



Universitat de Girona

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DEMOGRAFÍA GENÉTICA EN POBLACIONES DE TRUCHA COMÚN (Salmo trutta) DEL PIRINEO CATALÁN

Raquel FERNÁNDEZ CEBRIÁN

Dipòsit legal: GI. 1035-2012

<http://hdl.handle.net/10803/81854>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

Tesis doctoral

*Estructura poblacional y demografía
genética en poblaciones de trucha común
(Salmo trutta) del Pirineo catalán*



Raquel Fernández Cebrián

2011

TESIS DOCTORAL

**ESTRUCTURA POBLACIONAL Y
DEMOGRAFÍA GENÉTICA EN
POBLACIONES DE TRUCHA COMÚN
(*Salmo trutta*) DEL PIRINEO CATALÁN.**

Raquel Fernández Cebrián

2011

Doctorado en Ciencias Experimentales y
Sostenibilidad

Dirigida por Dr. José Luis García Marín



El Dr. José Luis García Marín, Profesor Titular de Genética del Departamento de Biología de la Universitat de Girona,

CERTIFICO:

Que el trabajo titulado “**Estructura poblacional y demografía genética en poblaciones de trucha común (*Salmo trutta*) del Pirineo catalán**”, presentado por **Raquel Fernández Cebrián** para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado en el Laboratori d'Ictiologia Genètica bajo mi dirección, está finalizado y por ello, autorizo su presentación ante el tribunal evaluador.

Girona, 15 de Noviembre de 2011

Dr. José Luis García Marín

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación recibida del Ministerio de Ciencia y Tecnología a través de la beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) BES-2004-4416 y del proyecto REN 2003-05931 titulado “Uso Sostenible, Conservación y Restauración de los Endemismos Moleculares de la Trucha Común (*Salmo trutta*). Demografía Genética de Poblaciones Sometidas a Diferentes Alternativas de Gestión”.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que han contribuido de diferentes maneras a la consecución de este trabajo. Especialmente a los compañeros del *Laboratori d'Ictiologia Genètica* de la UdG que me han ayudado y apoyado a lo largo del proceso de elaboración de esta tesis doctoral y también en las labores de docencia realizadas en los últimos años. Gracias a todos por los buenos ratos e historias que hemos compartido.

Al Dr. Armand Sanchez y al Dr. Daniel Ruzzante por acogerme en sus laboratorios durante las estancias realizadas en la Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona) y en la Dalhousie University (Halifax, Canadá).

Finalmente a mi familia y amigos, que me han ofrecido cariño y comprensión en todo momento.

Mil gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
<i>SUMMARY</i>	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Principales características biológicas de la trucha común.	5
1.2. Diversidad genética en la trucha común.	8
1.2.1. El efecto de las repoblaciones.	10
1.3. <i>Loci</i> microsatélites.	12
1.4. Demografía genética.	14
1.4.1. El tamaño efectivo.	15
1.4.2. Relaciones familiares y grado de parentesco.	17
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1. Zona de estudio.	21
3.2. Material biológico.	29
3.3. Extracción del DNA.	30
3.4. Selección de <i>loci</i> microsatélite.	31
3.4.1. Selección de <i>loci</i> y ajuste de las reacciones <i>multiplex</i> .	31
3.4.2. Análisis genéticos.	32
3.5. Análisis de la estructura poblacional y de los patrones de diversidad de la trucha común en el Pirineo catalán.	33
3.5.1. Diversidad genética intrapoblacional.	34
3.5.2. Diversidad genética entre las poblaciones.	34
3.5.3. Flujo génico.	35
3.5.4. Estabilidad temporal de los patrones de diversidad y de la incidencia de repoblación.	36
3.6. Análisis demográficos.	37
3.6.1. Identificación de cohortes.	37
3.6.2. Tamaños efectivos.	37
3.6.3. Estudio de las relaciones familiares.	39
3.6.3.1. Análisis de parentesco.	40
3.6.3.2. Análisis de grupos familiares.	41

4. RESULTADOS	43
4.1. Selección de <i>loci</i> .	43
4.2. Patrones de diversidad en los <i>loci</i> seleccionados.	45
4.3. Aplicabilidad al análisis de la estructura poblacional.	46
4.4. Variabilidad genética en las poblaciones en el año 2006.	49
4.5. Estructura poblacional en el año 2006.	51
4.6. Flujo génico.	55
4.7. Estabilidad temporal en los patrones de diversidad y de la incidencia de repoblación.	58
4.8. Estructura de edades.	62
4.9. Tamaños efectivos.	66
4.10. Análisis de consanguinidad y parentesco.	68
4.11. Análisis de grupos familiares.	72
5. DISCUSIÓN	75
5.1. Selección de <i>loci</i> microsatélites.	75
5.2. Variabilidad intrapoblacional.	81
5.3. Diferenciación poblacional.	82
5.4. El efecto de las repoblaciones en la diversidad poblacional.	86
5.5. Estabilidad temporal de la diversidad genética e incidencia de las repoblaciones.	88
5.6. Demografía genética.	92
5.6.1. Estructura de edades.	92
5.6.2. Tamaño efectivo de las poblaciones.	93
5.6.1. Análisis de las relaciones familiares.	97
5.7. Demografía genética y estructura poblacional de la trucha común en el Pirineo catalán.	101
6. CONCLUSIONES	105
7. REFERENCIAS	109

RESUMEN

La gestión de las especies explotadas puede verse favorecida por un apropiado conocimiento de los patrones de diversidad genética de sus poblaciones. Estos estudios permiten también determinar el aislamiento y flujo génico entre ellas, los tamaños efectivos y la composición de los grupos familiares entre otros parámetros importantes para su conservación. El desarrollo de marcadores moleculares permite acceder de manera rápida a este tipo de información, en este sentido, los *loci* microsatélites son potentes herramientas para el análisis poblacional a una escala geográfica reducida. En este trabajo se ha desarrollado un sistema de amplificación y genotipado de 9 *loci* microsatélites que, por un lado, ha permitido analizar eficientemente la estructura poblacional de las poblaciones de trucha común (*Salmo trutta*) en las cuencas del Pirineo catalán y, por otro, conocer su demografía genética. El estudio se basa en el genotipo obtenido para 1446 ejemplares de trucha común capturados en 14 localidades y en campañas realizadas repetidamente los años 1993, 2004 y 2006.

En contraste con estudios previos basados en datos alozímicos y mitocondriales, donde la mayor parte de la diferenciación se asociaba a una estructura poblacional en mosaico, los resultados obtenidos en esta tesis detectan una estructuración hidrográfica que parece consecuencia del diferente efecto del último periodo glacial en las diferentes cuencas estudiadas. En las cuencas interiores (Ter y Llobregat) se observa una alta diferenciación poblacional ($F_{ST} = 0,354$), resultado de la divergencia entre los afluentes. En las cuencas de la Noguera Pallaresa y Ribagorzana, aunque existe una significativa diferenciación entre sus tributarios, la principal componente de divergencia se observa dentro de cada uno de ellos ($F_{SC} = 0,133$, N. Pallaresa; $F_{SC} = 0,292$, N. Ribagorzana). Los estudios sobre el flujo génico apoyaron este aislamiento de las poblaciones y no detectaron evidencias de grandes desplazamientos dentro de las cuencas. Sí se intuye la migración de ejemplares a una escala espacial más reducida y principalmente dentro del mismo curso fluvial. Además de la distancia, otros factores hidrológicos y ambientales parecen incidir sobre la movilidad microgeográfica de los ejemplares.

La mayor parte de las poblaciones presentaban indicios de introgresión de genoma de repoblación centroeuropeo, pero su impacto ha sido reducido y en su mayor parte mantienen acervos genéticos nativos. Aunque en la mayoría de localidades se ha detectado una pequeña pero significativa diferenciación en su constitución génica en el periodo 1993 - 2006, sólo en algún caso se ha podido asociar esta inestabilidad temporal con el efecto de las repoblaciones. Otros mecanismos como la deriva y el intercambio de ejemplares entre poblaciones próximas podrían ser los responsables de esas fluctuaciones a medio plazo en las frecuencias alélicas de las poblaciones.

Resumen

La clasificación de los ejemplares de las muestras del año 2006 en grupos de edad realizada a partir de la distribución de las tallas en cada localidad, ha permitido detectar problemas de reclutamiento. El análisis del tamaño efectivo poblacional detectó diferencias entre las cuencas del Pirineo. Así, los valores observados en las cuencas internas de Cataluña (Ter y Llobregat) se situaron en torno a los 50 ejemplares, mientras los tamaños efectivos de la mayor parte de las poblaciones de los afluentes del Ebro (Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana) rondaban o superaban los 100 ejemplares. El número efectivo de reproductores también resultaba superior en la mayor parte de las poblaciones de los afluentes del Ebro. A pesar de los bajos tamaños efectivos detectados en alguna de las poblaciones, los coeficientes de consanguinidad de los juveniles (cohortes 1+ y 2+) del Pirineo no diferían de los esperados en simulaciones de ejemplares no emparentados. Por el contrario, los valores de parentesco de la mayoría de las muestras sí resultaban significativamente inferiores a los esperados en el caso de los ejemplares no emparentados. Esta situación sugería la presencia de estrategias familiares encaminadas a evitar altos valores de consanguinidad y parentesco. En este sentido, los análisis de parentesco sugerían la posible participación en las puestas de ejemplares foráneos procedentes de poblaciones próximas. La reconstrucción familiar de los juveniles en cada localidad del Pirineo indicó la abundancia de las familias, pero de reducido tamaño. Como consecuencia, fueron bajas las varianzas del tamaño familiar. Los valores de varianza en el tamaño familiar estuvieron significativamente correlacionados con los tamaños efectivos de las poblaciones. El cociente entre la varianza del tamaño familiar y el propio tamaño de las familias, interpretado en términos de distribución espacial de los ejemplares de las familias, sugiere que las familias de las clases 1+ y 2+ tienden a disgregarse y poco a poco expandirse a lo largo del tramo fluvial.

La complejidad de los procesos evolutivos ocurridos en la zona y la diferente escala espacio - temporal en la que éstos han tenido lugar impiden establecer un patrón general que relacione la estructura poblacional y la demografía genética en las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán. Sin embargo, los resultados obtenidos encajan con la estructura poblacional sugerida para las poblaciones mediterráneas de trucha común, que se consideran constituidas por pequeños demos interconectados que constituyen metapoblaciones. En todas las cuencas del Pirineo parece existir una tendencia a que la estrategia reproductora y la interconexión entre los demos limiten los efectos de la deriva.

SUMMARY

Management of exploited species can be enhanced by a proper understanding of their population genetic diversity patterns. These studies also permit determination of isolation and gene flow between locations, effective population sizes and kinship composition among other important parameters for their conservation. Molecular markers allow us a quick access to such information and, in this sense, microsatellite loci are powerful tools for population analysis in a small geographical scale.

In the present study an amplification and genotyping system for 9 microsatellite loci has been developed and used to genotype 1446 brown trout (*Salmo trutta*) individuals captured from 14 sites and repeatedly sampled in 1993, 2004 and 2006. This system has allowed, on one hand, to efficiently analyze the brown trout population structure from Catalan Pyrenees basins and, on the other, to describe their genetic demography.

In contrast to previous studies based on allozyme and mitochondrial data where most of the differentiation was related to a mosaic population structure, results obtained in this thesis detect a basin structure which seems related to the different effect of the last glacial period on the studied basins. Thus, in the interior basins (Ter and Llobregat) a high population differentiation ($F_{ST} = 0.354$) was observed, resulting from the divergence between the tributaries. In contrast, in the Noguera Pallaresa and Ribagorzana rivers, the main component of divergence was observed between locations within tributaries ($F_{SC} = 0.133$, N. Pallaresa; $F_{SC} = 0.292$, N. Ribagorzana), although the differentiation between its tributaries was also significant. Moreover, although gene flow analysis supported the isolation of populations and found no evidence of large movements within the basins, it seems that migration happens to a smaller spatial scale, mainly within the same stream. Besides hydrographic distances, additional hydrological and environmental factors influence the brown trout movements at microgeographical scale.

Most of the studied brown trout populations display evidences of Central European genome introgression caused by hatchery releases, but genetic impact has been small and most populations kept their native gene pools. In most locations a small but significant differentiation in its gene constitution during the 1993 - 2006 period has been detected, nevertheless this instability has been related to restocking effects only in just a few cases. Other mechanisms such as drift or the exchange of individuals between nearby populations may be responsible for these medium-term fluctuations in allele frequencies within locations.

Summary

The classification into age groups from the size distribution detected recruitment problems in some 2006 samples. The effective population size analysis detected differences among basins. Thus, in the interior basins (Ter and Llobregat) the population effective sizes stood around 50 individuals, while in most populations of the tributaries of the Ebro (Noguera Pallaresa and Noguera Ribagorzana) observed values were around 100 individuals or even larger. The effective number of spawners was also larger in most of the populations from the Ebro tributaries. Despite of the small effective sizes detected in some populations, inbreeding coefficients for juveniles (cohorts 1 + and 2 +) were not different from those suggested by simulations of unrelated individuals. The relatedness values from most of the samples were significantly lower than expected in the case of unrelated individuals. These results suggested the presence of family strategies designed to prevent high levels of inbreeding and relatedness. Relatedness analysis pointed to the contribution of foreign individuals from nearby populations to spawning. Kinship group reconstruction in each Pyrenean sample noted the abundance of families of small size. Variances in family size were also small. Variance in family size was significantly correlated with effective population size. The ratio between variance family size and estimated family size, interpreted as the spatial distribution of familiar groups, suggests that families of classes 1+ and 2+ tend to disgregate by gradually expanding along the river stretch.

The complexity of evolutionary processes occurred in the area and the different scale of space-time in which they took place make difficult to draw a general pattern relating structure and genetic demography of brown trout populations in the Catalan Pyrenees. However, results fit with the population structure suggested for the Mediterranean brown trout populations, which consist of small interconnected demes forming metapopulations. In the studied Pyrenean basins, the reproductive strategy and the connectivity between demes mitigate the genetic drift expected from the estimated effective population sizes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA TRUCHA COMÚN.

La trucha común, *Salmo trutta* (Linnaeus 1758), es un pez de la familia *Salmonidae*. Su área de distribución natural se extiende por la mayor parte del continente europeo, sin embargo su introducción en América, Australia, África y Asia a partir del siglo XIX, ha provocado que en la actualidad esta especie esté presente en la mayor parte de las aguas continentales del planeta (Elliott 1989).

