989). Las aguas idóneas para la especie han de tener un pH comprendido entre 5 y 9.2 (normalmente alcalinas), estar oxigenadas (no toleran niveles de saturación de oxígeno en el agua por debajo del 80%) y carentes de contaminación orgánica. Aunque la especie no está incluida en la lista roja de especies amenazadas de la IUCN, en la Península Ibérica su estatus es de vulnerable (Doadrio 2001).

La apariencia fenotípica de la especie varía ampliamente con el hábitat, y también varía su ecología (Pakkasmaa y Piironen 2001). La especie se reproduce en otoño o invierno, reproduciéndose antes en zonas de latitud y altitud elevada donde se requiere un período de incubación de los huevos más largo debido a la menor temperatura del agua. En los frezaderos, la trucha común construye nidos en el fondo del sustrato del río, donde la hembra deposita sus huevos que son fecundados por el macho. Una vez realizada la fecundación de los huevos, la hembra tapa la puesta con piedras y grava del lecho del río. En esos nidos los huevos permanecen entre 1 y varios meses (Klemetsen *et al.* 2003). La eclosión de los huevos se produce en primavera, alimentándose los alevines del saco vitelino en los primeros estadios de vida (Maisse y Blaglinière 1991). Una vez consumido el saco vitelino, el alevín de unos 20 mm se alimenta en la zona donde ha nacido o cerca, siendo en este período muy agresivo y territorial, ya que de este período depende la supervivencia del individuo, que si no se alimenta puede ser desplazado aguas abajo y probablemente morirá en un período corto (Elliott 1994). La dieta de los individuos adultos depende de varios factores (edad, área geográfica, ambiente, etc), pero consiste básicamente en bentos, zooplancton, insectos y peces (Hunter 1991).

Dentro de la especie se reconocen dos ciclos de vida, residente y anádromo, que pueden encontrarse en un mismo río, sobretodo en aquellos tramos que se encuentran cerca del mar (Jonsson 1985). Mientras que la forma residente se encuentra a lo largo de todo el rango de distribución, la forma anádroma se distribuye actualmente en la cuenca atlántica hasta la cuenca del río Miño alrededor del paralelo 42°N (Bouza *et al.* 1999, Weiss *et al.* 2000). Esta forma ha desaparecido de toda la cuenca mediterránea, aunque aún permanece en el Mar Negro y Mar Caspio (Elliott 1994). La estrategia residente implica que los

individuos pasan toda su vida en el río, mientras que la estrategia anádroma comporta el desplazamiento del individuo al mar, donde crece y madura sexualmente para reproducirse en el río donde nació, gracias a la fidelidad que muestra la especie a los lugares de puesta (*homing*). La proporción de sexos es variable en las dos estrategias. Mientras que en las poblaciones anádromas el número de hembras supera al de machos, en las poblaciones residentes ocurre todo lo contrario (Jonsson 1985, Euzenat 1999, Hansen *et al.* 2000, Schreiber y Diefenbach 2005). De manera general, los machos maduran antes y con tamaños más variables que las hembras, existiendo indicios de que esta diferenciación en la maduración sexual parece tener base genética y ser independiente de la tasa de crecimiento (Jonsson 1989). Algunos autores consideran la forma anádroma una subespecie diferente de la forma residente. Sin embargo, ambos tipos pueden coexistir en las mismas áreas y algunos estudios como los de Hindar *et al.* (1991) o Hansen *et al.* (2000) cuestionan el valor taxonómico de esta diferencia ya que las dos formas no se mantienen genéticamente aisladas.

A pesar de su aparente fidelidad ("*homing*") a las áreas de puesta, las truchas anádromas pueden favorecer la homogenización de las poblaciones (Paaver 1989), ya que algunos individuos anádromos se reproducen en ríos diferentes a los que nacieron (Berg y Berg 1987). Además, estos ejemplares pueden ser los responsables de la colonización de nuevos hábitats recuperados natural o artificialmente (Østergaard *et al.* 2003, Schreiber y Diefenbach 2005, Ayllon *et al.* 2006).

1.4.2. Estudios filogenéticos y patrones de diversidad

La extraordinaria variabilidad fenotípica de la trucha común provoca una considerable confusión con respecto a su taxonomía. Algunos autores defienden que cada grupo debería tener el estatus de especie, aunque según Behnke (1972) se trata de una sola especie politépica. Lelek (1980) comparte esta opinión aunque lista algunas subespecies, mientras que Kottelat (1997) propone más de 20 especies diferentes e indica que podría ser una lista incompleta. En un intento por conocer los patrones genéticos subyacentes en esas diferencias morfológicas y ecológicas, los estudios realizados con *Salmo trutta* han sido muy abundantes durante las últimas dos décadas, en las que se

han utilizado las diferentes metodologías genético-moleculares disponibles en cada momento. Los análisis iniciales se realizaron mediante electroforesis de proteínas, analizándose gran cantidad de sistemas enzimáticos (véase para revisión Ferguson 1989). Estos estudios confirmaron que la trucha es una de las especies más polimórficas dentro de la familia de los salmónidos y que presenta una elevada diferenciación interpoblacional tanto a escala local como Europea (Ferguson 1989, García-Marín *et al.* 1999). Estos polimorfismos han permitido definir diferentes grupos evolutivos y plantear hipótesis de como los cambios climáticos del Cuaternario han afectado a la distribución de la especie. Así, inicialmente se propuso la existencia de dos grupos en base a la distribución de alelos en el locus de la lactato deshidrogenasa (*LDH-C**) ya que en las cuencas hidrográficas accesibles tras la retirada de los hielos abunda la llamada “raza moderna”, que presenta una elevada frecuencia del alelo *LDH-C*90*, mientras que la variante *LDH-C*100*, que tipifica a la “raza ancestral”, es la que domina en toda la zona Sur del continente Europeo donde el efecto de las glaciaciones no fue tan severo (Hamilton *et al.* 1989). Posteriormente, basándose en la distribución de las variantes alélicas del locus *LDH-C** (alelos **100* y **90*) y del locus de la creatina quinasa *CK-A1** (alelos *CK-A1*100* y *CK-A1*115*), se ha propuesto la existencia de 4 grupos en las zonas que no fueron intensamente afectadas por los hielos en la última glaciación, aunque sólo tres (linaje I, II y III) habrían participado en la recolonización postglacial del norte de Europa (García-Marín *et al.* 1999).

Los análisis basados en las secuencias de la región de control del ADN mitocondrial definieron cinco linajes claramente diferenciados en la distribución de la trucha común (Bernatchez *et al.* 1992, 2001). De ellos, sólo uno se encontraría en toda la vertiente atlántica (linaje AT) y cuatro en la vertiente mediterránea, desde la Península Ibérica hasta el mar Aral: linaje Mediterráneo *sensu strictu* o ME, Adriático o AD, Danubio o DA y el linaje Marmoratus o MA encontrado en algunas cuencas adriáticas. Sin embargo, actualmente se plantea la posibilidad de un sexto linaje básicamente restringido a la cuenca del río Duero (Machordom *et al.* 2000, Suarez *et al.* 2001, Cortey 2005). Aunque inicialmente se consideraba una distribución alopátrica de todos estos linajes mitocondriales (Bernatchez 2001), estudios recientes determinan que se han

producido intensos contactos secundarios al menos entre aquéllos que se distribuyen en los ríos mediterráneos (Antunes *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004).

La distribución de la variabilidad genética entre las poblaciones de trucha común es compleja. En ocasiones se ha observado una importante correlación entre la distancia genética y geográfica entre diferentes ríos aunque no dentro de ellos (Morán *et al.* 1995, Hansen y Mensberg 1998). Otros estudios sugieren sin embargo procesos de aislamiento por distancia dentro de una misma cuenca fluvial (Estoup *et al.* 1998, Carlsson y Nilsson 2000), mientras que en otros casos se ha detectado un importante aislamiento entre poblaciones próximas, incluso simpátridas (Allendorf *et al.* 1976, Ferguson y Mason 1981). En las poblaciones de ríos mediterráneos, se observa una mayor diferenciación entre poblaciones dentro del mismo curso fluvial que entre ríos, sugiriendo una escasa correlación entre distancia geográfica y genética (Sanz *et al.* 2002). Permanece todavía desconocida la estabilidad temporal de estos patrones de diferenciación, ya que aunque algunos análisis muestran estabilidad temporal entre réplicas tomadas en un mismo punto en diferentes períodos (Hansen y Loeschcke 1996, Hansen *et al.* 2002), hay otros que sugieren todo lo contrario (Laikre *et al.* 1998, Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005). En estos últimos parece que el tamaño efectivo de la población es bajo, con estimaciones por debajo de los 50 individuos (p.e. Jorde y Ryman 1996, Laicke *et al.* 1998, Laikre *et al.* 2002, Palm *et al.* 2003), que son los mínimos propuestos para evitar la depresión por consanguinidad y retener la eficacia biológica a corto plazo. Parece además que en tales situaciones los demes locales presentarían una estructura de metapoblación y con importantes tasas migración entre ellos que mantendrían elevados los niveles de polimorfismo local (Laikre *et al.* 2002, Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005, Ayllon *et al.* 2006).

1.4.3. Estructura poblacional en la Península Ibérica

Los primeros análisis genéticos en truchas de la Península Ibérica pusieron de manifiesto una elevada diferenciación entre las poblaciones (García-Marin *et al.* 1991), destacando una significativa diferenciación entre los ríos atlánticos y mediterráneos (García-Marín and Pla 1996). En la vertiente atlántica, los análisis del polimorfismo en alozimas, sugieren una elevada diferenciación entre las poblaciones que se refleja en grupos restringidos que parecen seguir

un patrón hidrográfico de aislamiento (Sanz *et al.* 2000, Machordom *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Cortey 2005). Un primer grupo se distribuye a lo largo de los ríos cantábricos hasta el límite de la distribución de las formas anádromas (en Galicia), un segundo grupo ocupa los ríos de las costas de Portugal y penetra hacia el interior de la cuenca del Tajo y Duero, aunque en este último ocupa territorios separados de un linaje más antiguo (Bouza *et al.* 2001). El Guadalquivir estaría ocupado por poblaciones de compleja ancestralidad, aunque con predominancia de genes de linajes mediterráneos (García-Marín y Pla 1996, Sanz *et al.* 2006). Los estudios del polimorfismo en el ADN mitocondrial han confirmado esta estructura poblacional (Machordom *et al.* 2000, Suarez *et al.* 2001) (Fig.1-2).

Estos estudios indican que en las poblaciones españolas de la cuenca del Duero pervive un grupo atlántico altamente diferenciado, y que podría representar un nuevo linaje matriarcal (Cortey 2005). Esta singularidad de las poblaciones de la cuenca del Duero ya había sido detectada en los estudios con alozimas (Machordom *et al.* 1999, Sanz *et al.* 2000). De acuerdo con Bouza *et al.* (2001) la cuenca del río Duero estaría ocupada por dos linajes con distribuciones disjuntas, uno definido como ancestral y distribuido en los afluentes del margen norte de la cuenca denominado por ello grupo Norte, y otro más moderno, similar al detectado en las poblaciones cantábricas y que se distribuye en los afluentes del margen sur de la cuenca (grupo Sur).

En la cuenca mediterránea, Machordom *et al.* (2000) mediante el polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADNmt, propusieron una distribución geográfica separada de los dos linajes ME y AD. El linaje AD ocuparía los ríos del sur peninsular, mientras que el ME se distribuiría desde el Segura hacia el norte, siendo la cuenca del río Segura una zona híbrida entre ambos grupos. Posteriormente, mediante análisis enzimáticos Sanz *et al.* (2002), propusieron una distribución en mosaico para los diferentes grupos de poblaciones existentes en la cuenca mediterránea sin un claro patrón geográfico, que sería consecuencia de múltiples episodios de colonización por linajes diferentes, contactos secundarios y deriva genética. Recientemente, Cortey *et al.* (2004), mediante la secuenciación completa de la región de control del ADNmt, han confirmado esos resultados y sugieren que el patrón de diversidad observado

en los ríos mediterráneos de la Península Ibérica es el resultado tanto de las expansiones poblacionales de los linajes AD y ME, que han producido intensos contactos secundarios entre ellos, como de los procesos de deriva genética durante el postglacial (Fig.1-2).

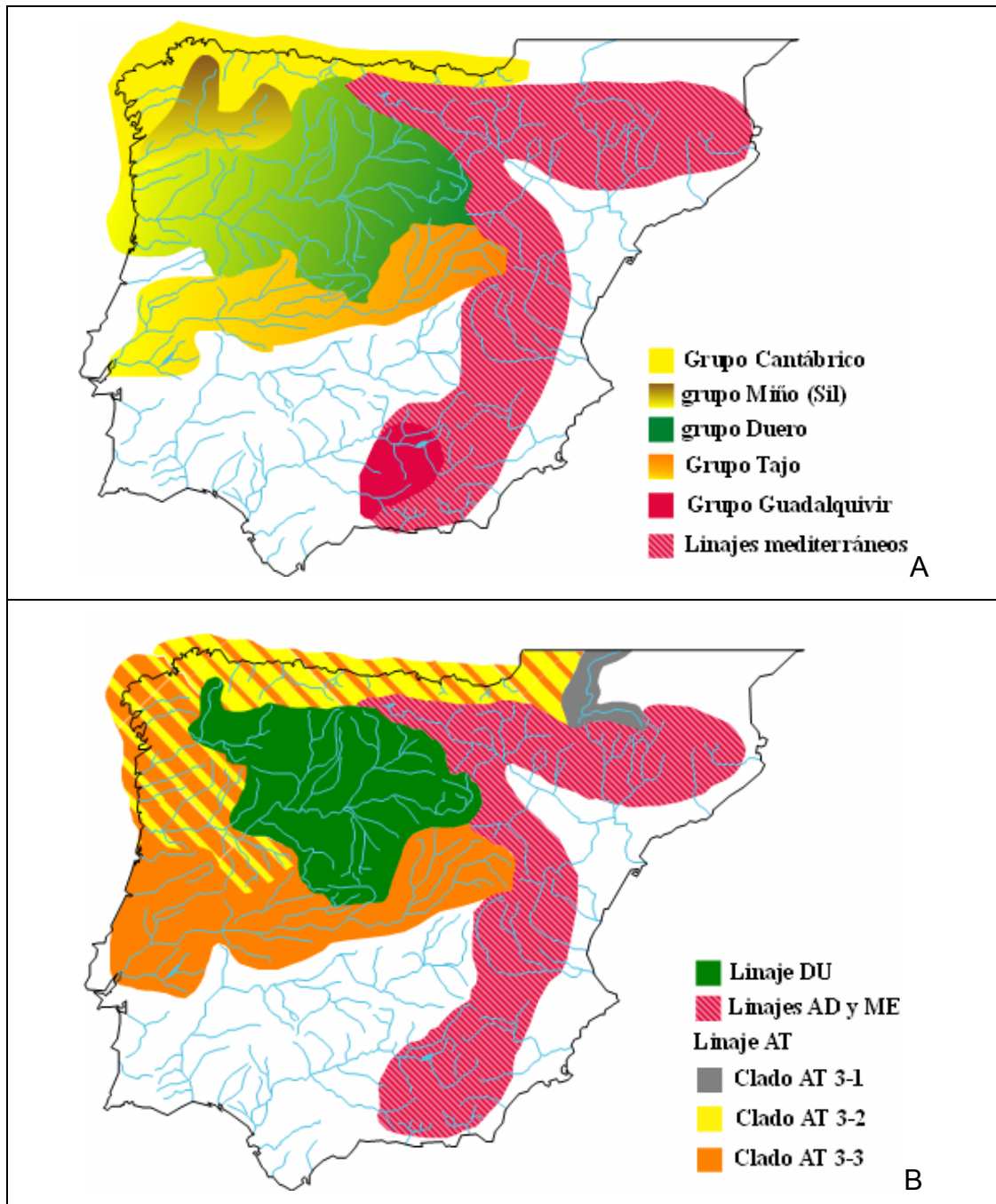


Figura 1-2 Distribución de los linajes de trucha común en la Península Ibérica. A: Distribución de los grupos alozímicos según Sanz (2000). B: Distribución de los linajes mitocondriales según Cortey (2005)

Las poblaciones nativas de trucha común en la Península Ibérica han sido catalogadas como vulnerables (Doadrio 2001). Las mayores amenazas para las poblaciones naturales existentes son la destrucción de sus hábitats, la sobrepesca (la especie tiene estatus de pescable en todas las comunidades del estado español) y las repoblaciones a partir de individuos procedentes de los centros piscícolas. Los estudios genéticos realizados sobre los *stocks* de los centros piscícolas comúnmente utilizados en las repoblaciones indican que provienen de un linaje diferente al de las poblaciones nativas (García-Marín *et al.* 1991, Martínez *et al.* 1993, Machordom *et al.* 2000, Cortey y García-Marín 2002). Así, la introducción de estos individuos en las poblaciones naturales provoca la pérdida de los patrimonios genéticos nativos y, dada la poca diferenciación entre los estocs (García-Marín *et al.* 1991), se favorece la homogenización de todas las poblaciones (Machordom *et al.* 1999, Araguas *et al.* 2004).

1.5. Objetivos

Como se ha indicado, la Península Ibérica representa uno de los puntos de máxima diversidad entre las poblaciones de trucha común (García-Marín y Pla 1996, Machordom *et al.* 2000, Presa *et al.* 2002). Tanto los ríos de la vertiente atlántica como los de la mediterránea han sido objeto de la colonización por diversos grupos o linajes evolutivos (Machordom *et al.* 2000, Sanz *et al.* 2000, Sanz *et al.* 2002, Bouza *et al.* 2001, Suarez *et al.* 2001, Presa *et al.* 2002). Sin embargo, el patrón de estructura poblacional es diferente entre ambas vertientes, mientras que en los ríos atlánticos existen una diferenciación poblacional en la que los grupos permanecen básicamente separados ocupando grandes territorios (Sanz *et al.* 2000, Bouza *et al.* 2001), en la mediterránea los diferentes linajes se encuentran distribuidos a lo largo de los diferentes ríos y parecen haber hibridado (Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004). En el presente trabajo de tesis doctoral se propone analizar los mecanismos responsables de este contraste en la resolución del contacto secundario entre linajes. Para ello se centrará en el estudio de la estructura poblacional en dos territorios, cuenca del Duero y Pirineos Orientales, que caracterizan el patrón observado en cada una de las vertientes. El trabajo que se propone se desarrolla en los siguientes objetivos:

1-Revisión mediante el análisis del ADN mitocondrial de la estructura poblacional en la cuenca del río Duero. Determinación de los patrones y las causas de la diferenciación entre las poblaciones.

2-Estudio de la estructura poblacional en los ríos de los Pirineos Orientales. Determinación de los patrones de diversidad, las causas de su distribución y su estabilidad temporal.

3-Valoración del papel de los agentes evolutivos en los diferentes territorios.

La exposición del trabajo se desarrolla en dos capítulos destinados a los objetivos 1 y 2, y un tercer capítulo de integración y discusión de las conclusiones principales de ambos análisis para valorar el papel relativo de los agentes evolutivos (migración, selección y deriva genética) en el origen y distribución de la diversidad de las poblaciones españolas de trucha común.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

La práctica totalidad de las 74 muestras analizadas en esta tesis se obtuvieron en un período comprendido entre los años 1990 y 2003 a partir de diferentes proyectos de investigación del LIG. Además se han incorporado algunas muestras cedidas por otros laboratorios para completar el detalle de las zonas estudiadas (2 muestras facilitadas por grupo del Dr. Paulino Martínez de la Universidad de Santiago de Compostela).

En total, se han analizado 49 localidades repartidas entre la cuenca del río Duero (Fig.2-1, Tabla 2-1) y los principales ríos del Pirineo oriental (Fig.2-2, Tabla 2-2). El objetivo, como ya se ha indicado, era comparar los procesos evolutivos que provocan la actual distribución de los diferentes grupos poblacionales en ambas zonas con marcado contraste en la estructura poblacional (Sanz *et al.* 2000, 2002, Bouza *et al.* 2001, Cortey *et al.* 2004). A continuación, se describen más detalladamente las dos zonas estudiadas y los análisis realizados en cada una de ellas.

Para todas las muestras del LIG anteriores al año 2002, se poseían los individuos completos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, por lo que las extracciones de ADN se realizaron a partir de una porción de tejido muscular de la zona dorsal, que posteriormente se guardó en un eppendorf con alcohol al 95%. Para las muestras de los años 2002 y 2003 y las facilitadas por el Dr. Martínez (Tormes y Águeda), se disponía de biopsias de la aleta adiposa conservadas en eppendorfs con alcohol al 95% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La obtención de aleta adiposa se puede realizar "in situ" y por tanto devolver los ejemplares al medio natural, es por tanto una técnica no destructiva, que ha permitido aumentar a más de 25 el número de capturas autorizadas por la administración en los diferentes puntos de muestreo.

2.1. Análisis de la estructura poblacional en el río Duero

El río Duero nace en la vertiente meridional de los Picos de Urbión, en la provincia de Soria. Aunque comparado con los ríos europeos del Atlántico puede considerarse como poco caudaloso, y con un importante estiaje, su cuenca con 98160 km^2 de superficie es la mayor de la Península Ibérica. Al norte se encuentra delimitado por la cordillera Cantábrica, al este por el sistema

Ibérico y al sur por el sistema Central, fluyendo hacia el oeste a través del macizo Hespérico. Estos 4 sistemas montañosos delimitan en su interior la depresión del río Duero (Fig.2-1).

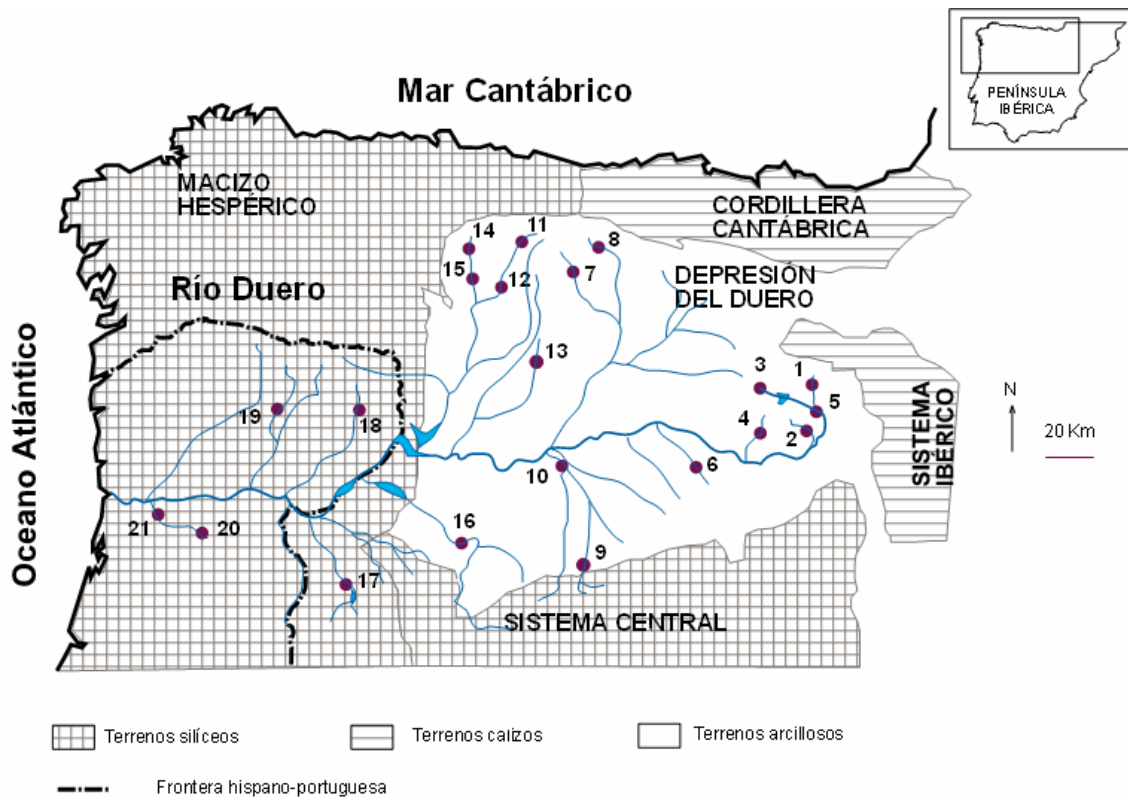


Figura 2-1. Cuenca hidrográfica, geomorfología (según Gutiérrez-Elorza 1994) y localidades analizadas en la cuenca del río Duero. Los números corresponden a los de la Tabla 2-1.

La trucha común se encuentra presente en la mayor parte de la cuenca, aunque se considera extinta actualmente la forma anádroma en la cuenca ya que su límite actual se localiza en cuencas más al norte (Bouza *et al.* 1999, Weiss *et al.* 2000).

2.1.1. Muestras analizadas

Se ha analizado la composición haplotípica en 10 muestras (1-Tera, 3-Duruelo, 4-Abión, 7-Pisuerga, 8-Carrión, 9-Moros, 11-Riaño, 12-Esla, 13-Villomar, 15-Millar) repartidas a lo largo de la cuenca del río Duero capturadas mediante pesca eléctrica por el LIG (Tabla 2-1, Fig.2-1). Debido a que tan sólo la localidad 9-Moros se encuentra dentro de la zona Sur, se han analizado también 2 muestras (16-Tormes y 17-Águeda) representativas del grupo Sur

descrito por Bouza *et al.* (2001) y facilitadas por el grupo del Dr. Paulino Martínez (Universidad de Santiago de Compostela). Junto a éstas, también se incluyeron tres poblaciones (2-Mazo, 6-Aguisejo y 14-Bernesga) analizadas en el trabajo de Cortey y García-Marín (2002).

Tabla 2-1. Poblaciones analizadas en la cuenca del río Duero. Referencia: procedencia de los datos.

Población	Río	Cuenca	Coordenadas	Referencia
1-Tera	A. Duero	Duero	41°57'N-2°28'W	Este trabajo
2-Mazo	A. Duero	Duero	41°36'N-2°28'W	Cortey y García-Marín 2002
3-Duruelo	A. Duero	Duero	41°58'N-2°52'W	Este trabajo
4-Abión	A. Duero	Duero	41°37'N-3°30'W	Este trabajo
5-Hinojosa	A. Duero	Duero	41°49'N-2°28'W	Machordom <i>et al.</i> 2000
6-Aguisejo	Riaza	Duero	41°21'N-3°21'W	Cortey y García-Marín 2002
7-Pisuerga	Pisuerga	Duero	42°59'N-4°29'W	Este trabajo
8-Carrión	Pisuerga	Duero	42°56'N-4°42'W	Este trabajo
9-Moros	Eresma	Duero	40°48'N-4°12'W	Este trabajo
10-Cega	Eresma	Duero	41°21'N-4°37'W	Machordom <i>et al.</i> 2000
11-Riaño	Esla	Duero	42°56'N-5°06'W	Este trabajo
12-Esla	Esla	Duero	42°37'N-5°14'W	Este trabajo
13-Villomar	Esla	Duero	42°37'N-5°15'W	Este trabajo
14-Bernesga	Esla	Duero	42°56'N-5°51'W	Cortey y García-Marín 2002
15-Millar	Esla	Duero	42°51'N-5°39'W	Este trabajo
16-Tormes	Tormes	Duero	40°22'N-5°17'W	Este trabajo
17-Águeda	Águeda	Duero	40°17'N-6°50'W	Este trabajo
18-Sabor	Sabor	Duero	41°50'N-6°45'W	Antunes <i>et al.</i> 2001
19-Tuela	Tuela	Duero	41°51'N-6°55'W	Antunes <i>et al.</i> 2001
20-Tenente	Tenente	Duero	40°55'N-7°52'W	Antunes <i>et al.</i> 2001
21-Ardena	Tenente	Duero	41°00'N-8°10'W	Antunes <i>et al.</i> 2001
22-Uña	Piscifactoría			Cortey y García-Marín 2002
23-Carballedo				Cortey y García-Marín 2002

Adicionalmente, en el análisis poblacional se incorporaron las poblaciones portuguesas de 18-Sabor, 19-Tuela, 20-Tenente y 21-Ardena descritas en el trabajo de Antunes *et al.* (2001). También se han utilizado algunas de las poblaciones incluidas dentro del trabajo de Machordom *et al.* (2000), donde los ejemplares se analizaron mediante RFLPs. La concordancia de las frecuencias haplotípicas estimadas mediante las dos técnicas (RFLPs y secuenciación) en muestras compartidas entre este trabajo y el trabajo de Machordom *et al.* (2000) (1-Tera, 2-Mazo, 3-Duruelo, 6-Aguisejo, 7-Pisuerga, 9-Moros) comprobada mediante el test de Fisher de probabilidades exactas, permitió correlacionar las clasificaciones haplotípicas mediante secuenciación y RFLPs,

e incorporar por tanto los datos haplotípicos de las poblaciones del Duero no compartidas (5-Hinojosa y 10-Cega). Con todo ello, finalmente el grupo Sur de Bouza *et al.* (2001) está representado por 8 muestras y el Norte por 13.

Para evaluar la incidencia genética de las repoblaciones desde los centros piscícolas descrita en esta zona (Machordom *et al.* 1999, 2000, Almodóvar *et al.* 2001), se utilizaron las muestras de los centros piscícolas de 22-Uña y 23-Carballo descritas en Cortey y García-Marín (2002).

2.1.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo de Fenol-Cloroformo descrito por Sambrook *et al.* (1989), con las modificaciones que se describen en Cortey y García-Marín (2002). Este protocolo se basa en la capacidad de crear dos fases, una fase superior acuosa, donde queda disuelto el ADN y una fase inferior orgánica donde quedan disueltos componentes orgánicos celulares no solubles en agua, como las proteínas hidrofóbicas y las membranas celulares. Una vez finalizada la extracción se comprobaba la calidad y cantidad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y revelado con Bromuro de Etidio.

La extracción de ADN total se realizó a partir de una pequeña porción de músculo esquelético (500 mg aproximadamente) para las muestras que se poseían en el laboratorio, o de aleta adiposa, para las dos poblaciones que se recibieron del laboratorio del Dr. P. Martínez.

2.1.3. Amplificación de la región de control del ADN mitocondrial

La Reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR (*Polimerase Chain Reaction*) fue descrita por Mullis (1983) y tiene como objetivo obtener un gran número de copias de un fragmento específico de ADN a partir de una extracción de ADN genómico total. Para que la técnica funcione se necesita abundante suministro de desoxinucleótidos y dos cebadores o *primers* específicos, que son secuencias cortas de ADN de aproximadamente veinte nucleótidos, que delimitan la región a amplificar y son necesarias para iniciar la reacción de las ADN polimerasas. Los pasos básicos de la técnica son tres: un primer paso de *desnaturalización*, donde la muestra se eleva a una temperatura de unos 94 °C que provoca la separación de las dos cadenas del

ADN por la ruptura de los puentes de hidrógeno. El segundo paso es el de hibridación o *annealing*, en el cual la temperatura baja alrededor de los 45 °C-55 °C, dependiendo de los *primers* utilizados, para permitir la formación de cebadores por unión entre el *primer* y su secuencia complementaria dentro de la cadena de ADN a estudiar. Finalmente, se realiza un paso de elongación, donde la temperatura aumenta hasta la óptima de trabajo de la ADN polimerasa utilizada, para que se sintetice la cadena complementaria. A esta subida de temperatura desaparecen las uniones inestables que se forman entre los *primers* y otras secuencias parcialmente complementarias dentro de la cadena de ADN y que provocarían la amplificación de más de un fragmento. La temperatura de elongación es normalmente de 72 °C, ya que se utilizan ADN polimerasas termoresistentes derivadas de la del bacilo *Thermus aquaticus*.

En este estudio, la amplificación de la región de control del ADN mitocondrial se realizó siguiendo el protocolo descrito por Cortey y García-Marín (2002), pero utilizando 0.25 µl de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* AmpliTaq® DNA polimerase (5 unidades/µl, Applied Biosystems). Los *primers* utilizados fueron el PST (5'CCCAAAGCTAAAATTCTAAAT3') que hibrida en la cadena ligera en el gen del RNA de transferencia de la prolina delante del extremo 5' de la región de control y el FST (5'GCTTTAGTTAAGCTACGC3') que hibrida en la cadena pesada en el gen del ARN de transferencia de la fenilalanina por detrás del extremo 3'. La amplificación de los productos de PCR se comprobaba mediante gel de agarosa al 1% de igual manera que en las extracciones. Los productos amplificados de los diferentes individuos eran limpiados mediante el kit de limpieza GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences), siguiendo las recomendaciones del proveedor. La limpieza también era comprobada mediante gel de agarosa.

2.1.4. Secuenciación de la región de control del ADN mitocondrial

La reacción de secuenciación, adaptada a la técnica de fluorocromos del secuenciador automático ABIPRISM 310 (Applied Biosystems), se fundamenta en el método propuesto por Sanger *et al.* (1977) que utiliza didesoxinucleótidos como terminadores de la reacción de polimerización. En cada reacción se utilizaron de 2 a 3 µl del producto limpio de la PCR, 4 µl del *Premix dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de Perkin-

Elmer Applied Biosystems, 3.2 μ M del *primer* correspondiente y agua desionizada hasta alcanzar el volumen final de 10 μ l. Para obtener la secuencia completa de la región de control se ha seguido el protocolo de dos reacciones complementarias, una para cada extremo de la región de control de *S. trutta*, tal y como se describe en Cortey y García-Marín (2002).

Los productos de la secuenciación se leían mediante electroforesis capilar en un ABIPRISM 310. Todas las secuencias obtenidas eran alineadas a mano editándolas con el programa SeqEdit (versión 1.0.3; Applied Biosystems) y utilizando como referencia el haplotipo 1 descrito por Cortey y García-Marín (2002) (Número de Acceso GenBank AF273086) que se renombró como ATcs1 (Cortey *et al.* 2004). Cada una de las diferentes secuencias detectadas se considera como un haplotipo para la región de control del ADN mitocondrial. Las posiciones variables se han visualizado mediante el programa MEGA version 2.1 (Kumar *et al.* 2001).

2.1.5. Relaciones filogenéticas entre los haplotipos

Se han realizado 3 tipos diferentes de análisis filogenéticos entre los haplotipos: (i) Análisis de máxima verosimilitud, (ii) análisis mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ), (iii) método de máxima parsimonia. Se ha utilizado como *outgroup* para enraizar los árboles una secuencia completa de la región de control del ADNmt de *Salmo salar* (Nº de Acceso EMBL M81755) y el haplotipo ADcs1 (Cortey *et al.* 2004).

2.1.5.1. Máxima verosimilitud

En el análisis filogenético de máxima verosimilitud se ha utilizado el algoritmo de *quartet puzzling* definido en Strimmer y von Haeseler (1996). Este algoritmo de *quartet puzzling* es un proceso en tres etapas. Primero se evalúa la máxima verosimilitud de todos los árboles de 4 haplotipos (cuartetos) en base a un modelo de sustitución nucleotídica, que en este caso ha sido el de Tamura-Nei (1993). El cuarteto de máxima verosimilitud se utiliza como punto de partida para ir añadiendo los otros haplotipos. La evaluación de la rama a la que debe adicionarse el nuevo haplotipo se basa en la máxima verosimilitud de los cuartetos que incluyen al nuevo y tres de los haplotipos del cuarteto inicial. Este proceso se repite hasta que se construye un árbol con todos los haplotipos

(*puzzling step*). En el proceso de adición de haplotipos, pueden ocurrir indeterminaciones en la adición de un haplotipo debido a la coincidencia de máxima verosimilitud entre dos posibles ramas. En tal caso, se elige al azar una de ellas para añadir el nuevo haplotipo. Cuando el análisis se realiza con muchos haplotipos, esta indeterminación puede producirse varias veces, en consecuencia el proceso de generar árboles (*puzzling step*) se repite un número determinado de veces (1000 en este estudio) y finalmente la topología definitiva se obtiene a partir del árbol consenso utilizando el principio de *majority rule*. Sin embargo la representación final es un árbol de idéntica topología al anterior, pero con una longitud de las ramas calculada en base a los cambios nucleotídicos en cada rama considerando el modelo de sustitución nucleotídica propuesto. Para la realización de estos análisis se ha utilizado el programa TREE-PUZZLE (Schmidt *et al.* 2002).

2.1.5.2. Análisis mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ)

El árbol de máxima verosimilitud anterior es comparable al obtenido mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei 1987) aplicado a una matriz de distancias entre haplotipos. El algoritmo NJ se basa en la búsqueda de las parejas de haplotipos que genera un árbol con una longitud menor de sus ramas. Se parte de un árbol en forma de estrella que no da ningún tipo de información, a partir de éste y utilizando la matriz de distancia entre haplotipos se van creando las parejas que minimizan la distancia de las ramas. Este análisis se realizó con el programa MEGA versión 2.1 (Kumar *et al.* 2001), la robustez de las ramas del árbol generado se obtuvo mediante el método de *bootstrap* (Felsenstein 1985), a partir de 1000 pseudo-réplicas de los haplotipos por remuestreo de las posiciones nucleotídicas.

Al igual que en el método de máxima verosimilitud, el modelo utilizado para calcular la distancia entre los haplotipos ha sido el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei (1993). Este modelo considera una tasa de mutación diferente entre las transiciones de purinas, las transiciones de pirimidinas y las transversiones (cambio de purina por pirimidina y viceversa), y parece ser adecuado para explicar la evolución de la región de control de la trucha común debido a su elevada composición en pares A-T (Cortey *et al.* 2004). Para todos los análisis realizados con secuencias y siempre que ha sido

posible, se ha utilizado para los cálculos este modelo de sustitución nucleotídica.

2.1.5.3. Método de máxima parsimonia

La reconstrucción mediante el método de máxima parsimonia considera cada posición nucleotídica como un carácter discreto y genera una relación entre los haplotipos teniendo en cuenta el mínimo número de pasos mutacionales necesarios para agruparlos a todos (Kluge y Farris 1969). Para la realización de este análisis se utilizó un criterio heurístico, que es el sugerido cuando el número de haplotipos es superior a 20 ya que el tiempo necesario para el análisis de parsimonia se vuelve enorme. La evaluación heurística disminuye el tiempo de cómputo (Nei y Kumar 2000). En este estudio se utilizó el algoritmo de *Stepwise Addition*, el cual a partir de un árbol inicial de tres haplotipos en que los cambios nucleotídicos entre las ramas resultantes sean mínimos, añade el resto de haplotipos uno a uno eligiendo como opción más correcta aquélla que minimiza los cambios en las ramas. El árbol obtenido se evalúa mediante el algoritmo TBR (*Tree Bisection-Reconnection*) de permutación de ramas o *Branch Swapping*. Mediante este algoritmo el árbol inicial se divide en dos sub-árboles que se reconectan posteriormente por cualquier combinación entre dos ramas, una de cada sub-árbol. Todos los nuevos árboles así generados con un número de cambios igual o inferior al inicial se consideran también como solución de máxima parsimonia. Dadas las limitaciones de cómputo, se canceló esta búsqueda de árboles igualmente parsimoniosos cuando se obtenía un máximo de 100. La reconstrucción mediante máxima parsimonia se realizó utilizando el programa PAUP* version 4.0 (Swofford 2000) y la robustez del árbol se obtuvo a partir de 1000 pseudo-réplicas de *bootstrap*.

2.1.6. Diversidad génica intrapoblacional

Los niveles de diversidad intrapoblacional se han analizado en base a la diversidad haplotípica y la diversidad nucleotídica.

La diversidad haplotípica es un parámetro que indica la probabilidad de que dos haplotipos cogidos al azar en una población sean diferentes. Se puede estimar como:

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) \text{ Nei y Tajima (1981)}$$

Donde n es el número de copias génicas en la muestra, k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del haplotipo i en la muestra. La diversidad haplotípica da una medida de diferentes tribus matriarcales en una población. En una población monomórfica su valor es 0.

La diversidad nucleotídica es una indicación del grado medio de divergencia nucleotídica entre los individuos presentes en la población. Se puede estimar como:

$$d = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j d_{ij}}{L} \text{ (Nei 1987)}$$

Donde d_{ij} es una estimación del número de sustituciones nucleotídicas entre los haplotipos i y j , k es el número de haplotipos, p_i es la frecuencia del haplotipo i y L es la longitud en pares de base de la secuencia analizada. Para la estimación del número de sustituciones nucleotídicas entre haplotipos se ha utilizado el modelo de sustitución nucleotídica Tamura-Nei.

Tanto la diversidad haplotípica como la diversidad nucleotídica, se han calculado utilizando el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

2.1.7. Diferenciación entre las poblaciones

2.1.7.1. Distancia genética entre las poblaciones

Para el análisis de las relaciones filogenéticas entre las localidades se ha calculado una matriz de distancia de Nei (Nei y Li 1979), en base a las frecuencias de los haplotipos y su divergencia nucleotídica:

$$D_{12} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k'} x_{1i} x_{2j} \delta_{ij}$$

Donde k y k' son el número de haplotipos en las poblaciones 1 y 2, x_{1i} y x_{2i} es la frecuencia del haplotipo i en la población 1 y 2, y δ_{ij} es el número medio de sustituciones por posición nucleotídica entre el haplotipo i y el haplotipo j . La significación de los valores se obtiene permutando los haplotipos entre las

poblaciones. Se realizaron 1000 permutaciones. Estos valores se calcularon utilizando el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

A partir de la matriz de las distancias entre las poblaciones, se construyeron los dendrogramas entre éstas utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining.

En aquellos análisis que incorporaron muestras de otros trabajos, la matriz de distancia entre las poblaciones se calculó en base a las frecuencias de los diferentes linajes presentes en la población (DU, AT nativo y AT repoblación) y la matriz de distancia media Tamura-Nei entre los haplotipos de esos linajes. Esta aproximación también fue utilizada en los análisis de la varianza molecular (AMOVA), que se describen a continuación.

2.1.7.2. Análisis jerárquico de la varianza molecular AMOVA

El análisis de la varianza molecular AMOVA (Excoffier *et al.* 1992) es similar a los estadísticos F descritos por Wright (1943). Inicialmente, la diversidad genética puede distribuirse dentro (IS) y entre poblaciones (ST). El análisis de AMOVA, permite además agrupar *a priori* las poblaciones, en diversos modelos jerárquicos, desglosando la diferenciación entre poblaciones en dos: diferenciación entre poblaciones dentro de grupo (SC) y diferenciación entre grupos (CT). Así, se crean tres niveles jerárquicos dónde se encuentra distribuida la variabilidad genética: dentro de poblaciones (IS), entre poblaciones dentro de grupo (SC) y entre grupos (CT). Las agrupaciones realizadas pueden seguir cualquier criterio que el investigador desee comprobar. En los análisis de AMOVA realizados, se han seguido diversos criterios geográficos (basado en la jerarquía hidrográfica, en la clasificación de las poblaciones según Bouza *et al.* 2001) y filogenéticos (basado en la abundancia relativa de los linajes mitocondriales). El análisis proporciona el porcentaje y significación de variabilidad explicado por cada nivel jerárquico. La significación se realiza mediante procesos de permutación no paramétricos (Excoffier *et al.* 1992) de haplotipos o genotipos (dentro de poblaciones), individuos (entre poblaciones dentro de grupo) y poblaciones (entre grupos). En todos los análisis, se realizaron 1000 permutaciones. Los cálculos se llevaron a cabo con el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

2.1.7.3. Análisis de Clados Encajados (NCA)

Los análisis de AMOVA no utilizan la información temporal disponible a partir de la filogenia entre los haplotipos. Por lo tanto, a partir de la distribución geográfica de la diversidad genética no son capaces de discernir entre la importancia de procesos históricos (fragmentación o expansiones de rango), de potencial interés biogeográfico, y la de los procesos actuales de flujo génico. Templeton *et al.* (1995,1998) propusieron el análisis de clados encajados (*Nested Clade Analysis*, NCA) para estudiar las causas actuales o históricas de los patrones observados en la diversidad genética. En este análisis se necesita un árbol filogenético de los haplotipos, que se convierte a continuación en una serie de clados encajados (cladograma) utilizando las reglas propuestas por Templeton *et al.* (1987) y Templeton y Sing (1993), y las distancias geográficas entre las muestras analizadas. Los cladogramas realizados fueron estimados mediante el método de parsimonia estadística desarrollado por Templeton *et al.* (1992), utilizando el programa TCS (Clement *et al.* 2000). Uno de los principales problemas de estos cladogramas es que frecuentemente se obtienen redes o *loops* de haplotipos. Para generar un diseño de clados encajados, estas redes se resuelven mediante los criterios de abundancia relativa de los haplotipos implicados, de simplicidad en la topología del árbol y de proximidad geográfica de los haplotipos según sugieren Templeton y Sing (1993). De esta manera, la red se convierte en un árbol dicotómico a partir del cual se describen una serie de clados encajados utilizando las reglas propuestas por Templeton *et al.* (1987) y Templeton y Sing (1993). El encaje de los clados se inicia a partir de los nodos terminales del árbol (*tips*), que se consideran clados de nivel 0 (haplotipos), que se encajan en clados de nivel 1 agrupándose con el haplotipo interior situado a un paso mutacional (un cambio nucleotídico). Una vez encajados todos los nodos terminales en clados de nivel 1, pueden añadirse a estos clados de nivel 1 el resto de haplotipos interiores del árbol respetando la regla básica de encaje de situarse a un único paso mutacional del clado de nivel 1 más próximo. Dos haplotipos interiores consecutivos y separados del resto de haplotipos por diversos pasos mutacionales, pueden agruparse y constituir un clado propio de nivel 1. Una vez todos los haplotipos se incluyen en un clado de nivel 1 se inicia de nuevo el

proceso de encaje. Ahora los clados de nivel 1 se encajan en clados de nivel 2 mediante las mismas reglas. El proceso se repite hasta englobar todos los clados de nivel n-1 en un único clado de nivel n.

Las distancias geográficas entre las muestras se cuantifican en dos parámetros relativos al rango geográfico de los clados: la distancia de clado (D_c) y la distancia del clado de encaje (D_n). La primera indica la distancia media que los individuos portadores de un determinado clado de nivel n-1 se separan del centro geográfico de este clado, mientras que la segunda mide la distancia promedio de los individuos portadores del clado de nivel n, donde se encaja el anterior, al centro geográfico de ese clado de nivel n. El contraste de los valores obtenidos para ambas distancias entre los clados interiores y terminales en un determinado nivel n de encaje nos puede informar sobre los agentes causales de la distribución geográfica de la diversidad genética (Templeton *et al.* 1995). La significación estadística de las diferentes distancias y de los contrastes entre clados interiores y terminales se realiza mediante permutaciones aleatorias de los clados entre las muestras, manteniendo todos los valores marginales, y utilizando el programa GeoDis (Posada *et al.* 2000). Un valor significativo sugiere que los clados dentro de un determinado nivel de encaje no se distribuyen de manera aleatoria. La causa de esta significación puede inferirse a partir de las claves suministradas en el manual del programa GeoDis, que actualizan a las de Templeton (1998). Se realizaron dos NCA, el primero utilizando únicamente datos propios y el segundo integrando las poblaciones descritas en el río Duero por Antunes *et al.* (2001). La distancia entre las poblaciones se calculó a partir de las coordenadas geográficas (latitud y longitud) de cada una de ellas.

2.7.1.4. *Demografía histórica* (Mismatch distribution)

El análisis de la *Mismatch distribution* construye un histograma que describe la variación en la cantidad de diferencias nucleotídicas entre pares de haplotipos, que puede aportar información sobre la historia de las poblaciones (Rogers y Harpending 1992). Si el tamaño de la población se ha mantenido constante, el número de diferencias apareadas entre los haplotipos describirá una distribución que convergerá a una curva de equilibrio (Watterson 1975). En cambio, si la población ha padecido alguna perturbación la curva descrita se

asemejará a una distribución unimodal, similar a una distribución de Poisson. Aunque este análisis ha recibido críticas porque diferentes historias poblacionales pueden dar patrones similares del histograma (ver Polanski et al. 1998), la distribución *Mismatch* se ha utilizado para estimar tanto el momento (τ) como los tamaños poblacionales antes (θ_0) y después (θ_1) de las principales explosiones poblacionales que seguramente sufrieron las poblaciones de trucha como respuesta a los cambios climáticos del Cuaternario (ver Bernatchez 2001, Cortey et al. 2004). En este trabajo se ha realizado este análisis para cada uno de los dos linajes nativos detectados en la cuenca del río Duero. Los cálculos se han realizado con el procedimiento implementado en el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider et al. 2000).

2.7.1.5. Detección de aislamiento por distancia (IBD)

Cuando se trabaja con marcadores moleculares neutros y en un corto período de tiempo (pocas generaciones), las principales fuerzas evolutivas causantes de la diferenciación o semejanza poblacional son la deriva genética y la migración, respectivamente. Para especies con una baja tasa de dispersión, se espera encontrar una similitud genética más elevada entre poblaciones cercanas geográficamente, que con aquéllas que se encuentran más alejadas. Este patrón de estructura genética basado en el “aislamiento por distancia” (IBD) fue definido por primera vez por Wright (1943). Cuando la deriva genética y la migración se encuentran en equilibrio en una población, se espera que haya una relación positiva entre la distancia geográfica y la distancia genética entre las poblaciones (Slatkin 1993).

En este trabajo, se han comparado mediante un test de mantel (Mantel 1967) la matriz de distancia genética y la de distancia geográfica entre las poblaciones. La distancia geográfica entre las poblaciones se ha calculado como la distancia lineal (en Km) entre las dos poblaciones siguiendo el curso de los ríos.

Estos análisis se llevaron a cabo con el programa NTSYS versión 2.1 (Applied Biostatistics Inc, Rohlf et al. 1993).

2.2. Análisis de la estructura poblacional en los Pirineos orientales

2.2.1. Muestras analizadas

En este estudio se analizaron 36 localidades. Distribuidas de este a oeste, las cuencas analizadas fueron las del río Tech (la única en el Pirineo francés, 1 localidad), el río Ter (3 localidades), el río Llobregat (6 localidades) y los afluentes del río Ebro, Noguera Pallaresa (11 localidades) y Noguera Ribagorzana (15 localidades) (Tabla 2-2, Fig.2-2). Además, se añadieron las localidades de 3-Massanes, 4-Queralbs, 24-Contraig, 40-Aciron y 41-Otal (las dos últimas del río Cinca, también afluente del río Ebro) descritas en Cortey *et al.* (2004). En 14 de las 36 localidades se obtuvieron réplicas temporales para el análisis de la estabilidad temporal en esta zona y la estimación del tamaño efectivo de las poblaciones,. En 5 de estas 14 localidades (2a-Vallter 90, 9a-Riutort 90, 21a-Ainet Cardós 93, 23a-Manyanet 93 y 26a-Cavallers 93) se utilizó como réplica inicial las muestras analizadas por Cortey *et al.* (2004) (Tabla 2-2). Todos los ejemplares se obtuvieron mediante pesca eléctrica a partir de los proyectos que el LIG de la UdG ha realizado en la zona durante los últimos 15 años.