A pesar de su amplio rango de distribución, la trucha común requiere un hábitat con unas condiciones del medio bastante estrictas, principalmente respecto a las características del agua y del volumen estacional de caudal, así como de factores topográficos de pendiente, profundidad de las aguas, cobertura y naturaleza del lecho de los ríos (Heggenes *et al.* 1999). Sin embargo, es la temperatura del agua el principal factor limitante para su distribución (Elliott 1989). Aunque la trucha común es una especie de aguas frías, presenta un amplio grado de tolerancia a la temperatura, pudiendo sobrevivir a una temperatura mantenida en el tiempo de 25 °C, mientras que su límite inferior de tolerancia se sitúa en torno a los 0 °C (Elliott 1989). Como todos los peces, la trucha común es poiquiloterma, es decir, su temperatura corporal depende de la temperatura del agua y ésta interviene en su grado de actividad metabólica. En aguas frías, presenta una

1. Introducción

baja actividad metabólica y a mayor temperatura alcanza mayor actividad (Hunter 1991; Heggenes *et al.* 1993). El desarrollo óptimo de la especie se produce a temperaturas moderadas, entre 4 y 19 °C (Elliott 1989). Su necesidad respiratoria requiere de altas concentraciones de oxígeno disuelto en el agua y tolera mal la polución acuática, siendo especialmente sensible a la contaminación orgánica (Blanco 1994). En la Península Ibérica, las zonas de cabecera de los ríos suelen cumplir las condiciones idóneas que permiten el óptimo desarrollo de las poblaciones de trucha común (Almodóvar *et al.* 2001).

La distribución de los ejemplares de esta especie dentro del río varía en función de diversos parámetros como la edad, la época del año o el momento del día y las condiciones del medio (Heggenes *et al.* 1999; Klementsén *et al.* 2003). Así, incluso en las poblaciones residentes se observa cierta movilidad de los individuos (Crisp 1993; Gowan *et al.* 1994; Heggenes *et al.* 1999; Bremset *et al.* 2000). Generalmente la trucha común evita tramos de ríos con grandes desniveles, con aguas turbulentas y lechos escarpados. Durante el verano, la distribución de las truchas está determinada básicamente por el nicho alimenticio y éste se estructura en base al tamaño de los ejemplares (Heggenes *et al.* 1999). Las zonas de rápidos con abundante corriente, poca profundidad y suelos pedregosos suelen dar cobijo a truchas de pequeño tamaño (Heggenes *et al.* 1999; Roussel y Bardonnet 1999). En torno a estas zonas de rápidos se originan pequeños espacios protegidos de la corriente que suelen albergar truchas de mayor tamaño, mientras que a mayor profundidad, en zonas rocosas o pedregosas, se reúnen las condiciones para la concentración de los ejemplares de tallas más grandes (Heggenes *et al.* 1993). Durante el invierno, las truchas de pequeño tamaño buscan cobijo en el sustrato o entre la vegetación (Heggenes *et al.* 1993; Mäki-Petäys *et al.* 1997). A falta de tales hábitats, estos ejemplares pueden adoptar un comportamiento gregario y habitar en el fondo de zonas más profundas. También los ejemplares de talla grande, superior a los 20 - 25 cm, forman agrupaciones de peces en zonas del río con aguas profundas y poca corriente o buscan refugio en el sustrato de manera individual (Cunjak y Power 1986; Heggenes *et al.* 1993).

La trucha común se alimenta fundamentalmente de invertebrados bentónicos, insectos y moluscos, aunque los ejemplares adultos también pueden consumir peces y anfibios (Hunter 1991; García de Jalón y Barceló 1987; Oscoz *et al.* 2000, 2005). Es una especie muy voraz durante la primavera y verano, periodo en el que experimenta el máximo crecimiento corporal, pero a finales del verano disminuye su metabolismo (Lagarrigue 2000; Baglinière y Maissa 1990; Bremset 2000). Como carnívoro predador, la trucha es territorial y esta territorialidad y las jerarquías entre ejemplares pueden afectar

profundamente a la vida y al desarrollo de los ejemplares (Alanärä *et al.* 2001; Carlsson *et al.* 2004).

La madurez sexual en la trucha común tiene un componente genético (Jonsson 1989) aunque también parece estar altamente influenciada por la oportunidad de crecimiento y de supervivencia a escala local (Klemetsen *et al.* 2003; Olsen y Vollestad 2005). En las poblaciones residentes de trucha común de la Península Ibérica se ha observado que los ejemplares adquieren la madurez sexual durante el segundo o el tercer año de vida, cohortes 1+ y 2+ respectivamente (Lobón-Cerviá 2000; Nicola y Almodóvar 2002). En las poblaciones de crecimiento más lento los ejemplares tienen una longitud de 10,5 - 11 cm, sin embargo, en otras poblaciones de la península la talla media de maduración de las truchas se corresponde con 16 - 17 cm. La variabilidad en la edad y en el tamaño de maduración también ha sido observada en poblaciones anádromas de la especie (Olsen y Vollestad 2005; Rubin *et al.* 2005). Asimismo, habitualmente los machos maduran antes que las hembras, pero éstas suelen tener mayor tamaño (Jonsson 1989; Olsen y Vollestad 2005). Al principio del otoño, con el descenso del fotoperiodo, el metabolismo de las truchas se ralentiza, momento en el que sus órganos sexuales comienzan a madurar y a producir gametos (Blanco 1994). En esta época los ejemplares se desplazan hacia las zonas de puesta o frezaderos localizados en zonas de aguas someras, con poca corriente y sustrato de grava en donde las hembras excavan con su aleta caudal los nidos en donde van a depositar los huevos. La puesta de la hembra y la fecundación de los huevos por el macho se realizan al mismo tiempo y este proceso de puesta se repite durante varios días (Klemetsen *et al.* 2003). Cada puesta es fecundada mayoritariamente por un único macho (Largiader *et al.* 2001), aunque un porcentaje reducido de la puesta puede ser fecundado por otros machos, dando lugar a eventos de múltiple paternidad (García-Vázquez *et al.* 2001). Tras la puesta, la hembra cubre con grava los huevos fecundados, de tal manera que quedan protegidos tanto de depredadores como de ser arrastrados por la corriente (Orcutt *et al.* 1968; Klemetsen *et al.* 2003). El tiempo de incubación de los huevos en estos nidos varía en función de la temperatura del agua y puede comprender de uno a varios meses (Klemetsen *et al.* 2003). Tras la eclosión, los alevines se alimentan inicialmente del saco vitelino (Maise y Blaglinière 1991) y posteriormente empiezan a alimentarse de larvas de insectos, principalmente de quironómidos, capturadas en el entorno de los nidos (Klemetsen *et al.* 2003). Los alevines presentan comportamientos agresivos, defienden territorios, forman jerarquías de dominancia y compiten intensamente por los recursos (Héland *et al.* 1999; Lahti *et al.* 2001). Los ejemplares que no logran alimentarse,

1. Introducción

son desplazados aguas abajo y probablemente mueren en un corto espacio de tiempo (Elliott 1994).

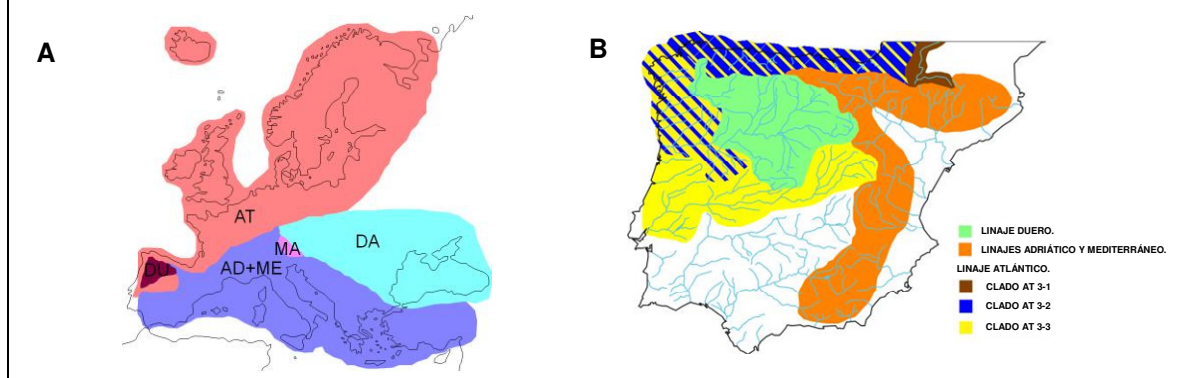
1.2. DIVERSIDAD GENÉTICA EN LA TRUCHA COMÚN.

La trucha común muestra un importante grado de diversidad morfológica y ecológica. El polimorfismo morfológico se detecta en el tamaño, la forma corporal y la pigmentación de los ejemplares (Ferguson y Taggart 1991; Aparicio *et al.* 2005). Desde el punto de vista ecológico, la trucha común presenta variaciones referidas a la tasa de crecimiento, al nicho alimenticio, al ciclo biológico, al uso del hábitat o a la edad de maduración (Pakkasmaa y Piironen 2001; Klemetsen *et al.* 2003). Pero sin duda, una de las características ecológicas más llamativas de esta especie es la presencia de modos de vida diferentes: la forma anádroma y la residente. La forma anádroma desarrolla su ciclo biológico entre el medio fluvial, en donde nace y se reproduce, y el medio marino, en donde alcanza su madurez sexual, mientras que la forma residente desarrolla la totalidad de su ciclo vital en el medio fluvial (Elliott 1989). Asimismo, se ha observado que en determinadas áreas ambas formas pueden coexistir y que pueden hibridar (Hindar *et al.* 1991a; Hansen *et al.* 2000). Sin embargo, la forma anádroma no está representada en todo el ámbito natural de la especie. El límite inferior de la forma anádroma en la cuenca atlántica se localiza alrededor del paralelo 42º N (Bouza *et al.* 1999) y se considera extinta de la cuenca Mediterránea, aunque permanece en el Mar Negro y en el Mar Caspio (Elliott 1994).

Además de la variabilidad morfológica y ecológica, la trucha común también presenta una gran variabilidad genética (Ferguson 1989). Los primeros estudios sobre polimorfismos genéticos de la especie dentro de su área de distribución natural detectaron una elevada diferenciación genética, tanto a escala local como a escala europea (Ferguson 1989; García-Marín *et al.* 1999). Los estudios con el DNA mitocondrial (DNAMt) definieron inicialmente 5 linajes evolutivos altamente divergentes, uno presente en toda la vertiente atlántica, el linaje Atlántico (AT), y cuatro en la vertiente mediterránea, el Mediterráneo (ME), el Adriático (AD), el Marmoratus (MA) y el Danubio (DA) (Bernatchez *et al.* 1992; Bernatchez 2001). Esta estructuración es el resultado de una compleja historia evolutiva reflejo tanto del aislamiento de las cuencas fluviales, como de las contracciones y expansiones del rango de la especie durante los periodos glaciales del Pleistoceno y también de procesos locales. Recientemente se ha confirmado la existencia de un nuevo linaje matriarcal en la cuenca interior del río Duero (linaje Duero, DU) y se ha observado una importante subestructuración del linaje Atlántico en tres grandes clados (Cortey *et al.* 2009; Vera *et al.* 2010).

En la Península Ibérica, se ha detectado una importante diferenciación genética entre las poblaciones nativas de la vertiente atlántica y las de la mediterránea. Las poblaciones de trucha común de la vertiente atlántica pertenecen mayoritariamente al linaje Atlántico (salvo el caso de la cuenca interior del Duero) y presentan una marcada estructura hidrográfica (Bouza *et al.* 1999; Machordom *et al.* 2000; Sanz *et al.* 2000; Vera 2006; Campos *et al.* 2007; Cortey *et al.* 2009). Sin embargo, en la vertiente mediterránea coexisten los dos linajes, el Mediterráneo (ME) y el Adriático (AD) en la mayoría de las cuencas (Cortey *et al.* 2004). En esta vertiente mediterránea, los análisis de diversidad basados en alozimas, detectaron que había una mayor diferenciación genética entre las poblaciones de un mismo río que entre las de ríos diferentes y una cierta abundancia de alelos propios a nivel local (García-Marín y Pla 1996; Sanz *et al.* 2002).

Figura 1.1. Distribución de los diferentes linajes de trucha común presentes en Europa (A) y en la Península Ibérica (B) basados en los análisis de DNA mitocondrial (según Cortey 2005).



En la cordillera pirenaica se localizan los mejores hábitats para las poblaciones de trucha común de la vertiente mediterránea de la Península Ibérica (Sanz *et al.* 2002; Cortey *et al.* 2004). Los Pirineos están próximos a la región del Rosellón, en el sur de Francia, propuesta como uno de los refugios de fauna durante la última glaciación y área en la que probablemente se originó el linaje mitocondrial ME (Bernatchez 2001). Los primeros análisis genéticos de las poblaciones de *Salmo trutta* del Pirineo catalán empezaron a realizarse a principios de la década de los 90 (García-Marín *et al.* 1991). Los trabajos realizados hasta el momento en esta región han detectado los dos linajes matriarcales, el ME y el AD, pero su distribución no muestra un claro patrón geográfico y parece el resultado de los contactos secundarios ocurridos entre ambos linajes durante los periodos glaciales y el posterior aislamiento y deriva post-glacial, tal y como se ha sugerido para el resto de ríos mediterráneos (Sanz *et al.* 2002; Cortey *et al.* 2004; Vera 2006).

1. Introducción

1.2.1. El efecto de las repoblaciones.

En la actualidad, un elevado número de especies o poblaciones que han sufrido declives importantes durante las últimas décadas están siendo gestionadas por el hombre para intentar garantizar su supervivencia (Frankhan *et al.* 2002). La finalidad principal de la gestión de las poblaciones naturales debería estar encaminada a restaurar las condiciones óptimas para su desarrollo y de esta manera garantizar que sobrevivan de manera autónoma. Esta gestión debe ser más minuciosa en el caso de aquellas poblaciones naturales que además de presentar problemas de conservación están sujetas a regímenes de explotación, para poder así realizar un uso sostenible del recurso y garantizar su supervivencia (Robinson 2001).

La trucha común, como muchos otros salmónidos, no es ajena a estas dinámicas. A pesar de su amplia distribución, esta especie está sufriendo un notable declive dentro de su área natural de distribución (García de Jalón y Schmid 1995). Entre las causas de este declive se encuentran la modificación del hábitat fluvial (Madeira *et al.* 2005), la sobreexplotación (Almodóvar y Nicola 2004) y las actividades de repoblaciones con ejemplares alóctonos (Sanz *et al.* 2002; Araguas *et al.* 2004; Madeira *et al.* 2005; Almodóvar *et al.* 2006). Esta situación ha llevado a incluir a la trucha común en el “Libro Rojo de los Vertebrados Españoles” dentro de la categoría “Especie Vulnerable” (Doadrio 2001).

Ante el continuo retroceso de las poblaciones españolas de trucha común, las distintas administraciones públicas y entidades privadas han puesto en marcha una serie de medidas para intentar frenar dicha tendencia. En algunos casos se han tomado decisiones encaminadas a regular la actividad pesquera para minimizar su efecto perjudicial en las poblaciones naturales de trucha común. De esta manera, en los últimos años se ha reducido el número de ejemplares de trucha común que se extraen de los ríos. Este hecho podría responder tanto a una mayor presencia de zonas de pesca sin muerte en los ríos españoles, como a la reducción del cupo máximo de capturas por pescador y día (ver por ejemplo Araguas *et al.* 2008; 2009). Asimismo, las estadísticas sobre la actividad pesquera española indican una reducción en el número de licencias de pesca en los últimos años, lo que también contribuiría a aliviar la presión sobre las poblaciones de trucha común (Ministerio de Medioambiente y Medio Rural y Marino 2006).

Sin embargo, hasta tiempos recientes, la principal medida paliativa al retroceso de las poblaciones de trucha común ha sido la aplicación generalizada de las repoblaciones. Por lo general, estas repoblaciones han sido efectuadas a partir de ejemplares domésticos de

trucha común de origen centroeuropeo, genéticamente muy diferentes a las poblaciones naturales de la Península Ibérica (García-Marín *et al.* 1991; Arias *et al.* 1995). En los últimos años, diversos estudios han descrito los efectos perjudiciales que estas repoblaciones han tenido sobre las poblaciones naturales de trucha común españolas. Así, se ha observado que la introducción de individuos de repoblación en las poblaciones naturales ha provocado la pérdida del patrimonio genético nativo (García-Marín *et al.* 1999; Machordom *et al.* 1999; Aparicio *et al.* 2005; Madeira *et al.* 2005; Almodóvar *et al.* 2006; Araguas *et al.* 2004) que conduce a la pérdida irreparable de las adaptaciones específicas de las poblaciones a las condiciones del medio en las que viven (Utter 2001). Además, la poca diferenciación entre los estocs utilizados para repoblar los diferentes territorios ha favorecido la homogeneización genética de las poblaciones naturales (Machordom *et al.* 1999; Araguas *et al.* 2004).

A pesar del gran esfuerzo de repoblación, la incidencia genética de las mismas ha sido inferior a la esperada. El éxito de repoblación parece depender de factores específicos de la población receptora y de las condiciones ambientales de la zona (Almodóvar *et al.* 2006). Además, los ejemplares domésticos obtenidos a partir de reproductores mantenidos durante varias generaciones en los centros piscícolas parecen tener menor éxito reproductivo al ser liberados al medio natural que los ejemplares naturales (Hindar *et al.* 1991b). Asimismo, también parece haber una mayor susceptibilidad de los ejemplares repoblados a ser capturados por los pescadores (García-Marín *et al.* 1998, Mezzera y Largiader 2001; Heggenes *et al.* 2006). El valor medio de introgresión observado para las poblaciones de trucha común en España es del 13,4% (Almodóvar *et al.* 2006), aunque el impacto genético de las repoblaciones es muy variable de unos ríos a otros (Arias *et al.* 1995; Blanco *et al.* 1998; García-Marín *et al.* 1999; Almodóvar *et al.* 2006; Araguas *et al.* 2008).

El deterioro de los acervos genéticos nativos de la trucha común y la mayor sensibilidad a la conservación de las poblaciones locales de trucha común mostrada en los últimos años por diversos agentes sociales ha dado lugar a cambios en las políticas de gestión de las poblaciones de esta especie. Concretamente en Cataluña, desde la Orden de Pesca de 1997 de la Generalitat, se reconocen como “Reservas Genéticas de Truchas” tramos fluviales de especial consideración para la conservación genética. En ellos está prohibida cualquier repoblación. Desde ese año 1997 hasta la actualidad la superficie de cauce incluida bajo esta figura de protección ha aumentando dentro del territorio catalán (Araguas *et al.* 2009). Cada vez más resulta importante vigilar las consecuencias no deseadas de las intervenciones humanas en las poblaciones naturales. El monitoreo o vigilancia genética, entendido como la cuantificación de los cambios temporales de los

1. Introducción

datos generados a partir de marcadores moleculares, se presenta como una prometedora herramienta para la conservación y la gestión de las poblaciones naturales (Schwartz *et al.* 2007).

1.3. *LOCI*/MICROSATÉLITES.

En la actualidad hay disponibles un elevado número de marcadores moleculares que facilitan el análisis de la diversidad genética. Sin embargo, es necesario conocer las características de cada uno de ellos antes de seleccionar el más apropiado para el tipo de estudio que se quiere realizar (Liu y Cordes 2004). Por ejemplo, y como se ha comentado anteriormente, la mayor parte de los análisis genéticos llevados a cabo hasta el momento en las poblaciones del Pirineo catalán fueron realizados a partir de datos alozímicos (Sanz *et al.* 2002; Araguas *et al.* 2004) o a partir de la secuenciación de la región de control del DNA mitocondrial (Cortey *et al.* 2004; Vera 2006). Sin embargo, estos marcadores presentan una serie de desventajas a la hora de su utilización en el seguimiento de las poblaciones naturales. Así, la electroforesis de alozimas precisa del sacrificio de los ejemplares para obtener los diferentes tejidos en donde hay la mayor expresión de las proteínas que se quieren analizar. Además del problema ético de contribuir a la disminución del número de ejemplares de las poblaciones muestreadas, hay que destacar que los permisos de pesca científica otorgados por las administraciones españolas en caso de muestreos de trucha con muerte, establece un máximo de 25 capturas por localidad. En algunos casos, este requisito legal puede llegar a limitar la interpretación estadística de los datos, tendiendo a alterar la importancia relativa de los componentes de diversidad genética (Sanz *et al.* 2000). El DNA mitocondrial es una molécula circular que se considera un único *locus* a nivel de transmisión ya que no parece manifestar fenómenos de recombinación (Wilson *et al.* 1985) y que puede analizarse a partir de una biopsia no letal. Sin embargo, su herencia materna condiciona la información obtenida a partir de su análisis y a pesar de ser un marcador muy utilizado en estudios de filogeografía no es el más apropiado para estudiar las relaciones microevolutivas entre poblaciones próximas (Frankhan *et al.* 2002).

Cuando se diseñó este trabajo de tesis doctoral, los marcadores moleculares denominados microsátélites eran los más utilizados en campos como la acuicultura (Chistiakov *et al.* 2006) o la ecología molecular (Estoup y Angers 1998). Estos *loci* microsátélites son regiones de DNA nuclear con un tamaño comprendido entre 80 y 400 pares de bases (pb) de longitud que se caracterizan por tener motivos de secuencia corta (2 - 5 pb) que se repiten en tandem diversas veces, originando polimorfismos de longitud según el número de copias presentes en cada uno de los alelos. Los microsátélites son

marcadores moleculares con expresión codominante que se encuentran ampliamente representados en los genomas de eucariotas, aunque parece tener menor presencia en regiones codificadoras (Cruz *et al.* 2005). Generalmente presentan un gran número de alelos por *locus* que conduce a elevados niveles de variabilidad (Litt y Luty 1989; Weber y May 1989). Estos cambios alélicos aparecen como consecuencia del desplazamiento de las hebras apareadas durante la replicación (Schlötterer y Tautz 1993; Richards y Sutherland 1994) o como resultado de apareamientos desiguales entre hebras cromosómicas en *sipnasis* o por conversión génica durante la recombinación (Welch *et al.* 1990; Richard y Pâques 2000). El modelo de mutación más aceptado para los microsatélites es el modelo de dos fases (*Two Phase Model*, TPM) propuesto por Di Rienzo *et al.* (1994), que considera que las mutaciones en los microsatélites generalmente provocan la adición o pérdida de una unidad de repetición (*Stepwise Mutation Model*, SMM) y menos frecuentemente de varias unidades de repetición (*Infinitive Alleles Model*, IAM). De esta manera, la aparición de un alelo nuevo dependería también del tamaño que tuviese el alelo antes de mutar. Aunque varía entre especies, la tasa de mutación de los microsatélites es muy elevada, alcanzando valores de $10^{-2} - 10^{-3}$ (Levinson y Gutman 1987; Weber y Wong 1993).

El genotipo para estos *loci* microsatélites puede ser obtenido a partir de DNA extraído de muestras no letales. La amplificación del DNA se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los productos de esta amplificación pueden ser analizados con gran rapidez mediante electroforesis. Asimismo, en paralelo a la utilización de los *loci* microsatélite, se han desarrollado métodos analíticos y estadísticos para el análisis de este tipo de marcadores que los han convertido en una potente herramienta en diversos campos de la genética, tales como la identificación individual y la asignación de parentesco o el establecimiento de las relaciones familiares (Wilson y Ferguson 2002), el análisis filogenético (Richard y Thorpe 2001), la genética de poblaciones (Allendorf y Luikart 2006), los estudios de epidemiología molecular y patología, el mapeo de QTLs o la selección asistida por marcadores (Chistiakov *et al.* 2007).

Al inicio del presente estudio, eran pocos los trabajos realizados sobre diversidad en *loci* microsatélites en poblaciones de trucha común de la Península Ibérica. El trabajo de Cagigas *et al.* (1999) observó que la variación en estos *loci* era superior a la detectada mediante alozimas. Aunque ese estudio pionero estaba limitado a sólo 3 *loci*, resultados similares se obtuvieron posteriormente en ríos gallegos con el uso de 6 microsatélites (Corujo *et al.* 2004). Estos estudios han sido ampliados en los últimos años. Así, Izquierdo *et al.* (2006) observaron alelos diferenciales en el *locus* BFRO 002 entre los ejemplares nativos de ríos en el norte de la Península Ibérica y las truchas foráneas

1. Introducción

utilizadas en las repoblaciones. Los *loci* microsatélites también se han mostrado eficientes en la descripción de la estructura de las poblaciones de trucha común en ríos de la Península Ibérica a escala macro y microgeográfica (Ayllon *et al.* 2006; Campos *et al.* 2006, 2007; Martínez *et al.* 2007; Vilas *et al.* 2010). Sin embargo, todos esos trabajos se han concentrado sobre poblaciones atlánticas pertenecientes a linajes evolutivos diferenciados de los que ocupan los ríos mediterráneos. Recientemente, Vera *et al.* (2010) han utilizado una batería de 8 *loci* microsatélite comunes en estudios de poblaciones noreuropeas (Ruzzante *et al.* 2001, Carlsson y Carlsson 2002; Hansen 2002; Hansen *et al.* 2002; Jensen *et al.* 2005) en la Noguera de Vallferrera, un tributario de la cuenca del Ebro en el Pirineo catalán. Mediante ese estudio se ha detectado una elevada diversidad génica, muy superior a la detectada en estudios previos mediante alozimas (Araguas *et al.* 2004) y DNA mitocondrial (Cortey *et al.* 2004; Vera 2006) en esa zona.

1.4. DEMOGRAFÍA GENÉTICA.

Con el nacimiento de la ciencia de la Biología de la Conservación se inició un debate acerca de la importancia relativa de la genética y de la demografía en la conservación y la gestión de las especies (Nunney y Campbell 1993; Hedrick *et al.* 1996; Clarke y Young 2000). Algunos autores apuntaban que los factores demográficos, las fluctuaciones ambientales y las catástrofes conducían a las poblaciones naturales a la extinción antes de que influyesen los factores genéticos (Lande 1988; Caughley 1994). Otros afirmaban que había bases teóricas y experimentales claras que evidenciaban que los factores genéticos estaban involucrados en la extinción (Avice 1989). En los últimos años se ha producido un acercamiento entre ambas posturas, de tal manera que se tiende a integrar la información demográfica y genética en los análisis poblacionales (Araki *et al.* 2007b; Palstra *et al.* 2009; Serbezov *et al.* 2010a). El desarrollo experimentado en los últimos años en las técnicas moleculares ha contribuido a esta integración (Hedrick 2000).

La utilización de marcadores moleculares permite inferir características demográficas en una población debido a que los patrones de variación genética en las poblaciones también están afectados por las fuerzas demográficas (Milligan *et al.* 1994; Frankham 1995c; Clarke y Young 2000). De este modo, la utilización de técnicas moleculares se ha convertido en una valiosa herramienta a la hora de conocer determinados parámetros demográficos y biológicos en especies en las que resulta complicado obtener estimas de las principales características demográficas mediante censos u observaciones directas (Avice 1994; Milligan *et al.* 1994; Wilson y Ferguson 2002; Leblois *et al.* 2003). Por todo ello, el uso de marcadores moleculares ha resultado

ser en diversas ocasiones la única forma de obtener información sobre la demografía de las poblaciones (Schwartz *et al.* 1998). Además, el uso de marcadores moleculares permite inferir procesos demográficos históricos, tales como cuellos de botella, fragmentación de la población, estimación del flujo génico y la consanguinidad, tanto a partir de muestras recientes (Cornuet y Luikart 1996; Carlsson *et al.* 1999; Ruzzante *et al.* 2001, 2004; Waldick *et al.* 2002; Hansen *et al.* 2007) como a partir de muestras antiguas (Hansen *et al.* 2001; Hansen y Jensen 2005). Todos estos factores resultan críticos en los procesos de extinción (Frankham *et al.* 2002) y tienen por tanto una especial repercusión en la gestión y mantenimiento de las poblaciones (Nunney y Campbell 1993; Mills y Smouse 1994; Hedrick 2000).

1.4.1. El tamaño efectivo.

El tamaño efectivo de las poblaciones (N_e) es el parámetro fundamental que determina el alcance de la variación genética de las especies amenazadas (Hedrick 2000; England *et al.* 2006) y tiene gran importancia en la gestión de las poblaciones naturales (Heath *et al.* 2002; Leberg 2005; Schwartz *et al.* 2007). Este parámetro predice la pérdida de variabilidad, la probabilidad de fijación de los alelos deletéreos y el aumento de la consanguinidad experimentado por la población (England *et al.* 2006), y por lo tanto, determina el tipo y la magnitud de los procesos evolutivos no selectivos que van a afectar a la población (Frankham *et al.* 2002). El conocimiento del tamaño efectivo tiene especial relevancia en poblaciones pequeñas, en las que se espera que la deriva genética actúe con cierta intensidad, provocando la pérdida de variabilidad genética y haciéndolas más vulnerables a la extinción (Frankham *et al.* 2002; Leberg y Firmin 2008).

En la mayoría de las poblaciones, el tamaño efectivo resulta inferior al censo de reproductores debido a diferentes causas, como por ejemplo las desviaciones en la proporción de sexos, la varianza del tamaño familiar o la estructura de edades (Crow y Kimura 1970). Teniendo en cuenta un amplio rango de sistemas de apareamiento y características biológicas, la relación entre el tamaño efectivo y el censo poblacional se sitúa en el 50% en poblaciones demográficamente estables y aisladas (Nunney y Elam 1994). Sin embargo, en determinadas poblaciones naturales de distintas especies se ha observado como el valor del tamaño efectivo resultaba inferior al 10% del censo poblacional (Frankham 1995c).