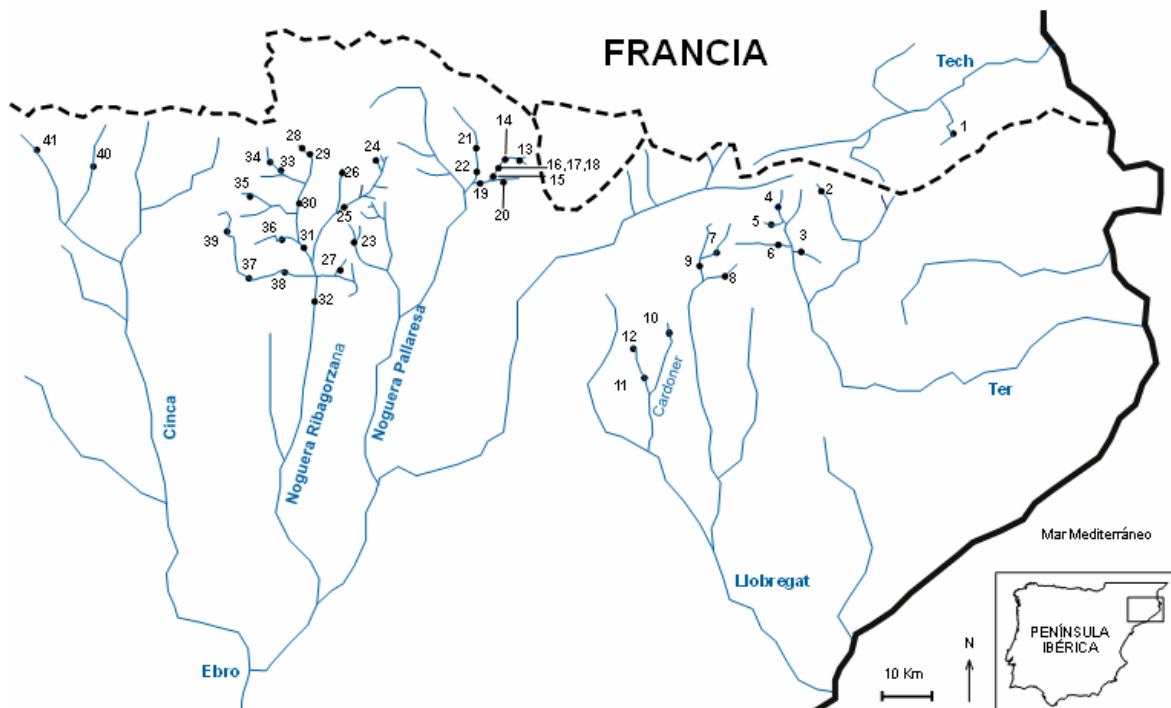


Figura 2-2. Situación geográfica de las localidades analizadas en el Pirineo Oriental. Los números corresponden a los mostrados en la Tabla 2-2.

Como se ha comentado anteriormente, las cuencas más ampliamente analizadas en el Pirineo oriental, fueron las cuencas del Noguera Pallaresa y del Noguera Ribagorzana. Los puntos de muestreo del Noguera Pallaresa se localizaron principalmente en los ríos de la Noguera de Vallferrera y Noguera de Cardós, que se obtuvieron para la realización del proyecto REN2000-0740-C02-01 del Ministerio de Ciencia y Tecnología Español (MCYT), que llevó por título “Incidencia de la repoblación y la pesca deportiva sobre los recursos genéticos nativos de la trucha común de España”. Por su parte, los puntos de muestreo del Noguera Ribagorzana, formaron el grueso de las muestras analizadas en el proyecto ITT-CTP 2001-3 de la Direcció General de Recerca del DURSI de la Generalitat de Catalunya, que llevó por título “Avaluació de la diversitat poblacional de la truita comuna, *Salmo trutta*, en el Massís Pirinenc”, realizado conjuntamente con el Servicio de Investigación Agrario (SIA) del Gobierno de Aragón.

Para tipificar los haplotipos de repoblación en la zona y evaluar la incidencia genética de las repoblaciones se incluyó en el estudio dos muestras del centro piscícola de Bagà (42a-Baga-R, 42b-Baga 03). Según los registros de repoblación de la Generalitat de Catalunya, los individuos criados en este centro piscícola se han utilizado habitualmente para la repoblación en todas las cuencas pirenaicas analizadas.

Tabla 2-2. Muestras analizadas en la región mediterránea. Referencia indica la procedencia de los datos.

Población	Río	Cuenca	Coordenadas	Año captura	Referencia
1-Tech	Tech	Tech	42°29'N-2°47'E	2002	Este trabajo
2a-Vallter 90	Ter	Ter	42°23'N-2°18'E	1990	Cortey <i>et al.</i> 2004
2b-Vallter 99	Ter	Ter	42°23'N-2°18'E	1999	Este trabajo
2c-Vallter 01	Ter	Ter	42°23'N-2°18'E	2001	Este trabajo
2d-Vallter 02	Ter	Ter	42°23'N-2°18'E	2002	Este trabajo
2e-Vallter 03	Ter	Ter	42°23'N-2°18'E	2003	Este trabajo
3-Massanes	Freser	Ter	42°17'N-2°09'E	1993	Cortey <i>et al.</i> 2004
4-Queralbs	Freser	Ter	42°20'N-2°08'E	1993	Cortey <i>et al.</i> 2004
5a-Núria 98	Freser	Ter	42°22'N-2°09'E	1998	Este trabajo
5b-Núria 01	Freser	Ter	42°22'N-2°09'E	2001	Este trabajo
6-Rigart 99	Freser	Ter	42°19'N-2°02'E	1999	Este trabajo
7-Riera Monells	Llobregat	Llobregat	42°16'N-1°99'E	2002	Este trabajo
8-Arija	Llobregat	Llobregat	42°17'N-1°99'E	2002	Este trabajo
9a-Riutort 90	Llobregat	Llobregat	42°15'N-1°55'E	1990	Cortey <i>et al.</i> 2004
9b-Riutort 99	Llobregat	Llobregat	42°15'N-1°55'E	1999	Este trabajo
9c-Riutort 02	Llobregat	Llobregat	42°15'N-1°55'E	2002	Este trabajo
10-Castellar	Cardoner	Llobregat	42°06'N-1°45'E	2002	Este trabajo

Tabla 2-2. Continuación

Población	Río	Cuenca	Coordenadas	Año captura	Referencia
11-Aiguadeval I	Cardoner	Llobregat	42°07'N-1°39'E	2002	Este trabajo
12-Aiguadeval II	Cardoner	Llobregat	42°08'N-1°40'E	2002	Este trabajo
13a-Pla Boet 93	Vallferrera	Pallaresa	42°37'N-1°23'E	1993	Este trabajo
13b-Pla Boet 99	Vallferrera	Pallaresa	42°37'N-1°23'E	1999	Este trabajo
13c-Pla Boet 02	Vallferrera	Pallaresa	42°37'N-1°23'E	2002	Este trabajo
13d-Pla Boet 03	Vallferrera	Pallaresa	42°37'N-1°23'E	2003	Este trabajo
14a-Vallferrera I	Vallferrera	Pallaresa	42°36'N-1°19'E	2002	Este trabajo
14b-Vallferrera I	Vallferrera	Pallaresa	42°36'N-1°19'E	2003 (Abril)	Este trabajo
14c-Vallferrera I	Vallferrera	Pallaresa	42°36'N-1°19'E	2003 (Julio)	Este trabajo
15a-Vallferrera II	Vallferrera	Pallaresa	42°34'N-1°19'E	2002 (Feb)	Este trabajo
15b-Vallferrera II	Vallferrera	Pallaresa	42°34'N-1°19'E	2002 (Dic)	Este trabajo
15c-Vallferrera II	Vallferrera	Pallaresa	42°34'N-1°19'E	2003 (Abril)	Este trabajo
15d-Vallferrera II	Vallferrera	Pallaresa	42°34'N-1°19'E	2003 (Julio)	Este trabajo
16a-Vallferrera III	Vallferrera	Pallaresa	42°35'N-1°19'E	2002 (Feb)	Este trabajo
16b-Vallferrera III	Vallferrera	Pallaresa	42°35'N-1°19'E	2002 (Dic)	Este trabajo
16c-Vallferrera III	Vallferrera	Pallaresa	42°35'N-1°19'E	2003 (Abril)	Este trabajo
16d-Vallferrera III	Vallferrera	Pallaresa	42°35'N-1°19'E	2003 (Julio)	Este trabajo
17-Areu I	Vallferrera	Pallaresa	42°35'N-1°19'E	2003	Este trabajo
18-Areu II	Vallferrera	Pallaresa	42°35'N-1°19'E	2003	Este trabajo
19-Alins	Vallferrera	Pallaresa	42°33'N-1°19'E	2002	Este trabajo
20a-Tor 93	Tor	Pallaresa	42°33'N-1°20'E	1993	Este trabajo
20b-Tor 99	Tor	Pallaresa	42°33'N-1°20'E	1999	Este trabajo
21a-Ainet Cardós 93	Cardós	Pallaresa	42°35'N-1°14'E	1993	Cortey <i>et al.</i> 2004
21b-Ainet Cardós 99	Cardós	Pallaresa	42°35'N-1°14'E	1999	Este trabajo
21c-Ainet Cardós 02	Cardós	Pallaresa	42°35'N-1°14'E	2002	Este trabajo
22a-Cardós	Cardós	Pallaresa	42°33'N-1°13'E	2003 (Abril)	Este trabajo
22b-Cardós	Cardós	Pallaresa	42°33'N-1°13'E	2003 (Julio)	Este trabajo
23a-Manyanet 93	Pallaresa	Pallaresa	42°23'N-0°53'E	1993	Cortey <i>et al.</i> 2004
23b-Manyanet 99	Pallaresa	Pallaresa	42°23'N-0°53'E	1999	Este trabajo
24-Contraig	Contraig	Ribagorzana	42°34'N-0°56'E	1993	Cortey <i>et al.</i> 2004
25a-Nicolau 93	Sant Nicolau	Ribagorzana	42°32'N-0°53'E	1993	Este trabajo
25b-Nicolau 99	Sant Nicolau	Ribagorzana	42°32'N-0°53'E	1999	Este trabajo
26a-Cavallers 93	N. Tort	Ribagorzana	42°35'N-0°51'E	1993	Este trabajo
26b-Cavallers 99	N. Tort	Ribagorzana	42°35'N-0°51'E	1999	Este trabajo
26c-Cavallers 02	N. Tort	Ribagorzana	42°35'N-0°51'E	2002	Este trabajo
27-Malpàs	Malpàs	Ribagorzana	42°24'N-0°47'E	2002	Este trabajo
28a-P.Conangles 93	Ribagorzana	Ribagorzana	42°37'N-0°45'E	1993	Cortey <i>et al.</i> 2004
28b-P.Conangles 99	Ribagorzana	Ribagorzana	42°37'N-0°45'E	1999	Este trabajo
28c-P.Conangles 02	Ribagorzana	Ribagorzana	42°37'N-0°45'E	2002	Este trabajo
29-N.Ribagorzana I	Ribagorzana	Ribagorzana	42°36'N-0°45'E	2002	Este trabajo
30-N.Ribagorzana II	Ribagorzana	Ribagorzana	42°33'N-0°45'E	2002	Este trabajo
31-N.Ribagorzana III	Ribagorzana	Ribagorzana	42°31'N-0°44'E	2002	Este trabajo
32-N.Ribagorzana IV	Ribagorzana	Ribagorzana	42°15'N-0°43'E	2002	Este trabajo
33-Salenques I	Salenques	Ribagorzana	42°35'N-0°44'E	2002	Este trabajo
34-Salenques II	Salenques	Ribagorzana	42°36'N-0°43'E	2002	Este trabajo
35-Llauset	Llauset	Ribagorzana	42°33'N-0°43'E	2002	Este trabajo
36-Estet	Estet	Ribagorzana	42°31'N-0°42'E	2002	Este trabajo
37-Ribera	Baliera	Ribagorzana	42°29'N-0°38'E	2002	Este trabajo
38-Baliera	Baliera	Ribagorzana	42°27'N-0°39'E	2002	Este trabajo
39-SanSilvestre	Baliera	Ribagorzana	42°31'N-0°38'E	2002	Este trabajo
40-Aciron	Cinca	Cinca	42°39'N-0°13'E	1993	Cortey <i>et al.</i> 2004
41-Otal	Ara	Cinca	42°42'N-0°08'E	1993	Cortey <i>et al.</i> 2004
42a-Baga-R	Piscifacoría	Bagà		2002	Este trabajo
42b-Baga 03	Piscifactoría	Bagà		2003	Este trabajo

2.2.2. Extracción ADN

A diferencia de las extracciones de ADN realizadas en los individuos analizados en la cuenca del Duero, el protocolo de extracción de ADN seguido para todas las muestras analizadas en los Pirineos Orientales fue el descrito por Estoup *et al.* (1996) con chelex. La única modificación fue el uso de 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) en vez de los 15 μ l (10 mg/ml) propuesto por los autores anteriores. La técnica del chelex, se empezó a utilizar a principio de los años noventa para la extracción de ADN forense a partir de muestras de museos (Walsh *et al.* 1991, Ellegren 1994). El chelex es una resina que inhibe la degradación del ADN ya que es un quelante catiónico y es fácilmente precipitado mediante una rápida centrifugación, quedando el ADN extraído en el sobrenadante.

El método de chelex presenta una serie de ventajas respecto al de Fenol-Cloroformo. Primero, la extracción es muchísimo más rápida ya que el tiempo estimado es de aproximadamente 2 horas, mucho menor a los 2 días que habitualmente requiere el método de Fenol-Cloroformo. Segundo, se evitan los pasos de pipeteo para la adición y eliminación de los solventes orgánicos que pueden provocar la contaminación de la muestra. Y, por último, el chelex es una sustancia no tóxica, a diferencia de los solventes orgánicos utilizados que son altamente nocivos. La única ventaja del método de Fenol-Cloroformo es que posee un mayor rendimiento en la extracción, obteniéndose gran cantidad de ADN, aunque mediante el método de chelex la concentración de ADN que presenta la muestra es óptima para la amplificación mediante PCR. Una vez finalizada la extracción se comprobaba la calidad y cantidad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y revelado con Bromuro de Etidio.

2.2.3. Identificación de los haplotipos y sus relaciones filogenéticas

Las relaciones filogenéticas de los haplotipos mediterráneos (linajes AD y ME) en la Península Ibérica han sido objeto de un extenso estudio en el Laboratorio de Ictiología Genética (Cortey *et al.* 2004), por lo que en el presente trabajo tan sólo se ha construido un nuevo cladograma de parsimonia estadística y un diseño de clados (ver apartado 2.1.7.3) incorporando los nuevos haplotipos detectados en las localidades de la cuenca del río Llobregat (7-Riera Monells,

8-Arija, 9-Riutort, 10-Castellar, 11-Aiguadeval I, 12-Aiguadeval II), la única de las cuencas estudiadas que era objeto de análisis detallado por primera vez. En estas localidades se obtuvo la secuencia completa de la región de control siguiendo los protocolos de amplificación y secuenciación tal y como se han descrito en los apartados 2.1.3 y 2.1.4. La revisión de la estructura de clados sugiere que la simple secuenciación del extremo 3' de la región de control (464 pb) es suficiente para identificar a los haplotipos y asignarlos a los clados de nivel 2. En este sentido, para agilizar el estudio en el resto de localidades, los haplotipos se identificaron y asignaron a clados de nivel 2 mediante la secuenciación de únicamente este extremo 3'. Asimismo, debido a una avería en los ultracongeladores del LIG, las muestras pirenaicas del año 1999 que se querían utilizar en el análisis de la estabilidad temporal de la composición matriarcal en los Pirineos Orientales, padecieron un proceso de descongelación y consiguiente degradación, que impidió amplificar toda la región de control con una única reacción de PCR. En estas muestras se amplificaron sólo 220 pb en el extremo 3' de la región de control utilizando los *primers* f+ (5'TTCCTGTCAAACCCCTAAACCAGG3', Shedlock *et al.* 1992) y FST. Mediante el análisis de este fragmento, se puede también detectar la práctica totalidad de clados de nivel 2 de los linajes autóctonos AD y ME, y distinguirlos de los haplotipos del linaje AT presentes en los estocs de los centros piscícolas. Como se comenta a continuación, las frecuencias de los clados de nivel 2 presentes en las muestras y una adecuada matriz de diversidad nucleotídica entre esos clados parece suficiente para estimar correctamente la diversidad en y entre las poblaciones.

2.2.4. Diversidad génica intrapoblacional

Por lo expuesto en el apartado anterior, la diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (d), definidas en el apartado 2.1.6, fueron calculadas en la cuenca Pirenaica a partir de la frecuencia relativa de los clados de nivel 2 y la matriz de distancia Tamura-Nei entre esos clados. Estos cálculos se realizaron utilizando el programa DA (Nei y Tajima 1981) incluido dentro del paquete estadístico REAP (McElroy *et al.* 1991).

Un análisis preliminar basado principalmente en las poblaciones analizadas en Cortey *et al.* (2004) sugiere que tal aproximación es ligeramente más adecuada

que aquella directamente basada en la frecuencia de las secuencias de los últimos 220pb del extremo 3' (Tabla 2-3). Así, los valores de diversidad nucleotídica intrapoblacional obtenidos utilizando la matriz de distancia entre los clados se correlacionan mejor ($R=0.978$, $P<0.01$) con los obtenidos mediante la secuencia completa de la región de control que aquéllos obtenidos mediante la secuencia de los 220pb del extremo 3' ($R=0.937$, $P<0.01$).

Tabla 2-3. Comparación entre los niveles de diversidad haplotípica y nucleotídica (desviación estándar) a partir de los tres métodos utilizados. SC: análisis utilizando la región de control completa. 220pb: resultados considerando tan sólo los últimos 220 pares de bases. CL: resultados utilizando los clados de nivel 2 y su frecuencia. Asterisco indica las localidades analizadas en Cortey *et al.* 2004.

Población	Diversidad Haplotípica (h)			Diversidad nucleotídica (d)		
	SC	220pb	CL	SC	220pb	CL
1-Tech	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000
2a.Vallter 90*	0.8000 (0.0711)	0.3619 (0.1148)	0.6381 (0.0931)	0.00165 (0.00115)	0.00228 (0.00226)	0.00183
2e-Vallter 03	0.3298 (0.0843)	0.3298 (0.0843)	0.3298 (0.0843)	0.00188 (0.00122)	0.00364 (0.00294)	0.00197
3-Massanes*	0.4667 (0.1318)	0.4667 (0.1318)	0.4667 (0.1318)	0.00232 (0.00156)	0.00416 (0.00350)	0.00251
4-Queralbs*	0.5926 (0.0878)	0.5926 (0.0878)	0.5317 (0.0829)	0.00364 (0.00211)	0.00837 (0.00546)	0.00307
5b-Núria 01	0.3250 (0.1251)	0.3250 (0.1251)	0.3250 (0.1251)	0.00227 (0.00147)	0.00583 (0.00427)	0.00216
7-RieraMonells	0.5072 (0.0929)	0.4638 (0.0695)	0.5072 (0.0929)	0.00062 (0.00056)	0.00204 (0.00206)	0.00086
9a-Riutort 90*	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000
10-Castellar	0.8000 (0.0711)	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.00023 (0.00003)	0.00000 (0.00000)	0.00000
11-Aiguadeval I	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000
12-Aiguadeval II	0.8000 (0.0711)	0.7500 (0.0965)	0.7500 (0.0965)	0.00267 (0.00180)	0.00239 (0.00249)	0.00316
21a-AinetCardós*	0.7233 (0.0447)	0.5733 (0.0632)	0.4800 (0.0600)	0.00306 (0.00183)	0.00510 (0.00388)	0.00258
23a-Manyanet*	0.7154 (0.0719)	0.6324 (0.0645)	0.6324 (0.0645)	0.00326 (0.00194)	0.00630 (0.00443)	0.00295
24-Contraig*	0.6286 (0.0923)	0.5143 (0.1015)	0.5143 (0.1015)	0.00221 (0.00142)	0.00368 (0.00304)	0.00222
28a-Conangles*	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000
40-Aciron*	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000
41-Otal*	0.1111 (0.0964)	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.00011 (0.00021)	0.00000 (0.00000)	0.00000
Ordisa*	0.1333 (0.1123)	0.1333 (0.1123)	0.0000 (0.0000)	0.00013 (0.00023)	0.00058 (0.00103)	0.00000
Alto Ara*	0.6000 (0.1753)	0.0000 (0.0000)	0.0000 (0.0000)	0.00059 (0.00065)	0.00000 (0.00000)	0.00000

2.2.5. Diferenciación entre las poblaciones

En todos los análisis realizados en los Pirineos orientales, la diferenciación en la composición haplotípica entre las poblaciones utilizó idénticos análisis a los aplicados en el estudio de la cuenca del Duero (distancia genética, AMOVA y aislamiento por distancia). En estos análisis se utilizaron como datos de partida las frecuencias de los clados de nivel 2 en cada una de las muestras y una matriz de divergencia nucleotídica entre estos clados. Esta matriz de distancia

entre los 8 clados de tipo 2 detectados en el Pirineo, se construyó teniendo en cuenta la frecuencia de aparición de cada haplotipo en la zona a partir de los resultados de Cortey *et al.* (2004) y los de las poblaciones analizadas por primera vez en este estudio.

A partir de la distancia genética entre los clados y su abundancia relativa en las poblaciones se calculó una matriz de distancia que fue utilizada para la realización de dendrogramas mediante el algoritmo de Neighbor-Joining. Además, debido a que las representaciones multidimensionales de las matrices de distancia pueden ser más informativas que los dendrogramas, en este trabajo se ha realizado también un Análisis de Componentes Principales (PCO, Gower 1966). Este análisis se llevó a cabo con el programa NTSYS versión 2.1 (Rohf 1993).

2.2.6. Estudios con loci microsatélites en la Noguera de Vallferrera

2.2.6.1. Relación y genotipado de los loci microsatélites

Los estudios de diferenciación microgeográfica en la Noguera Vallferrera incorporaron análisis basados en loci nucleares, del tipo microsatélites. Se utilizaron los 8 loci que se describen en la Tabla 2-4. El genotipado de los individuos se llevó a cabo en el grupo de genética de poblaciones del Dr. M.M. Hansen, en el *Danish Institute for Fisheries Research* (DIFRES).

Se utilizaron reactivos estándares para la realización de las reacciones de amplificación de los distintos microsatélites (PCR). La amplificación de los productos de PCR se comprobaba mediante gel de agarosa al 3% y revelado con bromuro de Etidio.

Uno de los *primers* utilizados para amplificar cada uno de los loci, normalmente el *primer forward*, estaba marcado con el fluorescente dye Cy5. Después de la amplificación, se procedía al genotipado de los individuos mediante la electroforesis en gel en un ALF Express Automated Sequencer siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech). El tamaño de los alelos se obtenían por comparación con un estándar externo de longitud conocida y teniendo combinaciones de estándares internos de 100, 200, 250 y 300 pares de base (pb) en cada muestra. Aunque las reacciones de amplificación se realizaban por separado para cada locus, pueden genotiparse

conjuntamente varios de ellos en una única electroforesis si no hay solapamiento entre la longitud de los alelos de los diferentes loci. Así, los loci Str 73, SsaHaeIII14.20, SsoSL 417 y Str 15 se analizaban en un único gel, SsoSL 438 y Ssa 197 en otro, y finalmente los genotipos para los loci Ssa 85 y T3-13 se obtenían de manera individual (Ruzzante *et al.* 2001 y Hansen *et al.* 2002). La longitud de los diferentes alelos para los 8 loci era confirmada mediante el programa Allele Locator (Amersham Pharmacia Biotech, 1998) que proporciona un archivo con los genotipos multilocus de los individuos.

Tabla 2-4. Relación de loci microsatélites utilizados en los análisis de la Noguera de Vallferrera. Entre paréntesis, el número de alelos observados y su tamaño en este estudio.

Microsatélite	Temperatura Annealing	No. de alelos observados	Tamaño (pb)	Motivo	Secuencias de primers	Referencia
Str15	58°C	10 (8)	192-224 (214-228)	CT	5'-TGCAGGCAGACGGATCAGGC-3' 5'-AATCCTCTACGTAAGGGATTTC-3'	Estoup <i>et al.</i> 1993
Str73	54°C	11 (7)	139-161 (133-149)	GT	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGAACTAGACCTA-3'	Estoup <i>et al.</i> 1993
SsaHaeIII14.20	54°C	18 (21)	300-336 (296-346)	GT	5'-QCTGCTATCACCTTGCTCTA-3' 5'-ATCTCTTCCTGGCTATTTG-3'	Goodier (no publicado) NºGenebank:U10050
T3-13	54°C	21 (29)	175-235 (177-241)	GT	5'-CCAGTTAGGGTTCATTGTCC-3' 5'-CGTTACACCTCTCAACAGATG-3'	Estoup <i>et al.</i> 1993
Ssa197	54°C	18 (11)	106-176 (126-166)	GTGA (+GT)	5'-GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG-3' 5'-TGGCAGGGATTGACATAAC-3'	O'Reilly <i>et al.</i> 1996
Ssa85	Touch Down (54°C a 49°C)	9 (8)	104 -120 (102-116)	GT	5'-AGTGGGTCCTCCAAGCTAC-3' 5'-ACCCGCTCCTCACTTAATC-3'	O'Reilly <i>et al.</i> 1996
SsoSL417	52°C	15 (27)	161-197 (163-219)	GT	5'-TTGTTCAAGTGATATGTGTCCCAT-3' 5'-GATCTTCACTGCCACCTTATGACC-3'	Slettan <i>et al.</i> 1995
SsoSL438	Touch Down (54°C a 49°C)	7 (7)	103-115 (101-113)	GT	5'-GACAACACACAACCAAGGCAC-3' 5'-TTATGCTAGGTCCTTATGCATTGT-3'	Slettan <i>et al.</i> 1996

2.2.6.2. Diversidad intrapoblacional

Las frecuencias alélicas se han obtenido por cuenta directa a partir de las frecuencias genotípicas observadas en cada una de las muestras (ver Tabla 2-5). La diversidad poblacional se ha estimado en términos del número medio de alelos por locus (N_a), la heterocigosidad media observada (h_o) y la esperada en situación de equilibrio de Hardy-Weinberg (h_e). Todos estos cálculos se han realizado mediante el programa Pop100Gene (CGBP-Software).

Tabla 2-5. Muestras analizadas en el río Noguera de Vallferrera y Noguera de Cardós. La cruz indica el marcador molecular (ADNmt o loci microsatélites) analizado en la muestra. N: tamaño muestral.

Muestra	Año Captura	N	ADNmt	Loci microsatélites
13c-Pla Boet 02	2002	32	X	X
14a-Vallferrera I	2002	16	X	X
14b-Vallferrera I	2003 (Abril)	9	X	
14c-Vallferrera I	2003(Julio)	8	X	
15a-Vallferrera II	2002 (Feb)	36	X	X
15b-Vallferrera II	2002 (Dic)	19	X	
15c-Vallferrera II	2003 (Abril)	29	X	
15d-Vallferrera II	2003 (Julio)	30	X	X
16a-Vallferrera III	2002 (Feb)	18	X	X
16b-Vallferrera III	2002 (Dic)	5	X	
16c-Vallferrera III	2003 (Abril)	17	X	
16d-Vallferrera III	2003 (Julio)	40	X	X
19-Alins	2002	14	X	X
22a-Cardós	2003 (Abril)	31	X	
22b-Cardós	2003 (Julio)	42	X	X

2.2.6.3. Test de equilibrio de Hardy-Weinberg

El equilibrio de Hardy-Weinberg es el modelo más simple de la genética de poblaciones y predice las proporciones genotípicas esperadas en una población genéticamente estable en la que la reproducción de los individuos se produce al azar. Cuando una población no sigue las proporciones genotípicas de Hardy-Weinberg se puede suponer que ha sufrido alguna perturbación genética en tiempos recientes. El índice de fijación F_{IS} (Wright, 1943), calculado como:

$$F_{IS} = 1 - \frac{h_o}{h_e}$$

es una medida del desequilibrio. Los desequilibrios pueden ser debidos tanto a un exceso ($H_o > H_e$) como a un déficit de heterocigotos ($H_o < H_e$).

Para comprobar si las muestras capturadas provienen de poblaciones en situación de equilibrio se ha utilizado el test de probabilidades exactas (Haldane 1954, Weir 1990, Guo y Thompson 1992). Recientemente, pueden

aplicarse variantes de este test para comprobar si el desequilibrio se produce por un déficit o un exceso de heterocigotos (test U, Raymond y Rousset 1995a). Todos estos cálculos se han realizado mediante el programa GENEPOP v.3.3 (Raymond y Rousset 1995b).

2.2.6.4. Efecto de las repoblaciones

El efecto de las repoblaciones se ha analizado en base a la estima del grado de introgresión de genes de repoblación en cada uno de los ejemplares capturados, medido mediante el coeficiente de hibridación (q). Este coeficiente mide la proporción del genoma de un individuo que pertenece a la población nativa original. La distribución de los valores de q es informativa de la presencia de los genes de repoblación. Si q es igual a 1 se considera un ejemplar de genotipo totalmente nativo, mientras que q vale 0 cuando el ejemplar tiene su origen en el centro piscícola. Una determinada población puede seguir tres tipos principales de distribuciones de q . En la primera, todos los individuos de la población tienen el valor 1 (o 0), indicando que todos los individuos forman parte de la misma unidad poblacional nativa (o de repoblación). En la segunda, algunos individuos presentan el valor 1 y otros el 0, lo que indica que en la muestra analizada existen dos unidades poblacionales independientes (nativa y repoblada). Finalmente, en la tercera, los valores de q se distribuyen entre 0 y 1, encontrándose valores intermedios de q , indicando que las dos unidades poblacionales que han entrado en contacto ya han hibridado.

La situación ideal para estimar la introgresión es tener información genética de la poblaciones naturales originales, que no han entrado en contacto con el centro piscícola y que son las utilizadas para conocer la proporción del genoma nativo. El principal problema es definir las poblaciones base nativas cuando ya se ha producido la introgresión, como parece ser el caso en algunos puntos del Noguera Vallferrera (Pla de Boet, Araguas *et al.* 2004). Sin embargo, Pritchard *et al.* (2000) han desarrollado un método bayesiano para la estima de q que no precisa de muestras representativas de las poblaciones parentales. En este trabajo, se ha utilizado ese método incorporando únicamente la muestra del centro piscícola de Baga (42a-Baga-R) como población parental de base. El coeficiente de hibridación (q) de los ejemplares se calculó mediante el programa STRUCTURE 2.0 (Pritchard *et al.* 2000) y considerando un modelo

de hibridación entre dos poblaciones, una nativa y la otra la del centro piscícola. Sin embargo, se fuerza a que el programa considere a todos los individuos del centro piscícola como no híbridos (véase Hansen *et al.* 2001). En la ejecución del programa se aplicaron 50000 pasos de *burning* seguidos de 200000 pasos para la estimación del valor q de cada individuo

2.2.6.5. Diferenciación interpoblacional

La diferenciación entre las muestras de la Vallferrera para los loci microsatélites se ha analizado mediante tablas de contingencia de las frecuencias alélicas tal y como se describe en Raymond y Rousset (1995a). Este test es análogo al test exacto de Fischer de una tabla de contingencia de 2x2, extendido a una tabla de contingencia de r poblaciones x k alelos. La significación se calculó mediante aproximaciones basadas en cadenas de Markov. Estos cálculos se llevaron a cabo con el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

2.2.6.6. Distancia genética entre las poblaciones

De manera similar a la indicada en el apartado 2.1.4, se ha calculado la distancia de Nei entre poblaciones (Nei y Li, 1979), como:

$$D = \pi_{12} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k'} x_{1i} x_{2j} \delta_{ij}$$

Donde k y k' son el número de alelos distintos en las poblaciones 1 y 2, x_{1i} y x_{2j} es la frecuencia del alelo i en la población 1 y del alelo j en la población 2, y δ_{ij} es la diferencia de tamaño entre el alelo i y el alelo j , siguiendo el modelo mutacional de infinito número de alelos (IAM, Crow y Kimura 1964), que a pesar de sus limitaciones para loci microsatélites, parece ser adecuado en situaciones de baja diferenciación como las esperadas en este estudio (Balloux y Lugon-Moulin 2002). La significación de los valores se obtuvo permutando alelos entre las poblaciones. Se realizaron 1000 permutaciones. Estos valores se calcularon utilizando el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

A partir de la matriz de las distancias entre las poblaciones, se construyeron los dendrogramas entre éstas utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining. Además para comprobar los posibles patrones de aislamiento por distancia en la zona,

se comparó mediante un test de Mantel (1967) con la matriz de distancia geográfica lineal a lo largo del curso fluvial.

2.2.7. Estimación del tamaño efectivo

2.2.7.1. Estimación de censos (N)

El censo es el número total de individuos que forman parte de una población natural. Para conocerlo, lo mejor sería capturar todos los individuos que forman parte de la población, pero en las poblaciones naturales esta tarea se vuelve bastante complicada, lo que hace necesario el uso de métodos para su estimación. Los más habituales son los métodos de captura-recaptura (Krebs 1999). La idea básica consiste en obtener una primera muestra de la población que una vez marcados los individuos se devuelve a la misma. Estos individuos marcados se mezclan con los individuos de la población que no se han capturado. Al cabo de un tiempo se vuelve a muestrear y se considera que la proporción de individuos marcados capturados en el segundo muestreo representa su proporción en la población en total (Pedersen 1896, Lincoln 1930). Así, si M representa el número de individuos capturados y marcados en el primer muestreo, C es el tamaño de la segunda muestra, R el número de individuos recapturados en el segundo muestreo y N es el censo de la población, se espera que se cumpla la relación:

$$\frac{R}{C} = \frac{M}{N} \text{ y por tanto } N = \frac{CM}{R}$$

Las asunciones de esta aproximación son: (i) la población es cerrada, no hay migración ni mortalidad de los individuos y por tanto N permanece constante entre la captura y la recaptura, (ii) todos los animales tienen la misma probabilidad de ser capturados en el primer muestreo, (iii) el marcaje de los individuos no afecta a su posterior capturabilidad (iv) los individuos no pierden la marca durante el período de tiempo entre los dos muestreos, y (v) los individuos recapturados son fácilmente detectables.

Cuando no se cumplen estas condiciones el problema de esta aproximación es que produce un estimador sesgado, que tiende a sobreestimar la población. Este sesgo puede ser muy importante en poblaciones pequeñas. Seber (1982) propuso un estimador más adecuado en esas situaciones:

$$\hat{N} = \frac{(M+1)(C+1)}{(R+1)} - 1 \text{ siendo su varianza } \text{var}(\hat{N}) = \frac{(M+1)(C+1)(M-R)(C-R)}{(R+1)^2(R+2)}$$

En este caso se obtiene una estima insesgada si $M+C > N$, y casi sin sesgo cuando $R > 7$ individuos.

Schnabel (1938) extendió el modelo de Petersen para “n” muestreos de la población. En este caso, los individuos capturados en sucesivos muestreos (t) son primero examinados para comprobar si están o no marcados. Si no lo están, se marcan y son devueltos a la población. La estimación del censo se calcula en este caso como:

$$\hat{N} = \frac{\sum_t (C_t M_t)}{(\sum_t R_t) + 1} \text{ siendo su varianza } \text{var}\left(\frac{1}{\hat{N}}\right) = \frac{\sum R_t}{(\sum C_t M_t)^2}$$

Donde C_t es el número de individuos capturados en el muestreo t , R_t es el número de individuos recapturados en el muestreo t y M_t es el número de individuos marcados en la población justo antes que el muestreo t se realizase (Krebs 1999). El cálculo de M_t se realiza como:

$$M_t = \sum_{i=1}^{t-1} U_i$$

Donde U_i es el número de individuos marcados por primera vez y soltados en el tiempo i .

Los intervalos de confianza de las estimaciones de los censos para ambos métodos, se calculan según el número de recapturas totales (R_t). Si $R_t < 50$ individuos, los límites de confianza se estiman a partir de la distribución de Poisson de valor R_t a un intervalo de confianza deseado (p.e $\alpha=0.05$). El intervalo se obtiene sustituyendo estos valores de R_t esperados según la distribución en el denominador de la fórmula:

$$\hat{N} = \frac{\sum_t (C_t M_t)}{\sum_t R_t + 1}$$

Si $R_t > 50$, el intervalo de confianza se estima a partir de la fórmula:

$$I.C = \frac{1}{\hat{N}} t_{\alpha} SE \text{ donde el error standard } SE\left(\frac{1}{\hat{N}}\right) = \sqrt{\text{Var} \frac{1}{\hat{N}}}$$

Donde Var es la varianza y t_α es el valor de la distribución *t-student* a un determinado nivel de confianza (si $\alpha=0.05$, $t_\alpha=1.96$)

2.2.7.2. Estimación del tamaño efectivo de las poblaciones (N_e)

El tamaño efectivo (N_e) de una población es uno de los principales factores que determinan los procesos evolutivos de la población (Waples 1991a). El tamaño efectivo determina tanto la magnitud de los procesos de deriva génica, como el aumento de la tasa de consanguinidad en la población a pesar de apareamientos aleatorios. El tamaño efectivo de una población es el número de individuos de una población ideal que presentaría los mismos niveles de variabilidad genética que la población estudiada. Una población ideal mantiene un tamaño estable, su proporción sexual (*sex-ratio*) es 1 y todos los individuos son ideales, es decir tienen las mismas expectativas evolutivas y reproductivas. En este caso, el tamaño efectivo es idéntico al censo (N). Sin embargo, en la naturaleza las poblaciones presentan individuos de diferentes categorías evolutivas (mejor y peor adaptados) y reproductivas (reproductores, alevines, senescentes), de manera que, en líneas generales, el tamaño efectivo es menor que el censo ($N_e < N$). La estimación del tamaño efectivo de una población precisa de información sobre sus parámetros demográficos, que no siempre están disponibles. Sin embargo, en los últimos tiempos se han desarrollado métodos indirectos que estiman el tamaño efectivo actual de la población a partir de su constitución genética.

Entre estos métodos, uno de los más utilizados se basa en la fluctuación temporal de las frecuencias alélicas. En este caso son necesarias dos muestras de un mismo punto separadas t generaciones. Inicialmente propuesto por Krimbas y Tsakas (1971) se basa en el hecho que las fluctuaciones alélicas ocurridas en una población son, en el corto plazo, función de la deriva genética asociada a su tamaño efectivo, ya que la mutación es negligible y se asume una tasa de migración constante o nula.

Para estimar la varianza del cambio alélico por locus se ha seguido la metodología sugerida por Waples (1989), basada en el coeficiente F_k de Pollak (1983) calculado como:

$$F_k = \frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^k \frac{(x_{i0} - x_{it})^2}{(x_{i0} + x_{it})} \cdot \frac{1}{2}$$

Donde k es el número de alelos, x_{i0} es la frecuencia del alelo i en la población x a tiempo 0 y x_{it} es la frecuencia del mismo alelo en la misma población a tiempo t . Una vez conocida la variación de las frecuencias alélicas, N_e se estima a partir de la relación:

$$N_e = \frac{t}{2 \left(F_k - \frac{1}{2S_0} - \frac{1}{2S_t} \right)} \quad (\text{Krimbas y Tsakas 1971})$$

Donde S_0 es el tamaño muestral de la población a tiempo 0 , S_t es el tamaño muestral de la población a tiempo t , siendo t el tiempo en generaciones transcurridas entre ambas muestras. Los cocientes $1/2S_0$ y $1/2S_t$ representan los errores muestrales, que aumentan cuando el tamaño muestral es pequeño y son sustraídos de la variación alélica total. En caso de trabajar con haplotipos mitocondriales, la estimación de la varianza del cambio haplotípico se estima como:

$$F_h = \frac{1}{h-1} \sum_{i=1}^h \frac{(x_{i0} - x_{it})^2}{(x_{i0} + x_{it})}$$

Donde h es el número de haplotipos diferentes. La estimación de N_e en este caso es:

$$N_e = \frac{t}{\left(F_h - \frac{1}{S_0} - \frac{1}{S_t} \right)}$$

Todos estos cálculos se han realizado con el programa NeEstimator (Peel *et al.* 2004).

Recientemente, Wang y Whitlock (2003) han optimizado mediante un método de máxima verosimilitud la estimación del tamaño efectivo a partir de muestras temporales, en el que es posible incorporar también el efecto de la migración desde poblaciones con composición genética conocida. Este método se encuentra implementado en el programa MLNE de estos autores, que se puede acoplar al programa NeEstimator.

Además de los métodos basados en la fluctuación temporal de las frecuencias alélicas, se puede también estimar el tamaño efectivo de una población considerando el desequilibrio gamético entre los loci en una única muestra (Hill 1981). Obviamente, esta aproximación no es adecuada para los datos haplotípicos del ADNmt ya que este genoma se comporta como una única unidad de transmisión y no parece sufrir recombinación (Wilson *et al.* 1985). Sin embargo, en este trabajo se ha utilizado para el cálculo del tamaño efectivo mediante loci microsatélites en la cuenca de la Noguera de Vallferrera, en la que se ha realizado un seguimiento de la población en varios puntos a lo largo de los años 2002 y 2003. En general, el desequilibrio de ligamiento es complicado de estimar a partir de muestras con un reducido número de ejemplares, sin embargo, Waples (1990) considera que la precisión aumenta rápidamente aumentando el número de loci en estudio. El programa NeEstimator implementa el método del desequilibrio de ligamiento desarrollado por Bartley *et al.* (1992) a partir del índice de desequilibrio compuesto de Burrow (D*, Campton 1987). El programa estandariza este índice de manera similar a una correlación génica clásica (r , Hill 1975), y a partir del valor medio de r^2 entre pares de loci se puede estimar N_e como:

$$N_e = \frac{1}{3\left(r^2 - \frac{1}{S}\right)} \quad (\text{Bartley } et al. 1992)$$

siendo S el tamaño de la muestra.

Vitalis y Couvet (2001a) han desarrollado un método que se basa también en esta aproximación, a partir de las identidades alélicas (*identity in state* o IIS) en uno y dos loci. La primera de ellas es un parámetro asociado al coeficiente de consanguinidad de la población estudiada y depende tanto del tamaño efectivo como de las tasas de migración. La segunda de ellas está estrechamente relacionada con el desequilibrio gamético y la tasa de consanguinidad en la población (Vitalis y Couvet 2001b). El método se encuentra implementado en el programa ESTIM 1.2 (Vitalis y Couvet 2001c). El programa estima el tamaño efectivo (N_e) y la tasa de migración entre las muestras (m). Para la estimación de estos parámetros, el programa trata a las diferentes muestras como subpoblaciones de una metapoblación. De esta manera, todos los individuos

analizados forman la metapoblación a partir de la cual proceden los posibles migradores para cada una de las sub-poblaciones. Según Vitalis y Couvet (2001a), la metodología puede ser aplicada en situaciones donde sea fácil estimar el desequilibrio de ligamiento, por tanto en situaciones de tamaños muestrales grandes, elevado número de loci polimórficos (mínimo 8) y gran número de alelos. En este trabajo se ha aplicado esta aproximación de estimación de N_e y m a los datos genotípicos obtenidos en loci microsatélites en muestras capturadas en la Noguera de Vallferrera los años 2002 y 2003.

3. ESTRUCTURA POBLACIONAL EN LA CUENCA DEL RÍO DUERO

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Análisis haplotípicos

En los 342 ejemplares analizados dentro de la cuenca hidrográfica del Duero se detectaron un total de 30 haplotipos atlánticos (linajes AT o DU) y un haplotipo típicamente mediterráneo (ADcs1) observado en un único ejemplar (Tabla 3-1). Este ejemplar con el haplotipo ADcs1 se ha excluido de todos los análisis poblacionales porque posiblemente refleja una translocación puntual desde la cuenca Mediterránea de origen antrópico ya que la localidad de 3-Duruelo donde se encontró esta próxima a cabeceras de ríos mediterráneos.

Los haplotipos atlánticos poseían un contenido de A-T del 63%, valor muy similar al descrito por Cortey y García-Marín (2002) y ligeramente inferior al 68% encontrado por Bernatchez *et al.* (1992) en sus estudios con 310 pb de la región de control. Estos haplotipos diferían de 1 a 7 pasos mutacionales de la secuencia de referencia ATcs1. Las transiciones (19) superaron a las transversiones (15) y tan sólo se observó un *indel* detectado en el haplotipo ATcs43. Los haplotipos más abundantes encontrados en las poblaciones naturales de la cuenca fueron del linaje DU (278 ejemplares), siendo DUcs1 (en 112 ejemplares y 8 muestras) y DUcs2 (en 49 ejemplares y 6 muestras) los más abundantes. Según Suárez *et al.* (2001) estas secuencias constituirían un grupo diferenciado del resto y se ha considerado un nuevo linaje (Cortey 2005). Tan sólo 39 individuos presentaron haplotipos del linaje AT, básicamente en poblaciones más próximas a la desembocadura. En 28 individuos salvajes se detectaron haplotipos típicos de los centros piscícolas (ATc1, ATcs2, ATcs3 y ATcs4) (Tabla 3-2).

Los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud, N-J y parsimonia dieron como resultado una topología muy similar de la relación entre los haplotipos. Las confianzas más altas se obtuvieron con el método de máxima verosimilitud y las más bajas mediante la máxima parsimonia. Con esta última metodología y utilizando *Salmo salar* como *outgroup* se obtuvieron 100 árboles igualmente parsimoniosos que necesitaban 112 pasos.

Este elevado número de pasos refleja el patrón de evolución de la región de control observado por Cortey (2005), dónde un reducido número de posiciones acumula la mayoría de los cambios nucleotídicos produciendo fenómenos de saturación de las mutaciones que complican la inferencia filogenética. Por este motivo, se repitió el análisis utilizando para enraizar la filogenia la secuencia ADcs1 del linaje Adriático que representa un *outgroup* más próximo y reduce por tanto las señales de saturación. De esta manera se obtuvieron 75 árboles igualmente parsimoniosos que necesitaban tan sólo 44 pasos mutacionales. En la topología de todos los árboles obtenidos destaca la clasificación en ramas separadas de los haplotipos AT y DU (Fig.3-1). La diferencia principal entre ambos linajes la constituyen tres transiciones detectadas en el extremo 3', en las posiciones 709, 899 y 902. En este extremo, se concentra la mayoría de cambios que originan la diversidad del linaje DU, sin embargo, los cambios detectados en los haplotipos nativos del linaje AT se distribuyeron más o menos por igual entre ambos extremos de la región de control.

El número medio de cambios nucleotídicos entre los haplotipos nativos del linaje AT y los del linaje DU es de 8.098 y la distancia media Tamura-Nei entre ellos es de 0.008060. Estos valores son similares a los que se observan entre estos linajes con respecto al linaje AD representado por el haplotipo ADcs1, y superiores a los que se observan dentro de los respectivos linajes (Tabla 3-3).

Tabla 3-3. Matriz de distancias Tamura-Nei entre los linajes mitocondriales observados en el río Duero. Entre paréntesis se indica la desviación típica. En la diagonal se indica la diversidad dentro de cada linaje. Linaje AT nat y linaje AT rep hacen referencia, respectivamente, a los haplotipos nativos y de repoblación del linaje AT. Del linaje AD se detectó únicamente la secuencia ADcs1.

	Linaje DU	Linaje ATnat	Linaje AT rep	Linaje AD
Linaje DU	0.002795 (0.000780)			
Linaje AT nat	0.008060 (0.002153)	0.004821 (0.001445)		
Linaje At rep	0.005440 (0.001887)	0.003968 (0.001233)	0.001651 (0.000913)	
Linaje AD	0.008506 (0.002725)	0.009541 (0.002628)	0.006967 (0.002377)	0.000000

El número medio de sustituciones nucleotídicas dentro del linaje DU es de 2.819 y la distancia media Tamura-Nei es de 0.002795, mientras que entre los haplotipos nativos del linaje AT es 4.857 y la distancia de 0.004821. También

son elevados los valores calculados dentro del linaje AT entre los haplotipos nativos y los presentes en los centros piscícolas, confirmando que el linaje AT es un grupo diverso (Cortey 2005).