La estimación del tamaño efectivo resulta complicada en las poblaciones naturales (Frankham 1995c; Schwartz *et al.* 1998; Waples y Yokota 2007; Araki *et al.* 2007b; Waples y Do 2007). Sin embargo, la utilización de marcadores de DNA altamente polimórficos, como son los microsatélites, ha proporcionado un aumento en la precisión

1. Introducción

de las estimas de este parámetro. Los microsatélites son capaces de detectar variabilidad genética a nivel poblacional y por lo general, parecen tener menos probabilidades que otros marcadores moleculares de estar sometidos a selección natural. Además, al poder ser determinados a partir de biopsias, los análisis con microsatélites han permitido aumentar los tamaños muestrales y en consecuencia la precisión de las estimas de N_e . Estos marcadores pueden ser estudiados en muestras históricas pertenecientes a colecciones de museo, lo que posibilita tener información del tamaño efectivo en el pasado y cuantificar los cambios temporales ocurridos (Schwartz *et al.* 1998). La aplicación de los microsatélites ha ido también acompañada del desarrollo de procedimientos de cálculo del tamaño efectivo que han permitido obtener mejor potencia estadística de las estimas (Schwartz *et al.* 1998). El procedimiento de cálculo más utilizado es el método temporal (Nei y Tajima 1981; Waples 1989; Wang 2001; Waples 2006), que realiza estimas de N_e a partir de la varianza de las frecuencias alélicas de la población a lo largo del tiempo. Aunque inicialmente este método fue desarrollado para ser aplicado en poblaciones con generaciones discretas, aisladas y con tamaños poblacionales estables durante el periodo de análisis, su uso se ha generalizado y en la actualidad, se utiliza de manera habitual ya que las desviaciones respecto a las condiciones de aplicación quedan minimizadas cuando las muestras utilizadas en el análisis tienen un tamaño mínimo, aparecen igualmente representadas las diferentes cohortes y las réplicas temporales se separan varias generaciones (Jorde y Ryman 1996; Waples y Yokota 2007; Palstra y Ruzzante 2008). El principal inconveniente en la aplicación de este método radica en la necesidad de contar con al menos dos muestras temporales y esto no siempre es posible. Otro procedimiento habitual para el cálculo de N_e es el método basado en los desequilibrios de ligamiento (LD). Esta estimación de N_e se basa en la existencia de asociaciones no aleatorias entre los alelos de *loci* no ligados. En el caso del análisis de marcadores neutros, como son los microsatélites, estos desequilibrios están principalmente causados por factores poblacionales tales como la estructuración y la endogamia (Hedrick 2000). A diferencia del método temporal, el método de desequilibrio de ligamiento presenta la ventaja de obtener estimas de N_e a partir de una única muestra.

La utilización de diferentes metodologías de cálculo de N_e aporta una visión más general del comportamiento genético de las poblaciones naturales (Palstra y Ruzzante 2008). Bajo unas condiciones demográficas y ecológicas constantes, se espera que las estimas de los tamaños efectivos basadas en las fluctuaciones temporales de las frecuencias alélicas y las estimas basadas en los desequilibrios de ligamiento presenten resultados

similares. Sin embargo, bajo situaciones de inestabilidad, ambas aproximaciones suelen diferir (Frankham *et al.* 2002; Palstra y Ruzzante 2008).

1.4.2. Relaciones familiares y grado de parentesco.

El conocimiento de las relaciones familiares y del grado de parentesco entre los ejemplares de una población contribuye a la comprensión de sus patrones de distribución, dispersión y comportamiento social (Garant *et al.* 2001; Wilson y Ferguson 2002; Kane y King 2009; Jones y Wang 2010), todos ellos factores de gran repercusión en la viabilidad y persistencia de las poblaciones (Frankham *et al.* 2002). Por ejemplo, las poblaciones con una elevada tasa de apareamientos consanguíneos probablemente son unidades aisladas y con un reducido tamaño poblacional.

El análisis familiar puede realizarse desde diferentes aproximaciones, bien a partir del grado de parentesco, o bien a partir de la estructura familiar o del pedigrí (Wilson y Ferguson 2002; Bloin 2003; Hansen y Jensen 2005; Jones y Wang 2010). En los últimos años, se ha aplicado este tipo de estudios para establecer la consanguinidad existente tanto entre los ejemplares mantenidos en cautividad como en aquellos pertenecientes a poblaciones naturales (Hansen *et al.* 1997; Hansen y Jensen 2005). El análisis de estas cuestiones en las poblaciones piscícolas naturales tiene a menudo la dificultad añadida de la ausencia de dicha información (Wilson y Ferguson 2002). Sin embargo, a partir de los genotipos *multiloci* de los individuos analizados, se han desarrollado diferentes métodos estadísticos que infieren las relaciones familiares y el grado de parentesco en ausencia de información de los individuos parentales (Queller y Goodnight 1989; Luikart y England 1999; Blouin 2003; Jones y Ardren 2003; Wang 2004). En este sentido, se ha generalizado la aplicación de los *loci* microsatélites en este tipo de análisis ya que su patrón de herencia codominante y el elevado polimorfismo que presentan (Parker *et al.* 1998; Jones y Ardren 2003) permite obtener genotipos únicos para cada individuo (Chistiakov *et al.* 2006).

2. OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación del *Laboratori d'Ictiologia Genètica* de la Universitat de Girona sobre las poblaciones residentes de trucha común (*Salmo trutta*, L.) en el noreste de la Península Ibérica, particularmente dentro de los objetivos del proyecto de investigación REN2003-05931, del cual he sido becaria FPI.

Los objetivos concretos de la tesis son los siguientes:

- I. El desarrollo de una batería de *loci* microsatélite útil para el estudio de la diversidad genética en las poblaciones de trucha de la cuenca mediterránea.
- II. El análisis de los patrones de diversidad genética entre y dentro de las poblaciones de trucha común del área de estudio y su estabilidad temporal. En este sentido se analiza también el efecto de las repoblaciones con ejemplares alóctonos sobre dichos patrones.
- III. El estudio de la demografía genética (tamaños efectivos, niveles de consanguinidad, relaciones de parentesco y estructura familiar) en las poblaciones de trucha común del Pirineo oriental.

2. Objetivos

La finalidad última de este trabajo de tesis doctoral es determinar el papel que tiene la demografía genética en la estructura poblacional de la especie dentro del ámbito de estudio, es decir, la integración de los resultados de los objetivos anteriores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

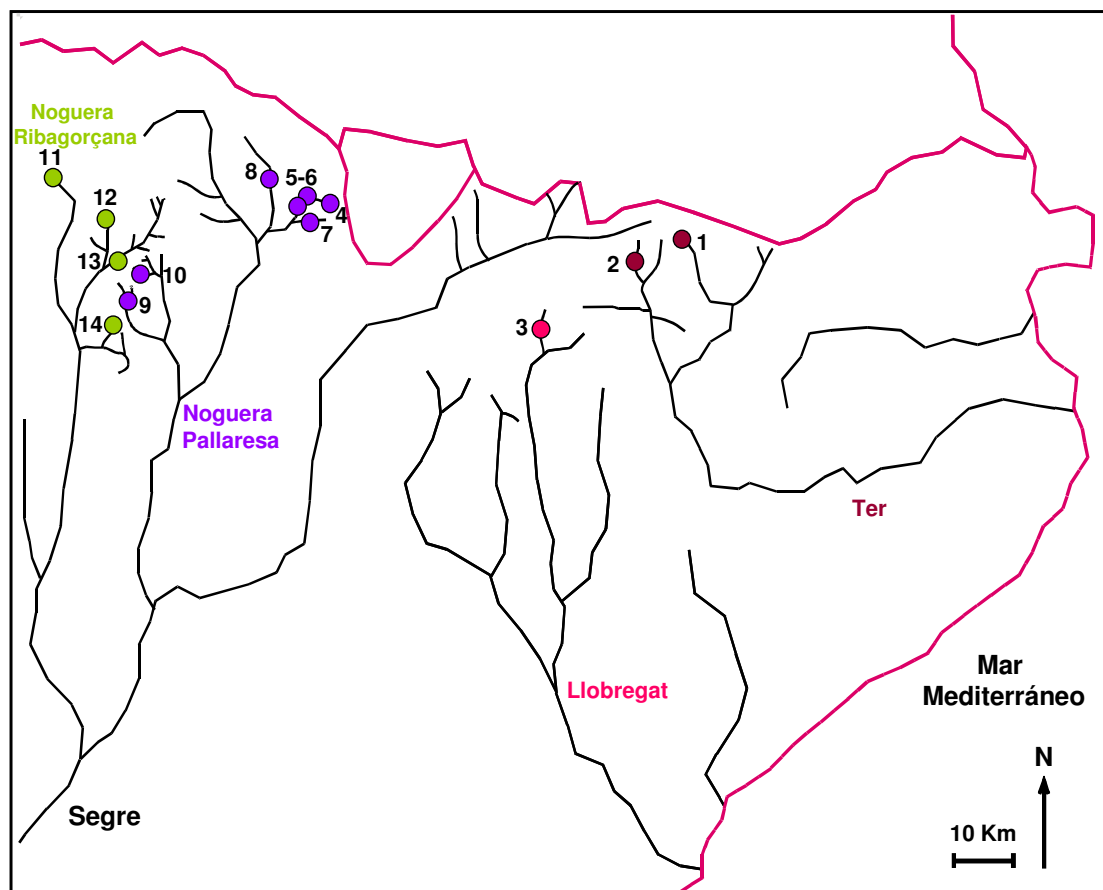
3.1. ZONA DE ESTUDIO.

Este estudio comprende las cabeceras de los ríos Ter, Llobregat, Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana, todas ellas localizadas en el Pirineo catalán (Fig. 3.1). El Ter y el Llobregat pertenecen al conjunto de cuencas internas de Cataluña ya que todo su recorrido transcurre dentro del territorio catalán. El río Ter, con una longitud de 208 Km, drena un área de 2955 Km². El caudal medio anual de este río, según la estación de aforo más cercana al punto de desembocadura (Torroella de Montgrí) es de 11,4 m³/s (serie 2001 - 2009). Los sitios de muestreo pertenecientes a esta cuenca se localizan en el municipio de Setcases (Girona), en la cabecera del cauce principal del río Ter, camino de la estación de esquí de Vallter (1-Vallter) y en su afluente, el río Freser (2-Nuria), en la confluencia de este río con el río de Nuria en el municipio de Queralbs (Girona) (Fig. 3.2). Ambos puntos de muestreo se sitúan en tramos de río clasificados como ríos de montaña húmeda silícica (Agència Catalana de l'Aigua 2005). Los tramos tipificados de esta manera se caracterizan por tener una aportación anual moderadamente baja (inferior a los 150 Hm³), una pluviometría anual superior a los 1000 mm, una temperatura ambiental media anual inferior a 9 °C y un porcentaje de geología superficial silícica superior al 80%. La serie de datos de los últimos 10 años de la estación de aforo de Sant Joan de les Abadeses, situada a escasos Km aguas arriba de la confluencia del Ter con el Freser,

3. Material y Métodos

muestra un caudal medio anual de $4,5 \text{ m}^3/\text{s}$ que sufre oscilaciones a lo largo del año. Los caudales máximos se alcanzan en primavera por la aportación del deshielo y los mínimos a finales de invierno y verano (Fig. 3.3).

Figura 3.1. Localidades de estudio en las cuencas de los ríos Ter, Llobregat, Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorçana.



Río Ter:	1-Vallter 2-Nuria
Río Llobregat:	3-Riutort
Río Noguera Pallaresa:	4-Pla de Boet 5-Palomera 6-Ermita 7-Tor 8-Ainet 9-Manyanet 10-Filià
Río Noguera Ribagorçana:	11-Conangles 12-Cavallers 13-Nicolau 14-Erta

El río Llobregat forma la mayor cuenca interna de Cataluña, ocupando una superficie de 4957 Km². Sin embargo, su caudal medio anual de 11,1 m³/s en las proximidades de su desembocadura (estación de aforo de Sant Joan Despí, serie de datos 2001 - 2009) es similar al del Ter. La única muestra analizada perteneciente a esta cuenca estaba localizada en el río Riutort (3-Riutort), afluente del río Llobregat y situada en el municipio de La Pobla de Lillet (Fig. 3.2). El lugar de muestreo pertenece a un tramo de río clasificado como río de montaña húmeda calcárea. Al igual que en las localidades del río Ter, la aportación anual y la temperatura ambiente son bajas y la pluviometría anual supera los 900 mm, pero el porcentaje de geología superficial silícica es inferior al 10 %. Los datos anuales de la serie 2002 - 2009 de la estación de aforo del Clot del Moro, afluente del Llobregat situado en las proximidades de la zona de muestreo y con características equiparables a las del río Riutort, determinan un caudal medio anual de 0,8 m³/s, con picos de caudal en la primavera, debido a la aportación nival, y en otoño, consecuencia de las lluvias, mientras que los mínimos rozan caudales de 0 m³/s a finales de invierno (Fig. 3.3).

Figura 3.2. Puntos de muestreo en las cuencas internas de Cataluña. A: 1-Vallter; B: 2-Nuria; C: 3-Riutort.

A



B

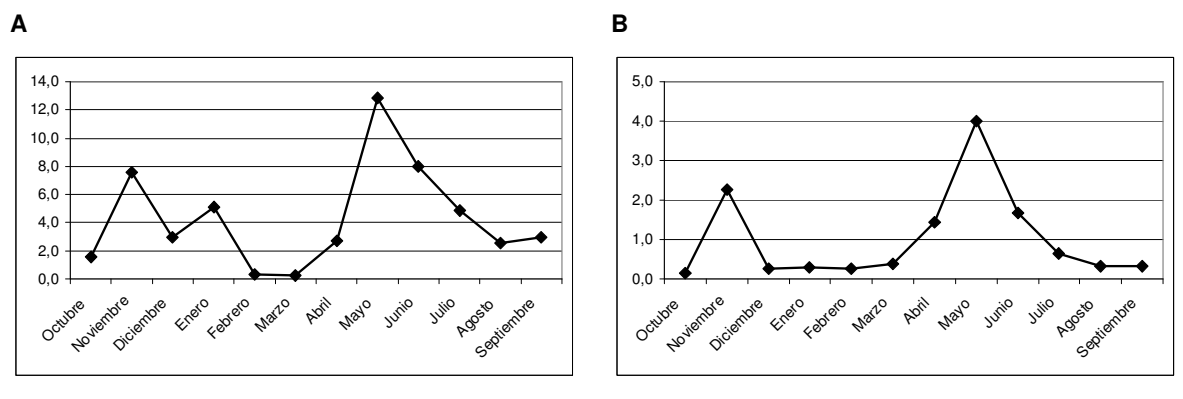


C



3. Material y Métodos

Figura 3.3. Fluctuación anual del caudal (m^3/s) en las zonas de muestreo de las cuencas internas de Cataluña. A: río Ter en Sant Joan de las Abadeses; B: río Llobregat en el Clot del Moro.

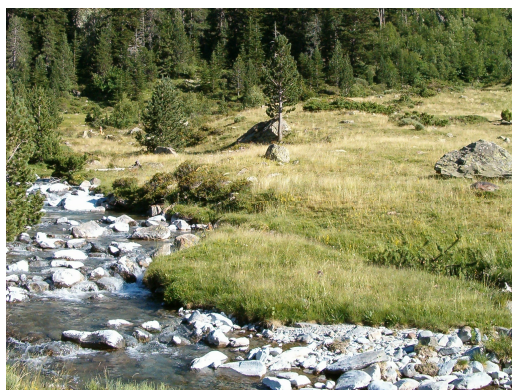


La Noguera Pallaresa, junto con la Noguera Ribagorzana son los afluentes principales del río Segre, el principal afluente del Ebro en Cataluña. La Noguera Pallaresa tiene una longitud de 147 Km, drena un área de 2811 Km² y presenta un caudal medio anual de 46,8 m³/s, según los valores observados durante el periodo 1965 - 1973 en la estación de aforo de Camarasa, poco antes de su confluencia con el Segre. Dentro de esta cuenca se muestrearon localidades pertenecientes a tres afluentes, la Noguera de Vallferrera, la Noguera de Cardós y el río Flamisell. Los tramos muestreados de la N. de Vallferrera y de la N. de Cardós están considerados ríos de montaña húmeda silíceo, mientras que los del Flamisell son ríos de montaña húmeda calcárea. Todas estas localidades están clasificadas como aguas de alta montaña según la normativa actual IBICAT (*Index d'Integritat Biòtica de Catalunya*, IBICAT, Agència Catalana de l'Aigua 2003).