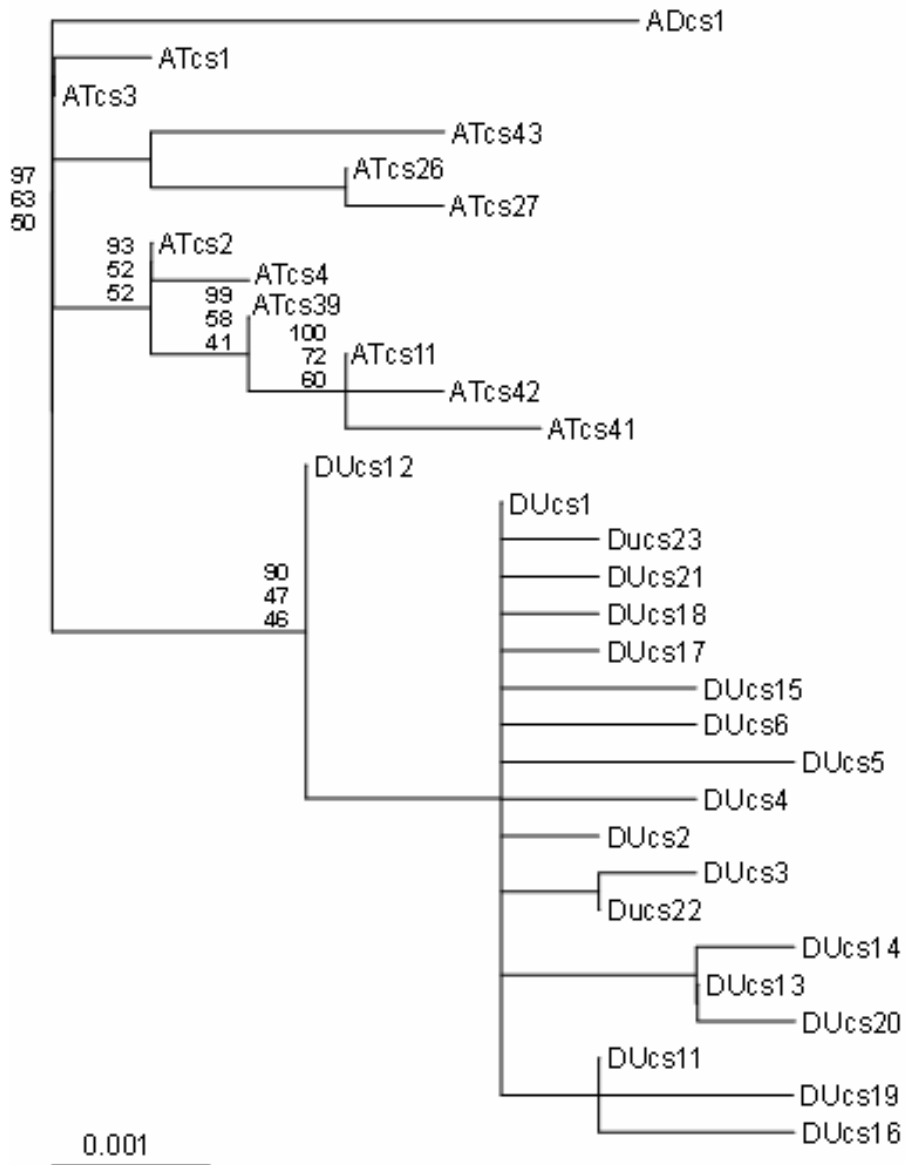


Figura 3-1. Árbol de máxima verosimilitud de los haplotipos hallados en la cuenca del río Duero. Los números de las ramas indican sus valores de confianza. Los dos siguientes valores indican los valores de distancia y de máxima parsimonia respectivamente. Se ha utilizado como outgroup la secuencia ADcs1.

La mayoría de sustituciones nucleotídicas observadas en los haplotipos nativos del linaje AT coinciden con las detectadas por Antunes *et al.* (2001) en su

estudio de las poblaciones portuguesas de trucha común. Este autor tan sólo analizaba los primeros 464 nucleótidos del extremo 5' por lo que la correlación entre los haplotipos de ambos estudios se ha realizado mediante las relaciones filogenéticas usando únicamente esos 464 nucleótidos que tienen en común los dos trabajos (Fig.3-2). Es de remarcar que con esta aproximación se pierden las diferencias entre el linaje DU y los haplotipos del linaje AT presentes en los centros piscícolas.

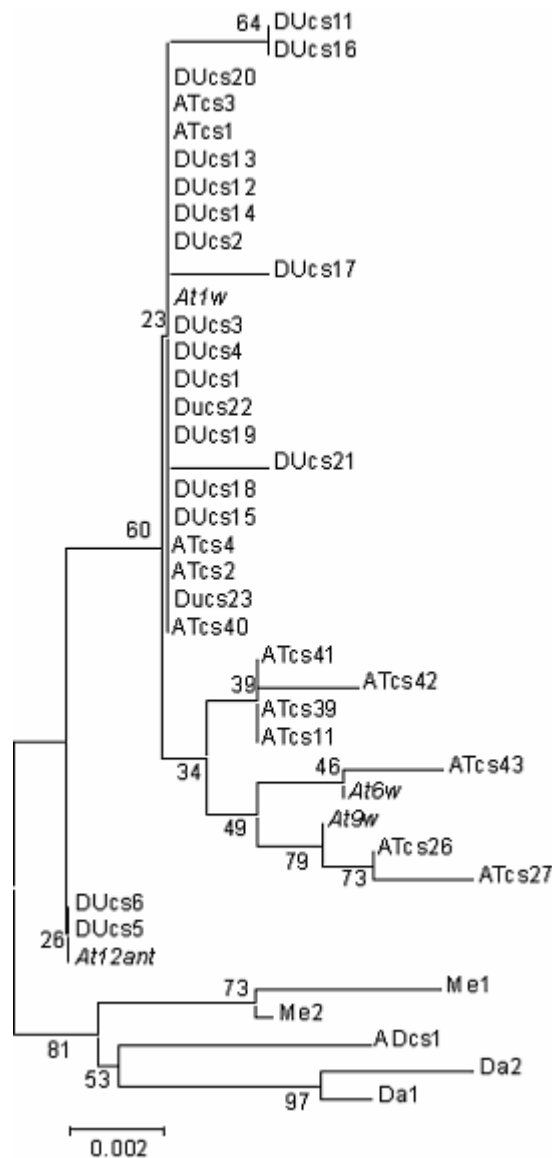


Figura 3-2. Árbol Neighbor-Joining, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2 parámetros, que incorpora los haplotipos hallados en la zona del Duero por Weiss *et al.* (2000) y Antunes *et al.* (2001). Este análisis utiliza únicamente los primeros 464 pb del extremo 5' de la región de control. Actúan de outgroups los haplotipos Me1 y Me2 descritos en Bernatchez *et al.* (1992) y Da1 y Da 2 descritos por Weiss *et al.* (2000). La confianza de las ramas se obtuvo a partir de 1000 réplicas bootstrap.

El haplotipo *At6w*, el más abundante en las poblaciones portuguesas del río Duero analizadas por Antunes *et al.* (2001) se relaciona con el haplotipo ATcs43 de este estudio. Este haplotipo *At6w* es además, el haplotipo más abundante en todas las cuencas portuguesas analizadas (ríos Miño, Lima, Vouga, Mondego, Tajo) representando prácticamente el 70% de los haplotipos portugueses nativos (71 individuos de 104). Por su parte, el haplotipo *At9w*, quedó agrupado con los haplotipos ATcs26 y ATcs27, y fue localizado únicamente en un haplotipo de 21-Ardena. Finalmente, el haplotipo *At12ant* se relacionó con haplotipos del linaje DU (DUcs5 y DUcs6) detectado sólo en 5 individuos de 18-Sabor.

3.1.2. Análisis poblacionales

3.1.2.1. Diversidad genética dentro de las poblaciones

En 28 ejemplares capturados en los ríos se detectaron haplotipos mitocondriales idénticos a los observados en los centros piscícolas que se consideraron, por tanto consecuencia de las repoblaciones efectuadas. Los individuos portadores de esos haplotipos se han eliminado de los análisis. Esta eliminación sólo parece ser grave en la muestra 13-Villomar ya que esos individuos representan 17 ejemplares, el 90% de la muestra. En el resto de muestras (1-Tera, 4-Abión, 9-Moros, 12-Esla y 15-Millar) los ejemplares con haplotipos de repoblación no superan el 25% (Tabla 3-2, Fig.3-3).

La diversidad haplotípica (h) varió entre el monomorfismo observado en 4 muestras y el valor más elevado (0.8406) encontrado en la muestra de 9-Moros, donde se detectaron 8 haplotipos del linaje DU y uno del linaje AT nativo (Tabla 3-4). Otra muestra con elevada diversidad haplotípica es la 3-Duruelo, donde también se detectan 6 haplotipos, 4 AT nativos y 2 del linaje DU, y en la que además se detectó el único individuo con el haplotipo ADcs1. En las restantes 13 muestras analizadas en la cuenca tan sólo se detectó uno de los dos linajes. El rango de diversidad nucleotídica (d) está entre el 0 observado en las muestras monomórficas y el 0.004109 detectado en la muestra de 3-Duruelo, sin embargo, la mayoría de los valores encontrados no superan el 0.001 y se encuentran por debajo de los valores medios descritos en poblaciones noratlánticas (0.003306, Hynes *et al.* 1996), pero dentro del

rango observado en poblaciones portuguesas (0-0.0026, Antunes *et al.* 2001) (Tabla 3-4).

Tabla 3-4. Diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (d) (desviación estándar) en las muestras naturales analizadas en la cuenca del río Duero.

Población	h	d
1-Tera	0.3250 (0.1359)	0.000452 (0.000468)
2-Mazo	0	0
3-Duruelo	0.7355 (0.0712)	0.004109 (0.002360)
4-Abión	0.1895 (0.1081)	0.000376 (0.000414)
6-Aguisejo	0	0
7-Pisuerga	0.4900 (0.1058)	0.000542 (0.000512)
8-Carrión	0.7275 (0.0365)	0.000994 (0.000767)
9-Moros	0.8406 (0.0507)	0.002586 (0.001596)
11-Riaño	0.6923 (0.0923)	0.000881 (0.000733)
12-Esla	0.5303 (0.1359)	0.000570 (0.000556)
13-Villomar	0	0
14-Bernesga	0.3526 (0.1227)	0.000365 (0.000407)
15-Millar	0.3824 (0.1132)	0.000379 (0.000420)
16-Tormes	0	0
17-Águeda	0.5333 (0.0515)	0.000527 (0.000520)

3.1.2.2. Diferenciación genética entre las muestras

Las relaciones filogenéticas entre las poblaciones analizadas se resumen en el árbol de Neighbor-Joining de la Fig.3-4A y señalan la diferenciación de la población 17-Águeda. En esta población, situada fuera de la depresión del Duero (Fig.3-3), se detectan exclusivamente haplotipos nativos del linaje AT. Un patrón similar se obtiene al incorporar en el análisis las muestras estudiadas por Machordom *et al.* (2000) y Antunes *et al.* (2001) (Fig.3-4B). La inclusión de estas 6 muestras confirma la existencia de dos ramas principales en el árbol filogenético, a una primera se asignan las poblaciones de la depresión del Duero, donde abunda el linaje DU, mientras que a la otra pertenecen las poblaciones de aguas abajo, en el Macizo Hespérico y Portugal, donde básicamente se detectan haplotipos nativos del linaje AT, como en 17-Águeda.

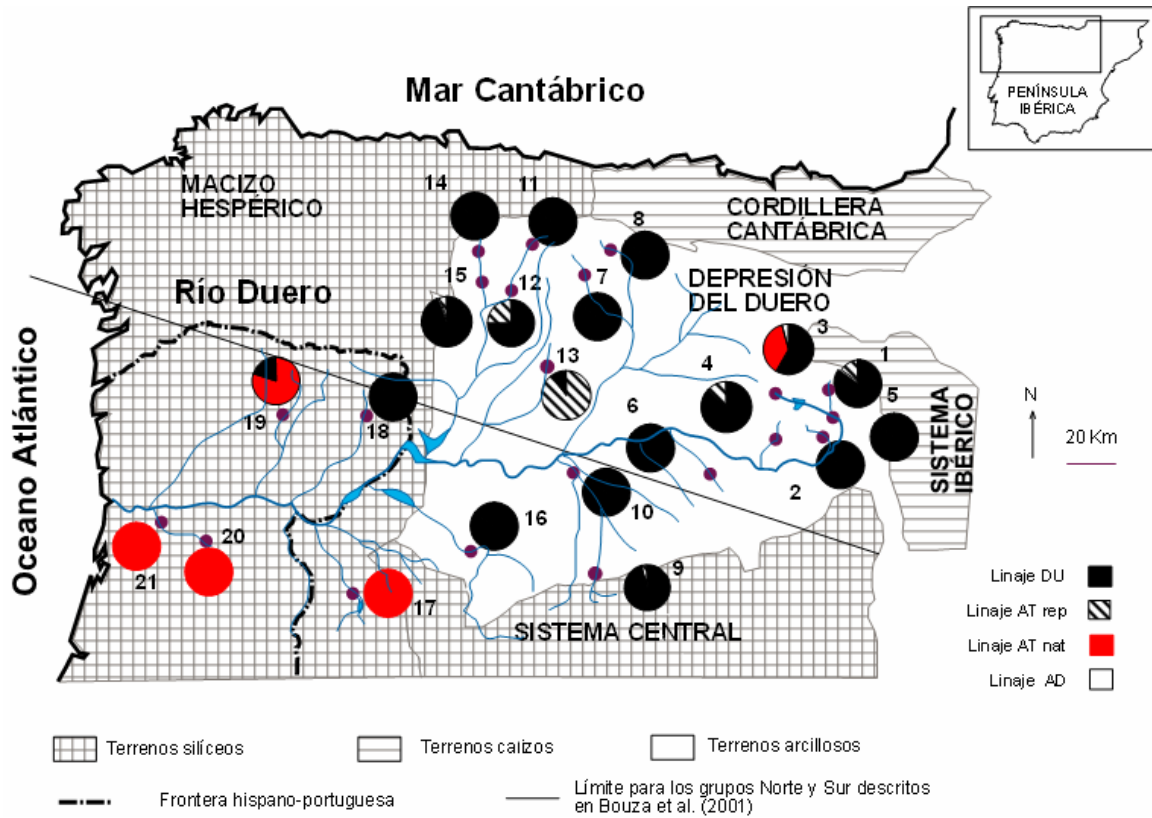


Figura 3-3. Distribución de los diferentes linajes de trucha común detectados en la cuenca del río Duero. Los números corresponden a los indicados en la Tabla 3-2.

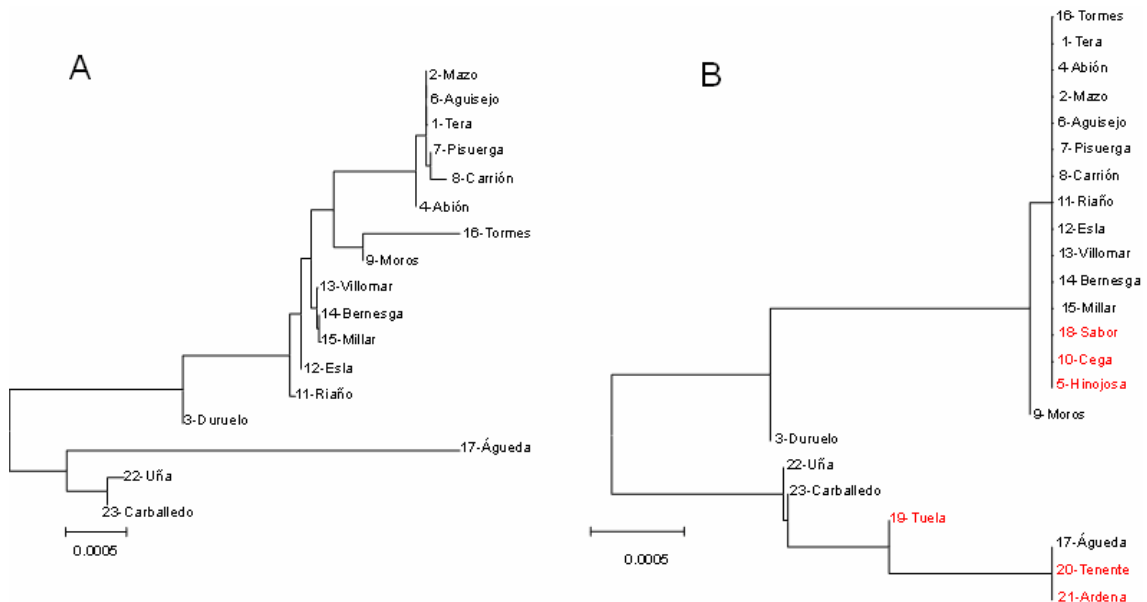


Figura 3-4. Dendrograma Neighbor-Joining entre las muestras del río Duero. (A) utilizando únicamente las muestras propias. (B) incorporando poblaciones (en color rojo) de los trabajos de Machordom *et al.* (2000) y Antunes *et al.* (2001).

En todos los AMOVA (Tabla 3-5), los valores de diferenciación nucleotídica (Φ_{ST}) fueron inferiores a los de diferenciación haplotípica (F_{ST}) como consecuencia del método utilizado que, para incorporar las muestras de otros autores, simplificó las distribuciones haplotípicas dentro de las poblaciones a los dos linajes observados. De esta manera, se utilizó la distancia nucleotídica de la Tabla 3-3 como estima de la divergencia entre y dentro de los linajes AT y DU. Esta aproximación provoca que se considere la diversidad dentro de linaje como diversidad dentro de las poblaciones, por lo que se sobreestima la diversidad nucleotídica interna de las poblaciones con baja diversidad haplotípica. No obstante lo anterior, la importancia relativa (%) de los niveles jerárquicos (SC y CT) aplicados a cada modelo es prácticamente idéntica mediante los dos análisis.

Todos los modelos de AMOVA presentaron un elevado coeficiente de diferenciación haplotípica entre las poblaciones ($F_{ST} > 0.78$) debido a que en prácticamente todas las poblaciones (excepto 3-Duruelo, 9-Moros y 19-Tuela) se detectó únicamente uno de los dos linajes nativos, en consecuencia, el modelo jerárquico que asignó la mínima diferenciación entre las muestras dentro de grupos fue el “modelo filogenético”, en el cuál las muestras se agruparon según el linaje mitocondrial (AT o DU) más abundante (Porcentaje de diferenciación poblacional asignado a Φ_{SC} : 2.4, porcentaje asignado a F_{SC} : 2.3). El modelo “afluente” (las muestras se agruparon según el afluente del Duero al que pertenecían, véase Tabla 2-1 en página 33), indica que existe una alta diferenciación entre los afluentes (Porcentaje asignado a Φ_{CT} : 86.5, porcentaje asignado a F_{CT} : 86.3), comparada con las divergencias poblacionales en su interior (porcentaje de diferenciación poblacional asignado a Φ_{SC} : 13.4, porcentaje asignado a F_{SC} : 13.7), lo que sugiere una estructuración hidrográfica en la distribución de los haplotipos. En el alto Duero y Pisuerga predominan haplotipos DU del clado 2-1, mientras que en el Esla abundan los haplotipos DU del clado 2-2 y en el bajo Duero (Portugal incluido) predomina los haplotipos del clado AT 3-2 (Tabla 3-1). No obstante esta estructuración no parece corresponderse con el patrón alozímico descrito por Bouza *et al.* (2001). La distribución de las poblaciones de acuerdo con el modelo de Bouza *et al.* (2001) resulta en mayores diferencias dentro (60%) que

entre grupos (40%), por lo que parece un modelo poco adecuado para explicar la estructura jerárquica de la diversidad mitocondrial en las poblaciones analizadas.

Tabla 3-5. AMOVAs realizadas aplicando diferentes modelos de estructura poblacional. “ Φ ” hace referencia a los resultados teniendo en cuenta la diversidad nucleotídica y “F” la diversidad haplotípica (* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Modelo	Estadístico	Coefficiente de diferenciación total (ST)	% dif. entre poblaciones dentro de grupo (SC)	% dif. entre grupos (CT)
General	Φ	0.19548***	-	-
	F	0.78856***	-	-
Afluente	Φ	0.21451***	13.4***	86.5*
	F	0.80734***	13.7***	86.3*
Bouza	Φ	0.23622***	63.2***	36.8*
	F	0.82637***	62.8***	37.2*
Filogenético	Φ	0.53887***	2.4***	97.6***
	F	0.92572***	2.3***	97.7***

El análisis del aislamiento por distancia que incorporó las muestras propias y las de otros autores resultó altamente significativo ($P < 0.001$, Tabla 3-6). Para poder integrar las poblaciones de otros autores en la cuenca, de manera similar al procedimiento utilizado en los AMOVA, en el análisis se ha calculado la distancia genética entre las poblaciones a partir de la abundancia relativa de cada linaje y la distancia Tamura-Nei entre linajes. La significación observada de esta manera en toda la cuenca del Duero, parece reflejar la distribución disyunta de los linajes AT y DU. Sin embargo, también se ha observado aislamiento por distancia en la zona dominada por el linaje DU en un análisis en el que la distancia entre las poblaciones se calculó directamente utilizando las frecuencias haplotípicas obtenidas en este estudio y la distancia genética entre los haplotipos (Tabla 3-6). Para la zona dominada por el linaje AT, no se pudo realizar análisis utilizando directamente los haplotipos debido a que sólo se poseía una población propia en la zona (17-Águeda).

Tabla 3-6. Resultados del aislamiento por distancia (IBD) en la Cuenca del Duero. “Duero” corresponde a los resultados utilizando todas las poblaciones. (a) análisis realizados con las muestras propias de este estudio y la distancia entre poblaciones mediante la tasa de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei, incluyendo los haplotipos de manera individual.

Área analizada	P (Zazar \geq Zobs)	R (índice de correlación)
Cuenca Duero	0.0007***	0.32333
Zona de dominio DU	0.3179 NS	0.06145
Zona de dominio DU ^a	0.0001***	0.57987
Zona de dominio AT	0.4900 NS	0.10706

El diseño de clados aplicado a la parsimonia estadística detectó 12 clados de nivel 1 (Fig.3-5), con diversa distribución geográfica. Algunos clados relacionados con el linaje DU se presentan en varias poblaciones (clados 1-1, 1-3 y 1-4), mientras que todos los relacionados con los haplotipos nativos del linaje AT se observan restringidos a una sola población, lo que produjo en este linaje resultados estadísticamente no significativos de la distribución geográfica (Tabla 3-7a). Los haplotipos portugueses descritos en Antunes *et al.* (2001) se asociaron a los clados anteriores basándose en su semejanza de secuencia y las relaciones haplotípicas observadas en la Fig.3-2. El haplotipo *At9w*, aparentemente relacionado con los haplotipos ATcs26 y ATcs27, fue el más difícil de asignar, optándose por una solución que maximiza la inferencia estadística del haplotipo y que consiste en considerarlo un clado propio terminal (1-13), que se incluyó en el mismo clado de nivel 2 que los haplotipos ATcs26 y ATcs27 (Fig.3-5).

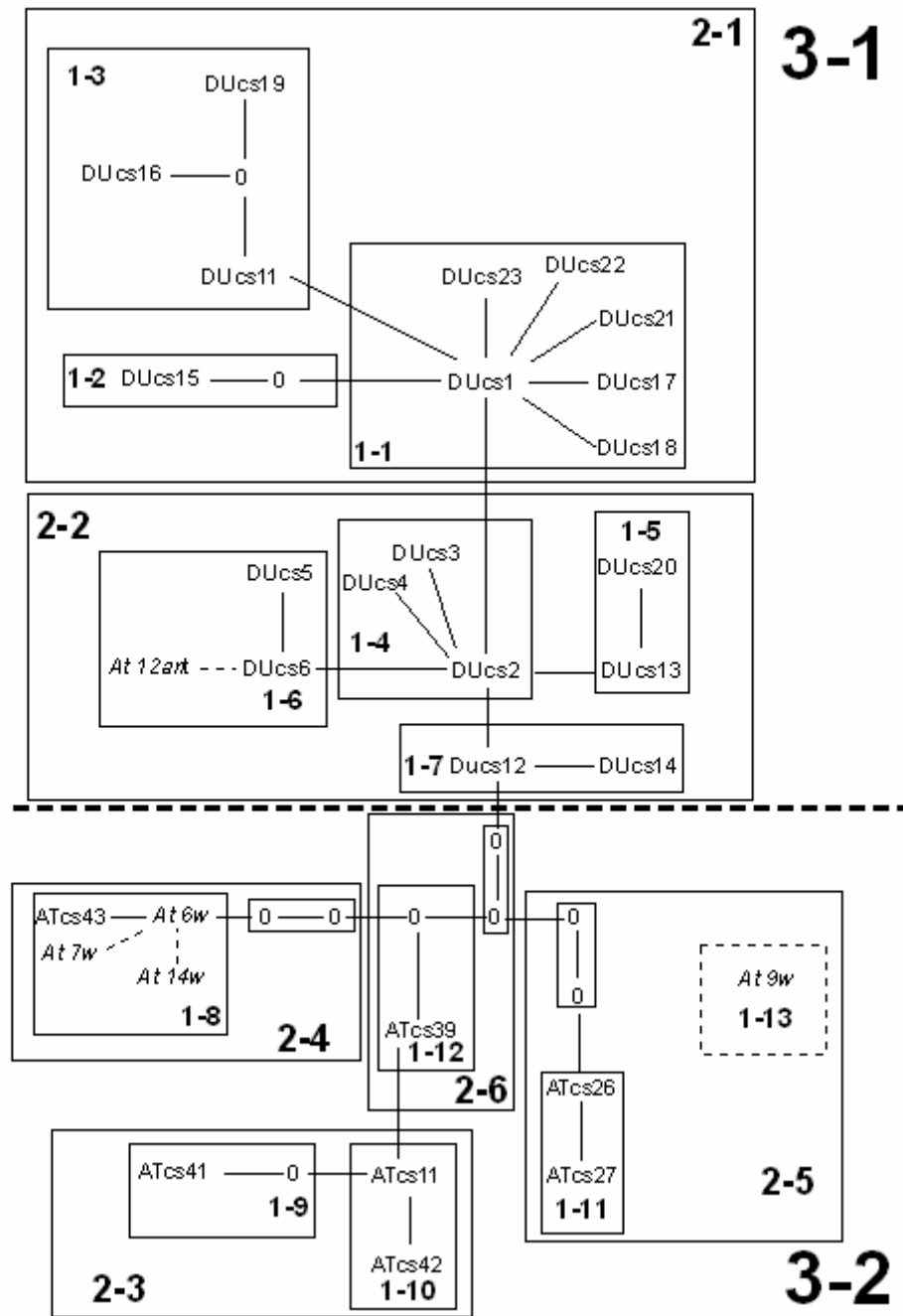


Figura 3-5. Cladograma de parsimonia estadística y diseño de clados incluyendo los haplotipos descritos por Antunes *et al.* (2001). Cada línea representa un paso mutacional. Las líneas discontinúas indican los haplotipos portugueses. Los ceros indican la posible ubicación de un nodo interno en el diseño de clados que no se ha detectado. Los haplotipos de este estudio están definidos en la Tabla 3-1.

El patrón espacio-temporal definido por el NCA básicamente es idéntico se consideren, o no, los haplotipos portugueses, incluso para el clado 1-8, al que se incorpora el haplotipo *At6w* muy extendido en Portugal (Tabla 3-7a y b).

Tabla 3-7a. Nested Clade Analysis en base a las poblaciones propias de este estudio. No indica el nombre del clado. Los cladogramas en negrita son interiores, las abreviaturas corresponden a: Aislamiento por Distancia (IBD), Colonización a Larga Distancia (LDC), Expansión de Rango (RE), Expansión de Rango a zonas Contiguas (CRE), Flujo Genético Restringido (RGF) y test No Significativo (NS). "S" indica que la distancia es significativamente pequeña, y "L" que la distancia es significativamente grande en un nivel de significación de $\alpha= 0.05$.

Haplotipo			clado nivel 1			clado nivel 2			clado nivel 3		
No	Dc	Dn	No	Dc	Dn	No	Dc	Dn	No	Dc	Dn
<i>DUcs1</i>	79.14 ^s	87.80 ^s									
<i>DUcs23</i>	0	142.20 ^L									
<i>DUcs22</i>	0 ^s	142.20 ^L									
<i>DUcs21</i>	0	134.83									
<i>DUcs17</i>	0	147.24 ^L									
<i>DUcs18</i>	7.86 ^s	140.04 ^L									
IT	75.01 ^L	-52.88 ^s									
1.2.3.5.8.13.14 CRE/LDC			1-1	95.80	95.10 ^s						
<i>DUcs15</i>	0	0	1-2	0	85.26						
<i>DUcs11</i>	110.32	128.58 ^L									
<i>DUcs16</i>	0	90.91									
<i>DUcs19</i>	0	90.91									
IT	110.32	37.67 ^L									
1.2.11.17.4 RGF con IBD			1-3	112.89 ^L	125.54 ^L						
			IT	-6.00 ^s	-28.41 ^s						
			1.2.11 RE.12 CRE			2-1	96.80 ^s	123.20 ^s			
<i>DUcs2</i>	33.35	33.20									
<i>DUcs3</i>	75.43	68.44									
<i>DUcs4</i>	28.77	27.44									
IT	-33.60 ^s	-27.78									
1.2.11 RE.12 CRE			1-4	36.85 ^s	71.03 ^s						
<i>DUcs13</i>	0	91.43									
<i>DUcs20</i>	0	156.98									
IT	0	-65.54									
1. NS			1-5	115.58	115.64						
<i>DUcs6</i>	86.18 ^s	93.57 ^s									
<i>DUcs5</i>	0	157.26 ^L									
IT	86.18	-63.69 ^s									
1.2.11 RE.12.CRE			1-6	44.55 ^s	200.88 ^L						
<i>DUcs12</i>	18.33	18.09									
<i>DUcs14</i>	0	13.56									
IT	18.33	4.52									
1. NS			1-7	17.13 ^s	63.55 ^s						
			IT	-15.34	-124.55 ^s						
			1.2.11 RE.12 .13.14 CRE/IBD			2-2	99.12 ^s	131.64			
						IT	2.32	8.44			
						1.2.11 RE.12 CRE			3-1	127.39 ^s	129.73 ^s
<i>ATcs43</i>	0	0	1-8	0	0	2-4	0	124.04			
<i>ATcs41</i>	0	0	1-9	0	0						
<i>ATcs11</i>	0	0									
<i>ATcs42</i>	0	0	1-10	0	0	2-3	0 ^s	289.79 ^L			
<i>ATcs26</i>	0	0									
<i>ATcs27</i>	0	0	1-11	0	0	2-5	0 ^s	111.23 ^s			
<i>ATcs39</i>	0	0	1-12	0	0	2-6	0	269.79			
						IT	0 ^L	105.17			
						1.2.3.5.15.16.18 RGF/IBD/CRE			3-2	154.90 ^s	230.80 ^L
									IT	-27.52 ^s	-101.06 ^s
						1.2.11 RE.12. CRE					

Tabla 3-7b. Nested Clade Analysis incluyendo los haplotipos descritos en Antunes *et al.* (2001) (en cursiva).

Haplotype			clado nivel 1			clado nivel 2			clado nivel 3		
No	Dc	Dn	No	Dc	Dn	No	Dc	Dn	No	Dc	Dn
<i>DUcs1</i>	79.14 ^s	87.80 ^s									
<i>DUcs23</i>	0	142.20 ^L									
<i>DUcs22</i>	0 ^s	142.20 ^L									
<i>DUcs21</i>	0	134.83									
<i>DUcs17</i>	0	147.24 ^L									
<i>DUcs18</i>	7.86 ^s	140.04 ^L									
IT	75.01 ^L	-52.88 ^s									
1.2.3.5.6.13.14 CRE/LDC			1-1	95.80	95.10 ^s						
<i>DUcs15</i>	0	0	1-2	0	85.28						
<i>DUcs11</i>	110.32	128.58 ^L									
<i>DUcs16</i>	0	90.91									
<i>DUcs19</i>	0	90.91									
IT	110.32	37.67 ^L									
1.2.11.17.4 RGF con IBD			1-3	112.89 ^L	125.54 ^L						
			IT	-6.00 ^s	-26.41 ^s						
			1.2.11 RE.12 CRE			2-1	96.80 ^s	130.47			
<i>DUcs2</i>	33.35	33.20									
<i>DUcs3</i>	75.43	68.44									
<i>DUcs4</i>	28.77	27.44									
IT	-33.60 ^s	-27.78									
1.2.11 RE.12 CRE			1-4	38.85 ^s	75.48 ^s						
<i>DUcs13</i>	0	91.43									
<i>DUcs20</i>	0	156.98									
IT	0	-85.54									
1. NS			1-5	115.58	122.80						
<i>DUcs6</i>	38.76 ^s	93.44 ^s									
<i>DUcs5</i>	0	128.99 ^L									
<i>At12ant</i>	0 ^s	125.13 ^L									
IT	38.76	-32.38 ^s									
1.2.11 RE.12.13 LDC			1-6	108.04	164.72 ^L						
<i>DUcs12</i>	18.33	18.09									
<i>DUcs14</i>	0	13.56									
IT	18.33	4.52									
1. NS			1-7	17.13 ^s	72.67 ^s						
			IT	-74.22 ^s	-87.07 ^s						
			1.2.11 RE.12 CRE			2-2	104.31 ^s	132.93			
						IT	7.51	2.48			
			1.2.11 RE.12 CRE			3-1	131.78 ^s	142.68 ^s			
<i>At6w</i>	62.72	63.39									
<i>ATcs43</i>	0	286.53									
IT	62.72	-223.14									
1. NS			1-8	0	0	2-4	68.66 ^s	86.74 ^s			
<i>ATcs41</i>	0	0	1-9	0	0						
<i>ATcs11</i>	0	0									
<i>ATcs42</i>	0	0	1-10	0	0	2-3	0 ^s	357.97 ^L			
<i>ATcs26</i>	0	0									
<i>ATcs27</i>	0	0	1-11	0	23.02						
<i>At9w</i>	0	0	1-12	0	114.71						
1. NS						2-5	38.30 ^s	92.37 ^s			
<i>ATcs39</i>	0	0	1-13	0	0	2-6	0	357.97			
						IT	-40.69 ^L	211.75			
						1.2.3.4 RGF con IBD			3-2	112.21 ^s	221.53 ^L
									IT	19.57	-78.85 ^s
						1.2.11 RE.12.13 LDC					

En general, la distribución geográfica de los clados de nivel 1 a los que se incorporan los haplotipos del linaje DU parece ser consecuencia de expansiones de rango (RE), por expansión a las zonas contiguas (CRE) o colonización a larga distancia (LDC), tal y como se observa para los clados de mayor abundancia como el 1-1, distribuido básicamente desde el Pisuegra al alto Duero en la zona más interior de la depresión del Duero, o el clado 1-4 que se extiende a lo largo de la cuenca del Esla. Estos modelos de dispersión parecen haberse repetido a lo largo del tiempo ya que son los que se infieren para los clados de nivel superior. Así, los clados 2-1 y 2-2, cronológicamente más antiguos, se expandieron también de manera ordenada en la cuenca. El 2-1 se extiende en la parte oriental de la depresión del Duero y el 2-2 en la occidental, ocupando también parte del macizo Hespérico. Tan sólo la distribución del clado 3-2, que incluye todos los haplotipos nativos del linaje AT podría ser consecuencia de una disminución del flujo génico entre las poblaciones, ocurrida con posterioridad a una expansión de rango (RE) en toda la cuenca que se infiere para el total del cladograma. El mecanismo por el que se efectuó esta primera expansión varía de expansión de rango a zonas contiguas (CRE) si se analiza el cladograma sin los haplotipos portugueses a colonización a larga distancia (LDC) cuando se incluyen dichos haplotipos.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de la distribución de *Mismatch*, también indicaron que tanto para el total de los haplotipos, como dentro del linaje DU y el linaje AT se han producido expansiones poblacionales (Tabla 3-8, Fig.3-6). Sin embargo, los resultados obtenidos en el análisis de los haplotipos nativos del linaje AT debería tenerse en cuenta con reservas, ya que se han utilizado únicamente los 7 haplotipos del presente trabajo, que no representan la totalidad de la variabilidad haplotípica del linaje en la zona (ver Cortey 2005).

Tabla 3-8. Demografía histórica de los linajes DU y haplotipos nativos del linaje AT. **Pd** indica el número de diferencias apareadas dentro de los grupos, **S** es el número de posiciones polimórficas detectadas. τ : edad de la expansión en unidades de tiempo mutacional, θ_0 : tamaño poblacional de las hembras antes de la expansión y θ_1 : tamaño poblacional de las hembras después de la expansión. Los intervalos de confianza al 95% se indican dentro de paréntesis. **P(SSD_{obs})** : probabilidad de observar al azar una peor concordancia entre la distribución observada y la distribución esperada bajo una expansión poblacional definida por los parámetros demográficos estimados τ , θ_0 , θ_1 . **P(Rag_{obs})**: probabilidad de observar al azar un valor más elevado de índice de *Raggedness* que el observado bajo la hipótesis de expansión poblacional.

	Pd	S	τ	θ_0	θ_1	P(SSD_{obs})	<i>Raggedness</i>	P(Rag_{obs})
Total	5.1(2.8-10.1)	30(27-52)	1.9(0.4-6.6)	4(0-14)	6645(30-7239)	0.139	0.029	0.310
Linaje DU	2.8 (2.1-3.9)	15(19-37)	2.9(0.6-4.1)	0 (0-2)	7000(44-9145)	0.080	0.088	0.110
Linaje AT nat	4.9 (2.0-7.7)	13(6-22)	6.5(2.5-10.1)	0 (0-3)	19 (6-6624)	0.830	0.045	0.920

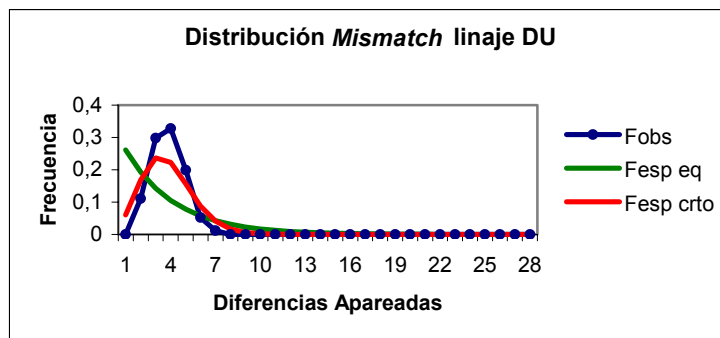


Figura 3-6. Distribución de *Mismatch* para el linaje DU. "Fobs" indica la distribución de diferencias apareadas entre haplotipos observada, "Fesp eq" indica la distribución esperada en equilibrio y "Fesp crto" indica la distribución esperada bajo una expansión poblacional.

3.2. DISCUSIÓN

3.2.1. Relación filogenética entre los haplotipos detectados

Los primeros trabajos sobre variabilidad mitocondrial realizados mediante secuenciación del extremo 5' de la región de control (310pb) en 53 ejemplares capturados en 8 localidades a lo largo de la vertiente atlántica europea detectaron un único haplotipo (Bernatchez *et al.* 1992). Estudios posteriores de poblaciones noreuropeas corroboraron la falta de variación en este segmento de la región de control (Hansen y Loeschke 1996a). Sólo en poblaciones atlánticas más al sur, básicamente ibéricas, se han detectado nuevos haplotipos ligeramente diferenciados (1-3 pasos mutacionales) (Apostolidis *et al.* 1997, Weiss *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Cortey y García-Marín 2002). Los dos grupos de haplotipos nativos observados en este estudio se corresponden con los que Suárez *et al.* (2001) detectaron en los ríos atlánticos de la Península Ibérica denominados suratlántico y Duero, mientras que los observados en los centros piscícolas se relacionan con el grupo que estos autores denominaron noratlántico. Recientemente Cortey (2005) ha confirmado la validez del grupo Duero (DU) como un linaje diferente del resto, y ha distinguido tres grandes grupos dentro del linaje AT, denominados AT3-1 (restringido a poblaciones noreuropeas), AT3-2 y AT3-3, siendo estos dos últimos los que Suárez *et al.* (2001) englobaban dentro de su grupo suratlántico.

En este trabajo se ha constatado la presencia en el río Duero de los clados AT3-2 (haplotipos: ATcs11, ATcs26, ATcs27, ATcs39, ATcs41, ATcs42, ATcs43) y AT3-3 (haplotipo ATcs43), unidos en el clado 3-2 de la Fig.3-5.

La distancia media utilizando la tasa de sustitución nucleotídica Tamura-Nei observada entre estos 2 grupos del linaje AT fue de 0.003991 ± 0.001224 , muy similar al 0.004659 ± 0.001120 observado por Cortey (2005) e inferior al valor descrito entre el linaje AT y el linaje DU (0.007475 ± 0.001959). Este hecho indicaría que la divergencia entre los grupos del linaje AT es de época más reciente. Según Cortey (2005), los haplotipos del linaje AT detectados en la Península Ibérica serían los más modernos del linaje. Así, los haplotipos del clado AT3-2 que se detectan en el norte de Europa y en los centros piscícolas

ibéricos (haplotipos ATcs2 y ATcs4) no son los mismos que hay de forma nativa en la zona analizada en este estudio. Entre los haplotipos nativos del linaje AT observados en este estudio, ATcs39 se sitúa en la posición más interna del cladograma (Fig.3-5), pero su baja frecuencia (únicamente 1 individuo) y la ausencia de haplotipos observados para los nodos interiores (indicados como 0 en la Fig.3-5) dificultan considerarlo como el haplotipo ancestral de ese grupo. Como se ha indicado (Fig.3-2), estos haplotipos se relacionan con los descritos en Portugal (ríos Lima, Montego y bajo Tajo) por Antunes *et al.* (2001), quien postuló como ancestral el haplotipo At6 descrito por Weiss *et al.* (2000), nombrado aquí como *At6w*. Sin embargo, este haplotipo *At6w* no se coloca en el centro del Clado 3-2 de la Fig.3-5, que incluye todos los haplotipos nativos del linaje AT en la región, lo que sugiere también la existencia de otros haplotipos centrales y más antiguos. De acuerdo con los resultados de Cortey (2005), la estructura de clados del linaje AT en la Península Ibérica es mucho más compleja de aquello que se puede detectar con el estudio de una sola cuenca y, de hecho, los haplotipos de los nodos internos que no se han detectado en este estudio, se hallarían en las poblaciones más al norte, y corresponderían a su grupo AT3-1 y al clado 2-4 de su grupo AT3-2.

En el linaje DU, los haplotipos DUcs1 y DUcs2 son los que presentaron una mayor frecuencia y un rango de distribución más elevado, lo que unido a su posición central en, respectivamente, los clados 2-1 y 2-2 de la Fig.3-5 sugiere que se trata de los más antiguos para el grupo.

3.2.2. Estructura poblacional de la trucha en el río Duero

Tanto el AMOVA basado en la jerarquía hidrográfica (Modelo "Afluente") y, especialmente el modelo de AMOVA "Filogenético" sugieren una alta estructuración de las poblaciones de trucha en la cuenca del río Duero. La elevada diferenciación entre grupos observada en este último modelo de AMOVA ($\Phi_{CT} = 97.6\%$, $F_{CT} = 97.7\%$), es reflejo de una distribución disjunta de los dos linajes, AT y DU, en la cuenca del Duero. Sólo 3 de las 21 muestras (3-Duruelo, 9-Moros y 19-Tuela) coexisten ambos linajes, aunque incluso en estos casos, el linaje dominante en las poblaciones geográficamente más próximas presentaba una frecuencia superior al 60% (Fig.3-3, página 71). El linaje DU se

extiende principalmente por las poblaciones de trucha de la depresión del Duero, mientras que el linaje AT domina en las poblaciones del macizo Hespérico, situadas más hacia la desembocadura, básicamente en afluentes portugueses (Fig.3-3).

Los análisis filogenéticos realizados señalan que la divergencia entre ambos linajes se inició en un rango entre 290000 y 765000 años antes del presente (a.a.p.) dependiendo de la tasa de sustitución nucleotídica aplicada (Cortey 2005). Este valor es muy similar al rango estimado (170000-612000) para el origen de la diferenciación parapátrica de las poblaciones de trucha en la cuenca del Duero detectada mediante electroforesis enzimática de genes nucleares (Bouza *et al.* 2001). Es bien conocido que la Península Ibérica ha sido una zona menos sensible que el norte de Europa a los periodos glaciares del Cuaternario (Hewitt 1996, Willis y Whittaker 2000) y por lo tanto, no debe extrañar que se conserven en ella linajes antiguos (Sanz *et al.* 2000). Una situación similar se ha descrito para el salmón atlántico del cantábrico (*S.salar*), aunque en esta especie sus haplotipos nativos, claramente distintos de los noreuropeos, se han extinguido en los últimos tiempos (Consuegra *et al.* 2002).

Curiosamente, la distribución de linajes aquí obtenida encaja con el patrón ictiológico descrito en la cuenca del Duero. Se ha observado que dentro de esta cuenca se pueden definir claramente dos áreas ictiológicas, una interior y otra inferior cerca de la desembocadura. La distribución del linaje DU se ajusta al área ictiológica de la cuenca interior caracterizada por la presencia de especies residentes y endémicas de la Península Ibérica como por ejemplo la bermejuela (*Rutilus arcasii*) o la lamprehuela (*Cobitis calderoni*) (Doadrio 2001). Por su parte, el linaje AT se distribuye en la parte inferior donde, curiosamente, son abundantes las especies anádromas como el sábalo (*Alosa alosa*), la anguila (*Anguilla anguilla*) o el esturión (*Acipenser sturio*) (Kottelat 1997), aunque la presencia actual de las dos últimas es muy reducida debido al deterioro de su hábitat en la cuenca del Duero (Doadrio 2001). Es por tanto posible que la distribución de los haplotipos nativos del linaje AT en la cuenca del Duero podría estar relacionada con la migración de ejemplares de trucha anádroma procedentes de cuencas vecinas situadas más al norte. En este sentido apunta también la presencia de haplotipos similares en los ríos

portugueses cercanos (Antunes *et al.* 2001). De hecho, haplotipos de este linaje AT muy relacionados a los observados en el Duero, parecen distribuirse a lo largo de la costa atlántica desde el Cantábrico hasta Marruecos (Machordom *et al.* 2000, Antunes *et al.* 2001, Suárez *et al.* 2001, Cortey 2005). Aunque el límite actual de distribución de las truchas anádromas se encuentre en cuencas más al Norte, alrededor del paralelo 42 (véase por ejemplo Bouza *et al.* 1999, Antunes *et al.* 2001), según Berg (1948) existían en el siglo pasado poblaciones anádromas de trucha en la cuenca del Duero, que desde la desembocadura se extendían hasta Palencia. El registro fósil sugiere la expansión y contracción de las poblaciones de trucha en los ríos ibéricos durante las fluctuaciones climáticas del Cuaternario (Muñoz y Casadevall 1997), e incluso parece que poblaciones anádromas podrían haber existido en la cuenca mediterránea durante los períodos glaciares (Berg 1948). Estas dinámicas de expansión y contracción de rango deberían facilitar los contactos entre linajes y aumentar la heterogeneidad de los haplotipos distribuidos en las poblaciones.

El presente estudio es el más amplio realizado hasta la fecha sobre diversidad haplotípica en y entre las poblaciones del linaje DU. De hecho, si se comparan las tablas 3-7a y 3-7b, las conclusiones relativas a este linaje varían muy poco ya que tan sólo se ha incorporado un único haplotipo de los trabajos previos de otros autores (*At12ant*, Antunes *et al.* 2001). De acuerdo con los análisis de clados encajados (NCA), la distribución actual de la diversidad haplotípica de este linaje en la cuenca del Duero parece ser básicamente el resultado de procesos de expansión de rango repetidos en los diferentes niveles de clado. Los estudios de la distribución de *Mismatch* indican que la expansión poblacional más antigua, aquella que afecta al clado 3-1, ocurrió hace 2.9 unidades de tiempo mutacional (τ) (Tabla 3-8). Este valor es similar al estimado para las expansiones poblacionales más antiguas que se detectan en la Península Ibérica para los linajes ME y AD (Cortey *et al.* 2004), lo que sugiere que la expansión poblacional de todos estos linajes fue probablemente el resultado de un proceso que afectó de manera general a todos los ríos ibéricos hace unos 70000-200000 a.a.p. Otros procesos no tan intensos (tanto expansiones poblacionales como cuellos de botella), y más recientes, pueden

haber quedado enmascarados por el impacto de estas expansiones (Rogers 1997).

La dominancia del clado 2-2 en las cuencas del Esla y del Tormes, sugiere su aislamiento de la parte más interior de la depresión del Duero, dominada por el clado 2-1. De hecho, se observa entre las poblaciones dónde predomina este linaje un patrón de aislamiento por distancia (Tabla 3-6), que se ve refrendado por el alto valor de la diferenciación entre afluentes que se observa en el “modelo afluente” de AMOVA (proporción de Φ_{CT} =86.5%).

Respecto al linaje AT, tanto los NCA del presente estudio (clado 3-2, en Tabla 3-7b) como los desarrollados por Antunes *et al.* (2001) sugieren que la estructura poblacional en la parte de la cuenca donde domina este linaje sería consecuencia de la restricción del flujo génico (RGF con IBD, Tabla 3-7b) ocurrida con posterioridad a las expansiones de rango. Sin embargo, el cladograma para el linaje AT presenta una gran cantidad de clados de nivel cero no detectados (haplotipos representados con un 0 en la Fig.3-5). Este hecho podría reflejar tanto el reducido número de muestras en la zona baja del Duero, como el reducido número de ejemplares analizados (35 ejemplares distribuidos en 5 muestras), lo que provoca la pérdida de resolución de la técnica del NCA por falta de nodos internos (Turner *et al.* 2000) y, en general, una mala inferencia de los procesos implicados en la diferenciación poblacional (Masta *et al.* 2003).

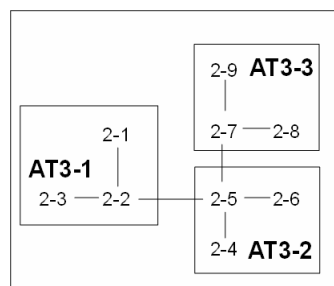


Figura 3-7. Distribución de los clados de nivel 2 y nivel 3 para el linaje AT en Cortey (2005).

Según Cortey (2005), con un muestreo más intenso de la cuenca atlántica, la distribución de su clado 2-5 incluido en el clado AT3-2, y al que pertenecen los haplotipos ATcs26 y ATcs27 observados en 17-Águeda, refleja procesos de

fragmentación entre las poblaciones que los contienen. Este clado además de presentarse en el Duero, se ha descrito en poblaciones de la cornisa cantábrica. Sin embargo, la distribución de su clado 2-6, también incluido en el clado AT3-2 (Fig. 3-7), y al que pertenecen los haplotipos ATcs11, ATcs39, ATcs41 y ATcs42 del presente estudio, sería el reflejo de una expansión de rango mediante una colonización a larga distancia. Este clado también se ha observado en poblaciones del cantábrico. Según este mismo autor, la separación de los clados de nivel 2 en el grupo AT3-2, sería consecuencia de procesos de expansión de rango mediante colonización a larga distancia. Como ya se ha comentado, a este grupo AT3-2 pertenecen también haplotipos observados en el norte de Europa (clado 2-4 en Cortey 2005) y que, su posición interior en el cladograma, hace considerarlos como más antiguos. Es por tanto probable que los clados 2-5 y 2-6 reflejen la expansión indicada por el NCA, que expandió al grupo desde el norte hasta las cuencas ibéricas. Según los resultados de *Mismatch* presentes en ese trabajo, la expansión ocurrió hace unas 3.8 unidades de tiempo mutacional y es por tanto, anterior a la que se detecta en el linaje DU.