La Noguera de Vallferrera es un afluente de la cabecera de la Noguera Pallaresa de 28,9 Km de longitud. Los puntos de muestreo de la N. de Vallferrera se sitúan en su cauce principal, en el Pla de Boet (4-Pla de Boet), en el paraje de la Palomera próxima al pueblo de Áreu (5-Palomera) y en el de la Ermita de Santa María de la Torre (6-Ermita), así como en su afluente principal, el río Tor (7-Tor) pertenecientes todas ellas al municipio de Alins (Lleida) (Fig. 3.4). El caudal medio anual de la N. de Vallferrera es de 1,4 m³/s, según los datos de la serie 1965 - 2005 de la estación de aforo situada próxima al pueblo de Alins, aguas abajo y a escasa distancia de su confluencia con el río Tor. Asimismo su afluente el río Tor, con una longitud de 12,7 Km, presenta un caudal medio anual de 1,3 m³/s, según los datos de la serie 1965 - 2005 de la estación de aforo situada en su cauce principal, próxima a la confluencia con la Vallferrera. En ambas estaciones se observan incrementos del caudal en la primavera-verano debidos al deshielo, mientras que en el resto del año se mantienen en torno a 1 m³/s (Fig. 3.5).

Figura 3.4. Puntos de muestreo en la Noguera Pallaresa. A: 4-Pla de Boet; B: 5-Palomera; C: 6-Ermita; D: 7-Tor; E: 8-Ainet; F: 9-Manyanet; G: 10-Filià.

A



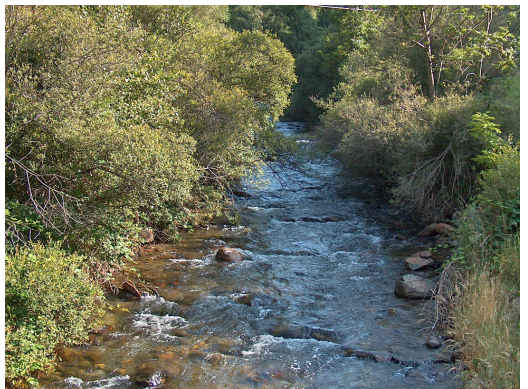
B



C



D



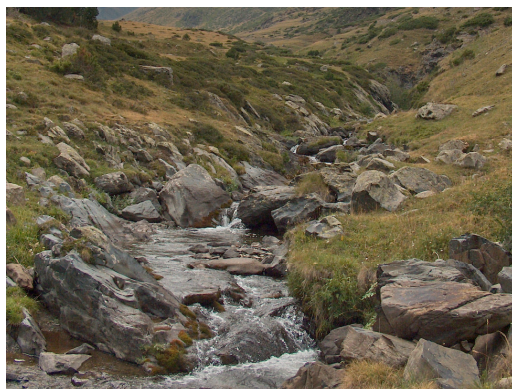
E



F



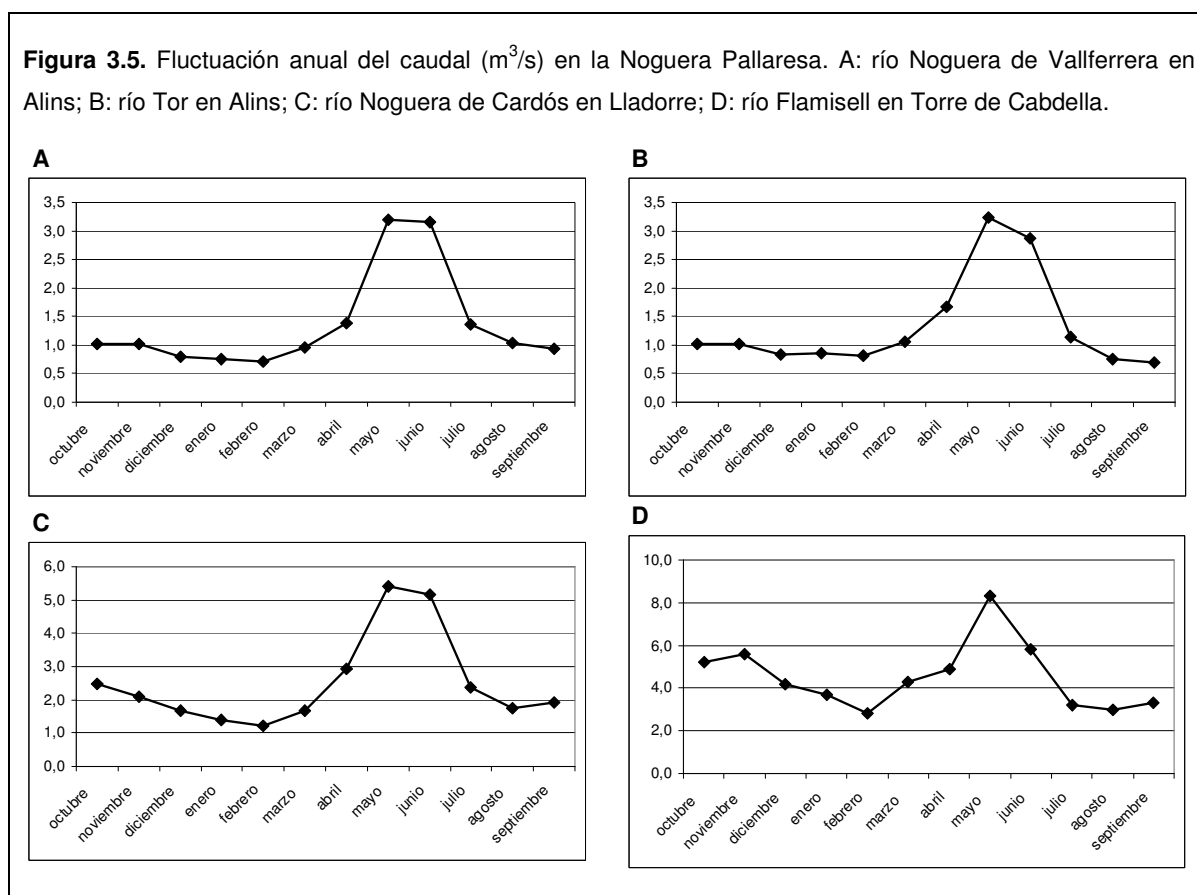
G



3. Material y Métodos

La N. de Vallferrera desemboca en la N. de Cardós, río de 33 Km de longitud que presenta un caudal medio anual de 2,7 m³/s, según la serie de datos 1954 - 1991 de la estación de aforo de Tavascán, situada en el municipio de Lladorre, aguas abajo del Pantano de Tavascán. El punto de muestreo en la N. de Cardós (8-Ainet) se sitúa en su cauce principal, en el municipio de Ainet de Cardós, aguas abajo de la estación de aforo anteriormente citada y próximo a la confluencia con el río N. de Vallferrera (Fig. 3.4). Los caudales medios mensuales de la estación de aforo también oscilan a lo largo del año. Los más elevados se detectan de abril a julio y los mínimos en invierno (Fig. 3.5).

Figura 3.5. Fluctuación anual del caudal (m³/s) en la Noguera Pallaresa. A: río Noguera de Vallferrera en Alins; B: río Tor en Alins; C: río Noguera de Cardós en Lladorre; D: río Flamisell en Torre de Cabdella.



El río Flamisell, con una longitud de 40,9 Km y una superficie de drenaje de 241,8 Km² desemboca en la Noguera Pallaresa en la localidad de La Poble de Segur (Lleida), registra un caudal medio anual de 5,9 m³/s, según la serie de datos 1961 - 1991 de la estación de aforo situada en dicha localidad. El tramo al que pertenecen las muestras capturadas en la cuenca del Flamisell (9-Manyanet y 10-Filià) está clasificado como río de montaña húmeda silícica. La muestra 9-Manyanet fue capturada en el río del mismo nombre, afluente del Flamisell, aguas arriba de la localidad de Manyanet (Lleida) (Fig. 3.4). La muestra 10-Filià, perteneciente al río Filià y fue capturada en el paraje

conocido como Cabana de Filià (Fig. 3.4), próximo a la localidad de Cabdella (Lleida). En estos casos, la información hidrológica de los puntos de muestreo procede de la serie de datos 1989 - 2005 de la estación de aforo de la localidad de Torre de Cabdella (Lleida) situada a escasos kilómetros aguas abajo de la confluencia entre el río Filià con el Flamisell. Con caudal medio anual de $1,8 \text{ m}^3/\text{s}$, se producen oscilaciones a lo largo del año con picos en otoño y primavera (Fig. 3.5).

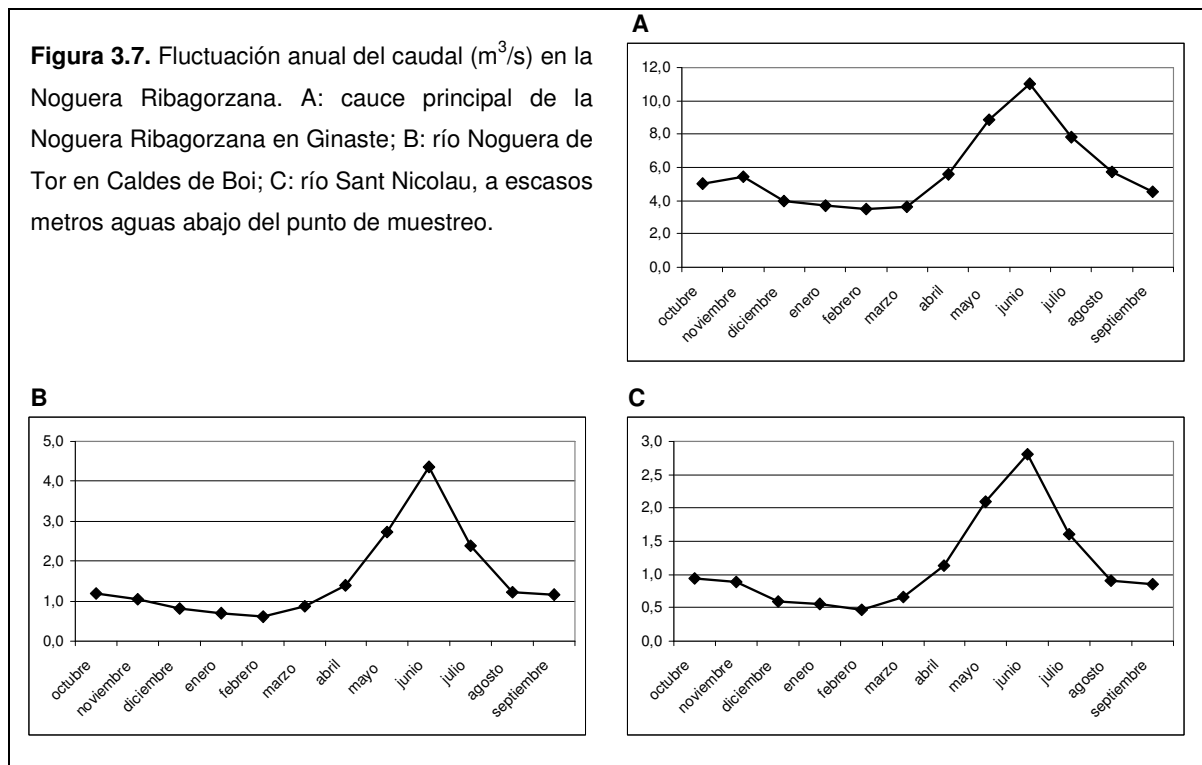
La Noguera Ribagorzana, con una longitud de 132,3 Km, drena un área de 1084 Km^2 y presenta un caudal medio anual de $18,6 \text{ m}^3/\text{s}$, según la estación de aforo de Canelles, ubicada en el municipio de Os de Balaguer (Lleida), próxima a su confluencia con el Segre. Los muestreos realizados en esta cuenca (Fig. 3.6) tuvieron lugar en la cabecera del cauce principal del propio río, concretamente en la zona conocida como el Barranco de Conangles (11-Conangles), y en dos afluentes del mismo, el río Noguera de Tor (12-Cavallers y 13-Nicolau) y el río Erta (14-Erta). Todas estas localidades están consideradas aguas de alta montaña según la normativa actual (Agència Catalana de l'Aigua 2003).

Figura 3.6. Puntos de muestreo en la Noguera Ribagorzana. A: 11-Conangles; B: 12-Cavallers; C: 13-Nicolau; D: 14-Erta.



3. Material y Métodos

La muestra 11-Conangles y las de los ríos Noguera de Tor (12-Cavallers y 13-Nicolau) se sitúan en tramos de ríos clasificados como de montaña húmeda silícica, mientras que la muestra 14-Erta pertenece a un tramo clasificado como de montaña húmeda calcárea. El caudal medio anual de la Noguera Ribagorzana en la estación de aforo más próxima al punto de muestreo 11-Conangles (Ginaste, municipio de Montanuy, Huesca) es 5,7 m³/s, según la serie de datos 1962 - 1996. El caudal tiene un importante incremento durante el deshielo (Mayo - Julio) y se mantiene más o menos estable durante el resto del año con valores comprendidos entre los 4 y 5 m³/s (Fig. 3.7).



El río Noguera de Tor, desemboca en la Noguera Ribagorzana a la altura de la localidad de Pont de Suert (Lleida). Con una longitud de 30,7 Km, su caudal medio anual alcanza los 7,7 m³/s en el municipio de Pont de Suert, según la serie temporal de datos 1962 - 1996 de la estación de aforo de Llesp, próxima a la confluencia con la Noguera Ribagorzana. Los puntos de captura en este río estaban localizados en su cauce principal, a escasos metros aguas abajo de la presa de Cavallers (12-Cavallers) y en su afluente el río Sant Nicolau, a la entrada del Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici (13-Nicolau), ambos puntos situados en el municipio de Barruera. A pesar de que el punto de muestreo 12-Cavallers se localiza a escasa distancia de la Presa de Cavallers, y el caudal por tanto en esta zona está regulado por este pequeño embalse (10,89 Hm³), los caudales medios de la estación de aforo en Caldes de Boi, situada a

escasos Km aguas abajo del punto de captura, reflejan un comportamiento similar al de los otros puntos, con un máximo durante el periodo del deshielo y un caudal más o menos estable ($1,5 \text{ m}^3/\text{s}$) durante el resto del año (Fig 3.7). La muestra 13-Nicolau se localiza en el río Sant Nicolau, afluente de la Noguera de Tor de 13,5 Km de longitud. La estación de aforo del río Sant Nicolau, próxima a la zona de captura, indica un caudal medio anual de $1,1 \text{ m}^3/\text{s}$ (1946 - 1996) con máximos a finales de primavera y principios de verano, mientras que el resto del año se mantiene bastante constante en torno a los $0,5 - 1 \text{ m}^3/\text{s}$ (Fig. 3.7). La muestra 14-Erta fue capturada a escasos kilómetros aguas arriba de la localidad de Erta, perteneciente al municipio de El Pont de Suert (Lleida). Este punto de muestreo no pudo ser caracterizado hidrológicamente debido a la ausencia de estaciones de aforo a lo largo de su cauce, pero es de suponer que el comportamiento hidrológico se enmarca dentro de lo observado en los otros puntos de la N. Ribagorzana.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

En total se han procesado 1446 ejemplares de trucha común del Pirineo catalán, capturados en las localidades de las cuencas de los ríos Ter, Llobregat, Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana antes descritas (Tabla 3.1). Los ejemplares corresponden a diversas capturas temporales a lo largo del periodo 1990 - 2006, a través de diferentes proyectos de investigación realizados por el *Laboratori d'Ictiologia Genètica* (LIG) de la Universitat de Girona en ese periodo.

Tabla 3.1. Localidades analizadas en este trabajo. Situación, cuencas a las que pertenecen, número de ejemplares por muestra y año. * Muestras capturadas en el año 1990.

LOCALIDAD	COORDENADAS	CUENCA	1993	2004	2006
1-Vallter	42° 24' 00" N, 2° 16' 41" E	Ter	15*	55	65
2-Nuria	42° 21' 49" N, 2° 10' 29" E		28	71	155
3-Riutort	42° 14' 36" N, 1° 55' 18" E	Llobregat	22*	10	43
4-Pla de Boet	42° 37' 15" N, 1° 23' 22" E	Noguera Pallaresa	5	7	-
5-Palomera	42° 34' 41" N, 1° 19' 50" E		-	28	55
6-Ermita	42° 34' 09" N, 1° 19' 46" E		-	19	46
7-Tor	42° 33' 19" N, 1° 20' 13" E		25	-	43
8-Ainet	42° 34' 57" N, 1° 14' 15" E		25	38	71
9-Manyanet	42° 25' 24" N, 0° 53' 16" E		23	46	104
10-Filià	42° 27' 44" N, 0° 57' 52" E		15	14	46
11-Conangles	42° 37' 26" N, 0° 46' 05" E	Noguera Ribagorzana	22	34	45
12-Cavallers	42° 34' 55" N, 0° 51' 09" E		20	37	55
13-Nicolau	42° 32' 40" N, 0° 50' 46" E		28	16	43
14-Erta	42° 25' 51" N, 0° 50' 56" E		-	-	72

3. Material y Métodos

En general, los muestreos fueron realizados al final de la estación de crecimiento de las truchas, entre finales de verano y principios de otoño. Los ejemplares se capturaron mediante pesca eléctrica utilizando para ello un equipo de mochila tipo “martín pescador”. La pesca se realizó remontando el río, haciendo un barrido de orilla a orilla a lo largo de un tramo aproximado de 50 m de longitud, lo que disminuía las posibilidades de captura de ejemplares pertenecientes a una única familia (Hansen *et al.* 1997).

Para facilitar su manipulación, los ejemplares fueron anestesiados con metanosulfonato de tricaina (MS-222). Los muestreos de 1993 se utilizaron en análisis electroforéticos previos del grupo de investigación (García-Marín *et al.* 1998; Sanz *et al.* 2002). A los ejemplares capturados durante las campañas de muestreo de los años 2004 y 2006 se les realizó una biopsia de aleta adiposa que fue conservada individualmente con etanol al 95% en tubos *ependorf*. Tras la biopsia, los ejemplares fueron introducidos en tanques de recuperación para ser posteriormente retornados al río. En el caso de las muestras letales, obtenidas para los análisis electroforéticos (año 1993), el número de ejemplares era reducido debido a la autorización de pesca científica (25 ejemplares), mientras que para las muestras del 2004 y 2006, donde sólo se obtuvo la biopsia, el número de ejemplares dependió de la densidad de ejemplares en cada punto de muestreo y fue por lo general superior a 25. Para las muestras del 2006 se extendió un poco el tramo de muestreo para asegurar la presencia de un mínimo de 40 ejemplares. Todas las muestras estaban compuestas por una mezcla de cohortes aunque en general, las clases 1+ y 2+ eran las más abundantes en todos los casos (ver detalles en el apartado 4.8., p. 62).

Además de las anteriores, también fue analizada una muestra de 96 ejemplares procedentes del centro piscícola de Bagà (cohorte del año 2003). Este centro es el responsable de las repoblaciones realizadas en la zona durante las últimas décadas. Esta muestra se utilizó como material de referencia para evaluar los efectos genéticos de las repoblaciones en las localidades del estudio.

3.3. EXTRACCIÓN DEL DNA.

En el caso de la colección de muestras del 1993, las extracciones de DNA fueron realizadas siguiendo el protocolo con fenol-cloroformo descrito por Sambrook *et al.* (1989), con las modificaciones que se describen en Cortey y García-Marín (2002). En el caso de las muestras de los años 2004 y 2006 las extracciones de DNA fueron realizadas siguiendo el protocolo de extracción con chelex-proteínasa K descrito por Estoup *et al.* (1996). La calidad de las extracciones de DNA fue comprobada mediante electroforesis

en gel de agarosa al 1% en el que se incluyó bromuro de etidio (0,05 µg/ml) para visualizar la abundancia de DNA en un transiluminador de luz ultravioleta.

3.4. SELECCIÓN DE *LOC*/MICROSATÉLITE.

Para el estudio de la estructura poblacional, el efecto de las repoblaciones y la demografía genética de las poblaciones del noreste de la Península Ibérica se ha puesto a punto una batería de *loci* microsatélite. Con este fin se ha analizado los niveles de diversidad alélica entre 368 ejemplares de trucha común (*Salmo trutta*) correspondientes a las 12 muestras obtenidas a lo largo de la campaña realizada entre los meses de julio y octubre del 2004 (Tabla 3.1). Asimismo, también se incorporó en este análisis la muestra de 96 individuos de la producción del año 2003 del estoc del centro piscícola de Bagà.

3.4.1. Selección de *loci* y ajuste de las reacciones *multiplex*.

Un total de 19 *loci* microsatélites fueron preseleccionados entre los sugeridos en la bibliografía de referencia. Así, once de estos *loci* microsatélite estaban incluidos en el listado recomendado por la “Acción Concertada en la Identificación, Gestión y Explotación de los Recursos Genéticos de la Trucha Común (*Salmo trutta*), EU FAIR CT97-3882” para el análisis de poblaciones de trucha común, ya que son aplicados de manera rutinaria en diferentes laboratorios y no presentan graves dificultades técnicas de amplificación y lectura (Laikre 1999). Nueve de estos 11 *loci* implicaban repeticiones de dinucleótidos: *Str15INRA*, *Str60INRA*, *Str73INRA* (Estoup *et al.* 1993), *Str591INRA* (Presa y Guyomard 1996), *T3-13* (Estoup *et al.* 1998a), *Ssa85* (O’Reilly *et al.* 1996), *OmyFgt1TUF* (Sakamoto *et al.* 1994), *SsoSL417* (Slettan *et al.* 1995) y *SsoSL438* (Slettan *et al.* 1996), mientras que 2 estaban compuestos por repeticiones de 4 y 2 nucleótidos, *Ssa197* y *Ssa171* (O’Reilly *et al.* 1996). Los 8 *loci* restantes se seleccionaron a partir de la bibliografía de salmónidos, 6 de ellos presentaban repeticiones de tetranucleótidos, *Ssa408UOS*, *Ssa410UOS*, *SSsp2213*, *SSps2201*, *SSsp2216*, *Sssp1605* (Cairney *et al.* 2000; Paterson *et al.* 2004), otro de dinucleótidos, *SsHaeIII14.20* (Goodier, no publicado, Nº acceso al GenBank U10050) y el último, *Ssa202* (O’Reilly *et al.* 1996), estaba compuesto por repeticiones de 4 y 2 nucleótidos.

Para cada *locus*, uno de los *primers* utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estaba marcado en la posición 5’ con uno de los siguientes fluorocromos: PETTM, NETTM, 6FAMTM y VICTM (*Applied Biosystems*) para permitir la lectura automática del genotipo de los individuos. La fluorescencia de cada *locus* se diseñó de tal forma que nunca dos *loci* con alelos descritos de similar tamaño pudiesen compartir un mismo fluorocromo. Así, se combinaron diferentes fluorocromos en aquellos *loci* que

3. Material y Métodos

presentaban alelos de menor tamaño (menos de 150 *bp*), alelos de mediano tamaño (150 - 250 *bp*) o alelos de gran tamaño (superior a 250 *bp*), para permitir la lectura simultánea de los todos los *loci* amplificados sin que se produjesen solapamientos.

Cada uno de estos *loci* fue amplificado por PCR individual en varios ejemplares de diversas poblaciones pertenecientes al área de estudio siguiendo las especificaciones técnicas incluidas en los trabajos en los que fueron inicialmente descritos. Los productos de amplificación fueron examinados mediante el analizador genético ABIPRIMS 3130 (*Applied Biosystems*), aplicando la matriz de análisis G5 *Matrix Standard Set DS-33* [6FAMTM, VICTM, NEDTM, PETTM, LIZ[®]] para la identificación de los fluorocromos y el marcador interno *GeneScanTM-500LIZ[®] Size Standard* para la identificación del tamaño de cada fragmento. El genotipo de los ejemplares fue inicialmente leído de manera automática mediante el programa *GeneMapper[®] Software V. 3.7* y luego revisado manualmente para su verificación. Mediante este análisis inicial se pudo conocer tanto los *loci* con amplificación positiva en nuestro laboratorio, como el rango de tamaño y la variabilidad de sus alelos en la zona de estudio. Además, se pudieron detectar aquellos problemas sistemáticos tales como duplicaciones y picos extras en las amplificaciones, que es necesario ajustar para establecer un patrón de lectura rutinario.

Una vez conocidas las características de amplificación de cada *locus* se diseñaron sistemas de amplificación conjunta o *multiplex* en función de la temperatura de hibridación (*annealing*) de los pares de *primers* de cada *locus*. A partir de la reacción de PCR para un *locus* determinado, se fueron añadiendo de manera secuencial pares de *primers* y se comprobaron los resultados con los obtenidos previamente en las amplificaciones individuales.

3.4.2. Análisis genéticos.

En primer lugar se revisó la presencia de alelos nulos y de problemas en la amplificación de alelos de gran tamaño (*large allele dropout*) mediante el programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Los niveles de diversidad para cada *locus* fueron estimados en base al número de alelos y las heterozigosis observada y esperada en las diferentes muestras con el programa POP100GENE 1.1.02 (Piry y Bouget 1999). Se comprobó también la existencia de desequilibrios de Hardy-Weinberg y de ligamiento entre pares de *loci* mediante el programa GENEPOP 3.3 (Raymond y Rousset 1995b), ajustando la significación de los valores obtenidos mediante la corrección secuencial de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice 1989). Asimismo se calculó el número más probable de grupos genéticamente homogéneos (*K*) presentes en cada muestra

utilizando métodos Bayesianos implementados en el programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) y en base al criterio descrito por Evanno *et al.* (2005).

Según el proceso de mutación propuesto para los *loci* microsatélites (DiRienzo *et al.* 1994), la mayor parte de los cambios ocurren por variaciones en una única unidad de repetición y bajo esta circunstancia, el tamaño de los alelos podría suministrar información a cerca de la diferenciación de las poblaciones. Para comparar la idoneidad de la aplicación de los estadísticos que incorporan el tamaño de los alelos (estadísticos-*R*) frente a los estadísticos basados únicamente en la frecuencia alélica (estadísticos-*F*) a la hora de analizar la diferenciación genética entre las poblaciones, se siguió el procedimiento descrito por Hardy *et al.* (2003). Este procedimiento fue ejecutado con el programa SPAGEDI 1.2. (Hardy y Vekemans 2002).

Para cada uno de los *loci*, se comprobó su contribución a la diferenciación génica entre pares de poblaciones a partir del test de probabilidades exactas (Raymond y Rousset 1995a). Asimismo, mediante el análisis de la varianza molecular AMOVA (Excoffier *et al.* 1992) del programa ARLEQUÍN 3.1 (Schneider *et al.* 2000), se analizaron las contribuciones de cada *locus* a los componentes de la estructura poblacional total (*ST*), entre localidades dentro de cuencas (*SC*) y entre cuencas (*CT*). Estos análisis fueron repetidos incorporando la muestra del centro piscícola de Bagà a los datos para conocer la importancia de cada uno de los *loci* en distinguir entre muestras nativas y los estocs del centro piscícola de Bagà usando en este caso el programa FSTAT 2.9.2.2 (Goudet 1995).

3.5. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DE LOS PATRONES DE DIVERSIDAD DE LA TRUCHA COMÚN EN EL PIRINEO CATALÁN.

El análisis de la estructura poblacional y de los patrones de diversidad se realizó a partir de las capturas más recientes (año 2006). Esta campaña del 2006 es la que tiene mayor número de ejemplares capturados en todo el periodo de estudio y en la que se procuró obtener en cada punto un tamaño mínimo de muestra comprendido entre los 40 y los 50 ejemplares (Tabla 3.1). Las localidades muestreadas fueron prácticamente las mismas que las utilizadas en el apartado 3.4, a excepción de la muestra del Pla de Boet, que no se muestreó debido al bajo número de ejemplares obtenidos en el 2004 y en años anteriores. Además, se añadieron dos muestras, una en la localidad de Tor en la cuenca de la Noguera Pallaresa y la otra en Erta, en la cuenca de la Noguera Ribagorzana. Estas muestras del 2006 fueron comparadas con las del 2004 para las 11 localidades en común (Vallter, Nuria, Riutort, Palomera, Ermita, Ainet, Manyanet, Filià, Conangles, Cavallers y

3. Material y Métodos

Nicolau) con el objetivo de analizar la estabilidad a corto plazo (tan sólo una generación) de la estructura poblacional y con muestras del año 1993 recogidas en estudios previos del LIG para detectar cambios a medio plazo (4-5 generaciones). Como ya se ha comentado, las muestras de 1993 tienen tamaños más reducidos porque provienen de capturas para estudios alozímicos (García-Marín *et al.* 1996; Sanz *et al.* 2002) y el máximo de capturas permitidas en aquellos permisos de pesca científica era de 25 por localidad, (Tabla 3.1). En el caso del Pla de Boet, la comparación fue realizada entre la muestra de 1993 y la capturada en 2004.