El haplotipo ATcs43 detectado en 9-Moros pertenecería al clado 2-7 de Cortey (2005) que es el clado interior de su grupo AT3-3 (Fig-3-7). Lamentablemente, tampoco el trabajo de este autor pudo discernir entre los diferentes procesos demográficos e históricos que explicarían su actual distribución. Además de en el Duero, el clado es abundante en la cuenca del Tajo. El haplotipo ATcs43 se relaciona con el *At6w* descrito por Weiss *et al.* (2000), que es el más abundante en las cuencas portuguesas de los ríos Miño, Lima, Cávado, Ave, Duero, Vouga, Mondego y Tajo (Antunes *et al.* 2001). Según los datos de Cortey (2005), 6 haplotipos de su clado 2-9 y dos de su clado 2-7 tienen los 464 pb del extremo 5' idénticos a este haplotipo *At6w*. Además de con el *At6w*, el haplotipo ATcs43 parece relacionado con los haplotipos *At7w* y *At14w* (Fig.3-5). El primero de ellos es un haplotipo abundante en la única muestra del Tajo analizada por Antunes *et al.* (2001) y se relaciona con el clado 2-8 de Cortey (2005), el segundo tan sólo se ha detectado en un ejemplar de la cuenca del río Lima y al igual que el *At6w* se considera un haplotipo del clado 2-9. Todo ello indica que el grupo AT3-3 se distribuye mayoritariamente en las cuencas

ibéricas desde Galicia hasta el Tajo, pero se encuentra también presente más al norte en ríos cantábricos, básicamente el clado 2-9. Los resultados apuntan también a que el clado 2-8 se distribuye principalmente a lo largo de la cuenca del Tajo. El NCA realizado por Cortey (2005) muestra que la distribución de estos clados del grupo AT3-3 es consecuencia de una expansión de rango mediante colonización a larga distancia. Así mismo, el análisis de *Mismatch* sugiere que esta expansión se habría producido hace 2.5 unidades de tiempo mutacional y sería, por tanto, un poco posterior a la sufrida por los clados del linaje DU.

En resumen, la cuenca interior del Duero habría estado permanentemente ocupada por poblaciones del linaje DU, sin embargo, las zonas más próximas a la desembocadura, en el Macizo Hespérico, y que principalmente incluyen la parte portuguesa de la cuenca parece haber sufrido diversas colonizaciones por truchas del linaje AT (Fig.3-8).

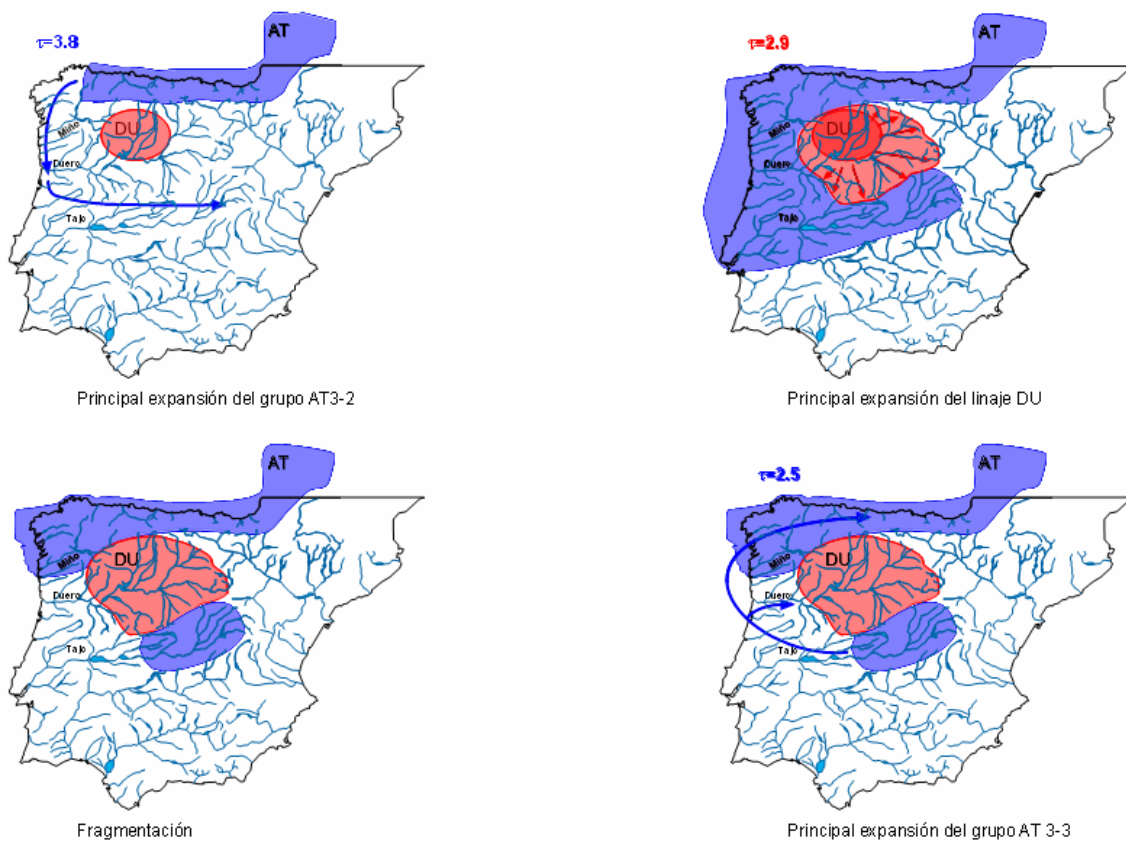


Figura 3-8. Secuencia temporal de colonización de la cuenca atlántica por los diferentes grupos de trucha común.

Entre estas expansiones parece haber habido períodos dominados por el aislamiento de las poblaciones. Es probable que tanto las expansiones poblacionales como las posteriores restricciones de flujo génico reflejen los cambios climáticos ocurridos en el Cuaternario.

3.2.3. Congruencia con estudios alozímicos

A pesar de la presencia de los dos linajes (AT y DU) en poblaciones tan distantes como 3-Duruelo y 19-Tuela, resulta sorprendente la importante separación que, en general, se observa en su distribución. Sin embargo, la presencia de linajes diferentes entre territorios de la Península Ibérica ha sido descrita en un número elevado de especies tanto animales como vegetales. Por ejemplo, diversos estudios filogeográficos en especies de peces indican que, a lo largo del Cuaternario, han existido en la Península Ibérica diferencias poblacionales y endemismos locales asociados a las principales cuencas hidrográficas (ver Gómez y Lunt 2006).

En la trucha común, Sanz *et al.* (2000) describieron mediante alozimas la presencia de hasta 4 grupos poblacionales diferentes para la zona noroeste de la Península Ibérica, siendo destacable las importantes diferencias observadas entre las poblaciones analizadas en la cuenca del Tajo respecto a las estudiadas en la cuenca del río Duero (Machordom *et al.* 1999). Los resultados obtenidos en el presente estudio, juntamente a los observados por Cortey (2005) para aquellas poblaciones compartidas con Sanz *et al.* (2000) (7-Pisuerga, 8-Carrión, 11-Riaño, 12-Esla, 13-Villomar, 14-Bernesga y 15-Millar en el Duero y Hocesequera, Pelagallinas y Bornova en el Tajo), indican que el linaje DU se correspondería con el grupo Duero propuesto por Sanz *et al.* (2000) y los haplotipos del clado AT3-3 estarían asociados con el grupo Tajo propuesto por estos autores.

Lamentablemente el estudio de Sanz *et al.* (2000) no incluía poblaciones de la zona inferior cercanas a la desembocadura del río Duero. Un análisis alozímico más exhaustivo de la cuenca del río Duero fue desarrollado por Bouza *et al.* (2001). Estos autores definieron la existencia de dos grupos divergentes de poblaciones dentro de la cuenca, que denominaron como grupo Sur y grupo Norte. En el grupo Norte se encuentra prácticamente fijado el alelo *SMDH-*

*B1,2*75*, lo que coincidía con los resultados de las poblaciones analizadas en la cuenca del Duero por Sanz *et al.* (2000) y en consecuencia, este grupo Norte quedaría relacionado también con el linaje DU. El grupo Sur (prácticamente fijado para el alelo *sMDH-B1,2*100*) se encuentra relacionado con las poblaciones de los ríos atlánticos próximos al Duero dónde Cortey (2005) indica la presencia del linaje AT. En el grupo Norte se incluirían según Bouza *et al.* (2001) las poblaciones de trucha del Alto Duero, de la cuenca del Pisuerga y del Esla, mientras que al grupo Sur se asignarían las poblaciones del Cega, el Eresma, el Tormes y la cuenca baja del Duero. El AMOVA basado en una estructura jerárquica de las poblaciones según este modelo asigna, sin embargo, una importante proporción de la diferenciación poblacional (63.2%) a las poblaciones dentro del territorio de cada uno de los grupos de Bouza *et al.* (2001), en claro contraste con la proporción que asigna el modelo Afluente (13.4%, Tabla 3-5). Parece haber por tanto una incongruencia entre los resultados obtenidos mediante las dos técnicas. El patrón de diferenciación observado entre las poblaciones en base a la distribución de los linajes del ADN mitocondrial no coincide plenamente con la estructura poblacional descrita por los alozimas ya que en el Cega, Eresma y Tormes predominan los haplotipos del linaje DU. Sin embargo, este trabajo y el de Bouza *et al.* (2001) llegan a conclusiones similares, es decir, que la cuenca del Duero ha sido colonizada por dos linajes de trucha que actualmente se distribuyen de manera parapátrica.

Una situación parecida ha sido descrita en la salamandra rabilarga (*Chioglossa lusitanica*), especie endémica del noroeste de la Península Ibérica y en la que se han descrito dos unidades evolutivas genéticamente diferenciadas y también con ligeras diferencias ecológicas (Arntzen y Alexandrino 2004). Sequeira *et al.* (2005) han definido mediante análisis electroforéticos y mitocondriales la barrera entre ambas unidades poblacionales de la salamandra. Aunque dicha barrera se encuentra alrededor de la cuenca del río Mondego, resulta más estrecha y situada ligeramente más al norte para los respectivos haplotipos mitocondriales. Según estos autores, estas discrepancias entre marcadores nucleares y mitocondriales podrían ser debidas, principalmente, a la deriva genética. Sugieren, además, que estos contactos entre diferentes unidades

poblacionales podrían ser comunes durante el Pleistoceno en los refugios glaciares del Sur de Europa. Efectivamente, el menor tamaño efectivo (N_e) que para el ADN mitocondrial tienen las poblaciones aumenta su sensibilidad a los procesos de deriva y lo convierten también en un peor marcador para detectar los contactos secundarios entre linajes ya que se pierden rápidamente los haplotipos involucrados en el proceso (Lu *et al.* 2001). No obstante, en tal situación no se esperan patrones geográficos tan claros de la distribución de haplotipos como los observados en este trabajo (Sanz *et al.* 2006).

Otras hipótesis que podrían explicar esta discordancia entre marcadores nucleares y mitocondriales serían: (i) cruzamientos asimétricos entre los dos linajes de manera que machos AT se cruzan con hembras DU y no a la inversa, (ii) migración selectiva de los sexos en el grupo AT y (iii) procesos selectivos favoreciendo al linaje DU en las zonas de contacto. Aunque no se dispone de evidencias sobre los cruzamientos entre ejemplares de ambos linajes, en general se observa que las poblaciones de trucha de la cuenca se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (Sanz *et al.* 2000, Bouza *et al.* 2001) por lo que no parece que existan dinámicas de apareamientos clasificados. Así mismo, tampoco parece probable una migración selectiva de los machos del linaje AT hacia el interior de la cuenca. Como ya se ha comentado, la presencia del linaje AT en la cuenca del Duero estaría asociada a procesos de colonización a partir de ejemplares anádromos y, en la trucha común, las hembras son generalmente más migradoras que los machos (ver Klemetsen *et al.* 2003); por lo que se debería esperar un resultado contrario al observado, es decir, una mayor penetración del linaje AT en la depresión del Duero.

3.2.4. Evidencias de selección

Algunos autores han observado que cuando hibridan especies de climas fríos y cálidos, el ADN mitocondrial que persiste en las poblaciones híbridas es el ADN de la especie del clima frío. Así Glémet *et al.* (1998) observaron una introgresión del ADN mitocondrial del salvelino (*Salvelinus alpinus*), que tiene una distribución en zonas más frías, sobre la trucha de fontana (*S. fontinalis*), pero no a la inversa. Entre ciprínidos la especie adaptada al frío es también la donadora del ADN mitocondrial (Duvernell y Aspinwall 1995). En la Península Ibérica, Alves *et al.* (2003) detectaron en las poblaciones de liebre europea

(*Lepus europaeus*) y liebre ibérica (*Lepus granatensis*) haplotipos de *Lepus timidus*, especie que actualmente no presenta poblaciones naturales en la península. Según Melo-Ferreira *et al.* (2005), la persistencia de los haplotipos de la especie nórdica *Lepus timidus* en las especies ibéricas de liebre podría reflejar la ventaja selectiva de sus portadores en los períodos fríos de la zona norte de la península.

Aunque no está claro si por procesos adaptativos o estocásticos, en la trucha común los factores climáticos como la temperatura o las precipitaciones juegan un papel crítico en el reclutamiento de las poblaciones y por tanto en su supervivencia (ver por ejemplo Lobón-Cerviá y Rincón 2004, Borgstrøm y Museth 2005, Lobón-Cerviá y Mortensen 2005). En este contexto es remarcable que la distribución de los dos linajes de truchas en la cuenca del Duero coincide con diferencias en el rango de temperatura. El linaje DU se encuentra distribuido a lo largo de la depresión del Duero donde la temperatura media anual es de unos 5 °C inferior a la de la zona del macizo hespérico donde se encuentra el linaje AT, debido a la influencia en la zona más costera del océano Atlántico, que suaviza las temperaturas en los períodos invernales (Font-Tullos 2000).

Evidencias a favor de procesos selectivos pueden obtenerse mediante la comparación de los datos mitocondriales con datos de genes nucleares. En este trabajo ha sido posible analizar los desequilibrios entre la constitución haplotípica y nuclear de las poblaciones con evidencias de contactos entre los linajes (3-Duruelo y 9-Moros), gracias a la existencia de datos alozímicos para los loci más significativos (*sMDH-B1*, *βGLUA* y *PEPLT*, Sanz *et al.* 2000) recogidos previamente en estas muestras. Aunque los tests de probabilidades exactas en el caso de 3-Duruelo sólo detectan una significación marginal (Tabla 3-9), la proporción de haplotipos del linaje DU supera a la frecuencia de los genes nucleares asociados a este linaje (*sMDH-B1**75, *βGLUA**150 y *PEPLT**70). En 9-Moros dos de los tests resultaron altamente significativos en especial el del locus *sMDH-B1* para el que se observa una mayor proporción del linaje AT que la supuesta en base a los datos mitocondriales. En general parece que en estas poblaciones híbridas los haplotipos del linaje DU estarían favorecidos respecto a los genes nucleares del linaje.

Tabla 3-9. Comparación de la distribución de los dos linajes de trucha común de la cuenca del Duero mediante alozimas y ADNmt. Significación indica la probabilidad que las proporciones calculadas con los alozimas sea diferente a la estimada con el ADN mitocondrial.

Localidad/locus	DU origen	AT origen	Significación
3-Duruelo			
ADNmt	0.609±0.100	0.391±0.100	
sMDH-B1	0.375±0.063	0.625±0.063	0.081
βGLUA	0.370±0.063	0.630±0.063	0.079
PEP-LT	0.389±0.063	0.611±0.063	0.087
9-Moros			
ADNmt	0.958±0.045	0.042±0.045	
sMDH-B1	0.339±0.063	0.661±0.063	0.000
βGLUA	0.714±0.063	0.286±0.063	0.016
PEP-LT	0.875±0.045	0.125±0.045	0.424

Contribuye también a sospechar dinámicas selectivas relacionadas con los haplotipos mitocondriales el hecho de que no se obtenga idéntica distribución de las posiciones variables a lo largo de la región de control en los haplotipos nativos del linaje AT y DU. Así, mientras que en el linaje DU se detectan sólo 3 posiciones variables en el dominio izquierdo y 9 en el derecho (Tabla 3-10), en los doce haplotipos analizados del linaje AT, la acumulación de posiciones variables en ambos dominios es muy parecida (3 en el izquierdo y 5 en el derecho), un patrón que también se observa en los linajes AD y ME (haplotipos de los linajes AD y ME descritos en la Península Ibérica por Cortey *et al.* 2004). Tan sólo para el linaje DU parece existir una ligera significación en la distribución de posiciones variables-invariables entre los dominios 5' y 3' ($P=0.071$, en el Test de Fisher, Tabla 3-10).

Discernir si la cantidad de variación genética en una población es mantenida por selección natural o por deriva genética representa uno de los principales problemas de la genética de poblaciones. Tajima (1989) propuso un método estadístico para estudiar si el número de diferencias nucleotídicas entre las secuencias de ADN se ajustaban a las esperadas según un modelo de cambios neutros (no selectivos) en equilibrio mutación-deriva. Posteriormente, Fu y Li (1993) propusieron nuevos tests estadísticos para comprobar si la distribución de mutaciones en las secuencias de ADN eran selectivamente neutras.

Tabla 3-10. Tests de neutralidad para la distribución de las posiciones variables (S) en los linajes de trucha. Los cálculos de los estadísticos se realizó con el programa DNAsp 4.0 (Rozas *et al.* 2003). Los cálculos realizados utilizan los haplotipos de la Península Ibérica descritos en este trabajo (DU y AT) y en Cortey *et al.* (2004) (AD y ME).

Linaje	Nº haplotipos	S (extremo 5') 1-315	S (extremo 3') 700-1014	Test Fisher	D Tajima 5'	Tests de Fu y Li 5'	D Tajima 3'	Tests de Fu y Li 3'
DU	23	3	9	P= 0.0711	D=-1.7313 0.10>P>0.05	D*=-2.4937 0.10>P>0.05 F*=-2.6306 *P<0.05	D=-1.0304 NS	D*=-1.0774 NS F*=-1.2368 NS
AT	12	3	5	P= 0.3624	D=-0.8288 NS	D*=-0.9342 NS F*=-1.0255 NS	D=0.4967 NS	D*=-0.1352 NS F*=0.0292 NS
AD	17	4	9	P= 0.1309	D=-1.5768 NS	D*=-1.5691 NS F*=-1.8022 NS	D=-1.5138 NS	D*=-1.5531 NS F*=-1.7765 NS
ME	15	4	5	P= 0.5000	D=-1.2203 NS	D*=-0.5961 NS F*=-0.8694 NS	D=-1.4512 NS	D*=-1.7470 NS F*=-1.9077 NS

La aplicación de estos tests a las secuencias detectadas en la Península Ibérica para los diferentes linajes autóctonos de trucha común produce resultados significativos para el dominio 5' del linaje DU, especialmente para el estadístico F* de Fu y Li (1993). El valor negativo obtenido en todos los estadísticos para los tres tests, sugiere mecanismos selectivos actuando contra mutaciones deletéreas en este dominio.

El método de ventanas deslizantes (*sliding window*) implementado en el programa DNAsp 4.0 (Rozas *et al.* 2003) permite ver el comportamiento del valor del estadístico F* a lo largo de toda la secuencia de la región de control. En este método, un segmento de ADN (ventana) de una determinada longitud se desplaza en saltos sucesivos de n nucleótidos (salto de ventana) a lo largo de la secuencia. En cada paso se calcula el valor del estadístico que se asigna al nucleótido del punto medio de la ventana. En este trabajo la longitud de la ventana fue de 314 pb, que aproximadamente se corresponde con la del primer dominio de la región de control y el salto entre ventanas fue de 10 pb. Los análisis realizados en cada uno de los linajes nativos indican un comportamiento mutacional diferente en la cuenca del Duero del linaje DU respecto de los haplotipos del linaje AT (Fig.3-9).

Índices de neutralidad

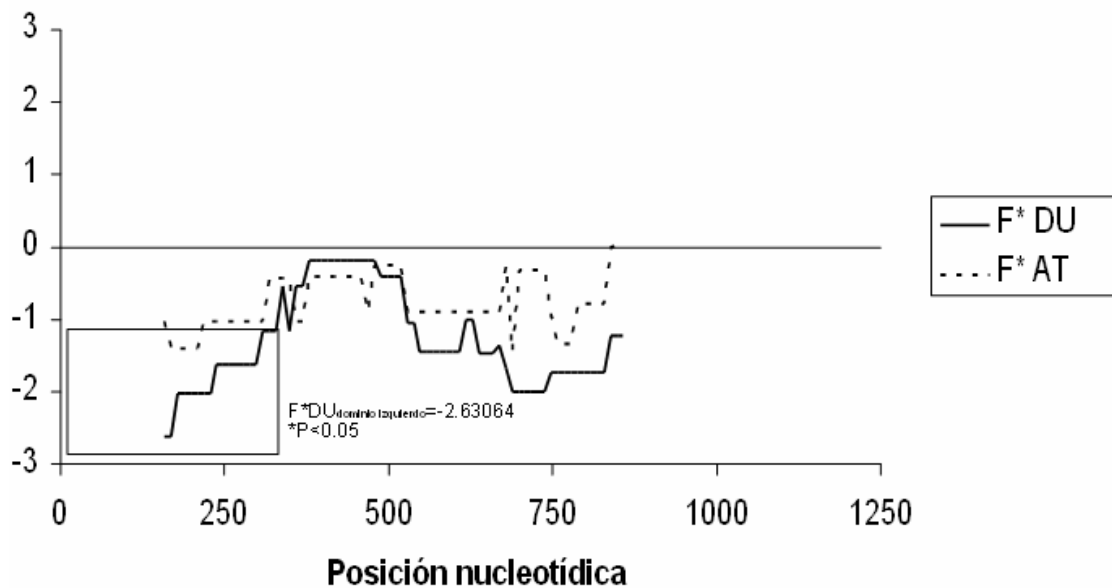


Figura 3-9. Distribución del estadístico F^* . Esta distribución se ha realizado con el programa DNAsp (Rozas *et al.* 2003) mediante el método de *Sliding window* que incorpora el programa y que permite estimar la evolución del estadístico a lo largo del fragmento analizado.

En el extremo 5' se encuentran localizadas 4 Secuencias de Terminación (TAS, *Terminated Associated Sequences*) implicadas en los señales de terminación para la formación del D-loop (Shedlock *et al.* 1992, Suárez *et al.* 2001, Cortey 2005). Además, tres de estas TAS se caracterizan por la presencia de repeticiones complementarias que generarían estructuras secundarias estables (Cortey 2005). Martín y Palumbi (1993) propusieron que las zonas con estructuras secundarias son menos susceptibles a almacenar cambios.

4. PATRÓN DE DIVERSIDAD GÉNÉTICA DE LA TRUCHA EN LOS PIRINEOS ORIENTALES

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Relaciones filogenéticas entre los haplotipos mitocondriales

En total se han observado 29 haplotipos diferentes pertenecientes a uno de los dos linajes nativos mediterráneos (AD y ME), de los cuales 9 no habían sido descritos con anterioridad, 1 del linaje AD y 8 del ME (Tabla 4-1). En esta zona se han observado tan sólo el 50% de todos los haplotipos del linaje AD descritos hasta la fecha (incluyendo los descritos por Cortey *et al.* 2004), pero cerca del 80% de los pertenecientes al linaje ME.

Entre los diferentes haplotipos AT, AD y ME analizados se han detectado 48 posiciones variables para la región de control. El cladograma de parsimonia estadística que reconstruyó las relaciones filogenéticas entre los haplotipos del linaje AD y ME de la Tabla 4-1 (Fig.4-1) definió un total de 18 clados de nivel 1 (7 clados para el linaje AD y 11 para el ME), 8 clados de nivel 2 (2-1, 2-3 y 2-4 del linaje AD y 2-5, 2-6, 2-7, 2-8 y 2-9 del linaje ME) y 3 clados de nivel 3 (uno que agrupaba a todos los haplotipos AD y dos para los haplotipos ME).

La nomenclatura de los clados de nivel 1 y 2 respeta la utilizada por Cortey *et al.* (2004). El clado 3-3 definido por primera vez en este trabajo parece estar restringido a la cuenca del río Llobregat. Es la primera vez que se ha muestreado con cierto detalle esta cuenca, en total 134 ejemplares de 6 muestras que incluían al propio Llobregat y a su afluente el Cardoner lo que seguramente ha permitido la detección de este nuevo grupo de haplotipos. La formación de este nuevo clado de nivel 3 es debida a una delección de dos nucleótidos en las posiciones 932 y 933, tratada como un único episodio mutacional (únicamente se indica un 0 en el cladograma de la Fig.4-1) común a todos los haplotipos del clado. Destaca también en este clado de nivel 3 la singularidad de los haplotipos del clado 2-9 que se comenta más abajo.

Tabla 4-1. Haplotipos de la región de control del ADN mitocondrial de trucha común detectados en la cuenca mediterránea. "-" indica posición idéntica y "x" indica *indels*. Los haplotipos descritos por primera vez en este trabajo se indican en negrita. Se indican con "a" los haplotipos de los linajes AD y ME descritos en Cortey et al. (2004) y no observados en este estudio.

Haplotipo	clados de nivel 2	26	44	49	79	80	126	146	196	235	236	262	344	389	390	403	428	449	465	484	530	533	589	662	664
		T	C	G	A	T	C	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	C	G	A	C	A	A	C	A
ATcs1		T	C	G	A	T	C	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	C	G	A	C	A	A	C	A
ATcs2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-
ATcs3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-
ATcs4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-
ADcs1	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs2 ^a	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs3 ^a	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs4	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs5 ^a	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs6	2-4	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs7	2-4	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	T	T	-	G	-	-
ADcs8	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs9 ^a	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs10 ^a	2-4	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs11 ^a	2-1	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs12	2-1	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs13	2-1	C	-	T	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs14 ^a	2-1	C	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs15 ^a	2-1	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs16	2-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs17	2-3	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs18 ^a	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	C	-	T	-	-	-	-
ADcs19 ^a	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs20 ^a	2-1	C	-	-	-	-	A	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs21	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs22 ^a	2-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
ADcs23	2-1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs1	2-5	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs2	2-7	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs3	2-5	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs4	2-6	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs5	2-6	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs6	2-5	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs7	2-7	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	T	T	-	-	-	-
MEcs8 ^a	2-5	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	A	-	-	T	T	-	-	-
MEcs9 ^a	2-5	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	C	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs10	2-5	C	-	-	G	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs11 ^a	2-5	C	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs12	2-6	C	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs13 ^a	2-5	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs14 ^a	2-5	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEcs15	2-5	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEca16	2-7	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEca17	2-7	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEca18	2-7	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEca21	2-6	C	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEca23	2-9	C	-	-	-	-	A	-	T	G	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEca25	2-8	C	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
MEca26	2-9	C	-	-	-	-	A	-	T	G	-	-	-	T	C	C	A	-	-	-	T	-	-	-	-
MEca27	2-9	C	-	-	-	-	A	-	T	G	-	-	-	T	C	C	-	-	-	-	T	-	-	T	T

Tabla 4-1. Continuación.

Haplotype	679	724	731	772	802	817	877	878	884	900	903	907	909	932	933	936	941	960	961	974	976	991	994	1003
ATcs1	C	C	A	C	C	T	T	T	C	A	A	C	T	T	A	C	*	T	T	A	T	C	A	T
ATcs2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-
ATcs3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-
ATcs4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	A	*	-	-	-	-	-	-	-
ADcs1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs2 ^a	T	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	C	-	-	-	T	-	C	-	-	-	-	-
ADcs3 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	A
ADcs4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	T	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs5 ^a	T	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	C	-	-	-	-	-
ADcs6	-	-	-	-	-	C	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs7	-	-	-	-	-	C	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs8	-	-	-	-	A	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs9 ^a	-	T	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs10 ^a	-	-	-	-	-	C	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs11 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs14 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs15 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	G	-	-	-	-
ADcs17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	G	-	-	-	-
ADcs18 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs19 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	C	-	-	-	-	-
ADcs20 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	G	-
ADcs22 ^a	-	-	-	-	-	C	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
ADcs23	-	-	-	-	-	-	-	C	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
MEcs1	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs2	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	A	-	-
MEcs3	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	G	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs4	T	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	A	-	-
MEcs5	T	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs6	-	-	-	-	-	-	-	G	G	-	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs7	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	A	-	-
MEcs8 ^a	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs9 ^a	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs10	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs11 ^a	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs12	T	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs13 ^a	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	G	-	-	-
MEcs14 ^a	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs15	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs16	-	-	-	G	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	A	-	-
MEcs17	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	A	-	-
MEcs18	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	A	-	-
MEcs21	T	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	A	-	-
MEcs23	-	-	T	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs25	-	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs26	-	-	T	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-
MEcs27	-	-	T	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	*	C	-	-	-	-	-	-

Tabla 4-2. Poblaciones analizadas para los análisis espaciales en los Pirineos Orientales. AD, ME y AT corresponden, respectivamente, al linaje Adriático, Mediterráneo y Atlántico.

Código	Cuenca	Linajes Clados	AD			ME			AT			
			2-1	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9		
1-Tech	Tech	Año Captura 2002				16						
2e-Vallter 03	Ter	2003	6			2	34					
3-Massanes	Ter	1993	7			3						
4-Queralbs	Ter	1993	18			3		7				
5b-Núria 01	Ter	2001	13					3				
6-Rigart 99	Ter	1999	5					17				
7-Riera Monells	Llobregat	2002				16	2	6				3
8-Arrija	Llobregat	2002										39
9c-Riutort 02	Llobregat	2002				19						7
10-Castellar	Llobregat	2002									26	
11-Aiguadeval I	Llobregat	2002									8	
12-Aiguadeval II	Llobregat	2002				3			2		3	
13c-Pla de Boet 02	Pallaresa	2002				16						16
14a-Vallferrera I	Pallaresa	2002	1			15						
15d-Vallferrera II	Pallaresa	2003	5			24						1
16d-Vallferrera III	Pallaresa	2003	2			38						
17-Areu I	Pallaresa	2003	9			42						2
18-Areu II	Pallaresa	2003				32						1
19-Alins	Pallaresa	2002	4			10						
20a-Tor 93	Pallaresa	1993				18						
21c-Ainet Cardos 02	Pallaresa	2002	10			16						
22a-Cardós	Pallaresa	2003	7			23						1
23a-Manyanet 93	Pallaresa	1993	4		12	7						

Tabla 4-2. Continuación.

Código	Linajes Clabos	Año Captura	AD			ME			AT			
			2-1	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9		
24-Contraig	Cuenca	1993	5	14		2						
25b-Nicolau 99	Ribagorzana	1999		16								1
26c-Cavallers 02	Ribagorzana	2002		23			1					
27-Malpàs	Ribagorzana	2002	9		3	4						
28c-P.Conangles 02	Ribagorzana	2002	18									6
29-N.Ribagorzana I	Ribagorzana	2002	16									4
30-N.Ribagorzana II	Ribagorzana	2002	14	1								2
31-N.Ribagorzana III	Ribagorzana	2002	8	1		9						
32-N.Ribagorzana IV	Ribagorzana	2002	2	3		5						
33-Salenques I	Ribagorzana	2002	18									
34-Salenques II	Ribagorzana	2002	14									
35-Llausest	Ribagorzana	2002	1	13								
36-Estet	Ribagorzana	2002	4	2		4						
37-Ribera	Ribagorzana	2002		1		19						
38-Ballera	Ribagorzana	2002		5		11						
39-San Silvestre	Ribagorzana	2002		3		36						
40-Aciron	Cinca	1993				5						
41-Otal	Cinca	1993	18									
Total			218	82	15	398	37	33	2	37	83	

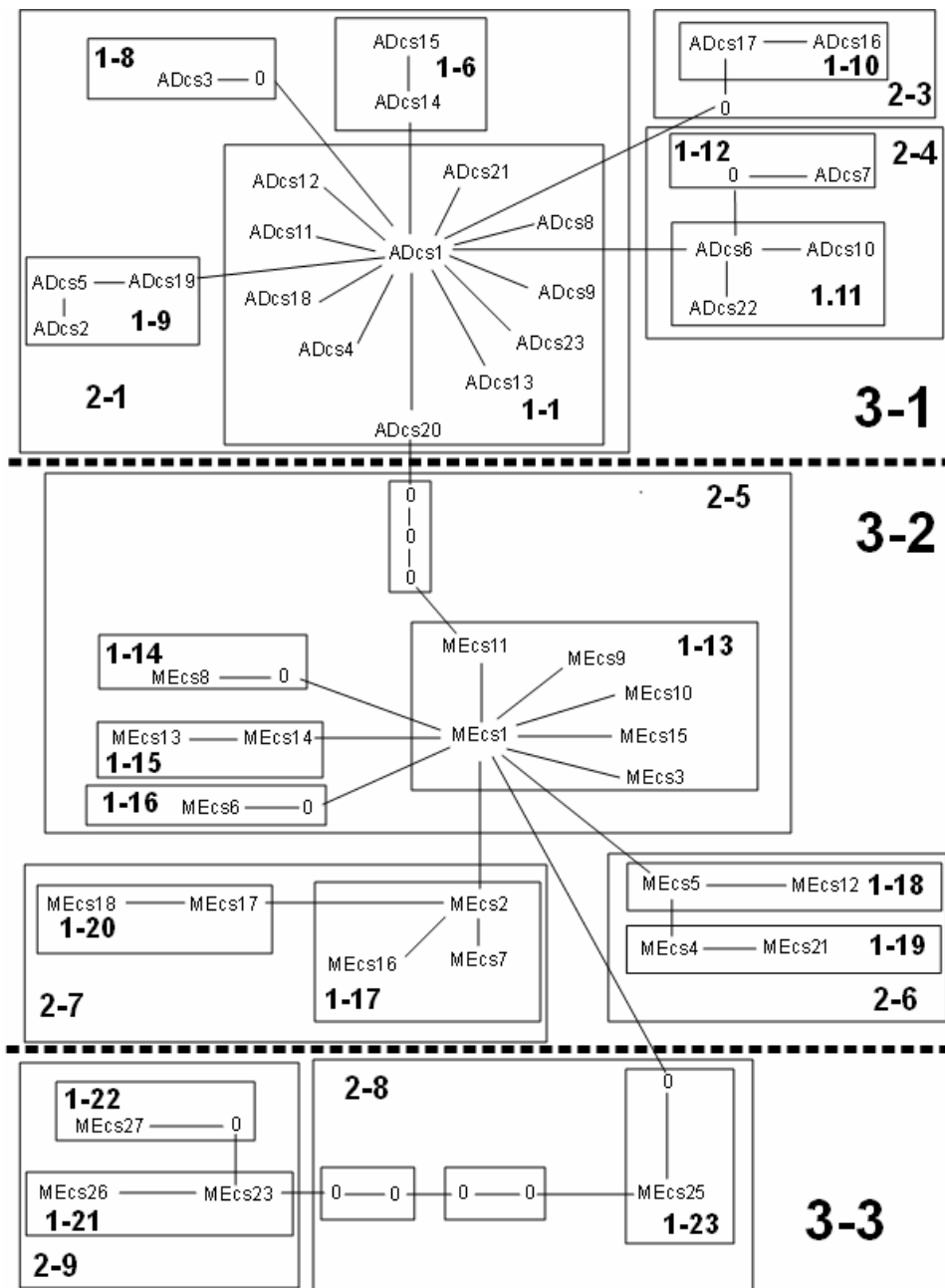


Figura 4-1. Diseño de clados entre los haplotipos detectados en la cuenca mediterránea. Cada línea representa un paso mutacional. Los ceros indican un nodo interior no detectado en las poblaciones. Los haplotipos están descritos en la Tabla 4-1.

La distancia Tamura-Nei entre haplotipos del linaje AD fue de 0.001046 ± 0.000772 , y de 0.002573 ± 0.001530 entre haplotipos del linaje ME. La divergencia promedio entre haplotipos de ambos linajes fue de 0.006306. Los clados de nivel dos más abundantes fueron el 2-5 con 195 individuos distribuidos en 17 poblaciones y el 2-1 con 157 individuos distribuidos en 16

poblaciones (Tabla 4-2). Estos dos clados incluyen respectivamente a los haplotipos centrales del linaje ME (MEcs1) y AD (ADcs1), que son los más abundantes en este estudio y en la cuenca mediterránea en general (Cortey *et al.* 2004). El clado 2-3, que ha sido el tercero en abundancia con 82 individuos, se encuentra restringido a la cuenca del Ribagorzana. La distancia Tamura-Nei dentro de los 8 clados de tipo 2 definidos en la zona varió entre 0 para aquellos clados con un único haplotipo (por ejemplo el clado 2-8, formado únicamente por el haplotipo MEcs25) y 0.000905 para el clado 2-7 (Tabla 4-3). Los valores más reducidos de las distancias entre clados de nivel 2 se obtuvieron entre los clados pertenecientes al mismo linaje mitocondrial (0.000200 entre el clado 2-5 y 2-8), produciéndose los valores más elevados entre pares de clados de dos diferentes linajes mitocondriales (0.008610 entre el 2-3 y el 2-6). Es de destacar, la gran distancia detectada entre el clado 2-9 del linaje ME, restringido a la cuenca de Llobregat, y el resto de clados. En este caso, los valores de diferenciación son elevados con respecto a los clados del linaje AD (0.006325-0.007907), pero es también importante la divergencia de este clado con los otros del propio linaje ME (rango entre 0.005051-0.006810), que supera ampliamente la divergencia promedio obtenida entre clados del mismo linaje.

Tabla 4-3. Matriz de distancia Tamura-Nei entre los clados de tipo 2 detectados en los Pirineos Orientales. AD y ME corresponden, respectivamente, a los linajes Adriático y Mediterráneo.

Clados	2-1 (AD)	2-3 (AD)	2-4 (AD)	2-5 (ME)	2-6 (ME)	2-7 (ME)	2-8 (ME)	2-9 (ME)
2-1 (AD)	0.000432							
2-3 (AD)	0.003105	0.000261						
2-4 (AD)	0.001428	0.003991	0.000330					
2-5 (ME)	0.005397	0.006975	0.006286	0.000380				
2-6 (ME)	0.006992	0.008574	0.007885	0.002162	0.000427			
2-7 (ME)	0.006706	0.008041	0.007541	0.001755	0.001784	0.000905		
2-8 (ME)	0.005246	0.006827	0.006137	0.000200	0.001965	0.001558	0.000000	
2-9 (ME)	0.006325	0.007907	0.007215	0.005253	0.006810	0.006256	0.005051	0.000165

De acuerdo con los resultados de Bernatchez *et al.* (1992) y Cortey *et al.* (2004), el análisis de 220 nucleótidos del extremo 3' de la región de control, permite diferenciar tanto los tres linajes mitocondriales detectados, AD, ME y

AT, como a la práctica totalidad de los clados de nivel 2 de los linajes AD y ME. Así, una transición A-G en la posición 900 permite separar los haplotipos de piscifactoría de los haplotipos nativos, y la inserción de una T en la posición 941 permite discriminar entre haplotipos del linaje AD y ME (Tabla 4-1). De esta manera, un simple estudio restringido a estos últimos 220 nucleótidos resulta ya informativo sobre la distribución de los linajes nativos en la zona y la incidencia de las repoblaciones con ejemplares noreuropeos. Además, esta aproximación permite también prácticamente distinguir entre los clados de nivel 2, tan sólo los 4 haplotipos del clado 2-6, caracterizados por una transición C-T en la posición 679 pasan inadvertidos y son asignados erróneamente a los clados 2-5 (haplotipos MEcs5 y MEcs12) o 2-7 (haplotipos MEcs4 y MEcs21). No obstante, esta fuente de error resulta de menor importancia si se tiene en cuenta que, tanto en los análisis anteriores de Cortey *et al.* (2004) como en el presente estudio, este clado es sólo abundante en la población de 2-Vallter en la cuenca del río Ter. Fuera de esta cuenca sólo se han detectado 2 ejemplares en 7-Riera Monells y uno más en 26c-Cavallers 02. Es decir, esta fuente de error sólo sería relevante en la identificación de los clados presentes en la población de 2-Vallter, aunque en ella la presencia de los clados 2-5 y 2-7 es baja o nula.

4.1.2. Variabilidad genética entre y dentro de cuencas fluviales

El análisis de la variabilidad matriarcal de los Pirineos Orientales incorpora los datos de 905 individuos de 41 localidades (Tabla 4-2). Para las localidades con más de una muestra se ha incorporado al análisis la muestra más reciente, salvo en 14-Vallferrera I donde se eligió la muestra de 2002 porque duplica en número de ejemplares a la de 2003 (16 versus 8), y 20-Tor y 23-Manyanet en la que se analizan las muestras de 1993 y no las de 1999 debido al ya citado problema de descongelación que afectó a estas últimas. En total se han detectado haplotipos del linaje AT típicos de repoblación en 83 ejemplares (9.17% del total) de 12 muestras: 7-Riera Monells, 8-Arija, 9c-Riutort 02, 13c-Pla de Boet 02, 15d-Vallferrera II, 17-Areu I, 18-Areu II, 22a-Cardós, 25b-Nicolau 99, 28c-P.Conangles 02, 29-N.Ribagorzana I, 30-N.Ribagorzana II (Tabla 4-1). Además destaca la muestra 8-Arija (N= 39 individuos), donde todos los individuos capturados poseían haplotipos de repoblación. Esta

muestra, al igual que el resto de individuos con haplotipos de repoblación, no se tuvo en cuenta en los análisis poblacionales realizados posteriormente. De los 804 ejemplares con haplotipo nativo, 315 tenían haplotipos del linaje AD y 489 del linaje ME.

Aunque en general la diversidad haplotípica (h) fue baja, con un valor medio de 0.2649 ± 0.0016 (rango entre 0 en las muestras monomórficas hasta 0.7500 ± 0.0965 en la muestra de 11-Aiguadeval II), 26 de las 40 muestras (se eliminó la muestra introducida de 8-Arija) presentaron 2 o más clados de nivel 2. Además, en la mayoría de las muestras polimórficas (23 de 26, 88.46%) se detectaron ambos linajes mitocondriales, AD y ME (Tabla 4-2 y 4-4). Sin embargo, a pesar de la presencia de dos linajes en numerosas poblaciones, también fueron bajos en general los valores de diversidad nucleotídica (valor medio $d = 0.001368 \pm 0.000000$, rango $0.000000-0.003938$).

Tabla 4-4. Diversidad haplotípica (h), diversidad nucleotídica (d) y clados de tipo 2 detectados en las localidades del Pirineo oriental. Entre paréntesis se indica la desviación estándar.

Población	h	d	Clados nivel 2
1-Tech	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-5
2e-Vallter 03	0.3298 (0.08435)	0.001903	2-1, 2-5, 2-6
3-Massanes	0.4667 (0.13176)	0.002519	2-1, 2-5
4-Querals	0.5317 (0.08287)	0.003104	2-1, 2-5, 2-7
5b-Núria 01	0.3250 (0.12510)	0.002179	2-1, 2-7
6-Rigart 99	0.3680 (0.10017)	0.002468	2-1, 2-7
7-Riera Monells	0.5072 (0.09287)	0.000939	2-5, 2-6, 2-7
9c-Riutort 02	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-5
10-Castellar	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-9
11-Aiguadeval I	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-9
12-Aiguadeval II	0.7500 (0.09650)	0.002814	2-5, 2-8, 2-9
13c-Pla de Boet 02	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-5
14a-Vallferrera I	0.1250 (0.10644)	0.000675	2-1, 2-5
15d-Vallferrera II	0.2956 (0.09300)	0.001595	2-1, 2-5
16d-Vallferrera III	0.0974 (0.06212)	0.000526	2-1, 2-5
17-Areu I	0.2965 (0.06956)	0.001600	2-1, 2-5
18-Areu II	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-5
19-Alins	0.4396 (0.11198)	0.002372	2-1, 2-5
20a-Tor 93	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-5
21c-Ainet Cardos 02	0.4923 (0.05127)	0.002657	2-1, 2-5
22a-Cardós	0.3701 (0.08414)	0.001998	2-1, 2-5
23a-Manyanet 93	0.6324 (0.06452)	0.002955	2-1, 2-4, 2-5
24-Contraig	0.5143 (0.10149)	0.002222	2-1, 2-3, 2-5
25b-Nicolau 99	0.1176 (0.10115)	0.001009	2-3
26c-Cavallers 02	0.0833 (0.07493)	0.000714	2-3, 2-6
27-Malpàs	0.6250 (0.09343)	0.002569	2-1, 2-4, 2-5
28c-P.Conangles 02	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-1
29-N.Ribagorzana I	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-1
30-N.Ribagorzana II	0.1333 (0.11230)	0.000414	2-1, 2-3
31-N.Ribagorzana III	0.5817 (0.06075)	0.003112	2-1, 2-3, 2-5
32-N.Ribagorzana IV	0.6889 (0.10384)	0.003938	2-1, 2-3, 2-5
33-Salenques I	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-1
34-Salenques II	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-1
35-Llauset	0.1429 (0.11881)	0.000444	2-1, 2-3

Tabla 4-4. Continuación

Población	h	d	Clados nivel 2
36-Estet	0.7111 (0.08600)	0.003711	2-1, 2-3, 2-5
37-Ribera	0.1000 (0.08799)	0.000697	2-3, 2-5
38-Baliera	0.4583 (0.09535)	0.003197	2-3, 2-5
39-San Silvestre	0.1457 (0.07240)	0.001017	2-3, 2-5
40-Aciron	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-5
41-Otal	0.0000 (0.00000)	0.000000	2-1
Promedio	0.2582 (0.00161)	0.001368 (0.0000000)	
Total	0.6867 (0.01200)	0.003570	

La presencia de los dos linajes en más de la mitad de las muestras confirma el elevado grado de contactos secundarios entre linajes de trucha producidos en la zona (Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004). En general, y después del presente estudio que elevó a 6 las localidades estudiadas en la cuenca del río Llobregat, esa cuenca parece la única libre de contactos entre linajes ya que sólo se detectó el linaje ME. Se puede ver también que alguno de los afluentes del Ebro, como el Noguera Ribagorzana es dominio casi exclusivo del linaje AD, con la excepción de su tributario Baliera (muestras 37, 38 y 39).

Todos los AMOVA realizados ponen de relieve una elevada diferenciación entre las poblaciones pirenaicas de trucha común (Tabla 4-5). Así, en el AMOVA "General" prácticamente 2/3 de la diversidad génica total (63.50%), es debida a la diferenciación entre poblaciones. El análisis basado en la jerarquía hidrográfica (AMOVA "Pirineos-I") indica que una parte importante de esta diferenciación se encuentra entre las diferentes poblaciones de un río (54.22%), siendo de menor cuantía (11.60%) las que se observan entre los 4 ríos analizados en este estudio (Tech, Ter, Llobregat y Ebro). Resultados similares se obtienen si se consideran los grandes afluentes del Ebro (Noguera Pallaresa, Noguera Ribagorzana y Cinca) como cuencas "independientes" y al mismo nivel que los ríos Tech, Ter y Llobregat (AMOVA "Pirineos-II"). En este caso, sin embargo, se duplica y convierte en estadísticamente significativa la diferenciación entre cuencas, sugiriendo algún nivel de aislamiento entre las poblaciones de los afluentes del Ebro. No obstante, el AMOVA realizado en dicha cuenca (AMOVA "Ebro") puso de manifiesto que sólo el 26.32% de la diversidad respondía a la diferenciación entre los afluentes estudiados (Pallaresa, Ribagorzana y Cinca). De hecho, en la cuenca del Ebro y, especialmente en la del Ter (AMOVA "Ter"), es donde se observa que la mayor parte de la diversidad se encuentra dentro de las poblaciones.

Tabla 4-5. AMOVAs espaciales en los Pirineos Orientales. df: grados de libertad.

Modelo	Fuente de Variación	df	Suma de cuadrados	Componentes	Varianza	% Varianza	Estadísticos- Φ	P
General	Dentro poblaciones	782	0.509	0.00067	36.50	0.63500 (Φ ST)	<0.001	
	Entre poblaciones	39	0.927	0.00116	63.50			
	Total	821	1.436	0.00182	100			
Pirineos-I	Dentro poblaciones	782	0.509	0.00067	34.18	0.65822 (Φ ST)	<0.001	
	Entre poblaciones dentro de río	36	0.776	0.00106	54.22	0.61337 (Φ SC)	<0.001	
	Entre ríos (Tech, Ter, Llobregat, Ebro)	3	0.151	0.00023	11.60	0.11599 (Φ CT)	0.05	
Total	821	1.436	0.00195	100				
Pirineos-II	Dentro poblaciones	782	0.509	0.00067	34.33	0.65668 (Φ ST)	<0.001	
	Entre poblaciones dentro de río	34	0.573	0.00082	42.36	0.55233 (Φ SC)	<0.001	
	Entre ríos (Tech, Ter, Llobregat, Pallaresa, Ribagorzana, Cinca)	5	0.354	0.00045	23.31	0.23310 (Φ CT)	0.003	
Total	821	1.436	0.00194	100				
Ter	Dentro poblaciones	113	0.134	0.00119	52.40	0.46502 (Φ ST)	<0.001	
	Entre poblaciones dentro de afluente	3	0.029	0.00047	20.54	0.28125 (Φ SC)	<0.001	
	Entre afluentes (Ter, Freser)	1	0.050	0.00061	26.96	0.26960 (Φ CT)	<0.001	
Total	117	0.214	0.00227	100				
Llobregat	Dentro poblaciones	80	0.021	0.00026	10.62	0.89379 (Φ ST)	<0.001	
	Entre poblaciones dentro de afluente	3	0.015	0.00032	13.06	0.55152 (Φ SC)	<0.001	
	Entre afluentes (Llobregat, Cardener)	1	0.086	0.00185	76.32	0.76319 (Φ CT)	<0.001	
Total	84	0.121	0.00243	100				
Ebro	Dentro poblaciones	574	0.428	0.00077	39.19	0.60809 (Φ ST)	<0.001	
	Entre poblaciones dentro de afluente	26	0.370	0.00068	34.49	0.46809 (Φ SC)	<0.001	
	Entre afluentes (Pallaresa, Ribagorzana, Cinca)	2	0.192	0.00052	26.32	0.26321 (Φ CT)	0.002	
Total	602	0.990	0.00196	100				
Pallaresa	Dentro poblaciones	283	0.188	0.00070	63.93	0.36070 (Φ ST)	<0.001	
	Entre poblaciones dentro de tributario	8	0.010	0.00003	2.39	0.03610 (Φ SC)	0.030	
	Entre tributarios (Vallferrera, Cardós, Manyanet)	2	0.048	0.00037	33.68	0.33676 (Φ CT)	0.020	
Total	293	0.246	0.00110	100				
Ribagorzana	Dentro poblaciones	269	0.166	0.00062	32.51	0.67491 (Φ ST)	<0.001	
	Entre poblaciones dentro de tributario	8	0.036	0.00022	11.71	0.26488 (Φ SC)	<0.001	
	Entre tributarios (Sant Nicolau, N.Tort, Malpás, Ribagorzana, Palenques, Llauset, Estet, Ballera)	7	0.278	0.00106	55.78	0.55778 (Φ CT)	<0.001	
Total	284	0.481	0.00190	100				
Cinca	Dentro poblaciones	21	0.000	0.00000	0	1.00000 (Φ ST)	<0.001	
	Entre poblaciones	1	0.021	0.00270	100			
	Total	22	0.021	0.00270	100			

Por el contrario, el AMOVA con las muestras nativas de la cuenca del Llobregat indica que es poca la diversidad intrapoblacional, pero muy elevada la diferenciación interpoblacional. Así, las muestras de tributarios del curso principal (7-Riera Monells y 9c-Riutort 02) forman un grupo poblacional diferenciado al observado en el afluente Cardoner (10-Castellar, 11-Aiguadevall I y 12-Aiguadevall II) (Fig.4-2). Como ya se ha indicado, estas poblaciones del Cardoner presentan en alta frecuencia haplotipos del clado 2-9, clado que además parece restringido a este afluente.

Entre los afluentes del Ebro (Noguera Pallaresa, Noguera Ribagorzana y Cinca) también se detectan diferencias en el patrón de distribución de la diversidad. En la Noguera Pallaresa, es alta la variabilidad intrapoblacional y baja la diferenciación interpoblacional ($\Phi_{CT}=33.68\%$). En la Noguera Ribagorzana y el Cinca predomina el aislamiento entre los tributarios ($\Phi_{CT}=55.78\%$) y es menor la diversidad intrapoblacional.

Tanto en el dendrograma (Fig.4-2) como en el análisis de PCO (Fig.4-3), las muestras quedaron generalmente agrupadas según el linaje con presencia más abundante, independientemente de su localización hidrográfica. Así, las muestras como 1-Tech, 9c-Riutort 02, 13c-Pla de Boet 02, 18-Areu II, 20-Tor 93, 40-Acirón, pertenecientes a distintas cuencas hidrográficas quedaban unidas debido a que todas ellas poseían únicamente el clado 2-5 del linaje ME. En el otro extremo, se encuentran las muestras 28c-P.Conangles 02, 29-N.Ribagorzana, 33-Salenques I y 34-Salenques II, o las de 25b-Sant Nicolau 99, 26c-Cavallers 02 y 35-Llauset, donde respectivamente están fijados o prácticamente fijados los clados 2-1 y 2-3 del linaje AD. La importancia de la abundancia relativa de cada uno de los linajes en las agrupaciones de las poblaciones se pone de manifiesto en la alta variación (77%) explicada por la primera coordenada del PCO, y que distribuye las muestras analizadas de acuerdo al patrón de mínima (valores negativos) a máxima (valores positivos) abundancia de linaje ME (o a la inversa para el caso de linaje AD). La segunda coordenada del PCO destaca la singularidad de las poblaciones del Cardoner (muestras 10, 11 y 12), afluente del Llobregat, como resultado de la ya citada presencia exclusiva del altamente divergente clado 2-9 del linaje ME.

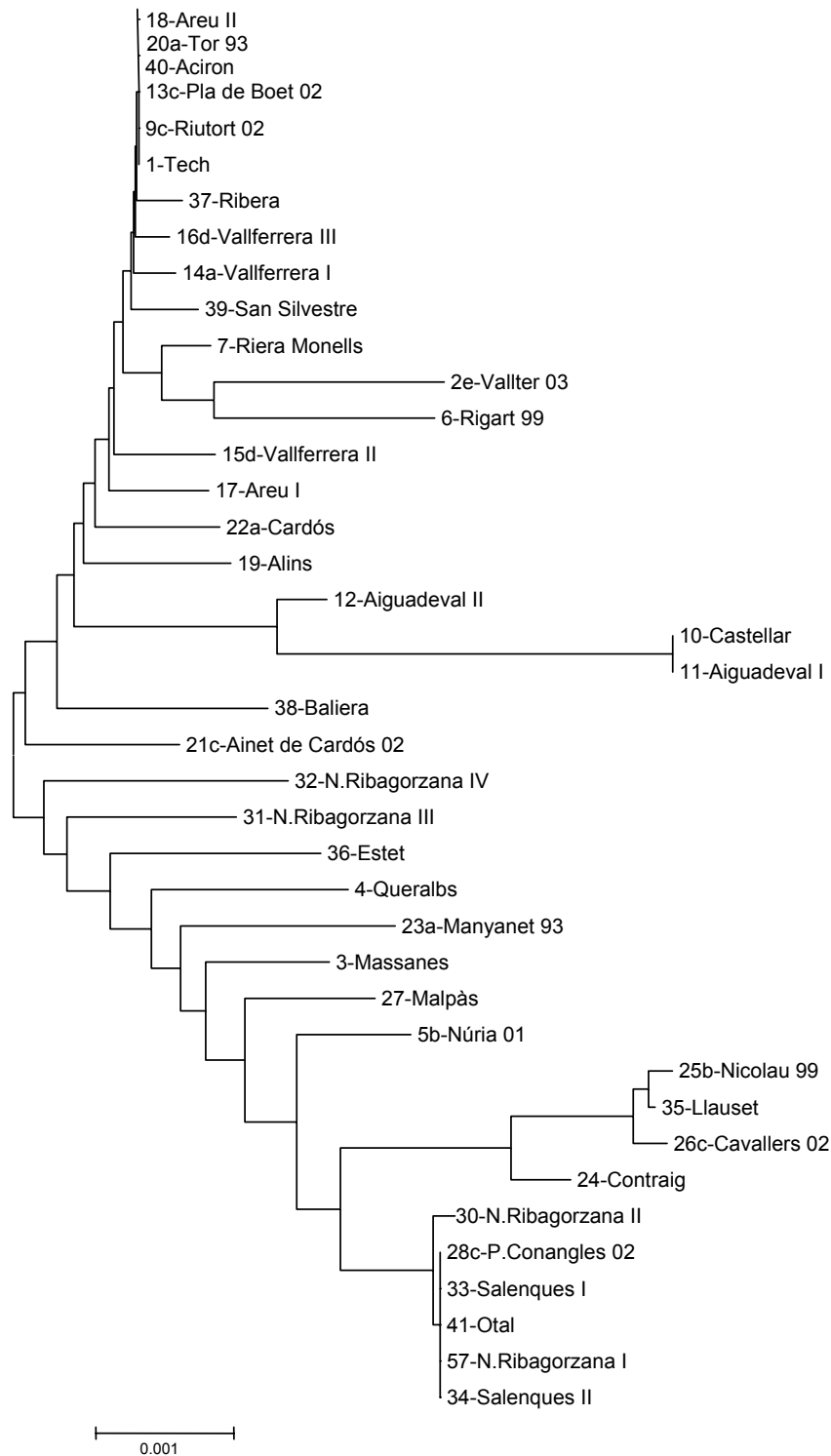


Figura 4-2. Dendrograma Neighbor-Joining entre las poblaciones de trucha común del Pirineo Oriental utilizando la matriz de distancia apareada (Tamura-Nei) entre ellas. Los códigos de las poblaciones se indican en la Tabla 4-2.

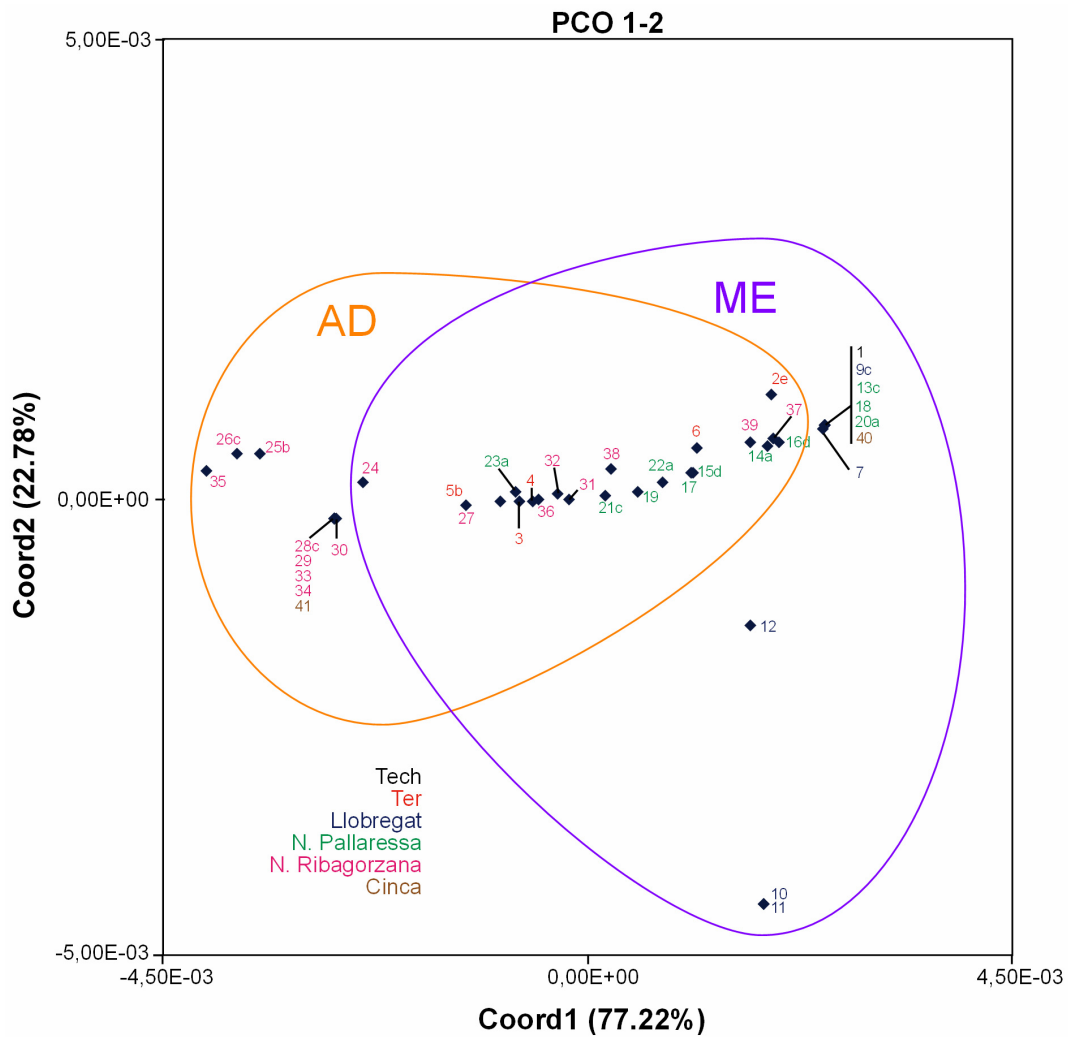


Figura 4-3. Análisis de Componentes Principales. AD y ME hacen referencia a los linajes Adriático y Mediterráneo, respectivamente. Los números hacen referencia a las muestras de la Tabla 4-2. Los óvalos incluyen muestras con más del 5% de haplotipos del linaje.

En general, existe una baja aunque significativa correlación entre la distancia geográfica y genética de las muestras ($R=0.17426$, $P=0.0117$). Esta significación entre ambas distancias parece ser reflejo del patrón de diferenciación entre las poblaciones del Ebro ya que en los ríos de la cuenca interna, Ter y Llobregat, aunque la correlación entre ambas distancias es superior, no resulta significativa (Tabla 4-6). La correlación más alta se obtuvo para las 10 muestras estudiadas de la Noguera Pallaresa a lo largo de 85Km de curso fluvial. En este caso, la correlación parece reflejar el cambio en la abundancia relativa de los linajes ME y AD. Así, el primero es muy abundante en la cuenca alta de la Noguera Vallferrera (muestras 13c-Pla de Boet 02 y 14a-Vallferrera I) mientras que a medida que se desciende por el curso fluvial

aumenta el número individuos con haplotipos del linaje AD (por ejemplo en 22a-Cardós y 23a-Manyanet).

Tabla 4-6. Correlación entre distancias genéticas y geográficas en el Pirineo. “Pirineos” corresponde a los resultados utilizando todas las poblaciones. Ter, Llobregat, Ebro, Pallaresa y Ribagorzana hacen referencia a los resultados utilizando las localidades (N) dentro de las cuencas o afluentes correspondientes indicados en la Tabla 4-2. Gmax: máxima distancia hidrográfica lineal entre dos muestras

Área geográfica	N	Gmax (Km)	R (índice de correlación)	P
Pirineos	40	793	0.17426	0.0117*
Ter	5	56	0.51725	0.1277 NS
Llobregat	5	135	0.58852	0.1811 NS
Ebro	28*	342	0.23813	0.0027***
Pallaresa	11	85	0.88583	0.0075***
Ribagorzana	16	55	0.27327	0.0227*

* incluye además de las muestras de el Noguera Ribagorzana y el Noguera Pallaresa y las dos muestras del Cinca.

4.1.3. Estabilidad temporal de la estructura geográfica

Este análisis se realizó sobre un conjunto de localidades en las cuencas fluviales de las que el Laboratorio de Ictiología Genética disponía de diferentes muestras recogidas en un periodo de aproximadamente 10 años. Sin embargo, dados los problemas de descongelación que han afectado a las muestras de 1999, en primer lugar y para agilizar el genotipado de los individuos, se comprobó si la identificación de los haplotipos y su asignación a clados de nivel 2 de acuerdo con la secuencia en los 220 nucleótidos finales del extremo 3' de la región de control tal y como se indica en el apartado 4.1.1 (ver también Tabla 2-3) reproducía de manera correcta los patrones de diferenciación. Para ello se utilizaron 6 muestras capturadas por el laboratorio entre los años 1990 y 1993 (2a-Vallter 90, 4-Queralbs, 9a-Riutort 90, 21a-Ainet de Cardós 93, 23a-Manyanet 93, 28a-Conangles 93) de las que se disponía de las secuencias completas de los ejemplares capturados. Según se observa en la Tabla 4-7, los resultados obtenidos mediante ambas aproximaciones son muy parecidos y prácticamente idénticos en el caso de Φ_{ST} y F_{ST} (0.432 y 0.459 utilizando los

haplotipos de la secuencia completa de la región de control, 0.457 y 0.463 utilizando los clados de tipo 2).

Tabla 4-7. Componentes de diversidad mitocondrial y diferenciación entre muestras seleccionadas del Pirineo. N: muestras analizadas en cada caso, ds:diversidad nucleotídica media entre las muestras y dt: diversidad nucleotídica total.

	N	ds	dt	Diferenciación entre las muestras	
				Φ_{ST}	F_{ST}
Pirineos-93 ^a	6	0.001925	0.003491	0.432	0.459
Pirineos-93 ^b	6	0.001778	0.003310	0.457	0.463
Pirineos-93 ^b	10	0.001067	0.003160	0.578	0.575
Pirineos ^b	40 ^c	0.001368	0.003570	0.635 ^c	0.635

a: Cálculos a partir de los haplotipos de secuencia completa de la región de control del ADNmt

b: Cálculos a partir de la distancia Tamura-Nei entre los clados de nivel 2 (Tabla 4-3)

c: Calculados con todas las localidades de la Tabla 4-4

No obstante, los patrones de diversidad y diferenciación de estas 6 localidades son sensiblemente diferentes a los obtenidos en el análisis del Pirineo Oriental, las diversidades nucleotídicas de las muestras (ds) están sobrestimadas, mientras que la diferenciación (Φ_{ST} y F_{ST}) esta infraestimada. Por esta razón, en el análisis de la estabilidad temporal se utilizó el máximo de localidades (10) de las que el LIG disponía de muestras temporales (Tabla 4-8). En este contexto, se consideró que las muestras 5a-Nuria 98 y 5b-Nuria 01, capturadas no más de 100 m aguas arriba del punto 4-Queralbs y en el mismo curso fluvial, representan réplicas temporales de esta localidad. Lamentablemente, de las localidades 20-Tor, 23-Manyanet y 25-Nicolau, no se disponía de réplicas en el año 2002. De la primera de ellas (20-Tor) puede dar una idea la muestra de 19-Alins (Tabla 4-2), capturada en 2002 unos 1000 metros aguas abajo de la muestra de 20-Tor, aunque en este caso se optó por no incluirla en los análisis por situarse ya en la Noguera de Vallferrera a la que vierte sus aguas la Noguera de Tor. Los análisis sobre diversidad y estructura poblacional en el Pirineo Oriental con estas 10 localidades de 4 cuencas fluviales (Ter, Llobregat, Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana) se ajustan mejor al patrón obtenido con el conjunto de 40 muestras utilizadas en el apartado 4.1.2.

Tabla 4-8. Fluctuaciones temporales en poblaciones del Pirineo catalán. Dif: coeficientes de diferenciación nucleotídica (Φ_{ST}) y haplotípica (F_{ST}).

Población	Cuenca	Nativos						Repoblación				
		Linaje AD			Linaje ME			Dif.		AT	Dif.	
		2-1	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	Φ_{ST}	F_{ST}			Φ_{ST}
2a-Vallter 90	Ter	1			5	8	1					
2b-Vallter 99	Ter	4			1	10	4	0.050 ^a	0.060 ^b		-	-
2d-Vallter 02	Ter	14			1	23						
4-Queralt (93)		18			3		7					
5a-Núria 98	Ter	14			1	1		0.043	0.067 ^a		-	-
5b-Núria 01	Ter	13					3					
9a-Riutort 90	Llobregat				20					1		
9b-Riutort 99	Llobregat	1			14			0.017	0.017	10	0.125b	0.124b
9c-Riutort 02	Llobregat				19					7		
13a-Pla de Boet 93	Pallaresa				3							
13b- Pla de Boet 99	Pallaresa				8			0.000	0.000	5	0.041	0.041
13c-Pla de Boet 02	Pallaresa				16					16		
20a-Tor 93	Pallaresa				18							
20b-Tor 99	Pallaresa	7			13			0.301 ^c	0.301 ^b	2	0.271c	0.281c
21a-Ainet Cardos 93	Pallaresa	9			16							
21b-Ainet Cardos 99	Pallaresa	7		1	15			0.000	0.000		-	-
21c-Ainet Cardos 02	Pallaresa	10			16							
23a-Manyanet 93	Pallaresa	4		12	7							
23b-Manyanet 99	Pallaresa	3		16	5			0.000	0.000		-	-
25a-Nicolau 93	Ribagorzana	21								2		
25b-Nicolau 99	Ribagorzana		16					1.000 ^d	1.000 ^d	1	0.709d	0.865d
26a-Cavallers 93	Ribagorzana	7										
26b-Cavallers 99	Ribagorzana	2	21					0.826 ^d	0.826 ^d		-	-
26c-Cavallers 02	Ribagorzana		23									
28a-P.Conangles 93	Ribagorzana	19								3		
28b-P.Conangles 99	Ribagorzana	14						0.000	0.000	10	0.056	0.056
28c-P.Conangles 02	Ribagorzana	18								6		

a: $0.1 > P > 0.05$; b: $0.05 > P > 0.01$; c: $0.01 > P > 0.001$; d: $P < 0.001$

El AMOVA en el que no se incluyen los haplotipos de repoblación detecta fluctuaciones temporales significativas en la composición matriarcal de las localidades analizadas, aunque la diferenciación geográfica entre localidades es claramente muy superior (53%, Tabla 4-9). Esta diferenciación entre réplicas temporales representa más del 8% de la diversidad nucleotídica de la región, y se mantiene en valores similares cuando al análisis se incorporan los ejemplares portadores de haplotipos de repoblación. No parece, por tanto, que las posibles repoblaciones realizadas en los ríos de la zona sean las principales responsables de los cambios detectados. De hecho, tan sólo en 9-Riutort, los

cambios temporales están asociados a un aumento significativo de los haplotipos de repoblación, principalmente en el periodo 1990-1999 (Tabla 4-8). Las repoblaciones sí que parecen haber contribuido a un aumento de la diversidad presente en la zona y a una ligera disminución de la diferenciación poblacional (Tabla 4-9).

Tabla 4-9. AMOVAs para el análisis de la estabilidad temporal en los Pirineos Orientales. df: grados de libertad.

Fuente de Variación	df	Suma de cuadrados	Componentes Varianza	% Variación	Estadísticos Φ	P
Sólo Haplotipos Nativos						
Dentro de muestras	486	0.362	0.00074	38.49	0.61512 (Φ_{ST})	<0.001
Entre réplicas temporales	17	0.064	0.00017	8.66	0.18361 (Φ_{SC})	<0.001
Entre localidades	9	0.505	0.00102	52.86	0.52856 (Φ_{CT})	<0.001
Total	512	0.932	0.00193	100		
Todos los haplotipos						
Dentro de muestras	549	0.726	0.00132	54.72	0.45285 (Φ_{ST})	<0.001
Entre réplicas temporales	17	0.095	0.00021	8.69	0.13708 (Φ_{SC})	<0.001
Entre localidades	9	0.511	0.00088	36.59	0.36593 (Φ_{CT})	<0.001
Total	575	1.332	0.00242	100		

Resulta remarcable que en las tres localidades con cambios más significativos (20-Tor, 25-Nicolau y 26-Cavallers) en el periodo analizado, se ha producido una alteración en la composición de los haplotipos del linaje AD. Así, en 25-Nicolau y 26-Cavallers, el clado 2-1 ha sido sustituido por el clado 2-3, ambos del linaje AD. En 20-Tor, de no detectarse haplotipos del linaje AD en 1993, su frecuencia fue del 35% en 1999. Curiosamente, en 2-Vallter, las ligeras, pero significativas fluctuaciones ocurridas entre 1990-2002, también reflejan un aumento de la frecuencia de haplotipos del linaje AD.

Aunque como resultado de estos cambios en la abundancia de los diferentes haplotipos nativos en las poblaciones en el periodo analizado no se han producido aumentos significativos de diversidad, sí que parece aumentar la diferenciación poblacional debido a estos haplotipos (Tabla 4-10).

Tabla 4-10. Fluctuación temporal del patrón de diferenciación entre poblaciones de trucha común en el Pirineo Oriental. N muestras analizadas en cada caso, ds:diversidad nucleotídica media entre las muestras, dt: diversidad nucleotídica total.

		Sólo haplotipos nativos				Todos los haplotipos			
				Diferenciación entre las muestras				Diferenciación entre las muestras	
	N	ds	dt	Φ_{ST}	F_{ST}	ds	dt	Φ_{ST}	F_{ST}
Pirineos-93	10	0.00107	0.00316	0.578	0.575	0.00147	0.00363	0.502	0.513
Pirineos-99	10	0.00133	0.00384	0.624	0.609	0.00290	0.00493	0.439	0.473
Pirineos-02	7	0.00117	0.00378	0.641	0.702	0.00294	0.00510	0.423	0.527

4.1.4. Diferenciación microgeográfica en los Pirineos

Los patrones de diversidad descritos en los apartados anteriores se refieren en general a los resultados obtenidos en toda la zona de estudio, pero como indicaban diversos estudios previos, una parte importante de la diversidad genética es consecuencia de la diferenciación entre las distintas poblaciones presentes dentro de los ríos mediterráneos (García-Marín *et al.* 1999, Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004, véase también Tabla 4-5). En esos trabajos realizados previamente, se analizaba la diferenciación dentro de ríos a un nivel de macro y mesoescala, es decir entre afluentes o localidades distantes varias decenas de kilómetros. En esta tesis se planteó un análisis de la diferenciación poblacional entre localidades separadas tan sólo unos pocos kilómetros dentro de un mismo curso fluvial. El tramo elegido se localiza en la cuenca de la Noguera de Vallferrera, afluente del Noguera Pallaresa. En el Noguera Pallaresa, los análisis indican un cierto grado de aislamiento por distancia de las poblaciones de trucha (ver Tabla 4-6).

Entre los pueblos de Àreu y Alins se eligieron 4 puntos de muestreo (14-Vallferrera I, 16-Vallferrera III, 15-Vallferrera II y 19 Alins) en un tramo de unos 6.5 km de río, lo que significa una separación media entre puntos de poco más de 2 Km (Fig.4-4). A unos 7.5 Km por encima de esta zona, separado por saltos de agua y un azud de captación de aguas, se encuentra el 13-Pla de Boet, donde la población de truchas está afectada por las repoblaciones (Araguas *et al.* 2004) y los ejemplares nativos presentan haplotipos del linaje ME (ver Tabla 4-1). Unos 6.5 Km aguas abajo de 19-Alins, la Noguera de

Vallferrera confluye con la Noguera de Cardós, en la que según los análisis, la población de truchas presenta en moderada frecuencia haplotipos del linaje AD (Cortey *et al.* 2004, ver también 21-Ainet Cardós en Tabla 4-8). De este último río se incluyó también una muestra en este análisis (22-Cardós). La muestra se capturó a 2 Km de la confluencia con la Noguera de Vallferrera. Finalmente, para analizar la incidencia de las repoblaciones que se realizan en esta zona, se incorporó al estudio una muestra de los reproductores que la Generalitat de Catalunya mantiene en el centro piscícola de Bagà (muestra 42a, Tabla 2-2).

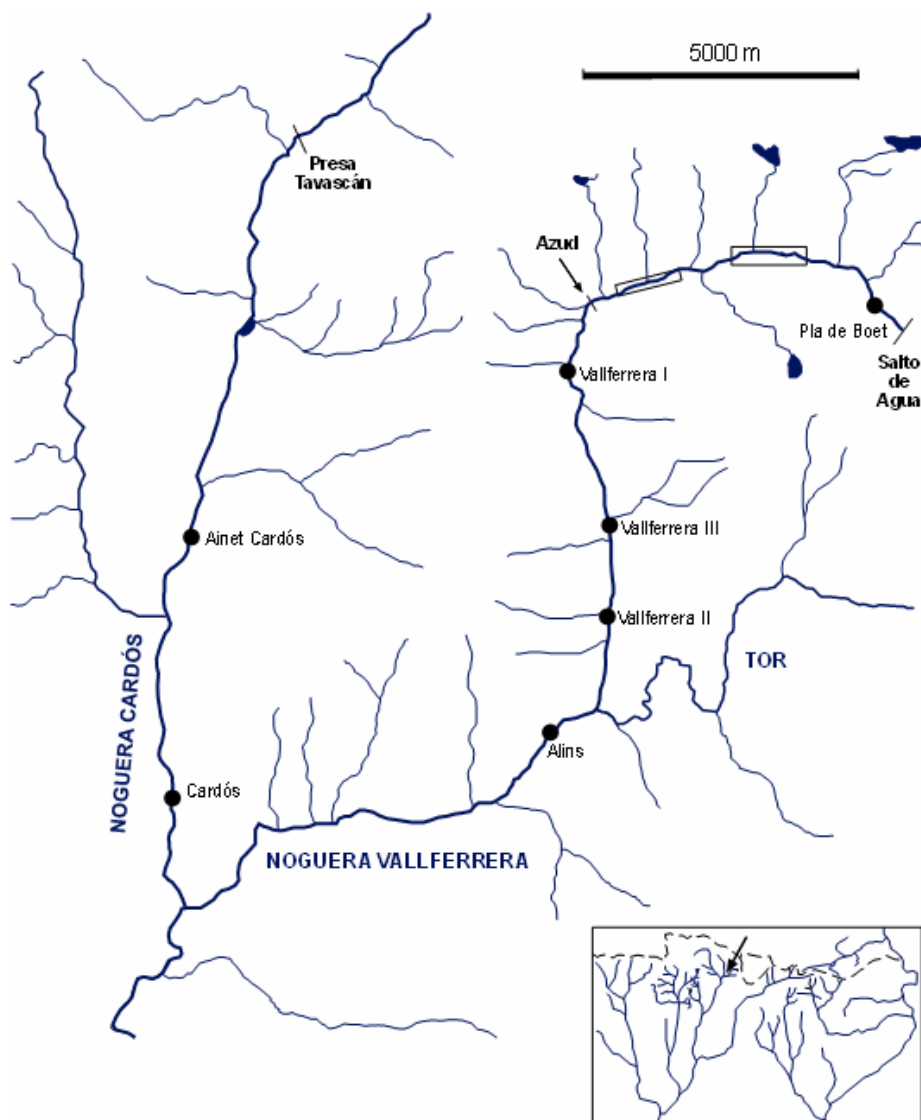


Figura 4-4. Cuenca de la Noguera de Vallferrera y de la Noguera de Cardós, indicando los puntos de muestreo realizados en la zona. Los rectángulos en el mapa superior indican saltos de agua. La flecha en el mapa inferior indica la situación de ambas cuencas en el Pirineo oriental.

Debido a que no existen estudios previos sobre el patrón de diversidad para los genes nucleares en esta zona, además de los análisis de haplotipos mitocondriales, en estas muestras se analizó el patrón de diversidad génica también para 8 loci microsatélites. En estos loci microsatélites, el número de alelos detectado por locus varió desde los 7 encontrados en el locus SsoSL 438 hasta los 29 alelos detectados en el locus T3-13. El número de alelos medio por locus y muestra varió desde los 3 en el locus Str 15 hasta los 13.167 detectados en el locus T3-13. La heterocigosidad más baja observada correspondió al locus Str 73, con un valor de 0.368, mientras que el valor máximo (0.977) lo mostró el locus T3-13 (Tabla 4-11).

Tabla 4-11. Variabilidad génica en las poblaciones de la Vallferrera. N: tamaño de muestra (gametos), Na: número de alelos detectados, Ho: Heterocigosis observada, He: diversidad génica, H-W equilibrio de Hardy-Weinberg, h: diversidad haplotípica, d: diversidad nucleotídica. Los códigos corresponden a los de la Tabla 4-2. NS: No Significativo.

Locus	13c	14a	15a	16a	19	22b	Media	42a
Microsatélites								
Str 15 (N)	58	30	64	32	26	84		76
Na	4	2	4	2	2	4	3	6
He	0.345	0.267	0.375	0.313	0.538	0.452	0.382	0.632
Ho	0.501	0.497	0.434	0.417	0.471	0.637	0.493	0.767
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS
SsaHaellI14.20 (N)	58	32	66	36	28	92		78
Na	9	3	3	3	3	11	5.333	12
He	0.517	0.188	0.333	0.222	0.571	0.391	0.371	0.667
Ho	0.816	0.546	0.573	0.565	0.532	0.718	0.625	0.838
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	P<0.001		P<0.001
Str 73 (N)	60	32	62	36	28	92		80
Na	5	3	5	5	2	4	4	5
He	0.633	0.063	0.258	0.5	0.429	0.326	0.368	0.5
Ho	0.69	0.502	0.585	0.525	0.349	0.481	0.522	0.571
H-W	NS	P<0.001	P<0.001	NS	NS	NS		NS
Str 85 (N)	62	32	68	34	28	88		78
Na	7	4	5	6	5	6	5.5	4
He	0.742	0.875	0.471	0.588	0.786	0.523	0.664	0.487
Ho	0.748	0.657	0.697	0.567	0.767	0.678	0.686	0.63
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS
Str 197 (N)	64	32	60	36	28	90		72
Na	7	7	8	6	7	10	7.5	8
He	0.813	0.625	0.833	0.833	0.643	0.711	0.743	0.694
Ho	0.749	0.827	0.825	0.783	0.794	0.79	0.794	0.748
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS
SsoSL 417 (N)	64	32	68	36	28	86		80
Na	9	10	15	8	13	17	12	11
He	0.813	0.813	0.5	0.611	0.714	0.605	0.676	0.8
Ho	0.843	0.875	0.876	0.721	0.913	0.889	0.853	0.865
H-W	NS	NS	P<0.001	NS	NS	P<0.001		NS

Tabla 4-11. Continuación

Locus	13c	14a	15a	16a	19	22b	<i>Media</i>	42a
SsoSL 438 (N)	62	32	72	36	28	92		80
Na	5	4	4	4	4	7	4.667	5
He	0.806	0.375	0.361	0.667	0.571	0.543	0.554	0.625
Ho	0.751	0.425	0.433	0.594	0.561	0.711	0.579	0.683
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS
T3-13 (N)	58	30	64	36	28	88		76
Na	13	11	13	12	9	21	13.167	17(3)
He	0.931	1	1	1	1	0.932	0.977	0.947
Ho	0.894	0.908	0.873	0.887	0.889	0.921	0.895	0.899
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS
<i>F_{IS}</i>	0.063	0.2043	0.2266	0.0649	0.053	0.2328		0.1900
<i>Media</i>								
Na	7.375	5.5	7.125	5.75	5.625	10		8.500
He	0.749	0.655	0.662	0.632	0.659	0.728		0.750
ADNmt (N)	32	16	36	18	14	46		40
h	0.6552	0.1250	0.2460	0.3072	0.4396	0.5237		0.5090
d	0.0044	0.0005	0.0011	0.0015	0.0019	0.0031		0.0019

En varios loci microsatélite se detectaron diferencias importantes entre las muestras naturales y el centro piscícola de Bagà. En este sentido cabe destacar el locus SsaHaelll14.20, en el que son diferentes los alelos presentes en uno u otro tipo de muestras; los loci Str 73 y Str 197, en los que el alelo común en el centro piscícola (*Str-73*147* y *Str-197*134*) prácticamente no se observa en las poblaciones naturales y; el locus SsoSL 438 en el que el alelo común en el medio natural (*SsoSL-438*107*) está prácticamente ausente en los ejemplares del centro piscícola (ver Apéndice, página 191). Basándose en las diferencias en los loci microsatélite se obtuvo el coeficiente de hibridación (*admixture coefficient, q*) para cada uno de los ejemplares capturados en el medio natural (Fig.4-5). Cuanto más se aproxima q a 1 más genoma nativo cabe suponer en el ejemplar, mientras que si el valor es próximo a 0, el genoma nativo que conserva el ejemplar es prácticamente nulo. Para la mayoría de muestras naturales a excepción de 13c-Pla de Boet 02, los valores de q fueron muy similares a 1 mostrando la poca o nula incidencia de los ejemplares repoblados sobre el acervo genético nativo de las truchas de la Vallferrera. En esta localidad de 13c-Pla de Boet 02, se observó una distribución sigmoideal de los valores de q . Esta es la forma típica que muestran las poblaciones donde se ha introducido material genético exógeno consecuencia de la hibridación entre individuos naturales y los de piscifactoría.

En 22b-Cardós, dónde también se detectaron ejemplares con valores bajos de q , no existe una distribución continua de los valores, sino que se observa un cambio brusco de los valores de q en 4 ejemplares respecto al resto de los ejemplares de la muestra. Estos 4 ejemplares, que además presentan haplotipo de repoblación del linaje AT, son seguramente individuos liberados desde el centro piscícola. La eliminación de estos 4 individuos de piscifactoría en la muestra 22b-Cardós provocó que la diversidad génica para los loci microsatélites disminuyera ligeramente de 0.728 a 0.697, y que disminuyera también el número medio de alelos de 10 a 8.375. Además, entre las muestras del medio natural, la máxima diversidad génica se detectó en 13c-Pla de Boet 02 ($H_e=0.749$, $h=0.6552$, $d=0.0044$; Tabla 4-11), seguramente reflejo de los genes atlánticos introducidos por las repoblaciones.

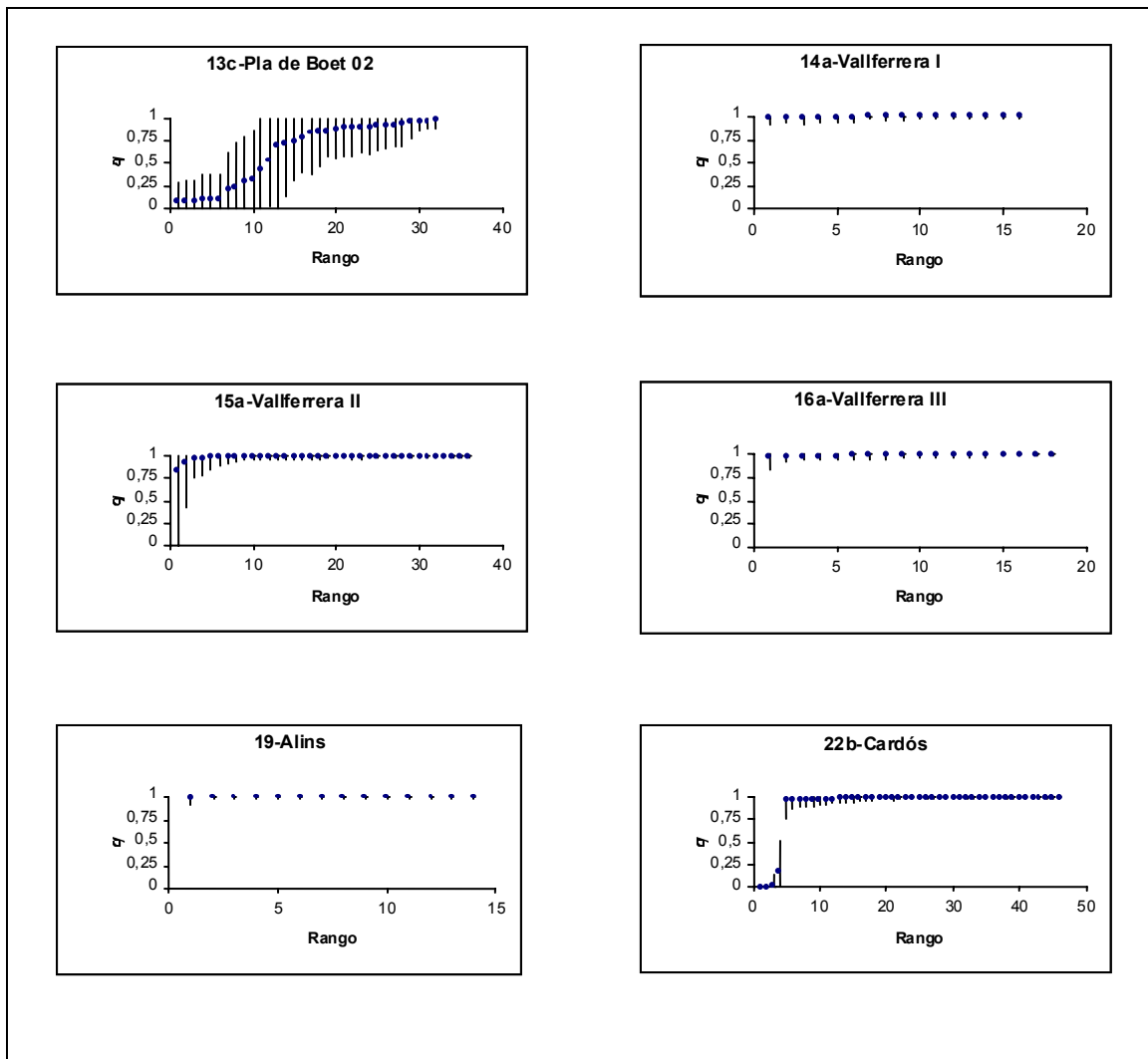


Figura 4-5. Distribuciones del coeficiente de hibridación (q) en las muestras de la Noguera Vallferrera y de la Noguera Cardós. Las barras verticales indican los límites de probabilidad al 90% de los valores q . Los individuos se ordenaron de menor a mayor valor de q .

Los valores diversidad haplotípica en la muestra de 13c-Pla de Boet 02 también fueron altos y responden a la presencia de 4 haplotipos diferentes, incluyendo a los de repoblación. Esta muestra fue la única en la que no se detectaron haplotipos del linaje AD, mientras que el resto de localidades presentaron los dos linajes mitocondriales nativos (AD y ME). El linaje más abundante fue el Mediterráneo (ME) con un 79.7% y sólo el 13.7 % de individuos tipificados en las muestras naturales presentaban haplotipos del linaje Adriático. El resto de haplotipos (6.6%) se identificaron como pertenecientes al linaje Atlántico y se localizaban principalmente en la muestra de 13c-Pla de Boet 02 (Tabla 4-12).

Tabla 4-12. Distribución de los clados de nivel 2 en las localidades de la Noguera Vallferrera y la Noguera Cardós. AT: número de individuos que mostraron haplotipos de repoblación (linaje AT).

Muestra	2-1 (AD)	2-5 (ME)	AT
13c-Pla Boet 02		16	16
14a-Vallferrera I	1	15	
14b-Vallferrera I	1	8	
14c-Vallferrera I	1	7	
15a-Vallferrera II	5	31	
15b-Vallferrera II	3	14	1
15c-Vallferrera II	1	28	
15d-Vallferrera II	5	21	1
16a-Vallferrera III	3	15	
16b-Vallferrera III	1	4	
16c-Vallferrera III	1	16	
16d-Vallferrera III	2	38	
19-Alins	4	10	
22a-Cardós	7	23	1
22b-Cardós	12	28	4
Total	47	274	23

En las 6 localidades estudiadas y para los 8 loci microsatélites, se detectaron 5 desajustes de las proporciones de equilibrio de Hardy-Weinberg después de aplicar la corrección secuencial de Bonferroni. En todos los casos, los desequilibrios fueron debidos a un déficit de heterocigotos. Dos de los desequilibrios se detectaron en la muestra 14a-Vallferrera II y dos más en la 22b-Cardós. En esta última los desequilibrios perduraron incluso después de

descartar del análisis a los presuntos ejemplares originados en el centro piscícola. Los valores de F_{IS} estuvieron en un rango entre 0.0053 en la muestra 19-Alins hasta 0.2328 en la muestra de 22b-Cardós, siendo todos los valores positivos (Tabla 4-11).

4.1.4.1. Diferenciación interpoblacional mediante loci microsatélites

Los coeficientes de diferenciación (F_{ST}) entre las muestras de la Vallferrera analizadas en los 6.5Km de río que separan Areu y Alins fueron muy bajos, y sólo la comparación entre 16a-Vallferrera III y 19-Alins resultó estadísticamente significativa (Tabla 4-13). Curiosamente, la muestra de 19-Alins no fue significativamente diferente a la muestra de 22b-Cardós, capturada aguas abajo en el río Noguera de Cardós (Fig.4-4). Esta muestra de la Noguera de Cardós se diferenció claramente del resto de muestras de la Noguera de Vallferrera.

Tabla 4-13. Diferenciación (F_{ST}) entre localidades de la Noguera de Vallferrera y Noguera Cardós utilizando loci microsatélites.

Población	13c	14a	15a	16a	19	22b	42a
13c-Pla Boet 02	-						
14a-Vallferrera I	0.13916***	-					
15a-Vallferrera II	0.15399***	0.00241 NS	-				
16a-Vallferrera III	0.15537***	0.00984 NS	0.01503 NS	-			
19-Alins	0.16950***	0.01730 NS	0.02088 NS	0.02695*	-		
22b-Cardós	0.13031***	0.03846*	0.05357***	0.06599***	0.02008 NS	-	
42a-Baga-R	0.08551***	0.24186***	0.25232***	0.26016***	0.25383***	0.18636***	-

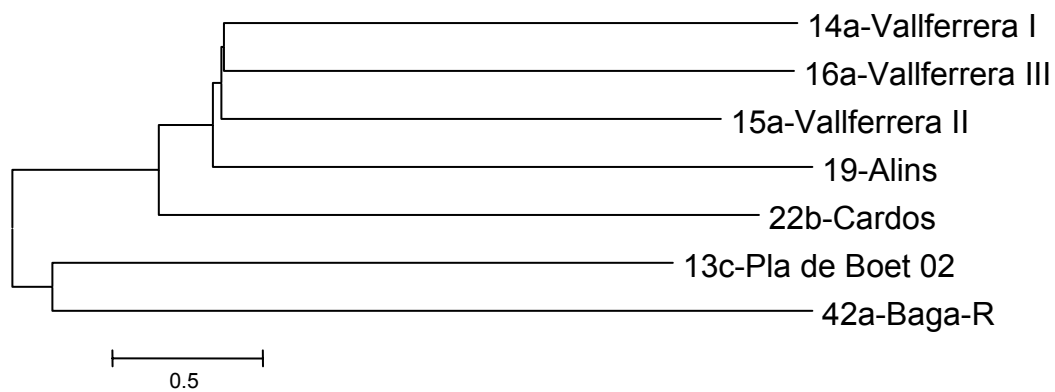
NS: No Significativo

* $P < 0.05$

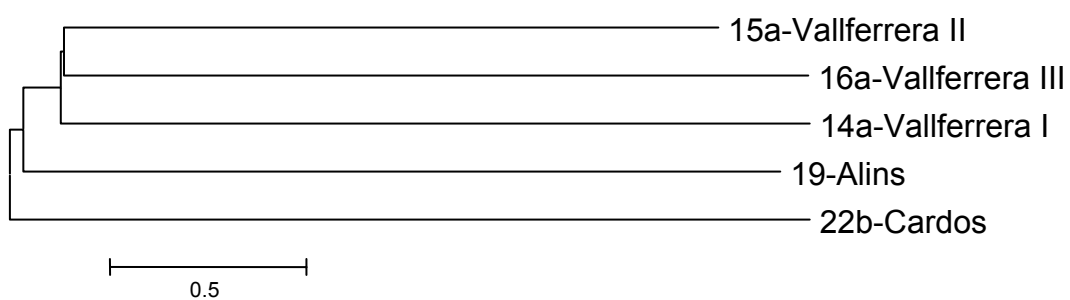
*** $P < 0.001$

Todas las muestras naturales resultaron significativamente diferentes de la muestra de piscifactoría. Sin embargo el coeficiente de diferenciación entre 13c-Pla de Boet 02 y 42a-Bagà ($F_{ST}=0.08551$) es menos de la mitad del observado en el resto de comparaciones entre poblaciones del río y el estoc del centro piscícola, confirmando los efectos de las repoblaciones en este punto de Pla de Boet (Araguas *et al.* 2004). Esta relación entre la población del Pla de Boet y el estoc del centro piscícola de Bagà queda también de manifiesto en el dendrograma calculado a partir de la matriz de distancias de Nei entre las

muestras (Fig.4-6A). El dendrograma también muestra la diferenciación entre la población de 22b-Cardós y las muestras de la Vallferrera. La eliminación de las muestras de 42a-Bagà y 13c-Pla de Boet 02, así como los individuos que en 22b-Cardós presentaban un coeficiente de hibridación que los relacionaba con la muestra de piscifactoría, produjo un dendrograma que sugiere una cierta relación entre las muestras 19-Alins y 22b-Cardós (Fig.4-6B). Además, en este último caso, se detectó un aislamiento por distancia al analizar todas las muestras conjuntamente ($R= 0.76561$, $P = 0.0090$), probablemente reflejo de la singularidad de la muestra de 22b-Cardós.



A



B

Figura 4-6. Dendrogramas Neighbor-Joining entre las localidades de la Noguera de Vallferrera y de la Noguera de Cardós, mediante la matriz de distancia de Nei apareadas entre éstas utilizando los loci microsatélites. A: todas las localidades. B: eliminando el efecto de la introgresión.

4.1.4.2. Diferenciación matriarcal

La secuenciación de 464pb de bases del extremo 3' de la región de control permitió asignar el haplotipo de todos los ejemplares estudiados a su correspondiente clado de nivel 2 (Tabla 4-12). En la zona de estudio de la Valferrera y la Noguera de Cardós sólo se detectaron los clados 2-1 (linaje AD) y 2-5 (linaje ME). Los valores de diferenciación interpoblacional entre los pares de muestras (Φ_{ST}) fueron en general no significativos, exceptuando aquéllos que incluían a la muestra del Pla de Boet o al estoc del centro piscícola (Tabla 4-14). Mediante el análisis del ADN mitocondrial también se observó un cierto grado de diferenciación entre la muestra de 22b-Cardós y las de 14a-Vallferrera I y 15a-Vallferrera II.

Tabla 4-14. Diferenciación mitocondrial (Φ_{ST}) entre localidades del río Noguera de Valferrera y Noguera de Cardós.

Población	13c	14a	15a	16a	19	22b	42a
13c-Pla Boet 02	-						
14a-Vallferrera I	0.29510***	-					
15a-Vallferrera II	0.29881***	-0.01762 NS	-				
16a-Vallferrera III	0.22394***	-0.00826 NS	-0.03454 NS	-			
19-Alins	0.14893*	0.10463 NS	0.02213 NS	-0.02382 NS	-		
22b-Cardós	0.09905*	0.10719*	0.07497*	0.03265 NS	-0.02602 NS	-	
42a-Baga-R	0.29510***	0.84032***	0.83149***	0.80145***	0.77021***	0.67378***	-

NS: No Significativo

* $P < 0.05$

*** $P < 0.001$

La clara diferenciación entre 13c-Pla de Boet 02 y el resto de muestras naturales analizadas es debida, como ya ha sido comentado, a la elevada introgresión procedente de la piscifactoría que ha sufrido esta muestra. En ella, el 50% de los haplotipos son del linaje AT, el único linaje presente en los individuos del centro piscícola (Tabla 4-12).

Todos estos resultados confirman los obtenidos mediante el análisis de loci microsatélites, y son reproducidos claramente en el dendrograma realizado a partir de la matriz de distancias Tamura-Nei entre las muestras (Fig.4-7). La muestra de 13c-Pla de Boet 02, se aleja del resto de muestras del río y se

acerca a la muestra de la piscifactoría. Así mismo, la muestra de la Noguera de Cardós, genera una rama separada de las muestras de la Noguera de Vallferrera, ya que el linaje AD es más abundante en ese río. Sin embargo, en el análisis de los haplotipos no se detectó aislamiento por distancia entre las poblaciones ($R= 0.42279$, $P= 0.2383$).

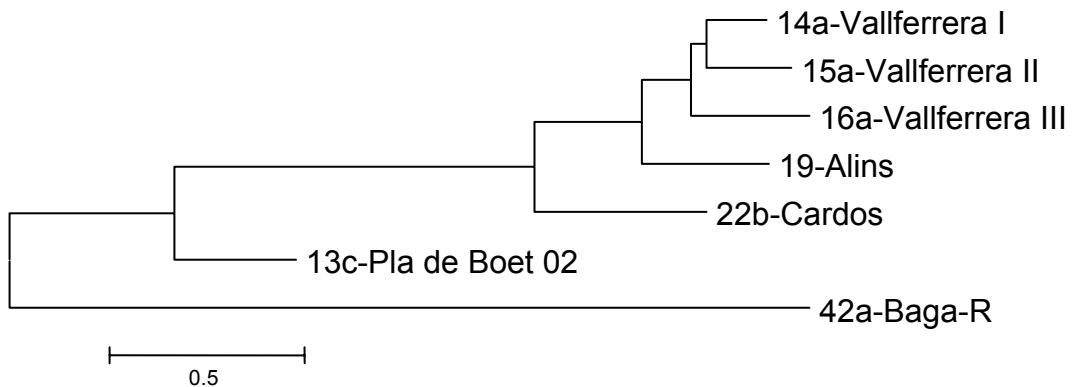


Figura 4-7. Dendrograma Neighbor-Joining entre las localidades de la Noguera de Vallferrera y de la Noguera de Cardós a partir de la matriz de distancia apareadas (Tamura-Nei) entre éstas utilizando haplotipos de la región de control del ADNmt.