3.5.1. Diversidad genética intrapoblacional.

Los niveles de diversidad genética para cada muestra fueron estimados en base al número de alelos y la heterozigosidad observada para cada uno de los 9 *loci* finalmente seleccionados en el apartado anterior. El ajuste de las proporciones genotípicas respecto de las esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg, los desequilibrios de ligamiento entre pares de *loci* y el número de unidades homogéneas dentro de cada muestra se comprobaron usando los programas GENEPOP 3.3 y STRUCTURE 2.3.3 de acuerdo con la metodología indicada en el apartado 3.4.2. Además, se analizó la posibilidad de episodios recientes de cuellos de botella en las diferentes localidades a partir de las dos diferentes aproximaciones que permite el programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet y Luikart 1996). En primer lugar se comparó la diversidad génica en la muestra (H_e) respecto a la esperada bajo condiciones de equilibrio mutación-deriva (H_{ek}) a partir del número de alelos (k) presentes en la muestra. En este análisis se asumió un modelo de mutación en dos fases (TPM) en el que el 70% de los cambios alélicos ocurrían según el *single mutation model (SMM)* y el 30% según el *infinite allele model (IAM)*. En segundo lugar, se utilizó el método gráfico descrito por Luikart *et al.* (1998), que analiza la distribución de las frecuencias alélicas de cada población y su desviación respecto de la forma de “L” esperada en las situaciones de equilibrio mutación-deriva.

3.5.2. Diversidad genética entre las poblaciones.

La diferenciación entre las poblaciones fue analizada a partir de los coeficientes de diferenciación (F_{ST}) entre pares de poblaciones según Weir y Cockerham (1984). El cálculo de estos coeficientes fue llevado a cabo con el programa ARLEQUIN 3.1 (Schneider *et al.* 2000). La significación de esta diferenciación fue calculada mediante un test de probabilidades exactas entre pares de muestras (Raymond y Rousset 1995a) a partir del mismo programa. El patrón de distribución de la diversidad genética en el área fue analizada mediante AMOVAs. La diferenciación entre las localidades se dividió en dos niveles jerárquicos, dentro (SC) y entre (CT) las 4 cuencas analizadas (Ter,

Llobregat, Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana). Además, se realizaron AMOVAs individualizados para las cuencas de la Noguera Pallaresa y la Noguera Ribagorzana con el fin de analizar los patrones de diferenciación a una menor escala geográfica. Todos estos AMOVAs se realizaron también con el programa ARLEQUIN 3.1.

Las posibles relaciones filogenéticas entre las poblaciones fueron analizadas también mediante diferentes metodologías de agrupación que no asumen una estructura predefinida. En primer lugar, se calculó la distancia Da (Nei *et al.* 1983) entre cada par de muestras utilizando el programa MSA (Dieringer y Schlötterer 2003). Esta distancia genética está recomendada en los estudios con *loci* microsatélites (Takazaki y Nei 1996). A partir de esta matriz, se construyó un árbol de Neighbor-Joining para representar gráficamente el parecido entre las localidades. Este árbol se generó mediante el programa PHYLIP 3.69 (Felsenstein 1993). Para enraizar el árbol se incorporó al análisis la muestra del centro piscícola de Bagà. Esta muestra estaba constituida por descendientes de ejemplares importados del centro de Europa que pertenecían al linaje evolutivo atlántico (AT), ausente de manera natural en las poblaciones de trucha común de la vertiente mediterránea (García-Marín *et al.* 1991; Bernatchez *et al.* 1992; Cortey *et al.* 2004). La confianza de las ramas del árbol se obtuvo a partir de 10000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein 1985) obtenidas mediante el programa MSA y analizadas con el *software* del paquete PHYLIP. En segundo lugar, las relaciones entre las muestras se analizaron a partir de la técnica no paramétrica del escalado multidimensional (MDS) de la matriz de distancias Da . Este análisis fue llevado a cabo mediante el paquete estadístico SPSS. Finalmente, se analizó el número más probable de grupos genéticamente homogéneos (K) presentes en el territorio a partir del método bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) y siguiendo el criterio de Evanno *et al.* (2005) para la selección del valor de K .

3.5.3. Flujo génico.

Con la finalidad de analizar la conectividad entre las poblaciones y los niveles de flujo génico, se comprobó la posible existencia de un patrón de aislamiento por distancia en el territorio (IBD, Wright 1943). Para este fin se analizó la correlación entre la diferenciación genética (medida como $F_{ST}/(1-F_{ST})$) y la distancia hidrográfica entre pares de localidades. La distancia hidrográfica entre dos poblaciones fue calculada como la distancia lineal (en kilómetros) entre ellas siguiendo el curso del río. Además, también se comprobó la existencia de un patrón de aislamiento por distancia en el interior de las diferentes cuencas, ya que el intercambio natural de ejemplares entre cuencas es en la actualidad escaso o imposible. En segundo lugar, se estimaron las tasas actuales de migración (m)

3. Material y Métodos

entre las muestras pertenecientes a la misma cuenca, teniendo en cuenta el aporte de genoma de repoblación y considerando como migración efectiva cualquier valor de m que supere claramente al valor máximo observado entre las muestras de cada cuenca respecto a una muestra ajena a la misma. Estos análisis fueron realizados a partir de aproximaciones bayesianas y mediante el programa BAYESASS 1.3 (Wilson y Rannala 2003). Para cada una de las cuencas se realizaron 5 réplicas del programa, siguiendo las recomendaciones determinadas en Wilson y Rannala (2003) y se compararon las distribuciones de los valores de probabilidad finales entre las réplicas, seleccionando aquella réplica que presentaba la mayor probabilidad para el conjunto de resultados.

3.5.4. Estabilidad temporal de los patrones de diversidad y de la incidencia de repoblación.

El efecto de las fluctuaciones temporales sobre los patrones de diversidad espacial se detectó inicialmente a partir del estudio de la evolución de la estructura poblacional obtenida mediante AMOVAs realizados para las colecciones de muestras de 1993, 2004 y 2006. La importancia relativa de las variaciones temporales y las espaciales dentro del territorio, fueron analizadas mediante AMOVAs jerárquicos. En primer lugar, se encajaron las distintas localidades en dos grupos temporales (1993 y 2006) para conocer la importancia de la fluctuación temporal sobre la estructura poblacional en el territorio al inicio y al final de los estudios genéticos. En segundo lugar, las muestras temporales se encajaron en cada localidad de muestreo, de esta forma se estimó la importancia local de la fluctuación temporal. Todos estos análisis fueron realizados con el programa ARLEQUÍN 3.1 (Schneider *et al.* 2000).

Además, la estabilidad temporal en cada una de las poblaciones de trucha del Pirineo catalán fue analizada a partir de la diferenciación (F_{ST} , Weir y Cockerham 1984) entre las muestras temporales de cada localidad a lo largo del periodo 1993-2006. Estos análisis fueron realizados con el programa ARLEQUÍN 3.1 (Schneider *et al.* 2000).

Debido a que las poblaciones del Pirineo catalán han sido afectadas por las repoblaciones realizadas en la zona (Araguas *et al.* 2004, 2008), se analizó el grado de incidencia de repoblación de cada muestra a partir de los coeficientes de hibridación de los individuos de las mismas (q) utilizando el programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000), siguiendo las recomendaciones y la metodología descrita por Sanz *et al.* (2009). Asimismo, se analizó la evolución en el tiempo del grado de incidencia de repoblación durante todo el periodo 1993 - 2006 en cada localidad del Pirineo catalán mediante pruebas T realizadas con el paquete estadístico SPSS sobre la proporción de genoma de repoblación.

3.6. ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS.

3.6.1. Identificación de cohortes.

El estudio de los tamaños efectivos poblacionales y las relaciones de parentesco en las poblaciones de trucha del Pirineo catalán se ha realizado sobre las 13 muestras obtenidas el año 2006 (Vallter, Nuria, Riutort, Palomera, Ermita, Ainet, Manyanet, Filià, Conangles, Cavallers, Nicolau, Tor y Erta) (Tabla 3.1). La estructura de edades de cada una de las muestras se obtuvo a partir de la distribución de tallas de los ejemplares capturados. Para ello se midió la longitud furcal (*FL*) de cada ejemplar con un ictiómetro y con una precisión de $\pm 0,5$ cm. Las distintas modas se identificaron mediante un análisis de progresión modal (*MPA*, Petersen 1892) realizado según los métodos de Bhattacharya (Bhattacharya 1967) y Normsep (Abramson 1971) implementados en el programa FISH STOCK ASSESSMENT TOOLS II 1.2.2 (FAO 2005). Esta metodología es aplicable a especies con un periodo reproductor muy marcado, como es el caso de la trucha común, en el que los ejemplares de un mismo año pueden identificarse como una sola moda. El procedimiento funciona muy bien con peces jóvenes pero va perdiendo utilidad a medida que los ejemplares tienen más edad, ya que el ritmo de crecimiento disminuye y las modas se confunden (Rocaspana 2006). El resultado final es la agrupación de los ejemplares de cada muestra en grupos de tamaño que representaría cada una de las cohortes existentes en la muestra, pero al que todavía no se ha asignado una edad determinada. Esta asignación fue realizada teniendo en cuenta los valores de referencia del trabajo de Rocaspana (2006) en donde se determina la edad de las truchas de diferentes zonas del Pirineo catalán combinando las tallas de los ejemplares con la lectura de los anillos de las escamas de esos ejemplares. Esta aproximación permitió ajustar muy bien el intervalo de longitud para cada clase de edad. Además, como el muestreo de Rocaspana (2006) fue realizado también durante los meses de julio y agosto del año 2006, se facilitó la comparación con las distribuciones de frecuencias de las tallas obtenidas en el presente trabajo. Los ejemplares fueron finalmente divididos en 3 categorías: alevines (clase 0+), juveniles (clases 1+ y 2+) y adultos (clases 3+ y superiores).

3.6.2. Tamaños efectivos.

Las diferentes metodologías desarrolladas a partir de marcadores moleculares para el cálculo de los tamaños efectivos de las poblaciones (N_e) suministran estimas de diferentes instantes (Waples 2005) y pueden estar afectadas de diferente manera por las características de las muestras analizadas (Palstra y Ruzzante 2008). Por ello, para la estimación de los tamaños efectivos de las poblaciones del Pirineo, en este trabajo se

3. Material y Métodos

han utilizado diversas aproximaciones. En primer lugar, el tamaño efectivo se estimó siguiendo el método temporal, basado en los cambios de las frecuencias alélicas entre muestras temporales de una misma localidad. Esta aproximación asume que tales cambios son debidos al efecto de la deriva, siendo ésta inversamente proporcional al tamaño efectivo de la población (Krimbas y Tsakas 1971). En los últimos años, el método de cálculo original ha sufrido modificaciones para adaptarse a las oportunidades surgidas a partir de la aplicación de marcadores moleculares más polimórficos y del desarrollo de nuevas técnicas de análisis (Williamson y Slatkin 1999; Wang 2001; Berthier *et al.* 2002; Wang y Whitlock 2003; Tallmon *et al.* 2004). Así, en este trabajo se ha aplicado el método de Waples (1989) y de Nei y Tajima (1981) que utiliza el método de los momentos estadísticos para estimar el cambio de frecuencias alélicas. En ambos casos, la estimación del tamaño efectivo se realiza a partir de la ecuación de Krimbas y Tsakas (1971), sin embargo, cada uno calcula de manera diferente el cambio de las frecuencias alélicas para cada *locus*. Las estimas calculadas por estos métodos pueden sufrir importantes desviaciones cuando en las muestras analizadas abundan los alelos raros (frecuencias < 4%) (Waples 1989; Luikart *et al.* 1999; Wang 2001; Pastra y Ruzzante 2008). Los cálculos basados en Waples (1989) fueron realizados con el programa NEESTIMATOR (Peel *et al.* 2004), mientras que los basados en Nei y Tajima (1981) a partir del programa MLNE 2.0 (Wang y Whitlock 2003).

También se estimaron los tamaños efectivos a partir de los cambios en las frecuencias entre muestras temporales utilizando métodos basados en máxima verosimilitud. Estos métodos obtienen estimas de N_e menos sesgadas y más precisas que los cálculos basados en momentos, sobre todo en el caso del análisis de muestras con alelos a baja frecuencia (Williamson y Slatkin 1999, Wang 2001; Berthier *et al.* 2002). Sin embargo, las ventajas de los métodos basados en máxima verosimilitud se reducen al analizar muestras de escaso tamaño (tamaños muestrales inferiores a 50 ejemplares) (Pastra y Ruzzante 2008). Estos métodos fueron realizados a partir de dos aproximaciones, mediante el método basado en pseudo-máxima verosimilitud descrito por Wang (2001) e implementado en el programa MLNE 2.0 y a partir del método basado en la teoría de coalescencia desarrollada por Berthier *et al.* (2002) ejecutado con el programa TM3, incorporado al programa NEESTIMATOR (Peel *et al.* 2004), y limitando el valor máximo de N_e a 1000 ejemplares.

En todos los procedimientos de cálculo de N_e realizados a partir de métodos temporales se ha considerado que el tiempo de generación de las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán es de 3 años (Vera 2006) y por tanto, que entre las capturas del 1993 y 2006 utilizadas en este trabajo han transcurrido un total de 4 generaciones ($t=4$).

Además de los procedimientos temporales, el tamaño efectivo también fue estimado a partir del método del desequilibrio de ligamiento (LD) entre *loci* (Hill 1981). Este procedimiento proporciona estimas del tamaño efectivo poblacional utilizando una única muestra, a partir de la correlación alélica en los *loci* entre individuos de la población (Waples 1991) y fue aplicado a cada una de las muestras capturadas en el 2006 para tener una estima total de su tamaño efectivo (N_e). Además, esta aproximación fue aplicada también a los ejemplares juveniles incluidos en cada una de las muestras del 2006 (cohortes 1+ y 2+), lo que permite obtener una estima del número efectivo de reproductores (N_b) que dieron lugar al grupo de juveniles para cada muestra. Recientemente se ha observado que el método estándar del desequilibrio de ligamiento puede sufrir desviaciones en las estimas del tamaño efectivo cuando el tamaño de la muestra utilizada en el análisis resulta inferior al tamaño efectivo real de la población a la que pertenece dicha muestra (England *et al.* 2006). Para evitar las posibles desviaciones causadas por reducidos tamaños de muestra, las estimas de N_e y N_b fueron realizadas con el programa LDNE 1.31 (Waples y Do 2007), que aplica una corrección de las posibles desviaciones en las estimas de N_e causadas por el tamaño muestral (Waples 2006). Para calcular el coeficiente de correlación, este programa utiliza una estima no sesgada del desequilibrio de Burrow descrito por Weir (1979) ajustada para un tamaño de muestra finito.

Las estimas del N_e calculadas por los diferentes métodos fueron comparadas entre sí mediante pruebas de U-Mann-Whitney. Estas pruebas fueron realizadas a partir del paquete estadístico SPSS.