4.1.4.3. Estabilidad temporal

No se detectaron diferencias significativas entre las muestras temporales capturadas en la Noguera de Vallferrera en el periodo 2002-2003 ni en los análisis que utilizaron los loci microsatelites, ni en los que utilizaron los haplotipos mitocondriales. En 15-Vallferrera II la F_{ST} con microsatélites fue de 0.01415 ($P=0.0820$) y la Φ_{ST} con el ADN mitocondrial -0.01437 ($P=0.4326$), mientras que en 16-Vallferrera III los valores fueron de 0.00841 ($P=0.2744$) para F_{ST} y 0.04490 ($P=0.2549$) para Φ_{ST} .

En las muestras del río Vallferrera, se pudo disponer de la edad de los ejemplares gracias a la colaboración de la Dra. A. Almodóvar (Universidad Complutense Madrid), por lo que fue posible analizar la estabilidad temporal también a partir de las fluctuaciones alélicas entre las cohortes. En esta aproximación, y como consecuencia de la baja o nula diferenciación geográfica y temporal entre los puntos de muestreo 14-Vallferrera I, 15-Vallferrera II, 16-Vallferrera III y 19-Alins (ver Tablas 4-13 y 4-14), se agruparon todas las capturas para, de esta manera, aumentar las muestras de cada cohorte de

edad. La cohorte más antigua fue la de 1996, de la que sólo se capturó un ejemplar, y la más moderna la cohorte del 2003, también con un único representante. A la cohorte de 1997 se asignaron 4 individuos, a la de 1998 6 individuos, a la de 1999 19 individuos, la del 2000 presentó 28 individuos, la del 2001 presentó 41 individuos y la del 2002 presentó 53 individuos. Las cohortes marginales de 1996 y 2003, no se tuvieron en cuenta en los análisis genéticos.

En total se detectaron 18 desequilibrios de Hardy-Weinberg para las seis cohortes analizadas y los 8 loci microsatélites testados, aunque después de la corrección secuencial de Bonferroni, los desequilibrios pasaron a ser 5 y siempre debidos a un déficit de heterocigotos (Tabla 4-15). La cohorte que mostró más desequilibrios fue la cohorte de 2002, que mostró 3 desequilibrios después de la corrección de Bonferroni. Los valores de F_{IS} variaron entre -0.0455 de la cohorte 1997 hasta 0.2523 detectado en la cohorte de 1998.

Tabla 4-15. Variabilidad génica en cohortes de trucha común de la Vallferrera. N: tamaño de muestras (gametos, Na: número de alelos diferentes detectados, Ho: Heterozigosis observada, He: diversidad génica, H-W: equilibrio de Hardy-Weinberg, h: diversidad haplotípica, d: diversidad nucleotídica. NS: No Significativo.

Locus	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Microsatélites						
Str15 (N)	6	12	38	56	80	96
Na	2	2	3	3	2	6
He	0.667	0.167	0.421	0.286	0.25	0.188
Ho	0.533	0.53	0.411	0.468	0.404	0.409
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	P<0.001
SsaHaelll14.20 (N)	8	12	38	58	80	102
Na	3	3	3	4	4	10
He	0.75	0.333	0.368	0.241	0.15	0.255
Ho	0.607	0.53	0.511	0.625	0.596	0.72
H-W	NS	NS	NS	P<0.001	P<0.001	P<0.001
Str73 (N)	8	12	38	58	78	100
Na	3	4	4	4	5	7
He	0.5	0.5	0.421	0.345	0.308	0.44
Ho	0.464	0.561	0.609	0.493	0.448	0.612
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Str85 (N)	6	12	36	58	82	104
Na	4	5	5	6	5	7
He	1	0.5	0.778	0.69	0.512	0.577
Ho	0.867	0.833	0.725	0.772	0.63	0.73
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Str197 (N)	8	12	34	58	78	102
Na	4	3	6	10	9	8
He	1	0.833	0.824	0.586	0.641	0.784
Ho	0.821	0.727	0.756	0.828	0.806	0.805
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SsoSL417 (N)	8	12	38	58	80	104
Na	5	6	13	18	14	15
He	0.5	0.5	0.632	0.793	0.525	0.615
Ho	0.893	0.803	0.872	0.91	0.746	0.794
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	P<0.001

Tabla 4-15. Continuación.

Locus	1997	1998	1999	2000	2001	2002
SsoSL438 (N)	8	12	38	58	82	106
Na	4	2	4	5	4	4
He	0.75	0.333	0.474	0.483	0.537	0.415
Ho	0.75	0.485	0.393	0.475	0.531	0.517
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS
T3-13 (N)	8	12	38	54	76	92
Na	7	5	11	15	15	16
He	1	0.833	1	1	0.974	0.978
Ho	0.964	0.758	0.866	0.91	0.906	0.854
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Media</i>						
Na	4.000	3.750	6.125	8.125	7.250	9.125
He	0.738	0.653	0.643	0.685	0.633	0.680
F _{IS}	-0.0455	0.2523	0.0480	0.1986	0.2352	0.2240
ADNmt (N)	4	6	19	28	41	53
h	0.5000	0.3330	0.4094	0.1402	0.2561	0.1742
d	0.0022	0.0014	0.0018	0.0008	0.0011	0.0008

Todos los valores de diferenciación entre pares de cohortes, tanto mediante el análisis de la variación en los loci microsatélites (F_{ST}) como el polimorfismo de la región de control del ADN mitocondrial (Φ_{ST}) resultaron no significativos (Tabla 4-16), confirmando la estabilidad temporal dentro de la Noguera de Vallferrera.

Tabla 4-16. Diferenciación entre cohortes de trucha común del río Vallferrera. Φ_{ST} utilizando la región de control del ADNmt (debajo diagonal) y F_{ST} utilizando loci microsatélites (encima diagonal) entre cohortes.

Cohorte	1997	1998	1999	2000	2001	2002
1997	-	-0.06217 NS	0.00679 NS	-0.02568 NS	-0.00618 NS	0.00455 NS
1998	-0.23577 NS	-	0.01603 NS	-0.00591 NS	-0.00212 NS	0.00660 NS
1999	-0.17773 NS	-0.09403 NS	-	0.00040 NS	0.01023 NS	0.00089 NS
2000	0.01428 NS	0.05540 NS	-0.08698 NS	-	0.00841 NS	0.00824 NS
2001	-0.10847 NS	-0.10371 NS	0.00639 NS	-0.00214 NS	-	0.00741 NS
2002	-0.00826 NS	-0.06947 NS	0.07894 NS	-0.02111 NS	-0.00882 NS	-

NS: No Significativo

4.1.4.4. Estimación del censo y el tamaño efectivo

La estimación de los censos en la Noguera Vallferrera se pudo llevar a cabo gracias a la colaboración durante las campañas de muestreo de las cuencas de

la Noguera Vallferrera y Noguera Cardós del grupo de la Dra. A. Almodóvar (UCM). Los censos obtenidos en los puntos de muestreo de 15-Vallferrera II, 16-Vallferrera III y 22-Cardós junto con el método utilizado para su estimación se muestran en la Tabla 4-17.

Tabla 4-17. Estimación de los censos poblacionales en la Noguera Vallferrera y la Noguera de Cardós.

Punto Muestreo	Método utilizado	Censo estimado
15-Vallferrera II	Schnabel	164.18 (135.01-246.51)
16-Vallferrera III	Schnabel	220.59 (177.73-457.92)
22-Cardós	Pettersen	177.88 (114.54-285.24)

Los tamaños efectivos calculados en la Noguera de Vallferrera se muestran en la Tabla 4-18. Mediante el método temporal se estimó el tamaño efectivo (N_e) en los dos únicos puntos dónde había réplicas temporales entre el año 2002 y 2003 (15-Vallferrera II y 16-Vallferrera III). Los valores de N_e estimados en estos puntos fueron bastante bajos y en general los márgenes para los intervalos de confianza fueron muy amplios, especialmente para la estimación con datos mitocondriales, reflejo seguramente de los reducidos tamaños muestrales. Por este motivo y dada la baja diferenciación detectada entre las muestras de estos dos puntos, se procedió a repetir el análisis agrupando las muestras anuales de ambos puntos, para partir así de tamaños muestrales más grandes. En este caso se obtuvieron estimas algo superiores de los tamaños efectivos tanto en general ($N_e=51.5$, método de Waples 1989) como de las hembras ($N_{ef} = 12.8$, también según Waples), pero los márgenes de error fueron también elevados. Finalmente, se realizó un último análisis agrupando en sendas muestras todos los genotipos del año 2002 y 2003 en los diferentes puntos de muestreo de este río, entre 14-Vallferrera I y 19-Alins. En este caso los valores de N_e y N_{ef} fueron muy similares a las anteriores estimas, excepto para el método del desequilibrio de ligamiento de Bartley *et al.* (1992), en el que la estima de N_e del año 2002 casi se duplica respecto de la obtenida con la simple agrupación de las muestras de Vallferrera II y III.

Tabla 4-18. Estimación de los Tamaños efectivos (Ne) en la Noguera de Vallferrera. Métodos temporales: W, según Waples (1989); NT, según Nei & Tajima (1981); ML-Censo y ML-500 estimas de máxima verosimilitud a partir del censo o de un valor máximo de NE de 500 según Wang & Whitlock (2003). Ne♀: Tamaño efectivo en las hembras. El método del desequilibrio gamético se basa en la aproximación de Bartley et al (1992).

Localidades	Método temporal						Desequilibrio Ligamiento		Ne♀*
	W	NT	ML-Censo	ML-100	ML-500	2002	2003		
15-Vallferrera II	25.7 (12.0 - 83.1)	24.9	163.8 (54.2 - 164)	99.4 (51.5 - 100)	188.5 (54.3 - 500)	22.9 (19.4 - 27.5)	22.7 (19.6 - 26.8)	∞ (0.0 - ∞)	
16-Vallferrera III	45.3 (13.3 - ∞)	43.4	220.8 (50.2 - 221)	99.3 (46.0 - 100)	382.7 (50.6 - 500)	11.0 (9.1 - 13.5)	37.2 (30.5 - 46.6)	5.9 (0.0 - ∞)	
Vallferrera (II + III)	51.5 (24.4 - 166.9)	48.5	249.9 (90.7 - 385)	99.76 (75.9 - 100)	297.4 (99.7 - 500)	43.2 (36.4 - 52.5)	43.4 (38.9 - 48.4)	12.8 (0.0 - ∞)	
Vallferrera Areu-Alins	55.3 (27.8 - 145.2)	53.7	-	99.8 (80.0 - 100)	250.4 (102.3 - 500)	70.1 (59.8 - 83.8)	43.4 (38.9 - 48.8)	14.2 (0.0 - ∞)	

* incluye todas las muestras con datos haplotípicos

Resulta sorprendente que las estimas obtenidas por los métodos de máxima verosimilitud son en todos los casos bastante superiores a las obtenidas mediante las otras aproximaciones. En especies con generaciones solapadas como es el caso de la trucha, Waples (2005) sugiere que tanto el método del desequilibrio como los de las fluctuaciones temporales basados en Waples (1989) o Nei y Tajima (1981), probablemente estiman el número efectivo de reproductores por año (N_b) y no el tamaño efectivo (N_e) de la población. La relación entre ambos parámetros parece ser compleja para especies que solapan generaciones en el momento de la puesta, sin embargo, en el salmón del pacífico (*Oncorhynchus tshawytscha*), parece haber una sencilla relación en la que N_e sería como máximo igual al producto entre el tiempo de generación G (medido como edad media de los reproductores) y el valor medio de N_b en los diferentes años necesarios para el paso de una generación: $N_e = G N_b$ (Waples 2002). Aunque el salmón del pacífico es una especie semélpara y la trucha es iterópara, por lo que la relación podría no ser idéntica, se debe destacar que la ratio entre el N_e obtenido por las aproximaciones de máxima verosimilitud y las demás aproximaciones se sitúa en valores entre 3 y 4 (Tabla 4-18). Esta indicación sobre el posible tiempo de generación de la trucha común en la Noguera de Vallferrera se corresponde bastante bien con la edad media de los reproductores en ese río (3.2 años, Tabla 4-19). Además, la distribución de las clases de edad en este río es muy similar al observado en otras poblaciones ibéricas (García de Jalón *et al.* 1986, Nicola y Almodóvar 2002, y Lobón-Cervian *et al.* 1997).

Tabla 4-19. Distribución de clases de edad en la Noguera de Vallferrera en el año 2002. G: edad media de los reproductores (clase de edad superior a 0+)

	14a-Vallferrera I	15a-Vallferrera II	16a-Vallferrera III	19-Alins	Total
N	16	36	18	14	84
Edad					
1(0+)	2	13	2	-	17
2(1+)	3	10	8	4	25
3(2+)	6	3	2	6	17
4(3+)	5	8	2	1	16
5(4+)	-	2	-	2	4
6(5+)	-	-	3	1	4
7(6+)	-	-	1	-	1
G	3.142	3.086	3.437	3.285	3.224

Para organismos que solapan generaciones en el momento de la reproducción, el estudio de las fluctuaciones alélicas entre dos cohortes consecutivas debería informar sobre el número efectivo de reproductores (N_b) que han generado las cohortes en cuestión (Waples 1991b), más concretamente sobre la media armónica de número efectivo de reproductores que han generado las dos cohortes (Waples 2005). Las cohortes utilizadas en estos estudios fueron las cohortes desde 1999 hasta 2002 ambas inclusive, ya que el resto de cohortes (1996, 1997, 1998 y 2003) tenían pocos representantes en las muestras analizadas. Los resultados se presentan en la Tabla 4-20. Las estimas de N_b son diferentes según la metodología utilizada. Aparentemente, salvo en la comparación de las cohortes 2000-2001, el método de máxima verosimilitud de Wang (2001) es incapaz de obtener un resultado que no se ajuste al valor máximo de N_e introducido en el programa para el cálculo, por lo que se consideró que estos resultados eran poco informativos. El resto de valores obtenidos mediante las clásicas estimas de fluctuación alélica entre cohortes (W y NT) son, en este caso, inferiores a los calculados mediante el desequilibrio de ligamiento. Sin embargo, si se exceptúa la comparación entre las cohortes de 1999 y 2000, ambas representadas por un reducido número de ejemplares, los valores de N_b obtenidos mediante las técnicas de fluctuación de las frecuencias alélicas (W y NT) son similares (entorno a 50-55) a los calculados para el conjunto de la Vallferrera comparando las capturas del año 2002 y 2003 (ver Tabla 4-18). Cuando se compara las cohortes del año 99 y 2002, entre las que prácticamente ha pasado una generación, los valores calculados estimarían el N_e de la población (Waples 2005), los valores son en este caso de 417 (método de Waples 1989) y 464 (método Nei y Tajima, 1981). Los valores obtenidos mediante la técnica del desequilibrio gamético en 1999 ($N_b=50$) y 2000 ($N_b=35$) fueron similares a los valores que se obtuvieron con los métodos de la fluctuación de las frecuencias alélicas, pero claramente inferiores a los calculados en 2001 ($N_b=304$) y 2002 ($N_b=250$).

Tabla 4-20. Estimación del Tamaño efectivo a partir de las cohortes de edad en la Noguera de Val Ferrera. El método del desequilibrio gamético se basa en la aproximación de Bartley et al (1992). Métodos temporales entre una cohorte y la siguiente: W, según Waples (1989); NT, según Nei & Tajima (1981); ML-500 estimas de máxima verosimilitud a partir de suponer un valor máximo de Ne de 500 según Wang & Whitlock (2003).

	N	Desequilibrio de ligamiento	Fluctuaciones temporales				
			W	NT	ML-100	ML-500	ML-1000
1999	19	50.0 (26.8 - 207.6)	-	-	-	-	-
2000	29	35.0 (26.3 - 50.0)	111.6 (18.3 - ∞)	102.2	99.8 (57.9 - 100)	494.8 (85.6 - 500)	999.8 (89.9 - 1000)
2001	41	304.2 (102.8 - ∞)	55.1 (18.3 - ∞)	53.9	61.9 (31.5 - 100)	61.9 (31.5 - 435.9)	61.9 (31.5 - 435.9)
2002	53	250.7 (123.9 - 3975.3)	53.5 (21.8 - 408.1)	49.3	99.8 (68.8 - 100)	499.4 (94.5 - 500)	999.3 (95.3 - 1000)
1999-2002	142	-	417.0 (27.9 - ∞)	463.9	99.8 (67.4 - 100)	499.5 (199.9 - 500)	999.8 (114.8 - 1000)

Finalmente, las aproximaciones en las que se consideró la migración entre la Noguera de Vallferrera, la Noguera de Cardós y los aportes desde los centros piscícolas (Tabla 4-21), dieron estimaciones de Ne entre 30 y 70 individuos según las diferentes metodologías aplicadas, muy parecidas por tanto a los resultados descritos en la Tabla 4-18. Seguramente, al tratarse de una especie con generaciones solapadas estas estimas reflejan de nuevo el número efectivo de reproductores. Los resultados sugieren además la existencia de flujo génico y por ende movimiento de reproductores entre las poblaciones de la Noguera de Vallferrera y Noguera de Cardós. Las estimas de flujo se reducen cuando se incorporan al análisis los individuos de Bagà, reflejo de que en esta zona las repoblaciones han tenido un reducido impacto genético.

Tabla 4-21. Estimación de los Tamaños efectivos (Ne) y las tasas de migración (m) en la Noguera de Vallferrera. FT: Métodos temporales implementados en el programa MLNE (Wang y Whitlock 2003): NT, según Nei y Tajima (1981). En este caso sólo se admite una fuente de migración (22b-Cardós). IIS: aproximaciones a partir de la identidad en estado según Vitalis y Couvet (2001a Genetics), en este caso es posible calcular la situación en los años 2002 (IIS-2002) y 2003 (IIS-2003) y se admite la combinación de más de una fuente de individuos migradores.

	Ne	m
Vallferrera - Cardós		
FT-NT	37.1	0.0743
FT-MLNE	53.2 (37.6 - 89.2)	0.1432 (0.0542 - 0.2549)
IIS-2002	38.4 (9.1 - ∞)	0.0614 (0 - 0.2497)
IIS-2003	34.7 (2.9 - ∞)	0.0755 (0 - 0.4904)
Vallferrera - (Cardós + Bagà)		
IIS-2002	68.9 (25.9 - ∞)	0.0140 (0 - 0.0452)
IIS-2003	62.8 (16.1 - ∞)	0.0175 (0 - 0.0760)

4.2. DISCUSIÓN

4.2.1. Relaciones entre los haplotipos

La detección de 9 nuevos haplotipos, básicamente del linaje ME (8), aumenta la diversidad del cladograma descrito en Cortey *et al.* (2004) que relaciona a este linaje con el linaje AD. Los análisis previos de ese autor agrupaban todas las secuencias de ambos linajes en un único clado de nivel 3 y todos los haplotipos del linaje ME constituían un único clado de nivel 2. Sin embargo, los nuevos haplotipos aumentan la diversidad del linaje y reestructuran las relaciones haplotípicas en 5 clados de nivel 2 para el linaje ME (Fig.4-1). Dos de estos clados de nivel 2 (2-8 y 2-9) se agruparon en un nuevo clado de nivel 3 del linaje Mediterráneo (ME). Este nuevo clado de nivel 3 se origina a partir de la doble delección en las posiciones 932 y 933 que caracteriza a una gran parte de individuos del río Cardoner, cuenca del Llobregat. El haplotipo MEcs25, que integra el clado 2-8, se diferencia únicamente del haplotipo MEcs1 por la doble delección anteriormente citada. Sin embargo, los haplotipos del clado 2-9 se encuentran como mínimo a 4 pasos mutacionales de ese haplotipo del clado 2-8 y del que son claramente divergentes (distancia Tamura-Nei = 0.005051). Un muestreo más exhaustivo de la cuenca del Llobregat, podría ayudar a detectar haplotipos intermedios entre los dos clados, provocando una genealogía más profunda del clado 3-3. De hecho, en los Pirineos Orientales, y considerando este estudio, se han detectado el 80% de los haplotipos del linaje ME descritos hasta la fecha y sólo el 50% de los descritos para el linaje AD. Este aumento de la diversidad detectada dentro del linaje ME estaría de acuerdo con la propuesta de que la zona del Rosellón, en el sur de Francia, y próxima a la zona estudiada en este trabajo, es el área de aparición del linaje ME (Bernatchez 2001).

4.2.2. Variabilidad intrapoblacional

Las diversidades haplotípica (valor medio $h=0.264$) y nucleotídica (valor medio $d=0.001368$) se encuentran dentro de la parte alta del rango descrito para las poblaciones mediterráneas de la Península Ibérica (Cortey *et al.* 2004) y son claramente superiores a los valores detectados en las poblaciones del sur de la península, en Sierra Nevada (Sanz *et al.* 2006). Sin embargo, se encuentran

por debajo de los detectados en poblaciones noratlánticas (Hansen y Mensberg 1998, Laikre *et al.* 2002) y, aunque los de diversidad nucleotídica son similares (rango 0.0005-0.0044) a los observados en las poblaciones francesas de los Pirineos atlánticos, los de diversidad haplotípica en esas poblaciones atlánticas son superiores (rango 0.22-0.80). Se debe resaltar que en esa zona francesa del Pirineo occidental tan sólo se han descrito haplotipos del linaje AT (Aurelle y Berrebi 2001).

Las muestras con valores más elevados de diversidad haplotípica coincidían con valores más elevados de diversidad nucleotídica (Tabla 4-4) ya que en su mayoría se encontraron clados pertenecientes a los dos linajes autóctonos (ME y AD). Este patrón es el habitual de las poblaciones en ríos mediterráneos de la Península Ibérica (Cortey *et al.* 2004) y se ha descrito también en diversos ríos europeos de la vertiente mediterránea (Giufra *et al.* 1994, Berrebi *et al.* 2000a).

4.2.3. Diferenciación interpoblacional

La estructura de las poblaciones mediterráneas de trucha común de la Península Ibérica ha sido objeto de diversos estudios tanto mediante genes nucleares como mitocondriales (Machordom *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001, Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004). En general, estos estudios ponen de manifiesto una elevada diferenciación entre las poblaciones tanto dentro como entre ríos. Por ejemplo, Sanz *et al.* (2002) mediante loci alozímicos detectaron una elevada diferenciación poblacional ($F_{ST}=0.615$) que se distribuía prácticamente en partes iguales dentro de ríos ($F_{SC}=0.316$) y entre ríos ($F_{CT}=0.299$). Más recientemente, mediante el estudio de la variación de las secuencias de la región de control del ADNmt se ha observado que más del 80% de la diversidad es consecuencia de la diferenciación poblacional, aunque en este caso las diferencias entre ríos ($\Phi_{CT}=0.15691$) son mucho menores que las observadas dentro de ríos ($\Phi_{SC}=0.67096$) (Cortey *et al.* 2004). Los estudios con genes nucleares sugieren también una importante diferenciación entre las poblaciones de los Pirineos, tanto occidentales ($F_{ST}=0.1744$, Cagigas *et al.* 2002) como orientales ($F_{ST}=0.396$, Araguas *et al.* 2004). Todo ello probablemente reflejo de la citada mezcla de diferentes linajes evolutivos en los ríos mediterráneos (Sanz *et al.* 2002, 2006, Cortey *et al.* 2004, Madeira *et al.* 2005). Los resultados del presente trabajo encajan plenamente con estos

estudios, el patrón de diferenciación mitocondrial observado en el Pirineo oriental es un fiel reflejo del descrito previamente para toda la vertiente mediterránea peninsular. En general, las poblaciones tienen una baja proporción de diversidad, y son mucho más importantes las diferencias dentro que entre ríos (ver Modelo Pirineos-I, Tabla 4-5). Exceptuando la cuenca del Llobregat, las demás presentan haplotipos tanto del linaje AD como del ME y el patrón de diferenciación poblacional parece la consecuencia lógica de la abundancia relativa de cada uno de estos linajes (Fig.4-2, Fig.4-3). No obstante, sobre el conjunto del territorio analizado se detecta un cierto patrón de aislamiento por distancia (Tabla 4-6), nunca antes descrito para ríos mediterráneos, pero que sí se ha observado en poblaciones atlánticas tanto ibéricas como noreuropeas (Morán *et al.* 1995, Hansen y Mensberg 1998, Bouza *et al.* 1999, Ruzzante *et al.* 2001). En esas poblaciones atlánticas, el patrón macrogeográfico de diferenciación que refleja el aislamiento por distancia de los diferentes cursos fluviales es la consecuencia del flujo génico asociado con los errores de retorno de los ejemplares anádromos (Morán *et al.* 1995). Sin embargo, en la cuenca mediterránea los individuos anádromos se extinguieron como mínimo hace 13000 años, al final del periodo glacial (Muñoz y Casadevall 1997), o incluso antes (300000 años, Berg 1948).

El análisis detallado de las cuencas estudiadas sugiere un patrón diferente en cada una de ellas. Así, por ejemplo, en el Ter predomina la diversidad intrapoblacional (52.40%) mientras que en el Llobregat predomina la diferenciación interpoblacional (89.37%) (Tabla 4-5). De igual manera, aunque el estudio en toda la cuenca del Ebro asigna la mayor parte de la diversidad a la diferenciación entre poblaciones (60.80%), en alguno de sus afluentes predomina también la diversidad intrapoblacional (63.93% en el Noguera Pallaresa). Todo ello sugiere un comportamiento diferencial de los agentes evolutivos en las poblaciones. Más allá del contacto secundario entre linajes, los procesos evolutivos que desde el final de la glaciación predominan en las poblaciones de truchas mediterráneas parecen ser la deriva genética y la restricción del flujo génico como consecuencia de la contracción de las poblaciones a las cabeceras de los cursos fluviales (Sanz *et al.* 2002, 2006, Cortey *et al.* 2004). Los análisis realizados en este trabajo no han detectado

indicios de aislamiento por distancia entre las poblaciones de trucha dentro de los ríos Ter y Llobregat. Sin embargo, si que se ha observado este patrón entre las poblaciones analizadas en la cuenca del Ebro, siendo muy marcado dentro de su afluente Noguera Pallaresa (Tabla 4-6). En este último caso, la correlación parece reflejar cambios en la abundancia relativa de los linajes AD y ME (Tabla 4-2).

Adaptando las conclusiones de las poblaciones atlánticas (ver Hansen y Mensberg 1998) a las poblaciones de trucha de la cuenca mediterránea, existen diversas situaciones que podrían explicar la falta de correlación entre flujo génico y distancia geográfica que se observa en las cuencas del Ter y el Llobregat: (i) muestreos no representativos de las poblaciones de los ríos; (ii) estructura jerárquica del flujo genético, donde el flujo genético dentro del curso fluvial se produce mediante un modelo de isla, mientras que el flujo genético entre cursos (afluentes) sigue un modelo *stepping-stone*; y (iii) tamaños poblacionales efectivos pequeños en las poblaciones de los tributarios provocando una fuerte deriva genética que podría enmascarar los patrones de flujo génico. Sin embargo, la primera opción no parece estar implicada en este caso ya que la extensión de río analizado en el Ter y el Llobregat no es diferente a las extensiones analizadas en los afluentes del río Ebro, dónde sí se ha observado aislamiento por distancia. Las opciones más probables serían por tanto las otras dos, o una combinación de ambas. Como se discute más adelante, las poblaciones pirenaicas parecen tener tamaños efectivos similares a los de algunas poblaciones noreuropeas y existen dinámicas de flujo génico entre poblaciones próximas.

Los salmónidos tienden a presentar una estabilidad temporal en sus composiciones genéticas (Nielsen *et al.* 1997, 1999a, 1999b, Tessier y Bernatchez 1999, Carlsson y Nilsson 2000, Hansen *et al.* 2002), pero estudios en poblaciones noreuropeas de trucha común han detectado fluctuaciones alélicas en cortos lapsus de tiempo que se consideran el resultado de la deriva génica consecuencia de los reducidos tamaños efectivos de las poblaciones (Jorde y Ryman, 1996). En las poblaciones de la isla Gotland (Mar Báltico, Suecia), dónde el tamaño efectivo de las hembras no es superior a 30, se ha observado que entre el 4-5% de la diversidad mitocondrial corresponde a

cambios en la composición haplotípica entre cohortes (Laikre *et al.* 2002). En otras ocasiones, las fluctuaciones temporales reflejan la inestabilidad del hábitat. En estos casos parecen tener un papel importante los procesos locales de extinción y recolonización asociados a una estructura de metapoblación en las zonas de estudio (Øestergaad *et al.* 2003, Ayllon *et al.* 2006). Cuando las poblaciones son grandes y los hábitats estables, no suelen producirse alteraciones en las frecuencias alélicas (Hansen *et al.* 2002).

En líneas generales, los análisis de AMOVA en el Pirineo oriental mostraron que el componente temporal de la variación es bastante inferior al espacial (Tabla 4-9). Este patrón ha sido detectado también en otros estudios con salmónidos (Morán *et al.* 1995, Carlsson *et al.* 1999, Nielsen *et al.* 1999a, Laikre *et al.* 2002, Palm *et al.* 2003). Sin embargo, la distribución espacial refleja en general procesos ocurridos a lo largo de miles de años, mientras que las fluctuaciones temporales se han analizado habitualmente en términos de, a lo sumo, unas decenas de años. En el Pirineo, los cambios haplotípicos afectan a un 8% de toda la diversidad descrita (Tabla 4-9), proporción que aunque pueda parecer pequeña, esta asociada a un periodo de tiempo de tan sólo unos 10 años. Así, en la cuenca del río Ter los estudios alozímicos han detectado fluctuaciones significativas de las frecuencias alélicas en el período de 1990-1999 que se han considerado el reflejo de procesos de deriva génica (Araguas *et al.* 2004). Los análisis del presente trabajo sugieren que tales procesos afectan también en algún grado a la composición haplotípica, en la que se ha producido un aumento de los haplotipos del linaje AD en la localidad de 2-Vallter. Una situación parecida se observa en 20-Tor. En conjunto, la mitad de las poblaciones han sufrido algún tipo de alteración en la composición haplotípica (Tabla 4-8), y sólo los cambios ocurridos en 9-Riutort parecen reflejar el impacto de las repoblaciones. Por tanto, se puede concluir que en cortos periodos de tiempo evolutivo pueden producirse notables cambios genéticos en estas poblaciones mediterráneas.

4.2.4 Flujo génico

A pesar de su alta capacidad de dispersión, la trucha común manifiesta una elevada diferenciación poblacional (Ferguson, 1989, García-Marín *et al.* 1999, Grant *et al.* 1999, Bernatchez 2001, Cortey *et al.* 2004). La presencia de

ejemplares anádromos favorece la cohesión entre las poblaciones noreuropeas (Hansen *et al.* 2002), pero a medida que tales ejemplares desaparecen aumenta la diferenciación poblacional al restar en los ríos únicamente poblaciones residentes (Morán *et al.* 1995, Bouza *et al.* 1999, Sanz *et al.* 2000). La diferenciación poblacional es especialmente notable entre las poblaciones mediterráneas (Apostolidis *et al.* 1996, Giuffra *et al.* 1996, Poteaux *et al.* 1999, Berrebi *et al.* 2000a, Sanz *et al.* 2002, 2006, Cortey *et al.* 2004). En general, la diferenciación poblacional resulta del balance entre la divergencia generada por los procesos de deriva asociados al tamaño efectivo de las poblaciones (N_e) y la fuerza homogenizadora del flujo génico (m). El producto Nem mide el número efectivo de migradores entre las poblaciones, siendo una regla comúnmente aceptada que un valor de 1 es suficiente para que la migración evite la completa diferenciación de las poblaciones (Wright 1969, Slatkin 1987). Valores inferiores a la unidad se relacionan con una interrupción del flujo génico y bajos tamaños efectivos, en tal situación, la deriva génica conduce a la diferenciación poblacional (Allendorf y Phelps 1981, Allendorf 1983, Mills y Allendorf 1996, Frankham *et al.* 2002). La magnitud del número efectivo de migradores se puede estimar a partir de los coeficientes de diferenciación poblacional, ya que en poblaciones dónde existe un equilibrio entre la migración y la deriva genética, la diferenciación poblacional es inversamente proporcional al número efectivo de migradores. En el caso de datos matriarcales:

$$F_{ST} = \frac{1}{1 + 2N_{ef}m_f} \text{ (Takahata y Palumbi 1985)}$$

donde N_{ef} es el tamaño efectivo de las hembras, m_f la tasa de migración, y su producto representa el número efectivo de hembras migradoras.

Los valores obtenidos en el Pirineo oriental son en general inferiores a 1 (Tabla 4-22), y confirman el aislamiento actual entre los diversos ríos, por la falta de ejemplares anádromos y la contracción de las poblaciones a las cabeceras. En el análisis particular de cada cuenca, no resulta sorprendente el reducido valor de hembras migradoras obtenido para el Llobregat, ya que su curso principal y el Cardoner confluyen aguas abajo de Manresa (Barcelona), en zona de ciprínidos y donde no existen en la actualidad poblaciones de truchas, por lo

que es de suponer un largo periodo de aislamiento entre las poblaciones de ambos cursos fluviales. Sí son sorprendentes los bajos valores obtenidos en el Ter y la Noguera Ribagorzana, porque el territorio estudiado en ambos ríos constituye un continuo de poblaciones truchícolas. En el caso del Ter, los resultados encajan con los del análisis del aislamiento por distancia (Tabla 4-6) que no detectaron un patrón de flujo génico entre las poblaciones de esa cuenca. Desde finales del siglo XIX, esta cuenca, y la del Llobregat están altamente afectadas por captación de aguas mediante azudes y pequeñas presas (ACA 2005), que en el periodo estival pueden provocar que se seque el cauce del río aguas abajo, produciéndose perturbaciones en el ambiente, lo que seguramente ha favorecido la fragmentación y el aislamiento de las poblaciones (Heath *et al.* 2002, Øestergaad *et al.* 2003, Yakamoto *et al.* 2004, Van Houdt *et al.* 2005). En la Noguera Pallaresa la estima del número efectivo de hembras migradoras es prácticamente 1, valor que estaría de acuerdo con el patrón de aislamiento por distancia observado.

Tabla 4-22. Diferenciación poblacional (F_{ST}) y Número efectivo de hembras migradoras ($N_{ef}m_f$) en el Pirineo oriental. $N_{ef}m_f = (1 - F_{ST})/2F_{ST}$.

Territorio/Cuenca	F_{ST}	$N_{ef}m_f$
Pirineos Orientales	0.636	0.29
Ter	0.575	0.37
Llobregat	0.776	0.14
Ebro	0.651	0.26
Noguera Pallaresa	0.322	1.05
Noguera Ribagorzana	0.696	0.21

A pesar de las diferencias anteriores, la estructura poblacional que se concluye de las distribuciones haplotípicas (Tablas 4-5 y 4-9) sugiere sin embargo un patrón común y coherente en todas las cuencas: las componentes de diferenciación entre afluentes son en general superiores a las obtenidas dentro de cada afluente. Así en el Ter (2-Vallter) predomina el clado 2-6 del linaje ME, mientras que en su afluente Freser (3-Massanes, 4-Queralbs, 5-Nuria) predominan haplotipos del clado 2-1 del linaje AD, y en el afluente de éste, el Rigart (6-Rigart), es abundante el clado 2-7 del linaje ME. En el Llobregat (7-

Riera Monells, 9-Riutort) el clado predominante es el 2-5, mientras su afluente Cardoner (10-Castellar, 11-Aiguadevall I i 12-Aiguadevall II) presenta los clados singulares 2-8 y 2-9. En la Noguera Pallaresa, las muestras analizadas se localizan principalmente en su afluente Noguera de Vallferrera donde abunda el clado 2-5 del linaje ME, siendo escasos los haplotipos del linaje AD. Sin embargo, en la Noguera de Cardós (21-Ainet Cardós, 22-Cardós) que confluye con la Noguera de Vallferrera pocos kilómetros antes de que desemboque en la Pallaresa, se encuentra en frecuencia moderada los haplotipos del clado 2-1 del linaje AD. Ese linaje (clado 2-4) es el predominante en otro afluente de la Pallaresa, el Flamicell (23-Manyanet). En el curso principal de la Noguera Ribagorzana (muestras 28-P Conangles a 32-Ribagorzana IV) predominan los haplotipos del clado 2-1 (linaje AD), siendo también este clado el único presente en su afluente Salenques (muestras 33 y 34). Sin embargo en sus afluentes Noguera de Tor (24-Contraig, 25-Sant Nicolau y 26-Cavallers) y Llauset predomina el clado 2-3, también del linaje AD, mientras que en el Baliera (37-Ribera, 38-Baliera y 39-San Silvestre) los haplotipos más abundantes son los del clado 2-5 del linaje ME. Este patrón con diferentes demes locales en tributarios separados por una escasa distancia hidrográfica parece estar extendida en la trucha común. En la cuenca mediterránea se han detectado diferencias entre dos tributarios próximos del río Orb en Francia (Poteaux *et al.* 1999). Además, estos patrones de diferenciación también se han detectado en estudios de la cuenca atlántica. En el análisis realizado sobre una extensión de 200 Km del fiordo Limfjord situado en la Península de Jutlandia (Dinamarca), Ruzzante *et al.* (2001) observaron que en regiones donde las poblaciones eran nativas existían diferencias significativas entre los tributarios que las formaban. Hansen *et al.* (2002) observaron una diferenciación clara entre poblaciones anádromas de 5 ríos daneses diferentes situados también en Jutlandia. Además, también se han descrito a escala microgeográfica, ya que se ha observado una diferenciación significativa entre localidades del río Nordre Finnvikelv (Noruega) alejadas tan sólo unos 500 metros pero situadas en tributarios diferentes (Carlsson *et al.* 1999).

Los análisis temporales (Tabla 4-8) sugieren también que algunos de los cambios en la composición genética de las poblaciones encajan con posibles

migraciones desde poblaciones próximas. Los cambios más significativos han ocurrido en 25-Sant Nicolau y 26-Cavallers, en la cuenca de la Noguera de Tor afluente del Noguera Ribagorzana. En estas dos localidades los haplotipos del clado 2-1 han sido reemplazados por haplotipos del clado 2-3 en tan sólo 10 años (1993-2002, Tabla 4-8). Este clado 2-3 era el más representativo en 24-Contraig, la otra localidad analizada en 1993 en el río Noguera de Tor. En la cuenca de la Noguera de Vallferrera, en 20-Tor se obtiene también un cambio significativo entre 1993 y 1999 debido a la irrupción de haplotipos del clado 2-1 del linaje AD. Esos haplotipos son escasos (10%) en el resto de la cuenca del Vallferrera, pero gozan de una abundancia moderada (30%) en el Noguera de Cardós (21-Ainet Cardos). Rodríguez (2002) indica, que aunque el movimiento general de los salmónidos en ríos europeos y norteamericanos es de unas decenas de metros durante los períodos no reproductivos, existe un porcentaje de individuos en las poblaciones (alrededor del 20%) que pueden realizar desplazamientos de varios kilómetros.

Estudios de las poblaciones noreuropeas, indican que en hábitats inestables, la trucha común parece constituir un sistema de poblaciones pequeñas y altamente interconectadas, que intercambian ejemplares de manera continuada (Laikre *et al.* 2002, Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005). Esta dinámica poblacional se ha observado también en poblaciones atlánticas del noroeste peninsular (Ayllon *et al.* 2006) y no es descartable que sea la responsable de los resultados obtenidos en los ríos mediterráneos, los de regímenes hídricos más inestables en toda la distribución de la trucha común, debido a la marcada estacionalidad del clima Mediterráneo (Gasith y Resh 1999, Font-Tulot 2000), con períodos de sequía más frecuentes que la vertiente atlántica (Martín-Vide y Gómez 1999). El régimen hídrico puede controlar la demografía de las poblaciones de salmónidos durante la mayor parte de su vida (Milner *et al.* 2003).

A pesar de que los análisis temporales, tanto aquéllos basados en las comparaciones interanuales como los que compararon las diferentes cohortes de edad sugieren una estabilidad en la composición genética de la Noguera de Vallferrera en un periodo de 6 años (1997-2002) (ver apartado 4.1.4.3 y Tabla 4-16), los análisis realizados indican una pequeña diferenciación entre las 4

muestras analizadas en la Vallferrera y la de la Noguera de Cardós tanto en la composición haplotípica como en la estructura revelada por los loci microsatélites (Tablas 4-13 y 4-14) que podría encajar en la dinámica poblacional y el patrón de flujo génico anterior. El análisis con loci microsatélites, marcadores más sensibles, sugiere una ligera diferenciación del punto 19-Alins con respecto a las otras 3, y su proximidad con las muestras del 22-Cardós. De esta manera, los loci microsatélites indican un patrón de aislamiento por distancia que pasa desapercibido con el análisis de las distribuciones haplotípicas. Los microsatélites son muchísimo más variables y por tanto más apropiados para la detección de aislamiento por distancia entre poblaciones altamente relacionadas (Estoup *et al.* 1998). Estudios realizados en un tramo de 11 Km del río Farsan (Suecia), detectaron diferenciación geográfica entre los diferentes puntos de muestreo utilizando el análisis de 5 loci microsatélites, incluso entre localidades separadas sólo 1.5 Km, a pesar de que sus datos de marcado-recaptura indicaron que en ausencia de barreras hidrográficas el movimiento de las truchas río arriba era de cómo mínimo 7 Km. En ese río, se considera que la trucha común presenta una estructura poblacional compleja mantenida por una alta fidelidad al puesto de fresa y un limitado, pero importante, flujo génico entre las secciones más cercanas dentro del río (Calsson y Nilsson 2000).

4.2.5 Tamaño efectivo

La distribución de las clases de edad a lo largo de las 4 localidades estudiadas en el tramo de 6.5 km de la Noguera de Vallferrera no es homogénea ($\chi^2=38.77$; gdl=18; $P<0.01$). Así, en 16a-Vallferrera III se detectó la principal contribución de individuos de más de 4 años (5+ y 6+) y, aunque es conocida la dificultad de capturar con pesca eléctrica los individuos pequeños de clase 0+ (Lobón-Cerviá 1991, Nordwall 1999) y por tanto su abundancia debe ser relativamente considerada, la clase 0+ fue la más abundante en 15a-Vallferrera II (Tabla 4-19). Milner *et al.* (2003) propusieron que las discrepancias en abundancia de las clases de edad entre determinados tramos, puede ser habitual, debido a que existen hábitats más propicios para determinadas clases de edad. Estos autores recomendaron el muestreo de diferentes puntos dentro de un mismo curso fluvial para conocer la estructura poblacional. La

distribución de las clases de edad en este río son parecidas a las de otros ríos de la Península Ibérica donde predominan las clases 1+ y 2+ (García de Jalon *et al.* 1986, Lobón-Cerviá *et al.* 1997, Nicola y Almodóvar 2002), en la Vallferrera, sin embargo, hay una mayor presencia de ejemplares de edad superior a 3+.

El tamaño efectivo (N_e) de las poblaciones de trucha es de capital importancia para determinar la viabilidad a corto término de tales poblaciones. La pérdida de variabilidad genética por deriva depende de N_e y no del censo (N) actual de la población (Kalinowski y Waples 2002). Los principales factores que provocan una diferenciación entre N_e y N son un *sex-ratio* desigual, una elevada varianza en los tamaños familiares y fluctuaciones de los tamaños poblacionales a lo largo de las generaciones (Frankham *et al.* 2002). El factor más común en la reducción de la relación N_e/N es la fluctuación en el tamaño poblacional a lo largo de las generaciones, seguido de la variación en el tamaño familiar, y siendo la variación en el *sex-ratio* un factor menos habitual (Frankham 1995b). En poblaciones con tamaños efectivos pequeños se espera que la actuación de la deriva sea mucho más severa que en poblaciones con tamaños efectivos superiores, provocando la pérdida de variabilidad genética y aumentando la diferenciación entre las poblaciones (Wright 1969, Nei *et al.* 1975). Además, esta situación provoca problemas en la población que pueden llevar a su extinción (Richards y Leberg 1996, Newman y Pilson 1997). Las estimas del tamaño efectivo de reproductores por año (N_b) obtenidos a partir de la comparación interanual se sitúan en torno a los 50 individuos (rango 25.7 - 55.3), muy parecidas a las que se obtienen con la aproximación de Bartley *et al.* (1992) a partir del desequilibrio de ligamiento (Tabla 4-18). De acuerdo con Waples (2005) y considerando un tiempo de generación (G) de 3 años en la trucha común en este río (Tabla 4-19), estos valores sugieren unos tamaños efectivos por generación de alrededor de 150 ejemplares ($N_b \times G$). La estimación a partir de la comparación entre las cohortes de 1999 y 2002 indica sin embargo valores superiores (417 ejemplares), muy próximas al censo estimado.

La estimación del tamaño efectivo a partir de datos genéticos resulta todavía complicada ya que muchas de las técnicas desarrolladas se basan en suponer

generaciones discretas y especies que se reproducen una sola vez (semélparas). Para especies con generaciones solapadas y puestas en varios años (iteróparas), como es el caso de la trucha común, las estimas obtenidas deben considerarse con precaución. Por ejemplo, las estimas basadas en comparaciones interanuales en donde el plazo de tiempo transcurrido entre la obtención de las dos muestras es inferior a dos veces el tiempo de generación representan en general infraestimaciones (Palm *et al.* 2003, Waples 2005). Jorde y Ryman (1995) desarrollaron una aproximación a partir de la comparación entre cohortes donde $Ne = C/2GFk'$, siendo G el tiempo de generación, Fk' una modificación del coeficiente Fk de Pollak (1983) utilizado para estimar las fluctuaciones alélicas entre cohortes consecutivas de tamaño reducido (Jorde comunicación personal) y C es un factor de corrección asociada a los patrones demográficos y reproductivos de la población. En este estudio no se dispone de datos para estimar C , sin embargo, los estudios de poblaciones noreuropeas indican que, en general, el cociente C/G tiene un valor de aproximadamente 2 (Jorde y Ryman 1996, Palm *et al.* 2003). Dada esa situación, $Ne \approx 1/Fk'$ puede representar una aproximación en ausencia de datos reproductivos y demográficos (Jorde, comunicación personal). Los valores calculados en la Vallferrera son $Fk' = 0.0040591$ y $Ne = 246$ si se consideran todas las cohortes con más de un ejemplar analizado, o 0.0070250 y 142 si sólo se tienen presentes aquellas cohortes con más de 10 individuos capturados (1999, 2000, 2001, 2002). Ambos valores se sitúan dentro del rango descrito para poblaciones residentes en lagos de Suecia (52-480, Jorde y Ryman, 1996), aunque sorprendentemente son superiores a los observados en poblaciones residentes en el afluente Haravattsån del río Indalsälven (19-48) de ese país (Palm *et al.* 2003), afluente con un caudal medio de 1.3 m³/s idéntico al caudal medio de la Noguera de Vallferrera en la estación de aforo de Alins en el periodo 1965-2001. Estas estimas de tamaño efectivo son claramente inferiores a las detectadas en las poblaciones anádromas (rango 49-1087, Hansen *et al.* 2002).

Como ya se ha comentado, en la trucha común (Laikre *et al.* 2002, Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005), como en otros salmónidos (Consuegra *et al.* 2005, Ayllon *et al.* 2006) se especula con que la estructura poblacional podría

estar compuesta por un sistema de pequeños demes temporalmente inestables, pero altamente interconectados. En tal situación, los tamaños efectivos locales de los demes podrían estar sobrestimados si no se considera el efecto de la migración entre ellos (Jensen *et al.* 2005). El estudio simultáneo del tamaño efectivo y la migración en la Vallferrera sugiere que en esta población mediterránea se podría reproducir ese patrón de estructura poblacional (Tabla 4-21), con una tasa de migración de entre el 7 y el 14% entre las truchas de la Noguera de Vallferrera y la Noguera de Cardós. Estos niveles de flujo génico son inferiores a los que se detectaron entre las poblaciones de la isla de Bornholm ($m=0.23-0.99$, Østergaard *et al.* 2003), pero no muy diferentes a las observadas entre los tributarios de lago Hald ($m=0.13-0.36$, Jensen *et al.* 2005). Se sitúan además ligeramente por encima de las estimas de flujo entre poblaciones anádromas danesas de los ríos Karup, Vejle y Kovads ($m=0.01-0.09$, Østergaard *et al.* 2003).

Los tamaños efectivos de las hembras reproductoras estimados en la Vallferrera fueron bastante bajos (Tabla 4-18) pero en concordancia con las estimas obtenidas en otras localidades pirenaicas (Tabla 4-23). Estas estimas deben valorarse con precaución ya que reflejan sólo información de un único locus, por ello, no es extraño que los intervalos de confianza vayan de 0 a infinito. En el mismo sentido, una estimación de tamaño infinito no debe valorarse en el sentido biológico de una población enorme, sino que sólo informa de la imposibilidad de detectar el efecto de la deriva con la metodología aplicada (ver Laikre *et al.* 2002). Sin embargo, el hecho de que la mayoría de estimaciones indican un reducido grupo de hembras reproductoras en las poblaciones del Pirineo sugiere que la estructura poblacional podría ser semejante en los diferentes ríos. Además, tamaños reducidos pueden justificar los cambios significativos en la composición de haplotipos detectados en esas poblaciones en tan sólo 6 años (Tabla 4-8).

Los valores de tamaños efectivos de hembras son similares a los estimados por generación para trucha anádroma en la isla de Gotland (Suecia), que no superaron las 30 hembras (10-80, Laikre *et al.* 2002) y donde también se detectan fluctuaciones temporales. Sin embargo, en poblaciones residentes del lago Blanktjärnen, también de este país, se ha estimado un tamaño efectivo de

hembras de 58 (Laikre *et al.* 1998), prácticamente la mitad del tamaño efectivo de la población (97, Jorde y Ryman 1996).

En la Noguera Vallferrera el tamaño efectivo de hembras reproductoras es mucho menor a la mitad del valor total de reproductores (N_b) estimado mediante loci microsatélites. Parece que, de manera general, el número de machos supera al de hembras durante el periodo reproductivo de la trucha común (Baglinière *et al.* 1989).

En las poblaciones atlánticas, donde conviven poblaciones de truchas anádromas y residentes comúnmente se ha observado que el número de machos supera al de las hembras en las poblaciones residentes (Euzenat 1999, Hansen *et al.* 2000, Schreiber y Diefenbach 2005). La presencia de machos juveniles sexualmente maduros en las poblaciones de salmónidos que se reproducen es habitual (Martínez *et al.* 2000, Klemetsen *et al.* 2003, Consuegra *et al.* 2005), lo que explicaría, además, que el tamaño efectivo de hembras sea inferior al de machos.

Tabla 4-23. Estimación del tamaño efectivo de las hembras (Nef) de las poblaciones pirenaicas donde se disponía de muestras temporales. Las estimaciones se realizaron con el programa Ne estimator (Peel et al. 2004) teniendo en cuenta un tiempo de generación (G) de la trucha común de tres años. N: número de individuos analizados. Para las localidades 2-Vallter y 9-Riutort el primer muestreo se realizó en el año 1990, y en la localidad de Núria se realizaron en los años 1998 y 2001.

Población	Cuenca	N 1993	N 1999	N 2002	Nef 93,99	Nef 99,02	Nef 93,02
2-Vallter	Ter	15	19	38	8.8 (2.1 - 57.7)	5.8 (1.1 - ∞)	4.5 (0.6 - 17.3)
5-Núria	Ter	-	16	16	-	-	8.0 (0.5 - ∞)
9-Riutort	Llobregat	21	25	26	6.1 (0.3 - 75.6)	7.4 (0.4 - ∞)	13.8 (0.6 - ∞)
13-Pla de Boet	Pallaresa	3	13	32	15.2 (0.1 - ∞)	18.8 (0.3 - ∞)	∞ (0.4 - ∞)
20-Tor	Pallaresa	18	22	-	4.1 (0.2 - 110.9)	-	-
21-Ainet Cardós	Pallaresa	25	23	26	3.6 (0.3 - 21.2)	∞ (0.2 - ∞)	4.2 (0.3 - 24.5)
23-Manyanet	Pallaresa	23	25	-	∞ (0.6 - ∞)	-	-
25-Nicolau	Ribagorzana	23	17	-	0.8 (0.1 - 3.1)	-	-
26-Cavallers	Ribagorzana	7	23	23	0.3 (0 - 2.1)	5.3 (0 - ∞)	0.4 (0.0 - 2.5)
28-Conangles	Ribagorzana	22	24	24	7.2 (0.1 - ∞)	12 (0 - ∞)	∞ (0.5 - ∞)

4.2.6 Impacto de las repoblaciones

La introgresión de genes exógenos como consecuencia de las repoblaciones con estocs originarios de centroeuropa pueden alcanzar niveles alarmantes en las poblaciones mediterráneas (Almodóvar *et al.* 2006). En el Pirineo catalán, se han detectado valores medios superiores al 10% (Araguas *et al.* 2004, Aparicio *et al.* 2005). Araguas *et al.* (2004) mediante el análisis de loci enzimáticos encontraron que en tan sólo 6 años (1993-1999) las repoblaciones han provocado un aumento de la diversidad intrapoblacional, pero una disminución de la diferenciación de las poblaciones en la misma zona que se analizó en este estudio. Estos efectos quedan claramente de manifiesto en el anterior análisis de la Noguera de Vallferrera donde las relaciones poblacionales y los niveles de diversidad intrapoblacional varían si se tienen en cuenta, o no, los ejemplares repoblados (Tabla 4-8, Fig.4-5, Fig. 4-6, Fig. 4-7).

El locus *LDH-C** ha sido utilizado como marcador genético de gran importancia en el seguimiento de las repoblaciones de trucha común tanto en la Península Ibérica como en otros países mediterráneos. Aparentemente, las poblaciones mediterráneas antes de iniciarse las repoblaciones se encontraban fijadas para el alelo *LDH-C* 100* (Hamilton *et al.* 1989). En cambio, las poblaciones de piscifactoría utilizadas en esta región son de origen noreuropeo y se encuentran fijadas para el alelo *LDH-C*90* (García-Marín *et al.* 1991, Martínez *et al.* 1993). De esta manera, la simple frecuencia del alelo *LDH-C*90* se considera una estima del impacto de las repoblaciones en esas poblaciones naturales (Moran *et al.* 1991, Martínez *et al.* 1993, García-Marín *et al.* 1999, Antunes *et al.* 2001, Almodóvar *et al.* 2001, Poteaux *et al.* 2001, Marzano *et al.* 2003, Caputo *et al.* 2004).

McMeel *et al.* (2001) propusieron el estudio de los alelos del locus mediante la digestión de un fragmento del gen de 464pb amplificado mediante PCR. Mediante esta técnica, la frecuencia del alelo *LDH-C*100* en la muestra del centro piscícola de Bagà de los ejemplares usados para las repoblaciones (42c-Bagà 03) fue de 0.026, mucho menor que la observada en el grupo de reproductores (42a-Bagà) (Tabla 4-24). Esta presencia del alelo*100 en el centro piscícola parece la consecuencia de los intentos de cruzar individuos de piscifactoría con individuos nativos que se han realizado durante los últimos 10

años. Aunque se ha conseguido un grupo de reproductores con una moderada frecuencia del alelo nativo, la menor frecuencia del alelo en los ejemplares destinados a la repoblación, podría reflejar el bajo éxito reproductor de los individuos híbridos según el responsable del centro (Antonino Clemente, comunicación personal). De hecho, Aparicio *et al.* (2005) no detectaron el alelo*100 en una muestra obtenida el año 2001 en el mismo centro piscícola, por lo que se puede suponer que su incorporación es relativamente reciente y no ha podido afectar a las muestras de este estudio capturadas con anterioridad a ese año. Dada la baja frecuencia del alelo nativo en el estoc del centro piscícola, en adelante se considerará que la frecuencia del alelo*90 en las poblaciones nativas sigue aun proporcionando una idea aproximada del impacto genético de las repoblaciones. Además, debido a que generalmente los intentos de hibridación en el centro piscícola entre ejemplares de su estoc y los nativos capturados en el río han sido del tipo hembra estoc x macho nativo (A. Clemente comunicación personal), la aparición del alelo nativo *LDH-C*100* no vino acompañada de la presencia de haplotipos pertenecientes a los linajes ME o AD típicos de las poblaciones nativas de la región. Una situación similar se ha descrito en el centro piscícola de Canourgue en el sur de Francia, la frecuencia del alelo nativo *LDH-C*100* fue de 0.030, sin embargo todos los haplotipos mitocondriales descritos en ese centro también pertenecían exclusivamente al linaje AT (Poteaux *et al.* 2001).

Tabla 4-24. Porcentaje del alelo *LDH-C* 90* y proporción de haplotipos del linaje AT en el Pirineo Oriental. Con asterisco se indican muestras analizadas en Sanz *et al.* (2002) para *LDH-C** y en Cortey *et al.* (2004) para haplotipos mitocondriales.

Población	Cuenca	<i>LDH-C*90</i>	AT ADNmt
1-Tech	Tech	0.000	0.000
2e-Vallter 03	Ter	0.000	0.000
3-Massanes	Ter	0.000	0.000
4-Queralbs	Ter	0.000	0.000
5b-Núria 01	Ter	0.000	0.000
6-Rigart 99	Ter	0.000	0.000
7-Riera Monells	Llobregat	0.479	0.111
8-Arija	Llobregat	1.000	1.000
9c-Riutort 02	Llobregat	0.440	0.269
10-Castellar	Llobregat	0.000	0.000
11-Aiguadeval I	Llobregat	0.000	0.000

Tabla 4-24. Continuación

Población	Cuenca	LDH-C*90	AT ADNmt
12-Alguadeval II	Llobregat	0.111	0.000
13c-Pla de Boet 02	Pallaresa	0.516	0.500
14a-Vallferrera I	Pallaresa	0.000	0.000
15d-Vallferrera II	Pallaresa	0.033	0.033
16d-Vallferrera III	Pallaresa	0.000	0.000
17-Areu I	Pallaresa	0.037	0.037
18-Areu II	Pallaresa	0.028	0.028
19-Alins	Pallaresa	0.000	0.000
21c-Ainet Cardos 02	Pallaresa	0.000	0.000
22a-Cardós	Pallaresa	0.025	0.032
23a-Manyanet 93*	Pallaresa	0.000	0.000
24-Contraig*	Ribagorzana	-	0.000
25b-Nicolau 99*	Ribagorzana	0.180	0.056
26c-Cavallers 02	Ribagorzana	0.308	0.000
27-Malpàs	Ribagorzana	0.000	0.000
28c-P.Conangles 02	Ribagorzana	0.130	0.250
29-N. Ribagorzana I	Ribagorzana	0.079	0.200
30-N. Ribagorzana II	Ribagorzana	0.357	0.100
31-N. Ribagorzana III	Ribagorzana	0.075	0.000
32-N. Ribagorzana IV	Ribagorzana	0.156	0.000
33-Salenques I	Ribagorzana	0.023	0.000
34-Salenques II	Ribagorzana	0.175	0.000
35-Llauset	Ribagorzana	0.000	0.000
36-Estet	Ribagorzana	0.000	0.000
37-Ribera	Ribagorzana	0.000	0.000
38-Baliera	Ribagorzana	0.000	0.000
39-San Silvestre	Ribagorzana	0.000	0.000
40-Aciron*	Cinca	-	0.000
41-Otal*	Cinca	0.167	0.000
Promedio		0.113	0.065
42a-Baga-R	Piscifactoría	0.775	1.000
42c-Baga 03	Piscifactoría	0.974	1.000

En general, el impacto genético medio de las repoblaciones en el Pirineo oriental, medido como la frecuencia promedio del alelo *LDH-C*90*, es bajo (valor medio 0.113, rango 0.000-1.000) y muy similar al 0.124 (rango 0.000-1.000) descrito por Aparicio *et al.* (2005), aunque estos autores detectaron una mayor proporción de muestras afectadas (65% versus 50%). En cualquier caso, las poblaciones españolas de la zona están mucho menos afectadas que las francesas, ya que en estas últimas, la frecuencia media del alelo *LDH-C*90* (0.203) casi duplica a la detectada en la vertiente española y la proporción de poblaciones afectadas es superior (83%, Berrebi *et al.* 2000b). En el presente

estudio, la incidencia más elevada se ha detectado en poblaciones aisladas, como la localidad de 8-Arija (fijada para el alelo *LDH-C* 90*) o la del 13-Pla de Boet. En 8-Arija se localiza un coto con muerte que es intensamente repoblado cada año, posiblemente la sobrepesca y la intensidad de las repoblaciones pueden haber favorecido la desaparición de los genes nativos. De manera similar, 13-Pla de Boet es un punto en la cabecera de la Noguera de Vallferrera, que se sitúa aguas debajo de unos lagos de montaña repoblados en 1993. En las poblaciones francesas de la región se ha observado que tales lagos actúan de reserva de ejemplares de repoblación que favorecen la permanente penetración de los genes exógenos (Berrebi *et al.* 2000b). Afortunadamente en la Vallferrera diversos saltos de agua y un azud aislan esta zona del Pla de Boet de las poblaciones aguas abajo.

Los niveles de introgresión estimados a partir de la frecuencia del alelo *LDH-C*90* fueron en general superiores a los estimados a partir de la frecuencia de los haplotipos atlánticos (AT) de la región de control del ADNmt (Tabla 4-24). Estas diferencias en el grado de introgresión entre genes nucleares y haplotipos mitocondriales se han observado en diversos estudios (Hansen *et al.* 2000, Poteaux *et al.* 2001). Recientemente, un estudio en la zona sur de la Península Ibérica (Sanz *et al.* 2006) ha atribuido esta discordancia entre estimas a la mayor intensidad de la deriva genética sobre el genoma mitocondrial, debido al menor tamaño efectivo de las poblaciones para ese genoma.

Sorprendentemente, en una tendencia general hacia la homogenización de las poblaciones del Pirineo oriental como resultado de la liberación de los ejemplares de repoblación (véase Tabla 4-9 y Araguas *et al.* 2004), estas poblaciones han aumentado sus diferencias en la constitución de los haplotipos nativos entre el año 1993 ($F_{ST}=0.575$, Tabla 4-10) y el año 2002 ($F_{ST}=0.702$). Parece que la presencia de los ejemplares de repoblación podría haber intensificado los procesos de deriva. Así, aunque el impacto directo es reducido, por vías indirectas de competencia ecológica por el hábitat o los recursos durante su corta permanencia en el río, los ejemplares de repoblación contribuyen a mantener tamaños efectivos reducidos en las poblaciones

nativas que intensifican los procesos de deriva y complican la conservación de sus patrimonios genéticos.

5. COMPARACIÓN ENTRE CUENCAS

La estructura poblacional de las especies de zonas templadas del hemisferio Norte ha sido modulada por los cambios de distribución producidos por las fluctuaciones climáticas del Cuaternario (Hewitt 2004). Las poblaciones de las penínsulas del sur de Europa (Ibérica, Itálica y Balcánica) son comúnmente contemplados como regiones estables debido a la menor influencia de las duras condiciones glaciales y, sus poblaciones, básicamente habrían jugado el papel de refugios glaciales (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 2000). Sin embargo, empiezan a destacar los estudios que consideran las poblaciones de esas zonas sureuropeas también como sensibles a los cambios climáticos (Sanz *et al.* 2000, Melo-Ferreira *et al.* 2005, Gómez y Lund 2006). En este sentido, la presencia de diversos linajes de trucha común tanto en la cuenca del Duero como en los Pirineos Orientales indica que ambas regiones han sufrido diversos procesos de colonización y, en consecuencia, que sus poblaciones han sido susceptibles a tales cambios climáticos. Diversas evidencias (número de haplotipos de los linajes, complejidad de los cladogramas, distancias entre los linajes, o momento de las expansiones poblacionales de los principales clados, ver Tabla 5-1) sugieren también que los procesos evolutivos que generan y mantienen la diversidad probablemente han actuado en paralelo en ambas zonas. Sin embargo, la foto final de la distribución de la diversidad no es igual. Así, mientras que en la cuenca del Duero existe una clara separación geográfica de los principales linajes (Fig.3-3, página 71), en los Pirineos se obtiene el patrón en mosaico o reticular (Tabla 4-2, página 98) que caracteriza al resto de la región mediterránea (Sanz *et al.* 2002, Cortey *et al.* 2004).

Los límites de la distribución de los linajes mitocondriales en la cuenca del Duero encajan con límites conocidos en la distribución de la ictiofauna ibérica (Doadrio 2001), además en la región se han descrito zonas de sutura para diversas especies (Fig.1-1, página 16). Los análisis genéticos realizados en las posibles poblaciones “híbridas” (3-Duruelo y 9-Moros) apuntan hacia la existencia de procesos selectivos que favorecen a los haplotipos del linaje DU en el interior de la Depresión del Duero, en territorio español (ver apartado 3.2.4). Aparentemente, hay una restricción a las mutaciones nucleotídicas en el extremo 5' de la región de control de ese linaje (Tabla 3-10, página 91). Coincide con esta observación el hecho de que la incidencia de las

re poblaciones en la cuenca del Duero, medida a partir de la frecuencia de los haplotipos de repoblación con idéntica secuencia en su extremo 5' a la del linaje DU (ATcs1, ATcs2, ATcs3, ATcs4, Tabla 3-1 página 64), duplica a la detectada mediante el alelo *LDH-C*90* (4%, Almodóvar *et al.* 2001), y es también más elevada que la observada en los Pirineos Orientales (6.5%).

Tabla 5-1. Patrones de diversidad genética y causas de su distribución en la Cuenca del Duero y los Pirineos Orientales. TN distancia Tamura Nei. τ : edad de la expansión en unidades de tiempo mutacional. Causas de la distribución: RE: Expansión de rango, por colonización de zonas contiguas (CRE), LDC: Colonización a larga distancia, PF: Antigua fragmentación de rango, RGF: Restricción del flujo génico, por aislamiento por distancia (IBD) o con dispersión a larga distancia (LDD).

Linajes ADNmt	Cuenca del Duero		Pirineos Orientales	
	DU	AT	AD	ME
Haplotipos nativos	19 (Tabla 3-2)	11 (Fig 3-5)	11 (Tabla 4-1)	18 (Tabla 4-1)
Divergencia	TN=0.007475		TN=0.006306	
Clados superiores (nivel 3)	1: 3-1 (Fig.3-5)	2: 3-2 y 3-3 (Cortey 2005)	1: 3-1 (Fig.4-1)	2:3-2 y 3-3 (Fig 4-1)
Divergencia entre clados	-	TN=0.0047034 (Cortey 2005)	-	TN=0.0058051 (Tabla 4-2)
Expansión del clado principal	τ =2.9 (Tabla 3-8)	3-2: τ =3.8 3-3: τ =2.5 (Fig 3-6)	τ =2.5 (Cortey <i>et al.</i> 2004)	τ =2.8 (Cortey <i>et al.</i> 2004)
Causa Distribución (Clados superiores)	RE.CRE (Tabla 3-7)	3-2: LDC 3-3:LDC (Cortey 2005)	PF (Cortey <i>et al.</i> 2004)	RGF (Cortey <i>et al.</i> 2004)
Causa Distribución (Clados encajados en clados superiores)	RE.CRE (Tabla 3-7)	PF // LDC (Cortey 2005) RGF.LDD // RGF.IBD (Antunes <i>et al.</i> 2001)	RGF.IBD	RGF.IBD
Diversidad intrapoblacional (genes nucleares)	0.029 (0.010) Sanz <i>et al.</i> 2000 0.020 (0.014) Bouza <i>et al.</i> 2001		0.022 (0.018) Sanz <i>et al.</i> 2002	
Diversidad intrapoblacional ADNmt (h)	0.3866 (Tabla 3-4)		0.2649 (Tabla 4-4)	
Diferenciación Macrogeográfica	Dos grupos de poblaciones según el dominio del linaje haplotípico. Importante componente hidrográfica. Evidencia de IBD.		Mezcla de ambos linajes. Importante componente hidrográfica. Evidencia de IBD.	
Diferenciación microgeográfica	Desconocida		Probable estructura de metapoblaciones con pequeños demes locales temporalmente inestables.	
Tamaño efectivo local	Desconocido		Probablemente: 50 -150 (machos > hembras)	
Impacto de las repoblaciones LDH-C*	Baja 4% (Almodovar <i>et al.</i> 2001)		Moderada 11% (Tabla 4-24)	
Impacto de las repoblaciones ADNmt	9.8% (Tabla 3-2)		6.5% (Tabla 4-24)	

Con la importante salvedad de esos procesos selectivos que parecen ocurrir en la parte interna de la cuenca del Duero, el patrón que se detecta en los afluentes de este río en la zona del macizo Hespérico en territorio portugués, no es notoriamente diferente al detectado en el Pirineo Oriental. El Pirineo ha sido una zona sujeta a la colonización de los linajes AD y ME. De manera similar, el tramo portugués de la cuenca del Duero ha sido colonizado por dos grupos evolutivos. A una colonización inicial realizada por el clado AT3-2 le siguió posteriormente la del clado AT3-3. Aunque a diferencia de los resultados del Pirineo, sólo en una población (21-Ardena) se detectan simultáneamente ambos clados, no se debe olvidar que el reducido tamaño de las muestras portuguesas y el gran número de 0 en el cladograma de la Fig.3-5 (página 75), indican la necesidad de un estudio más exhaustivo en esa zona, que podría aportar más evidencias de la hibridación entre ambos grupos. Los análisis de clados encajados indican que la historia de las poblaciones en la zona pirenaica y en la cuenca baja del Duero ha estado marcada por procesos de fragmentación y restricción del flujo génico (Tabla 5-1), mientras que en la cuenca interior del río Duero, en el dominio del linaje DU perduran las evidencias de las expansiones de rango.

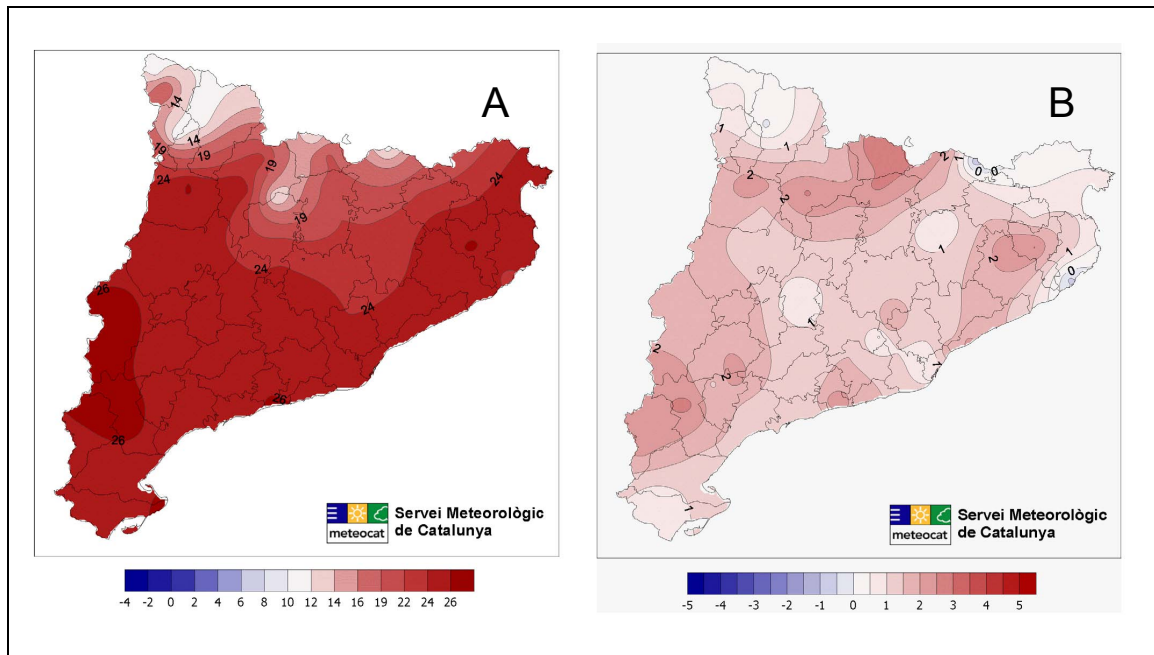


Figura 5-1. Temperatura media mensual (°C) durante Julio del 2005 (A) y diferencia con respecto a la media de años anteriores (B) en Cataluña.

La aportación media interanual en la zona española del río Duero (15168 Hm³) es ligeramente inferior a la registrada para la cuenca del Ebro (18217Hm³), en el que la contribución más importante la realiza el sistema de afluentes Segre-Cinca (6365 Hm³). Los aportes en las cuencas internas catalanas son mucho menores (540 Hm³ el Ter y 420 Hm³ el Llobregat). Sin embargo, una parte importante de la Cuenca del Duero, incluyendo el cauce principal, es zona truchícola, mientras que en las cuencas del Ebro, el Llobregat y el Ter, la trucha común tan sólo habita en los tramos de las cabeceras (Doadrio 2001). Además, en la Depresión del Duero se presentan las temperaturas medias más bajas de todas las cuencas hidrográficas ibéricas. Es por tanto posible que en el interior del Duero se han conservado durante el Cuaternario condiciones idóneas para las poblaciones de trucha común, mientras que en los Pirineos Orientales, durante los periodos interglaciales como el actual, las altas temperaturas (Fig.5-1) y el estiaje estival (el régimen hídrico es básicamente nival, Fig.5-2), reducen la disponibilidad de hábitats y aumentan la fragmentación de las poblaciones.

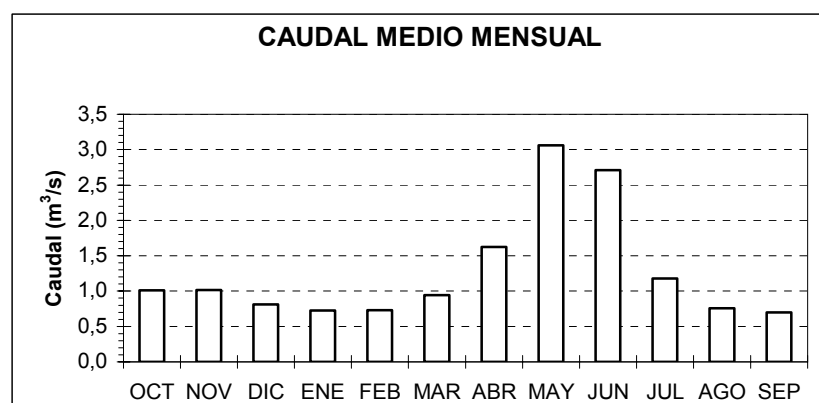


Figura 5-2. Caudal medio mensual en la estación de aforo de Alins en el periodo comprendido entre el año 1965 y el año 1999 (Fuente: Confederación hidrográfica del Ebro).

El registro fósil sugiere que las zonas en los tramos medios de los ríos pirenaicos, actualmente ocupadas por comunidades de ciprínidos, habían mantenido poblaciones de trucha común en épocas glaciales (Muñoz y Casadevall 1997). Esta podría ser también la dinámica que se ha producido en la cuenca baja del Duero, en territorio portugués. Los NCA sugieren que en esa

zona se han producido procesos de colonización a larga distancia (LDC, Tabla 5-1), sin embargo, es posible obtener tal inferencia también a partir de contracciones de rango que produzcan la desaparición de haplotipos ligada a la desaparición de las poblaciones en zonas intermedias (Masta *et al.* 2003).

La presencia de condiciones más favorables en la cuenca del Duero respecto a la observada en la zona pirenaica, podría explicar la aparente mayor diversidad genética presente en sus poblaciones, tanto a nivel nuclear como mitocondrial (Tabla 5-1). Los t-test unilaterales (Duero > Pirineo) para las comparaciones entre los valores medios de diversidad casi resultaron significativos tanto para alozimas (t-test = 1.381 y P=0.089, utilizando los datos en Sanz *et al.* 2000 y Sanz *et al.* 2002), como para el ADNmt (t-test = 1.609, P=0.057).

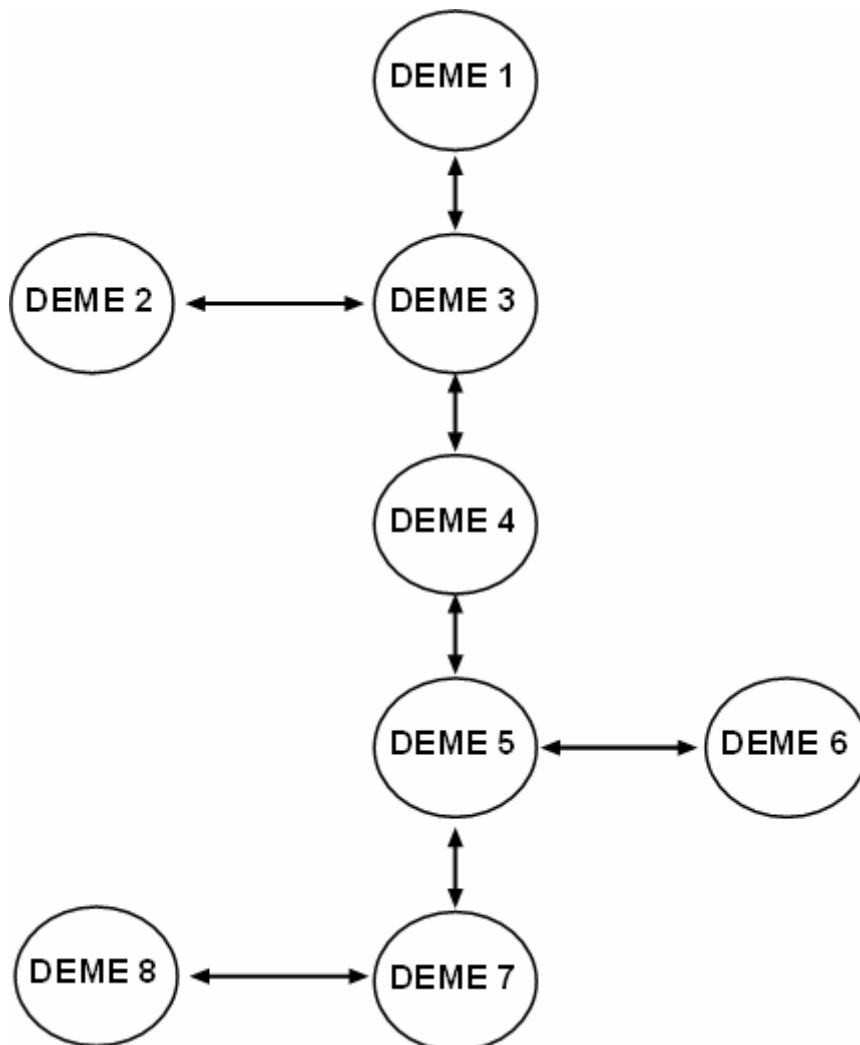


Figura 5-3. Estructura poblacional supuesta para la trucha común en tramos fluviales. Las flechas indican flujo génico.

Estudios recientes en salmónidos indican que la estructura poblacional a escala microgeográfica se basa en la existencia de demes locales que cada generación intercambian un cierto número de individuos (Fig.5-3) (Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005, Ayllon *et al.* 2006). Este patrón encaja con los resultados obtenidos en la zona pirenaica, donde una parte importante de las fluctuaciones temporales en la composición genética de las poblaciones se pueden asociar a migraciones a partir de los afluentes más cercanos (ver Tabla 4-8, página 111). En la cuenca de la Vallferrera, la muestra de 19-Alins obtenida más próxima a la confluencia con la Noguera de Cardós es también la más similar a la población en este último río (ver Tabla 4-13, página 119). En esta situación la estructura poblacional depende básicamente del flujo génico entre los demes y de su tamaño efectivo. Con el tiempo, el patrón de diferenciación debería encajar con modelos de aislamiento por distancia a lo largo del curso fluvial, tal y como aun se detecta en el Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana (Tabla 4-6, página 109). Sin embargo, cuando por causas naturales (cambios climáticos) o artificiales (construcción de presas o embalses) se corta permanentemente el flujo génico entre dos tramos del río, sus poblaciones evolucionan de manera independiente y pueden perderse las evidencias del anterior aislamiento por distancia (ríos Ter y Llobregat).

Esta estructura poblacional en demes interconectados se ha observado en poblaciones que ocupan hábitats inestables (Laikre *et al.* 2002, Østergaad *et al.* 2003), seguramente porque la realidad del patrón en tales hábitats no es exactamente la reflejada en la Fig.5-3, sino una estructura más dinámica, donde la intensidad del flujo entre los demes y el tamaño efectivo de cada uno de ellos es variable en el tiempo dependiendo de las condiciones ambientales (Fig.5-4). Cuando uno de los demes desaparece por factores ambientales desfavorables (p.e. períodos prolongados de sequía), su lugar lo ocupan migradores procedentes de las zonas más cercanas una vez se restablece el hábitat. Además, el posterior flujo génico con los otros demes restablece en corto plazo la variabilidad genética, incluso cuando el tamaño efectivo es bajo (Østergaad *et al.* 2003).

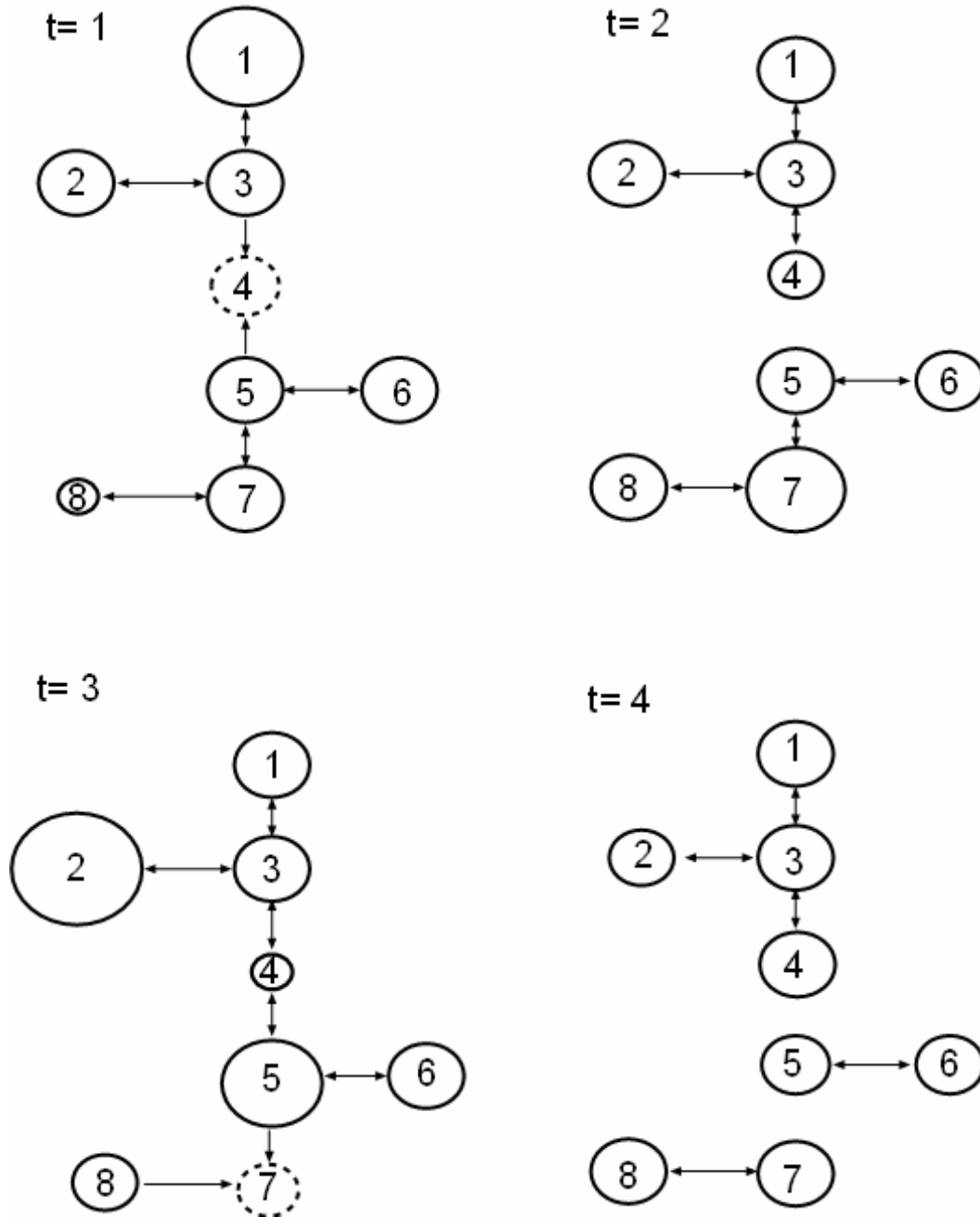


Figura 5-4. Ejemplo de cambios temporales en la estructura poblacional supuesta para la trucha común en tramos fluviales con hábitats inestables. Los números indican los distintos demes locales. Los círculos punteados indican la extinción del deme. El área de los círculos se relaciona con el tamaño efectivo del deme. Las flechas indican flujo génico.

Sólo cuando las condiciones ambientales son favorables y permanecen estables, se obtendría el patrón reflejado en la Fig.5-3. Aunque en la cuenca del Duero no se ha realizado un análisis microgeográfico, el patrón macrogeográfico obtenido indica un marcado componente hidrográfico y un

aislamiento por distancia entre las poblaciones de la Depresión del Duero, donde domina el linaje DU, que es compatible con la dinámica poblacional sugerida en la Fig.5-3. De esta forma, la dinámica local sería idéntica en ambos territorios, pero sólo la mayor inestabilidad de los ríos mediterráneos permitiría analizarla con detalle. El patrón sería más fácilmente detectable en esa situación porque se obtiene una metapoblación que experimenta notables cambios genéticos locales en el corto tiempo, mientras que en regiones ecológicamente estables, se tendría un conjunto de subpoblaciones genéticamente más homogéneas y donde los cambios genéticos serían menos acentuados.

Desde el punto de vista de la conservación, esta estructura poblacional implica por una parte la necesidad de proteger tantos hábitats como sean posibles para preservar la mayor cantidad de demes y por otra asegurar el flujo génico entre las poblaciones a lo largo del curso fluvial (mantenimiento de caudales ecológicos, pasos en las presas, etc...), ya que el flujo génico contribuye al mantenimiento de variabilidad genética de la especie y evita su extinción.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes obtenidas en esta tesis son los siguientes:

1. Los dos linajes mitocondriales descritos en el río Duero (linajes AT y DU) se corresponden con los dos grupos parapátricos descritos en la zona mediante alozimas y se encuentran distribuidos en el territorio siguiendo el patrón ictiológico descrito en la zona. El linaje DU habría estado presente permanentemente en el interior de la cuenca, mientras que las zonas más próximas a la desembocadura habría padecido diversas colonizaciones de grupos de trucha del linaje AT. Además se han detectado evidencias de selección a favor de los haplotipos del linaje DU que explicarían las discrepancias en la distribución de los grupos mediante el ADNmt y los alozimas.

2. En los Pirineos Orientales se ha detectado una alta diversidad para el linaje ME y se ha definido un nuevo clado de nivel 3 que estaría restringido a una única cuenca (río Llobregat). A diferencia de la cuenca atlántica, la distribución de los linajes nativos AD y ME entre las poblaciones no tuvo un patrón geográfico.

3. Entre las poblaciones parece existir un importante componente hidrográfico en la distribución de la diversidad genética y se ha detectado un patrón macrogeográfico de aislamiento por distancia (IBD).

4. En el Pirineo Oriental existen algunas localidades sujetas a fluctuaciones temporales en su composición genética matriarcal. Estas fluctuaciones encajan con procesos de deriva genética y con migraciones de ejemplares procedentes de localidades cercanas.

5. El tamaño efectivo estimado para las poblaciones pirenaicas depende de la técnica utilizada, situándose entre 50 y 150. El tamaño efectivo de las hembras es menos de la mitad del estimado para el conjunto de la población, lo que también explicaría las variaciones temporales en la composición genética de las poblaciones.

6. Con la salvedad de la existencia de selección de los haplotipos del linaje DU comentada anteriormente, los procesos poblacionales que regulan la distribución de la variabilidad genética observada tanto en la cuenca del río Duero como en los Pirineos Orientales podrían ser idénticos y caracterizados por la existencia de múltiples demes locales interconectados entre sí a lo largo de todo el curso fluvial. Este flujo génico entre los demes locales que mantendría los niveles de variabilidad genética elevados a pesar de los reducidos tamaños efectivos locales.

7. El efecto de las repoblaciones, con individuos procedentes de centros piscícolas, parece tener poca importancia en ambas zonas según indica la baja frecuencia que mostraron los marcadores moleculares (tanto el alelo *LDH-C*90*, como los haplotipos del linaje AT típicos de piscifactoría). En los Pirineos Orientales, se encontraron poblaciones naturales altamente introgresadas e incluso fijadas para estos marcadores de repoblación. Los ejemplares repoblados pueden tener sin embargo un efecto indirecto en las poblaciones naturales ya que su presencia reduce el hábitat disponible para los ejemplares nativos y, en consecuencia, contribuyen al reducido tamaño efectivo de las poblaciones, agudizando así los efectos de la deriva genética.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALLENDORF, F.W., N. RYMAN, A. STENNEK, y G. STAHL. 1976. Genetic variation in Scandinavian brown trout (*Salmo Trutta* L). Evidence of distinct sympatric populations. *Hereditas* **83**: 73-82.
- ALLENDORF, F.W., y S.R. PHELPS. 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**:1507-1514.
- ALLENDORF, F.W. 1983. Isolation, gene flow and genetic differentiation among populations.pp:51-65. En: *Genetics and Conservation: a reference for management wild animal and plant populations* (Eds. C.M. Schonewald-Cox, S.M. Chambers, B. MacBryde y L. Thomas). Benjamin-Cummings Publishing Co.
- ALLENDORF, F.W., K.L. KNUDSEN y R.F. LEARY. 1983. Adaptive significance of differences in the tissue-specific expression of a phosphoglucosylase gene in rainbow trout. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:1397-1400.
- ALMODÓVAR, A. 2001. La trucha común hacia una nueva estrategia de conservación. pp:303-313. En: *Atlas y libro rojo de los peces continentales de España* (Ed. I. Doadrio). Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 364pp.
- ALMODÓVAR, A., J. SUÁREZ, G.G. NICOLA, y M. BUENO. 2001. Genetic introgression between wild and stocked brown trout in the Douro basin, Spain. *J. Fish Biol.* **59**(Suppl A):68-74.
- ALMODÓVAR, A., G.G. NICOLA, B. ELVIRA, y J.L. GARCÍA-MARÍN. 2006. Introgression variability among Iberian brown trout Evolutionary Significant Units: The influence of local management and environmental features. *Freshwater Biol.* En revision.
- ALVES, P.C., N. FERRAND, F. SUCHENTRUNK, y D.J. HARRIS. 2003. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* **27**:70-80.
- ANGERS, B., y L. BERNATCHEZ. 1997. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 230-238.
- ANTUNES, A., R. FARIA, S. WEISS, y P. ALEXANDRINO. 2001. Complex evolutionary history in the brown trout: insights on the recognition of conservation units. *Conserv. Genet.* **2**:337-347.
- ANTUNES, A., A.R. TEMPLETON, R. GUYOMARD, y P. ALEXANDRINO. 2002. The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: Genealogy of the transferrin gene in the brown trout. *Mol. Biol. y Evol.* **19**: 1272-1287.
- APARICIO, E., E. GARCÍA-BERTHO, R.M. ARAGUAS, P. MARTÍNEZ, y J.L. GARCÍA-MARÍN. 2005. Body pigmentation pattern to assess

- introgression by hatchery stocks in native brown trout (*Salmo trutta*) from Mediterranean streams. *J. Fish Biol.* **67**:931-949.
- APOSTOLIDIS, A.P., C. TRIANTAPHYLLIDIS, A. KOUVATSI, y P.S. ECONOMIDIS. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L.(Greek brown trout) populations. *Mol. Ecol.* **6**:531-542.
- ARAGUAS R., N. SANZ, C. PLA, y J.L. GARCÍA-MARÍN. 2004. Breakdown of the brown trout evolutionary history due to hybridization between native and cultivated fish. *J. Fish Biol.* **65**(Suppl A):28-37.
- ARNTZEN, J.W., y J. ALEXADRINO. 2004. Ecological modelling of genetically differentiated units of the Iberian endemic golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*. *Herpetol. J.* **14**:137-141.
- AURELLE, D., y P. BERREBI. 2001. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta*, L) populations from south-western France: data from mitochondrial control region variability. *Mol. Ecol.* **10**:1551-1561.
- AVISE, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman y Hall, New York.
- AYLLON, F., P. MORAN, y E. GARCIA-VAZQUEZ. 2006. Maintenance of a small anadromous subpopulation of brown trout (*Salmo trutta* L.) by straying. *Freshwater Biol.* **51**:351-358.
- BAGLINIÈRE, J.L., G. MAISSE, P.Y. LEVAIL, y A. NILHOURHAN. 1989. Population dynamics of brown trout, *Salmo trutta* L., in a tributary in Brittany (France): spawning and juveniles. *J. Fish Biol.* **34**:97:110.
- BALLARD, J.W.O., y M. WHITHLOCK. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* **13**:729-744.
- BALLOUX, F., y N. LUGON-MOULIN. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* **11**:155-165.
- BARTLEY, D., M. BAGLEY, G. GALL, y B. BENTLEY. 1992. Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. *Conserv. Biol.* **6**:365-375.
- BARTON, N.H., y G.M. HEWITT. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **16**:113-148.
- BEHNKE, R.J. 1972. The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes. *J. Fish. Res. Bd. Canada* **29**:639-671.
- BERG, L.S. 1948. *Freshwater fishes of the U.S.S.R and adjacent countries*. National Science Foundation, Washington, D.C.
- BERG, O.K., y M. BERG. 1987. Migration of sea trout, *Salmo trutta* L., from Vardnes in northern Norway. *J. Fish Biol.* **31**:113-121.

- BERNATCHEZ, L., R. GUYOMARD, y F. BONHOME. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphological remote European brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Mol. Ecol.* **1**:161-173.
- BERNATCHEZ, L., J.A. VUORINEN, R.A. BODALY, y J.J. DODSON. 1996. Genetic evidence for reproductive isolation and multiple origins of sympatric trophic ecotypes of whitefish (*Coregonus*). *Evolution* **50**: 624-635.
- BERNATCHEZ, L., y C.C. WILSON. 1998. Comparative phylogeography of nearctic and palearctic fishes. *Mol. Ecol.* **7**: 431-452.
- BERNATCHEZ, L., J.B. DEMPSON, y S. MARTIN. 1998. Microsatellite gene diversity analysis in anadromous arctic char, *Salvelinus alpinus*, from Labrador, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**:1264-1272.
- BERNATCHEZ, L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, y mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* **33**:351-379.
- BERREBI, P., M. POVZ, D. JESENSEK, D. CATTANEO-BERREBI, y A.J. CRIVELLI. 2000a. The genetic native diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soca River, Slovenia. *Heredity* **85**:277-287.
- BERREBI, P., C. POTEAUX, M. FISSIER, y G. CATTANEO-BERREBI. 2000b. Stocking impact and allozyme diversity in brown trout from Mediterranean southern France. *J. Fish Biol.* **56**:949-960.
- BLANCO G., J.A. SÁNCHEZ, E. VÁZQUEZ, E. GARCÍA y J. RUBIO. 1990. Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in *Salmo salar* L. *Aquaculture* **84**:199-209.
- BORGSTRØM, R., y J. MUSETH. 2005. Accumulated snow and summer temperature critical factors for recruitment to high mountain populations of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecol. Freshw. Fish* **14**:375-384.
- BOUZA, C., J. ARIAS, J. CASTRO, L. SÁNCHEZ, y P. MARTÍNEZ. 1999. Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L., at the southern limit of the distribution range of the anadromous form. *Mol. Ecol.* **8**:1-11.
- BOUZA, C., J. CASTRO, L. SÁNCHEZ, y P. MARTÍNEZ. 2001. Allozymic evidence of parapatric differentiation of brown trout (*Salmo trutta* L.) within an Atlantic river basin of the Iberian Peninsula. *Mol. Ecol.* **10**:1455-1469.
- BROWN, W.M., E.M. PRAGER, A. WANG, y A.C. WILSON. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* **18**:225-239.

- CAGIGAS, M.E., E. VÁZQUEZ, G. BLANCO, y J.A. SÁNCHEZ. 2002. Phylogeographical lineales in brown trout (*Salmo trutta*): investigating microgeographical differentiation between native populations from Northern Spain. *Freshwater Biol.* **47**:1879-1892.
- CAMPTON, D.E. 1987. Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and interpretation. pp:161-192. En: *Population genetics and fishery management* (Eds. N. Ryman y F.M. Utter). Washington Sea Grant Program, Seattle.
- CAPUTO, V., M. GIOVANNOTTI, P. NISI CERIONI, M.L. CANIGLIA y A. SPLENDIANI. 2004. Genetic diversity of brown trout in central Italy. *J. Fish Biol.* **65**:403-418.
- CARLSSON, J., K.H. OLSÉN, J. NILSSON, O. OVERLI, y O.B. STABELL. 1999. Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. *J. Fish Biol.* **55**:1290-1303.
- CARLSSON, J., y J. NILSSON. 2000. Population genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) within a northern boreal forest stream. *Hereditas* **132**:173-181.
- CARVALHO, G.R., y T.J. PITCHER. 1994. Molecular Genetics in Fisheries Editorial. *Rev. Fish Biol. Fisher.* **4**: 269-271.
- CASTRIC, V., y L. BERNATCHEZ. 2003. The rise and fall of isolation by distance in the anadromous brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Genetics* **163**:983-996.
- CHAMBERS, G.C., y E.S. MaCAVOY. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Phys. B.* **126**:455-476.
- CLEMENT, M., D. POSADA, y K.A. CRANDALL. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**:1657-1660.
- CONSUEGRA, S., C. GARCÍA DE LEÁNIZ, A. SERDIO, M. GONZÁLEZ MORALES, L. STRAUS, D. KNOX, y E. VERSPOOR. 2002. Mitochondrial DNA variation in Pleistocene and modern Atlantic salmon from the Iberian glacial refugium. *Mol. Ecol.* **11**:2037-2048.
- CONSUEGRA, S., E. VERSPOOR, D. KNOX y C. GARCÍA de LEÁNIZ. 2005. Asymmetric gene flow and the evolutionary maintenance of genetic diversity in small, peripheral Atlantic salmon populations. *Conserv. Genet.* **6**:823-842.
- CORTEY, M., y J.L. GARCÍA-MARÍN. 2002. Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout. *J. Fish Biol.* **60**:1058-1063.
- CORTEY, M., C. PLA, y J.L. GARCÍA-MARÍN. 2004. Historical biogeography of mediterranean trout. *Mol. Phylogenet. Evol.* **33**:831-844.