3.6.3. Estudio de las relaciones familiares.

Los análisis de las relaciones familiares fueron realizados únicamente en los ejemplares juveniles (clases de edad 1+ y 2+) para cada una de las muestras capturadas en el año 2006. Las cohortes de ejemplares 1+ y 2+ son las más abundantes en los ríos mediterráneos (Vera *et al.* 2010) y están constituidas por grupos de hermanos y de medio-hermanos, ya que la aportación paterna de la clase 2+ a la 1+ es prácticamente nula. Diferentes motivos justificaron la exclusión de los ejemplares pertenecientes a la cohorte 0+. En primer lugar, estos ejemplares apenas se desplazan del área de freza (Vera *et al.* 2010; Sanz *et al.* 2011) y pueden resultar muy abundantes en las proximidades a las zonas de puestas, mientras que su presencia va disminuyendo a medida que nos alejamos de éstas. Esta habitual distribución de los ejemplares 0+ puede causar sobrestimas o infraestimaciones del grado de parentesco entre los individuos en función de la disponibilidad de hábitats apropiados para las puestas o a su cercanía en

3. Material y Métodos

los diferentes puntos de muestreo (Hansen *et al.* 1997; Carlsson *et al.* 2003; Vera *et al.* 2010). En segundo lugar, los ejemplares 0+ son difíciles de capturar mediante la técnica de pesca eléctrica utilizada (Lobón-Cerviá 1991; Borgstrom y Skaala 1993), así que en general, la presencia de individuos 0+ en las muestras analizadas resultó limitada. También, fueron eliminados del análisis los ejemplares pertenecientes a la cohorte 3+ y superiores. Estos ejemplares adultos son probablemente progenitores de la clase 1+ y 2+, y estas posibles relaciones padre - hijo pueden causar falsos grupos de hermanos.

3.6.3.1. Análisis de parentesco.

En este trabajo, se ha calculado el coeficiente de consanguinidad (F) en cada individuo siguiendo el estimador descrito por Loiselle *et al.* (1995) para la estimación del parentesco entre individuos. Esta metodología es adecuada para marcadores codominantes y no está afectada por la presencia de alelos a baja frecuencia (< 5%) en la muestra. Este estimador de consanguinidad fue calculado mediante el programa SPAGEDI 1.2 (Hardy y Vekemans 2002), utilizando como frecuencias alélicas de referencia las obtenidas de las propias cohortes 1+ y 2+. Para cada muestra se obtuvo la distribución y la consanguinidad media de los individuos. Asimismo se calculó la consanguinidad poblacional mediante el estadístico de Wright y utilizando el programa GENEPOP 3.3 (Raymond y Rousset 1995b). En base a este último cálculo, se comprobó si los valores medios de los coeficientes individuales de consanguinidad se enmarcaban dentro de su intervalo de confianza al 95%.

También se calculó el coeficiente de parentesco (R) entre los individuos, que mide la proporción de alelos idénticos por descendencia compartida entre ellos. Es una magnitud que indica la semejanza genética entre dos individuos respecto a la observada entre dos individuos cogidos al azar en una población (Blouin 2003). Como estima del coeficiente de parentesco se utilizó el estadístico de Wang (2002), ya que a diferencia de otros estadísticos (Queller y Goodnight 1989; Lynch y Ritland 1999), presenta baja sensibilidad a los errores en las estimas de las frecuencias alélicas (Hardy y Vekemans 2002). Este coeficiente de parentesco fue también calculado mediante el programa SPAGEDI 1.2 (Hardy y Vekemans 2002) utilizando las frecuencias alélicas de referencia de la propia muestra analizada. Para cada muestra se obtuvo la distribución de los coeficientes de parentesco y su valor medio.

Además, se calcularon los coeficientes de fraternidad (Δ) entre los pares de individuos de cada población. Este índice indica la probabilidad de que dos genes del individuo i sean idénticos por descendencia a cada uno de los dos genes del individuo j (Lynch y Walsh 1998; Lynch y Ritland 1999). Es por tanto una comparación entre cuatro

genes. A mayor índice, más hermanados están los individuos i y j , y más parentesco y consanguinidad tienen los padres de uno con el otro (Lynch y Walsh 1998). El estimador elegido para el cálculo del coeficiente de fraternidad es el descrito por Wang (2002) y también fue calculado mediante el programa SPAGEDI 1.2 (Hardy y Vekemans 2002) utilizando las frecuencias de las cohortes 1+ y 2+. Para cada muestra se obtuvo la distribución de los valores de fraternidad, así como su media.

Para conocer la significación de los coeficientes anteriores, a partir de las frecuencias alélicas de las muestras reales, se generó una simulación de 100 individuos no emparentados para cada muestra mediante el programa HYBRIDLAB (Nielsen *et al.* 2006). De esta manera, cada muestra real tenía su correspondiente muestra simulada y en cada una de estas muestras simuladas se calculó la distribución y la media de los coeficientes de consanguinidad, parentesco y fraternidad. En el cálculo de estos coeficientes se utilizaron también las frecuencias alélicas observadas en la muestra original de juveniles. Además, en el caso del coeficiente de parentesco, R , también se realizó un nuevo cálculo a partir de las frecuencias de los adultos de cada muestra. Esta última aproximación debería informar de hasta qué punto los adultos de la muestra son los progenitores de los juveniles de la misma. La diferencia entre las distribuciones de los coeficientes de consanguinidad, parentesco y fraternidad obtenidas para las muestras reales y para sus correspondientes muestras simuladas se evaluaron mediante pruebas de U-Mann-Whitney, que fueron realizadas con el paquete estadístico SPSS.

3.6.3.2. Análisis de grupos familiares.

Como ya se ha comentado, *a priori*, los individuos de las cohortes 1+ y 2+ deberían constituir grupos de hermanos completos y de medio-hermanos. En este estudio, esos individuos juveniles fueron distribuidos en grupos familiares de hermanos completos (*fullsib*, FS) y de medio hermanos (*halfsib*, HS) mediante el método de agrupación de máxima verosimilitud implementado en el programa COLONY 1.2 (Wang 2004). Este método examina todos los individuos de la muestra y los distribuye en grupos familiares. La probabilidad de una determinada configuración familiar es calculada en base a las reglas de herencia mendeliana y las frecuencias alélicas de una muestra de referencia, y es el resultado del producto de las probabilidades de cada grupo familiar de la configuración. El objetivo de este método es alcanzar una solución que maximice la probabilidad de la configuración de todo el pedigrí. Las posibles configuraciones son valoradas a partir de un procedimiento secuencial que se inicia a partir de una configuración inicial para la que se calcula su probabilidad de ocurrencia. La configuración inicial es alterada levemente por la reasignación de los individuos en

3. Material y Métodos

nuevas agrupaciones familiares. El programa comprueba la existencia de incompatibilidades mendelianas en la nueva configuración y calcula su probabilidad de ocurrencia. Si la probabilidad de la nueva configuración supera a la de la inicial, ésta será utilizada como referencia y la inicial será descartada. Este proceso se repite hasta que se alcanza una configuración final con la máxima probabilidad.

La precisión de los métodos de agrupación basados en máxima verosimilitud depende en gran medida de la fiabilidad en la obtención de los genotipos *multiloci* utilizados para inferir la configuración familiar. El programa COLONY permite incluir una tasa de error determinada en la elaboración de las particiones familiares. Al ejecutar el programa se asumió una tasa de error del 2% en la obtención de los genotipos y que es la asumida habitualmente en el trabajo con *loci* microsatélites en la trucha común (Hansen y Jensen 2005).

El poder de reconstrucción familiar también depende fuertemente de las frecuencias alélicas de referencia (Hansen y Jensen 2005), que en este caso fueron las de la propia muestra a analizar. Por ello, la estructura familiar de cada muestra real fue comparada con la obtenida en la población simulada a partir de sus propias frecuencias alélicas, con apareamiento aleatorio, y de la que se extrae una muestra con el mismo tamaño de ejemplares que la real. Las simulaciones fueron realizadas con el programa HYBRIDLAB (Nielsen *et al.* 2006) y su estructura familiar fue obtenida con el COLONY 1.2 (Wang 2004) utilizando los mismos parámetros de análisis que en el caso de las poblaciones reales. La estructura familiar de cada muestra fue caracterizada a partir del número de familias de hermanos verdaderos (*FS*) y de medio-hermanos (*HS*), sus respectivos tamaños medios (*K*) y varianzas (V_K). Las diferencias entre las distribuciones de ejemplares de las *FS* y las *HS* de la muestra real y la simulada para cada localidad fueron testadas mediante *T-tests* realizados con el paquete estadístico SPSS.

Para cada una de las localidades se calculó el índice de variabilidad del tamaño familiar (V_K/K) a partir de los parámetros que caracterizan la estructura familiar de los juveniles. Mediante pruebas de U-Mann-Whitney se analizó la existencia de diferencias entre las distribuciones de los valores de V_K/K para el conjunto de muestras reales y simuladas, así como entre los valores reales de V_K/K observados para el conjunto de muestras pertenecientes a la cuenca interna de Cataluña y las situadas en la cuenca del Ebro. Todos estos análisis fueron realizados con el paquete estadístico SPSS.

4. RESULTADOS

4.1. SELECCIÓN DE *LOCI*.

A partir de los 19 *loci* iniciales se consiguió estandarizar el análisis de 9 de ellos mediante 2 reacciones *multiplex* (Tabla 4.1). Los 10 *loci* descartados presentaron diferentes tipos de problemas que impedía su incorporación dentro del sistema de análisis diseñado. Los *loci* *OmyFgt1FUF*, *Ssa171*, *Ssa197* y *Ssa410UoS* fueron descartados por escaso éxito o calidad de la reacción de amplificación. En el *locus* *Str60INRA* no se observó polimorfismo para el conjunto de individuos amplificados, y en el caso de los *loci* *SSsp1605*, *SSsp2201* y *SSsp2216* se producían inespecificidades de amplificación que provocaban la presencia de varios picos a diferentes tamaños que dificultaban la posterior lectura automatizada de los genotipos con el analizador genético ABIPRISM 3130. Asimismo, el amplio rango de tamaño de los alelos de los *loci* *Ssa202* y *T3-13* dificultaba la lectura en las reacciones *multiplex* por problemas de solapamientos de fluorescencias con los otros *loci*.

En una *multiplex* (*multiplex A*), se incorporaron los *loci*: *SsoSI438* (Slettan *et al.* 1996), *Ssa85* (O'Reilly *et al.* 1996), *Str73INRA* (Estoup *et al.* 1993), *Str591INRA* (Presa y Guyomard 1996) y *SsHaeIII14.20* (Goodier no publicado, nº de acceso Genebank U10050). En otra *multiplex* (*multiplex B*) se incluyeron los *loci*: *Str15INRA* (Estoup *et al.* 1993), *SsoSL417* (Slettan *et al.* 1995), *Ssa408UoS* (Cairney *et al.* 2000) y

4. Resultados

SSsp2213 (Paterson *et al.* 2004). Debido a que no había solapamiento en el rango de alelos de los *loci* marcados con los mismos fluorocromos, los productos de ambas amplificaciones pudieron ser leídos conjuntamente mediante el analizador genético.

Tabla 4.1. *Loci* microsatélites seleccionados para realizar el genotipado rutinario de las muestras. Se indica la reacción *multiplex* mediante la cual cada *locus* fue amplificado; el motivo de repetición de cada *locus*; la concentración final de cada par de *primers* en la reacción, la secuencia de los *primers* utilizados para su amplificación y el tipo de fluorocromo de la posición 5' de cada *primer forward*.

	Locus	Motivo	µM	Secuencia de los primers	Fluorocromo
Multiplex A:	SsoSL438	GT	0,08	5'-GACAACACACAACCAAGGCAC-3' 5'-TTATGCTAGGTCTTTATGCATTGT-3'	NED
	Ssa85	GT	0,08	5'-AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC-3' 5'-ACCCGCTCCTCACTTAATC-3'	FAM
	Str73INRA	GT	0,12	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGTAACTAGACCTA-3'	NED
	Str591INRA	CT	0,50	5'-CTGGTGGCAGGATTTGA-3' 5'-CACTGTCTTTCGTTCTT-3'	VIC
	SsHaell14.20	GT	0,08	5'-CTGCTATCACCTTGCTCTA-3' 5'-ATCTCTTCTGGCTATTTG-3'	VIC
Multiplex B:	SSsp2213	GTTA	0,08	5'-ATGTGGAGGTCAACTAACCAGCGTG-3' 5'-CATCAATCACAGAGTGAGGCACTCG-3'	FAM
	SsoSL417	GT	0,16	5'-TTGTTCAAGTGTATATGTGTCCCAT-3' 5'-GATCTTCACTGCCACCTTATGACC-3'	NED
	Str15INRA	CT	0,08	5'-TGCAGGCAGACGGATCAGGC-3' 5'-AATCCTCTACGTAAGGGATTTGC-3'	PET
	Ssa408UoS	GACA	0,20	5'-AATGGATTACGGGTACGTTAGACA-3' 5'-CTCTTGTGCAGGTTCTTCATCTGT-3'	FAM

En el caso de la *multiplex A*, como los pares de *primers* de los *locus* preseleccionados presentaban prácticamente la misma temperatura de hibridación, se ajustó un programa de PCR simple. Este programa se inicia con un periodo de desnaturalización a 95 °C durante 10 min seguido de 35 ciclos que incluyen un periodo de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, un periodo de hibridación a 54 °C durante 1 min y un periodo de extensión a 72 °C durante 2 min. En el caso de la *multiplex B*, los pares de *primers* de los *loci* preseleccionados presentaban un amplio rango de temperatura de hibridación de *primers*, por lo que se optó por ajustar a un programa de PCR compuesto por un periodo de ciclos en caída de la temperatura de hibridación (*touchdown*), seguido de un programa simple de PCR. La PCR comienza en este caso con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguida del programa de 10 ciclos en caída *touchdown* de 1 °C de la temperatura de hibridación, y que incluye una desnaturalización a 95 °C, durante 30 s, una hibridación durante 45 s (temperatura del primer ciclo: 65 °C) y una extensión a 72 °C

durante 45 s tras el que continua el programa simple de PCR, compuesto por 25 ciclos con una desnaturalización a 95 °C durante 1 min, una hibridación a 58 °C durante 1 min y una extensión a 72 °C durante 2 min. Tanto en el caso de la *multiplex A* como en el de la *multiplex B*, se realizó una extensión final a 72 °C durante 30 min.

Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25 µl. Se utilizaron 0,05 u/µl de Amplitaq Gold ® DNA Polimerase de Applied Biosystems, 0,8 mM de dNTP Mix, 0,08 µM de cada par de *primers*, 1x de BufferGold (10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 50mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂ y 1µl de la extracción de DNA. Posteriormente se ajustaron las concentraciones de *primers* y de MgCl₂ para optimizar cada una de las reacciones *multiplex*. El porcentaje de fallos de amplificación para la batería de los 9 *loci* microsatélites no superaba el 5% y aquellas muestras que no amplificaron fueron nuevamente analizadas. Asimismo, los genotipos obtenidos a partir del genotipado *multiplex* coincidían con los genotipos observados mediante las PCR individuales de cada *locus*.

4.2. PATRONES DE DIVERSIDAD EN LOS *LOCi* SELECCIONADOS.

El número de alelos por *locus* (A) detectado en las muestras del Pirineo catalán variaba desde los 5 del *locus Str73INRA* hasta los 22 alelos detectados del *locus SsoSL417* (Tabla 4.2). Sin embargo, el valor medio de alelos por *locus* y localidad (N_a) era menor y se situaba dentro de un rango más estrecho, entre los 3,08 observado para el *locus