- CORTEY, M. 2005. Filogeografía de la truita comuna (*Salmo trutta*) basada en la diversitat molecular del DNA mitocondrial. Tesis Doctoral. Laboratori d'ictiologia Genètica. Universitat de Girona.
- Di RIENZO A., A.C. PETERSON, J.C. GARZA, A.M. VALDÈS, M. SLATKIN, y N.B. FREIMER. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**:3166-3170.
- DOADRIO, I. 2001 (Editor). *Atlas y libro rojo de los peces continentales de España*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. CSIC. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- DUFTNER, N., S. WEISS, N. MEDGYESY y C. STURMBAUER. 2003. Enhanced phylogeographic information about Austrian brown trout populations derived from complete mitochondrial control region sequences. *J. Fish Biol.* **62**:427-435.
- DUVERNELL, D.D., y N. ASPINWALL. 1995. Introgression of *Luxilus cornutus* mtDNA into an allopatric populations of *Luxilus chrysocephalus* (Teleostii: Cyprinidae) in Missouri and Arkansas. *Mol. Ecol.* **4**:173-181.
- DYNES, J., P. MAGNAN, L. BERNATCHEZ, y M.A. RODRIGUEZ. 1999. Genetic and morphological variation between two forms of lacustrine brook charr. *J. Fish Biol.* **54**:955-972.
- ELLEGREN, H. 1994. Genomic DNA from museum bird feathers. pp: 211-217. En: *Ancient DNA*, (Eds. B. Herrmann y S. Hummel). Springer-Verlag, New York.
- ELLEGREN, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. - *Trends Genet.* **16**: 551-558.
- ELLIOTT, J.M. 1989. Wild brown trout *Salmo trutta*: an important national and international resource. *Freshwater Biol.* **21**:1-5.
- ELLIOTT, J.M. 1994. *Quantitative Ecology and the Brown Trout*. Oxford University Press, Oxford.
- ENDLER, J.A. 1977. *Geographic variation, speciation and clines*. Princeton University Press, New Jersey.
- ESTOUP, A., P. PRESA, F. KRIEG, D. VAIMAN, R. GUYOMARD. 1993. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*. **71**:488-496.
- ESTOUP, A., C.R. LARGIADIER, E. PERROT, y D. CHOURROUT. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**:295-298.
- ESTOUP, A., F. ROUSSET, Y. MICHALAKIS, J.M. COURNET, M. ADRIAMANGA, y R. GUYOMARD. 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating

- microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Mol. Ecol.* **7**:339-353.
- EUZENAT, G. 1999. *Sea trout (Salmo trutta L.) in Normandy and Picardy*. pp: 175-203. En: *Biology and ecology of the brown trout and sea trout* (Eds. J.L. Baglinière y G. Maisse). Springer-Verlag, Praxis Publications, London.
- EXCOFFIER, L., P.E. SMOUSE, y J.M. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**:479-481.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- FERGUSON, A., y F.M. MASON. 1981. Allozyme evidence for reproductively isolated sympatric populations of brown trout, *Salmo trutta* L. in Lough Melvin, Ireland. *J. Fish Biol.* **18**:629-642.
- FERGUSON, A. 1989. Genetic differences among brown trout, *Salmo trutta*, stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater Biol.* **21**:35-46.
- FERGUSON, A., J.B. TAGGART, P. A. PRODOHL, O. MCMEEL, C. THOMPSON, C. STONE, P. MCGINNITY, y R.A. HYNES. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *J. Fish Biol.* **47**:103-126.
- FONT-TULLOT, I. 2000. *Climatología de España y Portugal*. 2a Ed. Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca.
- FONTAINE, P.M., J.J. DODSON, L. BERNATCHEZ, y A. SLETTAN. 1997. A genetic test of metapopulation structure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**:2434-2442.
- FRANKHAM, R. 1995a. Conservation genetics. *Annu. Rev. Genet.* **29**:305-327.
- FRANKHAM, R. 1995b. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genet. Res.* **66**:95-107.
- FRANKHAM, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.* **10**:1500-1508.
- FRANKHAM, R., J.D. BALLOU, y D.A. BRISCOE. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- FRANKHAM, R. 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* **126**:131-140.
- FRASER, D.J. y L. BERNATCHEZ. 2005a. Adaptive migratory divergence among sympatric brook charr populations. *Evolution* **59**:611-624.

- FRASER, D.J., y L. BERNATCHEZ. 2005b. Allopatric origins of sympatric brook charr populations: colonization history and admixture. *Mol. Ecol.* **14**:1497-1509.
- FU Y.F., y W.H. LI. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**:693-709.
- GARCÍA DE JALÓN, D., E. TOLOSANA, y F. RODRÍGUEZ. 1986. Estimación de algunos parámetros poblacionales de la trucha común (*Salmo trutta fario*) en los ríos pirenaicos. *Boletín de la Estación Central de Ecología* **29**:51-58.
- GARCÍA-MARÍN, J.L., P.E. JORDE, N. RYMAN, F.M. UTTER, y C. PLA. 1991. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture* **95**:235-249.
- GARCÍA-MARÍN, J.L., y C. PLA. 1996. Origins and relationships of native populations of *Salmo trutta* (brown trout) in Spain. *Heredity* **77**:313-323.
- GARCÍA-MARÍN, J.L., F.M. UTTER, y C. PLA. 1999. Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity* **82**:46-56.
- GASITH, A., y V.H. RESH. 1999. Streams in Mediterranean climate regions: abiotic influences and biotic responses to predictable seasonal events. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **30**:51-81.
- GILLES, A., R. CHAPPAZ, L. CAVALLI, M. LORTSCHER, y E. FAURE. 1998a. Genetic differentiation and introgression between putative subspecies of *Leuciscus soufia* (Teleostei : Cyprinidae) of the region of the Mediterranean Alps. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**: 2341-2354.
- GILLES, A., G. LECOINTRE, E. FAURE, R. CHAPPAZ, y G. BRUN. 1998b. Mitochondrial phylogeny of the European cyprinids: Implications for their systematics, reticulate evolution, and colonization time. *Mol. Phylogenet. Evol.* **10**: 132-143.
- GIUFFRA, E., L. BERNATCHEZ, y R. GUYOMARD. 1994. Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Mol. Ecol.* **3**:161-171.
- GIUFFRA, E., R. GUYOMARD, y G. FORNERIS. 1996. Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Mol. Ecol.* **5**:207-220.
- GLÉMET, H., P. BLIER, y L. BERNATCHEZ. 1998. Geographical extent of artic charr (*Salvelinus alpinus*) mtDNA introgression in brook charr populations (*S. fontinalis*) from eastern Québec, Canada. *Mol. Ecol.* **7**:1655-1662.

- GÓMEZ A., y D.H. LUNT. 2006. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. pp (en prensa). En: *Phylogeography in southern European refugia: Evolutionary perspectives on the origins and conservation European biodiversity* (Eds. S. Weiss y N. Ferrand),. Kluwer, Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- GOWER, J.C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods in multivariate analysis. *Biometrika* **53**:315-328.
- GRANT, W.S., J.L. GARCÍA-MARÍN, y F.M. UTTER. 1999. Defining population boundaries for fishery management. pp:27-72. En: *Genetics in Sustainable Fisheries Management* (Ed. S. Mustafa). Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.
- GUO, S.W., y E.A. THOMPSON. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**:361-372.
- GUTIÉRREZ-ELORZA, M. 1994. *Geomorfología de España*. Editorial Rueda. Madrid, 525pp.
- GUYOMARD, R. 1989. Diversité génétique de la truite commune. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **314**:118-135.
- HALDANE, J.B.S. 1954. An exact test for randomness of mating. *J. Genet.* **52**:631-635.
- HAMILTON, K.E., A. FERGUSON, J.B. TAGGART, T. TOMASSON, A. WALKER, y E.FAHY. 1989. Post-glacial colonization of brown trout *Salmo trutta* L.: *Ldh-5* as a phylogeographic marker locus. *J. Fish Biol.* **35**:651:664.
- HANSEN, M.M., y V. LOESCHCKE. 1996a. Genetic differentiation among Danish brown trout (*Salmo trutta* L.) populations, as detected by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *J.Fish Biol.* **48**:422-436.
- HANSEN, M.M., y V. LOESCHCKE. 1996b. Temporal variation in mitochondrial DNA haplotype frequencies in a brown trout (*Salmo trutta* L.) population that shows stability in nuclear allele frequencies. *Evolution* **50**:454-457.
- HANSEN, M.M., y K.L.D. MENSBERG. 1996. Founder effects and genetic population structure of brown trout (*Salmo trutta*) in a Danish river system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**:2229-2237.
- HANSEN, M.M., y K.L.D. MENSBERG. 1998. genetic differentiation and relationship between genetic and geographical distance in Danish sea trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Heredity* **81**:493-504.
- HANSEN, M.M., D.E. RUZZANTE, E.E. NIELSEN, y K.L.D. MENSBERG. 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history

- dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Mol. Ecol.* **9**:583-594.
- HANSEN, M.M., E.E. NIELSEN, D. BEKKEVOLD, y K.L.D. MENSBERG. 2001. Admixture analysis and stocking impact assessment in brown trout (*Salmo trutta* L.), estimated with incomplete baseline data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **58**:1853-1860.
- HANSEN, M.M., D.E. RUZZANTE, E.E. NIELSEN, D. BEKKEVOLD, y K.L.D. MENSBERG. 2002. Long-term effective population sizes, temporal stability of genetic composition and potential for local adaptation in anadromous brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Mol. Ecol.* **11**:2523-2535.
- HANSEN, M.M. 2003. Application of molecular markers in population and conservation genetics, with special emphasis on fishes. Dsc thesis. Faculty of Natural Sciences. University of Aarhus.
- HARRISON, R.G. 1990. Hybrid zones: windows on the evolutionary process. *Oxford Surveys Evol. Biol.* **7**:69-128.
- HARRISON, R.G. 1993. *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press, Oxford.
- HEATH, D.D., C. BUSCH, J. KELLY, y D.Y. ATAG. 2002. Temporal change in genetic structure and effective population size in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Ecol.* **11**:197-214.
- HEDRICK, P. W. 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* **53**:313-318.
- HEDRICK, P. W. 2001. Conservation genetics: where are we now?. *Trends Ecol. Evol.* **16**:629-636.
- HENDRY A.P., E.B. TAYLOR, y D. McPHAIL. 2002. Adaptive divergence and the balance between selection and gene flow: lake and stream stickleback in the misty system. *Evolution* **56**:1199-1216.
- HEWITT, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in the divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* **58**:247-256.
- HEWITT, G.M. 2000. The genetic legacy of Quaternary ice ages. *Nature* **405**:907-913.
- HILL, W.G. 1975. Linkage disequilibrium among multiple neutral alleles produced by mutation in finite population. *Theor. Popul. Biol.* **8**:117-126.
- HILL, W.G. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet. Res.* **38**:209-216.
- HEWITT, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos. T. Roy. Soc. B.* **359**:183-195.

- HINDAR, K., B. JONSSON, N. RYMAN, y F.M.G. STAHL. 1991. Genetic relationships among landlocked, resident and anadromous brown trout, *Salmo trutta* L. *Heredity* **63**:83-91.
- HUNTER, C.J. 1991. *Better trout habitat. A guide to stream restoration and management*. Montana Land Reliance. Island Press. 319pp.
- HUTCHINGS, J.A. 2000. Collapse and recovery in marine fishes. *Nature* **406**:882-885.
- HYNES, R.A., A. FERGUSON, y M.A. McCANN. 1996. Variation in mitochondrial DNA and post-glacial colonization of north western Europe by brown trout. *J.Fish. Biol.* **48**:54-67.
- JARNE, P., y P.J.L. LAGORDA. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* **11**:424-429.
- JENSEN, L.F., M.M. HANSEN, J. CARLSSON, V. LOESCHCKE, y K.L.D. MENSBERG. 2005. Spatial and temporal genetic differentiation and effective population size of brown trout (*Salmo trutta*, L.) in small Danish rivers. *Conserv. Genet.* **6**:615-621.
- JONSSON, B. 1985. Life history pattern of freshwater resident and sea-run migrant brown trout in Norway. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **114**:182-194.
- JONSSON, B. 1989. Life history and habitat use of Norwegian brown trout (*Salmo trutta*). *Freshwater Biol.* **21**:71-86.
- JORDE P.E., y N. RYMAN. 1995. Temporal allele frequency change and estimation of effective size in populations with overlapping generations. *Genetics* **139**:1077-1090.
- JORDE P.E., y N. RYMAN. 1996. Demographic genetics of brown trout (*Salmo trutta*) and estimation of effective size in populations with overlapping generations. *Genetics* **143**:1369-1381.
- KALINOWSKI S.T., y R.S. WAPLES. 2002. Relationship of effective to census size in fluctuating populations. *Conserv. Biol.* **1**:129-136.
- KIMURA, M. 1953. "Stepping stone" model of population. *Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. Japan* **3**:62-63.
- KIMURA, M., y J.F. CROW. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite populations. *Genetics*. **49**:725-738.
- KIMURA, M., y G.H. WEISS. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* **49**:561-576.
- KIMURA, M., y T. OHTA. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. *Proced. Nat. Acad. Sci. USA.* **75**:2868-2872.

- KLEMETSEN, A., P.A. AMUNDSEN, J.B. DEPSON, B. JONSSON, N. JONSSON, M.F. O'CONNELL, y E. MORTENSEN. 2003. Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecol. Freshw. Fish* **12**:1-59.
- KLUGE, A.G. and J.S. FARRIS. 1969. Quantitative phyletics and evolution of animals. *Syst. Zool.* **18**:1-32.
- KOTTELAT, M. 1997. European freshwater fishes. An heuristic checklist of freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. *Biologia, Sec. Zool.* 52 Suppl. **5**:1-271.
- KREBS, C.J. 1999. *Ecological Methodology*. 2a Edición. Benjamin/Cummings United States.
- KRIMBAS, C.B., y S. TSAKAS. 1971. The genetics of *Dacus oleae*. V. Changes of esterase polymorphism in a natural population following insecticide control- Selection or drift? *Evolution* **25**:454-460.
- KRISTJANSSON, B.K. 2005. Rapid morphological changes in threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, in freshwater. *Environm. Biol. Fish.* **74**:357-363.
- KUMAR, S., K. TAMURA, I. B. JAKOBSEN, y M. NEI. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**:1244-1245.
- LAIKRE, L., P.E. JORDE, y N. RYMAN. 1998. Temporal change of mitochondrial DNA haplotype frequencies and female effective size in a brown trout (*Salmo trutta*) population. *Evolution* **52**:910-915.
- LAIKRE, L., T. JARVI, L. JOHANSSON, S. PALM, J.F. RUBIN, C.E. GLIMSATER, P. LANDERGREN, y N. RYMAN. 2002. Spatial and temporal population structure of sea trout at the Island of Gotland, Sweden, delineated from mitochondrial DNA. *J. Fish Biol.* **60**:49-71.
- LANDE, R. 1988. Genetics and Demography in Biological Conservation. *Science* **241**:1455-1460.
- LEARY, R.F., F.W. ALLENDORF, y K.L. KNUDSEN. 1984. Superior developmental stability of enzyme heterozygotes in salmonid fishes. *Am. Nat.* **124**:540-551.
- LEE, W.J., J. CONROY, W.H. HOWELL y T.D. KOCHER. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J. Mol. Evol.* **41**:54-66.
- LELEK, A. 1980. Threatened freshwater fishes of Europe. *Nature and Environment Series 18*. Council of Europe.
- LINCOLN, F.C. 1930. Calculating waterfowl abundance on the basis of banding returns. *U.S. Dept. Agricult. Circ.* **118**:1-4.

- LOBÓN-CERVIÁ, J. 1991. *Dinámica de poblaciones de peces. Pesca eléctrica y métodos de captura sucesivas en la estima de abundancias*. Monografías del Museo Nacional de Ciencias Naturales nº 3. CSIC.
- LOBÓN-CERVIÁ, J., C.G. UTRILLA, P.A. RINCÓN, y F. AMEZCUA. 1997. Environmentally induced spatio-temporal variations in the fecundity of brown trout *Salmo trutta* L: trade-offs between egg size and number. *Freshwater Biol.* **38**:277-288.
- LOBÓN-CERVIÁ, J., y P.A. RINCÓN. 2004. Environmental determinants of recruitment and their influence on the population dynamics of stream-living brown trout *Salmo trutta*. *Oikos* **105**:641-646.
- LOBÓN-CERVIÁ J., y E. MORTENSEN. 2005. Population size in stream-living juveniles of lake-migratory brown trout *Salmo trutta* L.: the importance of stream discharge and temperature. *Ecol. Freshw. Fish* **14**:394-401.
- LU, G.Q., y L. BERNATCHEZ. 1999. A study of fluctuating asymmetry in hybrids of dwarf and normal lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*) from different glacial races. *Heredity* **83**:742-747.
- LU, G.Q., D.J. BASLEY, y L. BERNATCHEZ. 2001. Contrasting patterns of mitochondrial DNA and microsatellites introgressive hybridisation between lineages of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*); relevance for speciation. *Mol. Ecol.* **10**:965-985.
- MACHORDOM, A., J.L. GARCÍA-MARÍN, N. SANZ, A. ALMODÓVAR, y C. PLA. 1999. Allozyme diversity in brown trout (*Salmo trutta*) from Central Spain. Genetic consequences of restocking. *Freshwater Biol.* **41**:707-718.
- MACHORDOM, A., J. SUÁREZ, A. ALMODOVAR, y J.M. BAUTISTA. 2000. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations. *Mol. Ecol.* **9**:1325-1338.
- MADEIRA M.J., B.J. GÓMEZ-MOLINER, y A. MACHORDOM. 2005. Genetic introgression on freshwater fish populations caused by restocking programmes. *Biol. Invasions* **7**:117-125.
- MAISSE, G., y J.L. BAGLINIÈRE. 1991. Biologie de la truite commune (*Salmo trutta* L.) dans les rivières françaises. pp: 25-45. En: *La truite. Biologie et ecologie* (Eds. J.L. Baglinière y G. Maisse). INRA, París.
- MANTEL, S. 1967. the detection of disease clustering and a generalised regression approach. *Cancer Res.* **27**:209-220.
- MARTIN A.P., y S.R. PALUMBI. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:4087-4091.
- MARTÍN-VIDE, J., y L. GÓMEZ. 1999. Regionalization of peninsular Spain based on the length of dry spells. *Int. J. Climatol.* **19**:537-555.

- MARTÍNEZ, J.L., P. MORÁN, J. PÉREZ, B. De GAUDEMAR, E. BEALL, y E.GARCÍA-VÁZQUEZ. 2000. Multiple paternity increases effective size of southern Atlantic salmon populations. *Mol. Ecol.* **9**:293-298.
- MARTÍNEZ, P., J. ARIAS, J. CASTRO, y L. SÁNCHEZ. 1993. Differential stocking incidence in brown trout (*Salmo trutta*) populations from Northwestern Spain. *Aquaculture* **114**:203-216.
- MARZANO, F.N., N. CORRADI, R. PAPA, J. TAGLIAVINI, y G. GANDOLFI. 2003. Molecular evidence for introgression and loss of genetic variability in *Salmo (trutta) macrostigma* as a result of massive restocking of Apennine populations (Northern and Central Italy). *Environm. Biol. Fish.* **68**:349-356.
- MASTA, S.E., N.M. LAURENT, y E.J. ROUTMAN. 2003. Population genetic structure of the toad *Bufo woodhousii*: an empirical assessment of the effects of haplotype extinction on nested cladistic analysis. *Mol. Ecol.* **12**:1541-1554.
- McELROY, D., D. MORAN, E. BERMINGHAM, y I. KORNFELD. 1991. REAP. The restriction enzyme analysis package. Version 4.0. dept. of Zoology, Migratory Fish Research Institute and Center for Marine Studies. University of Maine. Orono.
- McMEEL, O.M., E.M. HOEY, y A. FERGUSON. 2001. Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1*90 and *100 alleles. *Mol. Ecol.* **10**:29-34.
- MELO-FERREIRA, J., P. BOURSOT, F. SUCHENTRUNK, N. FERRAND, y P.C. ALVES. 2005. Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Mol. Ecol.* **14**:2459-2464.
- MEYER, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. pp:1-38, vol.2. En: *Biochemistry and molecular biology of fishes* (Eds. P. W. Hochachka y T. P. Mommsen). Elsevier, Amsterdam.
- MILLS, L.S., y F.W. ALLENDORF. 1996. The One Migrant per Generation Rule in conservation and management. *Conserv. Biol.* **10**:1509-1518.
- MILNER, N.J., J.M. ELLIOTT, J.D. ARMSTRONG, R. GARDINER, J.S. WELTON, M. LADLE. 2003. The natural control of salmon and trout populations in streams. *Fish. Res.* **62**:111-125.
- MOORE, W.S. 1977. An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Q. Rev. Biol.* **52**:263-277.
- MORÁN, P., A.M. PENDÁS, E. GARCÍA-VAZQUEZ, y J.I. IZQUIERDO. 1991. Failure of stocking policy, of hatchery reared brown trout, *Salmo trutta* L., in Asturias, Spain, detected using LDH-5* as a genetic marker. *J. Fish Biol.* **39**:117-122.

- MORÁN, P., A.M. PENDÁS, E. GARCÍA-VAZQUEZ, J.I. IZQUIERDO, y J. LOBON-CERVIÁ. 1995. Estimates of gene flow among neighbouring populations of brown trout. *J. Fish Biol.* **46**:593-602.
- MULLIS, K.B. 1983. The unusual origin of polymerase chain reaction. *Sci. Am.* **4**:56-65.
- MUÑOZ, M., y M. CASADEVALL. 1997. Fish remains from Arbreda Cave (Serinyà, Girona), northeast Spain, and their palaeological significance. *J. Quaternary Sci.* **12**:111-115.
- NEI, M., T. MARUYAMA, y R. CHAKRABORTY. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**:1-10.
- NEI, M., y W.H. LI. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:5269-5273.
- NEI, M. y F. TAJIMA. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**:145-162.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- NEI, M., y S. KUMAR. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- NELSON, J.S. 1994. *Fishes of the World*. 3a ed. Wiley, New York.
- NEVO, E., A. BEILES, y R. BEN-SHLOMO. 1984. The evolutionary significance of genetic diversity: Ecological, demographic and life history correlates. En: *Evolutionary dynamics of genetic diversity* (Ed. G.S. Mani). *Lect. Notes Biomath.* **53**:13-213.
- NEVO, E. 1986. Pollution and genetic evolution in marine organisms: Theory and practice. En: *Environmental quality and ecosystem stability*. pp:841-848 (Eds. Z. Dubinsky y Y. Steinberger). Vol. 3. Bar-ilan University Press, Ramat-Gan, Israel.
- NEWMAN D., y D. PILSON. 1997. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkie pulchella*. *Evolution* **51**:354-362.
- NICOLA G.G., y A. ALMODÓVAR. 2002. Reproductive traits of stream-dwelling brown trout *Salmo trutta* in contrasting neighbouring rivers of central Spain. *Freshwater Biol.* **47**:1353-1365.
- NIELSEN, E.E., M.M. HANSEN, y V. LOESCHCKE. 1997. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon: A comparison of genetic composition over sixty years. *Mol. Ecol.* **6**:487-492.

- NIELSEN, E.E., M.M. HANSEN, y V. LOESCHCKE. 1999a. Genetic variation in time and space: microsatellite analysis of extinct and extant populations of Atlantic salmon. *Evolution* **53**:261-268.
- NIELSEN, E.E., M.M. HANSEN, y V. LOESCHCKE. 1999b. Analysis of DNA from old scale samples: technical aspects, applications and perspectives of conservation. *Hereditas* **130**:265-276.
- NIELSEN, E.E., M.M. HANSEN, D.E. RUZZANTE, D. MELDRUP, y P.GRØNKJÆR. 2003. Evidence of a hybrid-zone in Atlantic cod (*gadus morhua*) in the Baltic and the Danish Belt Sea revealed by individual admixture analysis. *Mol. Ecol.* **12**:1497-1508.
- NORDWALL, F. 1999. Movements of brown trout in a small streams: effects of electrofishing and consequences for population estimates. *North American Journal of Fisheries Management* **19**:462-469.
- NOSIL, P., y T.E. REIMCHEN. 2005. Ecological opportunity and levels of morphological variance within freshwater stickleback populations. *Biol. J. Linn. Soc.* **86**: 297-308.
- NUNNEY, L. 2000. The limits to knowledge in conservation genetics: the value of effective population size. *Evol. Biol.* **32**:179-194.
- O'REILLY, P.T., L.C. HAMILTON, S.K. McCONNELL, y J.M. WRIGHT. 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**:2292-2298.
- ØSTERGAARD, S., M.M. HANSEN, V. LOESCHCKE, y E.E. NIELSEN. 2003. Long-term temporal changes of genetic composition in brown trout (*Salmo trutta* L.) populations inhabiting an unstable environment. *Mol. Ecol.* **12**:3123-3135.
- PAAVER, T.K. 1989. Genetic differentiation of sea trout, *Salmo trutta*, populations of Estonian rivers. *J. Ichthyol.* **29**:583-590.
- PAKKASMAA, S., y J. PIIRONEN. 2001. Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biol. J. Linn. Soc.* **72**:231-239.
- PALM, S., L. LAIKRE, P.E. JORDE, y N. RYMAN. 2003. Effective population size and temporal genetic change in stream resident brown trout (*Salmo trutta*, L.). *Conserv. Genet.* **4**:249-264.
- PEDERSEN, C.G.J. 1896. The yearly immigration of young plaice into the Limfjord from the German Sea. *Rep. Dan. Biol. Stat.* **6**:1-48.
- PEDRAZA, J. 1996. *Geomorfología. Principios, Métodos y Aplicaciones*. Editorial Rueda. Madrid.

- PEEL, D., J.R. OVENDEN, y S.L. PEEL. 2004. NeEstimator: software for estimating effective population size, Version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries.
- PIGEON, D., J.J. DODSON, y L. BERNATCHEZ. 1998. A mtDNA analysis of spatiotemporal distribution of two sympatric larval populations of rainbow smelt (*Osmerus mordax*) in the St. Lawrence River estuary, Quebec, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**:1739-1747.
- POLANSKI, A., M. KIMMEL, y R. CHAKRAVORTY. 1998. Application of a time-dependent coalescence process for inferring the history of population size changes from DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:5456-5461.
- POLLAK, E. 1983. A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. *Genetics* **104**:531-548.
- POSADA, D., K.A. CRANDALL, y A.R. TEMPLETON. 2000. Geodis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* **9**:487-488.
- POTEAUX, C., F. BONHOMME, y P. BERREBI. 1999. Microsatellite polymorphism and genetic impact of restocking in Mediterranean brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity* **82**:645-653.
- POTEAUX, C., P. BERREBI, y F. BONHOMME. 2001. Allozymes, mtDNA and microsatellites study introgression in a stocked trout population in France. *Fish Biol. Fisher.* **10**:281-292.
- PRESA, P., B.G. PARDO, P. MARTÍNEZ, y L. BERNATCHEZ. 2002. Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. *Mol. Biol. Evol.* **19**:2161-2175.
- PRIMMER, C.R., P.A. LANDRY, E. RANTA, J. MERILÄ, J. PIIRONEN, K. TIIRA, N. PEUHKURI, S. PAKKASMAA, y P. ESKELINEN. 2003. Prediction of offspring fitness based on parental genetic diversity in endangered salmonid populations. *J. Fish Biol.* **63**:909-927.
- PRITCHARD, J.K., M. STEPHENS, y P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotypes data. *Genetics* **155**:945-959.
- RAEYMAEKERS, J.A.M., G.E. MAES, E. AUDENAERT, y F.A.M. VOLCKAERT. 2005. Detecting Holocene divergence in the anadromous freshwater threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) system. *Mol. Ecol.* **14**:1001-1014.
- RAND, D.M. 2001. The units of selection on mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **32**:415-448.
- RAYMOND, M., y F. ROUSSET. 1995a. An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**:1280-1283.

- RAYMOND, M., y F. ROUSSET. 1995b. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecuminicism. *J. Hered.* **86**:248-249.
- RICHARDS, C., y P.L. LEBERG. 1996. Temporal changes in allele frequencies and population's history of severe bottlenecks. *Conserv. Biol.* **10**:832-839.
- RODRÍGUEZ, M.A. 2002. Restricted movement in stream fish: The paradigm is incomplete, not lost. *Ecology* **83**:1-13.
- ROGERS, A.R., y H. HARPERNDING. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**:552-569.
- ROGERS, A.R. 1997. Population structure and modern human origins. pp:55-79. Vol. 87. En: *Progress on Population Genetics and Human Evolution*. (Eds. P. Donnelly y S. Tavaré). The IMA volumes in mathematics and its applications. Springer, New York.
- ROHLF, F.J. 1993. NTSYS-pc. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.1*. Setauket, New York.
- ROZAS, J., J.C. SÁNCHEZ-DELBARRIO, X. MESSEGUER, y R. ROZAS. 2003. DNAsp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**:2496-2497.
- RUIZ-PESINI, E., D. MISHMAR, M. BRANDON, V. PROCACCIO, y D.C. WALLACE. 2004. Effects of purifying and adaptative selection on regional variation in human mtDNA. *Science* **303**:223-226.
- RUZZANTE, D.E., M.M. HANSEN, y D. MELDRUP. 2001. distribution of inbreeding coefficients, relatedness and influence of stocking on native anadromous brown trout (*Salmo trutta*) population structure. *Mol. Ecol.* **10**:2107-2118.
- RYMAN, N., F.W. ALLENDORF, y G. STÅHL. 1979. Reproductive isolation with little genetic divergence in sympatric populations of brown trout (*Salmo trutta*). *Genetics* **92**:247-262.
- SAITOU, N., y M. NEI. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- SAMBROOCK, J., E. F. FRITSCH, y T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- SAINT-LAURENT, R., M. LEGAULT, y L. BERNATCHEZ. 2003. Divergent selection maintains adaptive differentiation despite high gene flow between sympatric rainbow smelt ecotypes (*Osmerus mordax* Mitchill). *Mol. Ecol.* **12**:315-330.
- SANGER, F., NICKLEN, S. y A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain determination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-5467.

- SANZ, N., J.L. GARCÍA-MARÍN, y C. PLA. 2000. Divergence of brown trout (*Salmo trutta*) within glacial refugia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**:2201-2210.
- SANZ, N., J.L. GARCÍA-MARÍN, y C. PLA. 2002. Managing fish populations under mosaic relationships. The case of brown trout (*Salmo trutta*) in peripheral Mediterranean populations. *Conserv. Genet.* **3**:385-400.
- SANZ, N., M. CORTEY, C. PLA, y J.L. GARCÍA-MARÍN. 2006. Hatchery introgression blurs ancient hybridization between brown trout (*Salmo trutta*) lineages as indicated by complementary allozymes and mtDNA markers. *Biol. Conserv.* En prensa.
- SCHMIDT, H.A., K. STRIMMER, M. VINGRON y A.VON HAESELER. 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**:502-504.
- SCHNABEL, Z.E. 1938. The estimation of the total fish population of a lake. *Am. Math. Mon.* **45**:348-352.
- SCHNEIDER, S., D. ROESSLI, y L. EXCOFFIER. 2000. Arlequin, Version 2.000: a software for populations genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- SCHREIBER, A., y G. DIEFENBACH. 2005. Population genetics of European trout (*Salmo trutta* L.) migration system in the river Rhine: recolonisation by sea trout. *Ecol. Freshw. Fish* **14**:1-13.
- SCHULTER, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends Ecol. Evol.* **16**:372-380.
- SEBER, G.A.F. 1982. *The estimation of Animal Abundance and Related Parameters* (Ed. Charles Griffin). London.
- SEQUEIRA, F., J. ALEXANDRINO, S. ROCHA, J.W. ARTZEN, y N. FERRAND. 2005. Genetic exchange across a hybrid zone within the Iberian endemic golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*. *Mol. Ecol.* **14**:245-254.
- SHEDLOCK, A.M., J.D. PARKER, D.A. CRISPIN, T.W. PIETSCH y G.C. BURMER. 1992. Evolution of the Salmonid Mitochondrial Control Region. *Mol. Phylogenet. Evol.* **3**:179-192.
- SLATKIN, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**:787-792.
- SLATKIN, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* **47**:264-279.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. **139**:457-462.

- SLETTAN, A., I. OLSAKER, y Ø LIE. 1995. Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311 and SSOSL417 loci. *Anim. Genet.* **26**:277-285.
- SLETTAN, A., I. OLSAKER, y Ø LIE. 1996. Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL438, SSOSL439 and SSOSL444 loci. *Anim. Genet.* **27**:57-64.
- SMITH, P.J., y Y. FUJIO. 1982. Genetic variation in marine teleosts: high variability in habitat specialist. *Mar. Biol.* **69**:7-20.
- STRIMMER, K., y A. VON HAESELER. 1996. Quartet Puzzling: A quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* **13**:964-969.
- SUÁREZ, J., J.M. BAUTISTA, A. ALMODÓVAR, y A. MACHORDOM. 2001. Evolution of the mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity* **87**:198-206.
- SWOFFORD, D.L. 2000. PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony, v 4.0*. Illinois Natural Survey, Champaign, Illinois.
- TABERLET, P., L. FUMAGALLI, A.G. WUST-SAUCY, J.F. COSSON. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.* **7**:453-464.
- TABERLET, P., y R. CHEDDADI. 2002. Quaternary refugia and persistence of biodiversity. *Science* **297**:2009-2010.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**:585-595.
- TAKAHATA, N., y S.R. PALUMBI. 1985. Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics* **109**:441-457.
- TAMURA, K., y M. NEI. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**:512-526.
- TEMPLETON, A.R., E. BOERWINKLE, y C.F. SING. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* **117**:343-351.
- TEMPLETON, A.R., K. A. CRANDALL, y C. F. SING. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**:619-633.
- TEMPLETON, A.R., y C.F. SING. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from the restriction endonuclease

- mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* **53**:563-590.
- TEMPLETON, A.R., E. ROUTMAN, y C. PHILLIPS. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* **140**:767-782.
- TEMPLETON, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* **7**:381-397.
- TESSIER, N., y L. BERNATCHEZ. 1999. Stability of population structure and genetic diversity across generations assessed by microsatellites among sympatric populations of landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol. Ecol.* **8**:169-179.
- TURGEON, J., y L. BERNATCHEZ. 2003. Reticulate evolution and phenotypic diversity in North American ciscoes, *Coregonus* ssp (Teleostei: Salmonidae): implications for the conservation of an evolutionary legacy. *Conserv. Genet.* **4**:67-81.
- TURNER, T.F., L.R. RICHARDSON, y J.R. GOLD. 1999. Temporal genetic variation of mitochondrial DNA and the female effective population size of red drum (*Sciaenops ocellatus*) in the northern Gulf of Mexico. *Mol. Ecol.* **8**:1223-1229.
- TURNER, T.F., J.C. TREXLER, J.L. HARRIS, y J.L. HAYNES. 2000. Nested cladistic analysis indicates population fragmentation shapes genetic diversity in a freshwater mussel. *Genetics* **154**:777-785.
- UTTER, F.M. 1991. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *J. Fish Biol.* **39** (Suppl. A):1-20.
- VAN HOUTT, J.K.J., J. PINCEEL, M.C. FLAMAND, M. BRIQUET, E. DUPONT, F.A.M. VOLCKAERT, y P.V. BARET. 2005. Migration barriers protect indigenous brown trout (*Salmo trutta*) populations from introgression with stocked hatchery fish. *Conserv. Genet.* **6**:175-191.
- VITALIS, R., y D. COUVET. 2001a. Estimation of effective population size and migration rate from one- and two-locus identity measures. *Genetics* **157**:911-925.
- VITALIS, R., y D. COUVET. 2001b. ESTIM 1.0: a computer program to infer population parameters from one- and two-locus gene identity probabilities. *Mol. Ecol. Notes* **1**:354-356.
- VITALIS, R., y D. COUVET. 2001c. Two-locus identity probabilities and identity disequilibrium in a partially selfing population. *Gen. Res.* **77**:67-81.

- WALSH, P., D.A. METZGER, y R. HIGUCHY. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**:506-513.
- WANG, J. 2001. A pseudo-likelihood method for estimating effective population size from temporally spaced samples. *Genetics* **157**:867-874.
- WANG, J., y M.C. WHITLOCK. 2003. Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *Genetics* **163**:429-446.
- WANG, S., J.J. HARD, y F. UTTER. 2002. Genetic variation and fitness in salmonids. *Conserv. Genet.* **3**:321-333.
- WAPLES, R.S. 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* **121**:379-391.
- WAPLES, R.S. 1990. Conservation genetics of Pacific salmon. III. Estimating effective population size. *J. Hered.* **81**:277-289.
- WAPLES, R.S. 1991a. Genetic methods for estimating the effective size of cetacean populations. *Rep. Int. Whal. Commn.* **13**:279-299.
- WAPLES, R.S. 1991b. Pacific salmon, *Oncorhynchus* sp., and the definition of 'species' under the Endangered Species Act. *US National Marine Fisheries Service Marine Fisheries Review.* **53** (3):11-22.
- WAPLES, R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J. Hered.* **89**:438-450.
- WAPLES, R.S. 2002. The definition and estimation of effective population size in the conservation of endangered species. pp:147-168. En: *Population viability analysis* (Eds. S.R. Beissinger y D.R. McCullough). The University of Chicago Press, Chicago y London.
- WAPLES, R.S. 2005. Genetic estimates of contemporary effective population size: to what time periods do the estimates apply?. *Mol. Ecol.* **14**:3335-3352.
- WARD, R. D., M. WOODWARK, y D.O.F. SKIBINSKI. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J. Fish Biol.* **44**:213-232.
- WATTERSON, G.A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.* **7**:256-276.
- WEIR, B.S. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- WEISS, S., A. ANTUNES, C. SCHLÖTTERER, y P. ALEXANDRINO. 2000. Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmo*

- trutta* L. populations: relevance to the post-Pleistocene recolonization of northern Europe. *Mol. Ecol.* **9**:691-698.
- WESTGAARD, J.I., A. KLEMETSEN, y R. KNUDSEN. 2004. Genetic differences between two sympatric morphs of Arctic charr confirmed by microsatellite DNA. *J. Fish Biol.* **65**:1185-1191.
- WILLIS, K. J., y R.J. WHITTACKER. 2000. The refugial debate. *Science* **287**:1406-1407.
- WILSON, A.C., R. CANN, S.M. CARR, M.JR. GEORGE, U.B. GYLLESTEN, K.M. HELM-BYCHOWSKY, R.G. HIGUCHI, S.R. PALUMBI, E.M. PRAGER, R.D. SAGE y M. STONEKING. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Lin. Soc.* **26**:375-400.
- WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**:97-159.
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* **28**:114-138.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**:323-354.
- WRIGHT, S. 1969. *Evolution and Genetics of Populations*, vol.2, *The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- YAKAMOTO, S., K. MORITA, I. KOIZUMI, y K. MAEKAWA. 2004. Genetic differentiation of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: Spatial-temporal changes in gene frequencies. *Conserv. Genet.* **5**:529-538.

8. APÉNDICE

Apéndice. Frecuencias alélicas en poblaciones de trucha común de la Noguera de Vallferrera y Noguera de Cardós para 8 loci microsatélites. N: número de alelos analizados, na: número de alelos diferentes detectados, Ho: heterozigosidad observada, He: diversidad génica, ES: error standard. Poblaciones: 13c-Pla de Boet 02, 14a-Vallferrera I, 15a-Vallferrera II (2002), 16a-Vallferrera III (2002), 19-Alins, 22b-Cardós, 42a-Bagà R, 15d-Vallferrera II (2003), 16d-Vallferrera III (2003).

		Poblaciones										
LOCUS	Alelo	13c	14a	15a	16a	19	22b	42a	15d	16d	Media	
Str 15												
N		58	30	64	32	26	84	76	60	80		
na		4	2	4	2	2	4	6	6	3	3.667	
	114	0	0	0	0	0	0	0.053	0	0		
	116	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05		
	118	0	0	0	0	0	0	0	0.067	0		
	120	0.672	0.6	0.719	0.719	0.654	0.512	0.158	0.65	0.775		
	122	0.052	0.4	0.234	0.281	0.346	0.214	0.263	0.217	0.175		
	124	0.224	0	0.016	0	0	0.25	0.342	0.033	0		
	126	0.052	0	0.031	0	0	0.024	0.171	0.017	0		
	128	0	0	0	0	0	0	0.013	0.017	0		
Ho		0.345	0.267	0.375	0.313	0.538	0.452	0.632	0.233	0.1	0.362	
He		0.501	0.497	0.434	0.417	0.471	0.637	0.767	0.533	0.371	0.514	
SsaHaell14.20												
N		58	32	66	36	28	92	78	60	80		
na		9	3	3	3	3	11	12	7	6	6.333	
	296	0	0	0	0	0	0	0	0.033	0		
	298	0	0	0	0	0	0.033	0	0.033	0		
	300	0	0.5	0.424	0.444	0.643	0.478	0.051	0.25	0.362		
	302	0.224	0.469	0.5	0.5	0.25	0.141	0	0.3	0.525		
	304	0	0.031	0.076	0.056	0.107	0.185	0	0.183	0.075		
	306	0	0	0	0	0	0.011	0	0.067	0		
	308	0	0	0	0	0	0.065	0	0	0.013		
	310	0.017	0	0	0	0	0	0.013	0	0		
	312	0.19	0	0	0	0	0.022	0.282	0	0		
	318	0	0	0	0	0	0	0	0	0.013		
	322	0.241	0	0	0	0	0.022	0.218	0	0		
	324	0.224	0	0	0	0	0.011	0.141	0	0		
	326	0	0	0	0	0	0	0.026	0	0		
	328	0	0	0	0	0	0.011	0.128	0	0		
	330	0.017	0	0	0	0	0	0.013	0	0		
	332	0.017	0	0	0	0	0	0	0	0.013		
	334	0.034	0	0	0	0	0	0.051	0	0		
	336	0.034	0	0	0	0	0.022	0.051	0	0		
	338	0	0	0	0	0	0	0.013	0	0		
	344	0	0	0	0	0	0	0	0.133	0		
	346	0	0	0	0	0	0	0.013	0	0		
Ho		0.517	0.188	0.333	0.222	0.571	0.391	0.667	0.067	0.25	0.356	
He		0.816	0.546	0.573	0.565	0.532	0.718	0.838	0.803	0.594	0.665	
Str 73												
N		60	32	62	36	28	92	80	60	80		
na		5	3	5	5	2	4	5	4	5	4.222	

LOCUS	Alelo	13c	14a	15a	16a	19	22b	42a	15d	16d	Media	
	133	0	0	0.032	0	0	0	0	0	0		
	139	0	0	0	0.028	0	0	0	0.017	0		
	141	0.333	0.656	0.532	0.667	0.786	0.674	0.075	0.667	0.537		
	143	0.017	0.281	0.371	0.194	0.214	0.261	0.063	0.3	0.263		
	145	0.383	0.063	0.016	0.056	0	0.022	0.225	0.017	0.15		
	147	0.25	0	0	0.056	0	0.043	0.613	0	0.013		
	149	0.017	0	0.048	0	0	0	0.025	0	0.037		
	Ho	0.633	0.063	0.258	0.5	0.429	0.326	0.5	0.533	0.45		0.41
	He	0.69	0.502	0.585	0.525	0.349	0.481	0.571	0.473	0.626		0.534
	Str 85											
N		62	32	68	34	28	88	78	60	80	5.444	
	na	7	4	5	6	5	6	4	6	6		
	102	0.016	0	0	0	0	0	0	0	0		
	104	0.032	0.031	0.147	0.029	0.107	0.114	0.103	0.083	0.087		
	106	0.339	0.156	0.132	0.088	0.107	0.068	0	0.133	0.125		
	108	0.032	0	0.103	0.088	0.25	0.034	0	0.067	0.2		
	110	0.048	0.469	0.5	0.647	0.393	0.307	0.218	0.467	0.35		
	112	0.306	0.344	0.118	0.118	0.143	0.466	0.551	0.233	0.225		
	114	0.226	0	0	0.029	0	0	0.128	0	0		
	116	0	0	0	0	0	0.011	0	0.017	0.013		
	Ho	0.742	0.875	0.471	0.588	0.786	0.523	0.487	0.633	0.575		0.631
	He	0.748	0.657	0.697	0.567	0.767	0.678	0.63	0.71	0.773		0.692
Str 197												
N		64	32	60	36	28	90	72	60	80	7.778	
	na	7	7	8	6	7	10	8	8	9		
	126	0	0.156	0.233	0.278	0.393	0.378	0	0.233	0.237		
	130	0.406	0.313	0.283	0.333	0.107	0.189	0.014	0.367	0.325		
	134	0.266	0	0	0	0	0.056	0.417	0.05	0.013		
	138	0.031	0	0	0	0	0.022	0.194	0	0		
	142	0.031	0.094	0.05	0.056	0.036	0.044	0.181	0.05	0.15		
	146	0.125	0.063	0.033	0	0	0.011	0.125	0.017	0		
	150	0	0.125	0.133	0.167	0.071	0.056	0.042	0.067	0.138		
	154	0.078	0.219	0.15	0.139	0.214	0.167	0.014	0.183	0.075		
	158	0.063	0	0	0	0.071	0.022	0	0	0.025		
	162	0	0.031	0.1	0.028	0.107	0.056	0	0.033	0.025		
166	0	0	0.017	0	0	0	0.014	0	0.013			
Ho	0.813	0.625	0.833	0.833	0.643	0.711	0.694	0.6	0.75	0.723		
He	0.749	0.827	0.825	0.783	0.794	0.79	0.748	0.78	0.799	0.788		
SsoSL 417												
N		64	32	68	36	28	86	80	60	80	12.444	
	na	9	10	15	8	13	17	11	16	13		
	163	0	0	0.015	0	0	0	0	0	0		
	167	0.266	0.281	0.235	0.5	0.25	0.174	0.075	0.45	0.475		
	169	0	0.094	0.044	0.139	0	0.035	0	0	0.013		
	171	0	0.031	0.147	0.056	0.107	0	0.013	0.05	0.138		
	173	0.156	0.156	0.044	0.056	0.071	0.035	0.188	0	0.013		
	175	0.203	0	0.015	0	0	0.035	0.263	0.017	0		
	177	0.125	0	0.015	0	0	0.047	0.087	0.017	0.013		
	181	0.109	0	0	0	0	0.035	0.1	0	0		
	183	0.063	0	0	0	0	0	0.075	0	0		

LOCUS	Alelo	13c	14a	15a	16a	19	22b	42a	15d	16d	Media
Ho	185	0	0	0.015	0	0	0	0	0	0	0.681
	187	0	0	0	0	0	0.012	0.037	0	0	
	189	0.047	0	0	0	0	0	0.075	0	0	
	191	0.016	0	0	0	0.036	0.012	0.013	0	0	
	193	0	0	0.015	0	0	0.116	0	0	0	
	195	0	0	0.103	0.028	0.036	0.093	0	0.083	0.063	
	197	0	0.094	0.147	0.028	0.107	0.233	0.075	0.067	0.113	
	199	0.016	0.094	0.147	0.056	0.107	0.07	0	0.083	0.037	
	201	0	0	0	0	0.036	0.012	0	0.05	0	
	203	0	0.031	0.015	0	0	0.035	0	0.033	0.013	
	205	0	0.063	0	0	0.071	0.012	0	0.033	0	
	207	0	0	0.029	0	0.071	0.012	0	0.017	0	
	209	0	0.031	0	0	0	0.035	0	0.017	0.013	
	211	0	0	0	0	0.036	0	0	0.017	0.013	
	213	0	0.125	0	0	0.036	0	0	0.017	0.05	
	215	0	0	0.015	0	0	0	0	0	0	
	217	0	0	0	0	0	0	0	0.017	0	
	219	0	0	0	0.139	0.036	0	0	0.033	0.05	
	He		0.813	0.813	0.5	0.611	0.714	0.605	0.8	0.7	
SsoSL 438											4.667
	N	62	32	72	36	28	92	80	60	80	
	na	5	4	4	4	4	7	5	5	4	
	101	0	0	0	0	0	0.022	0	0	0	
	103	0.242	0.125	0.153	0.25	0.143	0.152	0.175	0.15	0.237	
	105	0.258	0.094	0.028	0.028	0.143	0.25	0.412	0.133	0.063	
	107	0.339	0.75	0.736	0.583	0.643	0.446	0.05	0.633	0.675	
	109	0.016	0.031	0.083	0.139	0.071	0.109	0.013	0.067	0.025	
	111	0.145	0	0	0	0	0.011	0.35	0.017	0	
	113	0	0	0	0	0	0.011	0	0	0	
Ho		0.806	0.375	0.361	0.667	0.571	0.543	0.625	0.4	0.55	0.544
He		0.751	0.425	0.433	0.594	0.561	0.711	0.683	0.563	0.49	0.579
T3-13											13.889
	N	58	30	64	36	28	88	76	56	70	
	na	13	11	13	12	9	21	17	17	12	
	177	0	0	0	0	0	0	0.013	0	0	
	181	0	0	0	0	0	0	0.039	0	0	
	183	0	0	0	0	0	0.011	0	0	0	
	185	0	0	0.016	0.028	0.036	0.034	0.013	0	0	
	187	0.138	0	0.031	0	0	0.023	0.224	0.036	0.029	
	189	0.034	0.033	0.125	0.056	0.071	0.091	0.079	0.071	0.057	
	191	0.069	0	0	0	0	0	0.092	0	0.014	
	193	0.034	0.133	0.031	0.056	0	0.023	0.079	0	0.086	
	195	0.034	0	0.031	0.028	0	0.011	0.118	0.036	0.029	
	197	0	0	0	0	0	0	0	0.018	0	
	199	0	0	0	0	0	0.023	0	0	0	
	203	0	0.033	0	0	0	0	0.013	0.018	0	
	205	0	0	0.016	0.056	0	0.011	0	0.036	0	
207	0.086	0.133	0.047	0.083	0	0.034	0.013	0.143	0.1		
209	0.103	0.133	0.25	0.278	0.214	0.182	0.118	0.232	0.286		
211	0.19	0.167	0.031	0.111	0.036	0.034	0.013	0.089	0.1		

LOCUS	Alelo	13c	14a	15a	16a	19	22b	42a	15d	16d	Media
	213	0.19	0.033	0.156	0.083	0.143	0.136	0.092	0.036	0.014	
	215	0.017	0.067	0.078	0.028	0.143	0.068	0.026	0.018	0.057	
	217	0	0.033	0.031	0	0.071	0.057	0	0.036	0.057	
	219	0	0.167	0.156	0.139	0.179	0.102	0.013	0.125	0.171	
	221	0	0.067	0	0.056	0.107	0.045	0	0.036	0	
	223	0.034	0	0	0	0	0.023	0.039	0.018	0	
	225	0	0	0	0	0	0	0.013	0	0	
	227	0	0	0	0	0	0.011	0	0.018	0	
	229	0	0	0	0	0	0.045	0	0	0	
	231	0	0	0	0	0	0.023	0	0.036	0	
	237	0.034	0	0	0	0	0	0	0	0	
	239	0.034	0	0	0	0	0	0	0	0	
	241	0	0	0	0	0	0.011	0	0	0	
Ho		0.931	1	1	1	1	0.932	0.947	0.964	0.943	0.969
He		0.894	0.908	0.873	0.887	0.889	0.921	0.899	0.903	0.862	0.893
promedio											
na		7.375	5.5	7.125	5.75	5.625	10	8.5	8.625	7.25	
(ES)		2.925	3.423	4.518	3.151	3.852	6.188	4.504	5.012	3.694	
Ho		0.7	0.526	0.516	0.592	0.657	0.56	0.669	0.516	0.524	
(ES)		0.191	0.35	0.262	0.255	0.177	0.193	0.151	0.281	0.265	
He		0.749	0.655	0.662	0.632	0.659	0.728	0.75	0.693	0.657	
(ES)		0.119	0.191	0.184	0.153	0.208	0.141	0.116	0.152	0.168	

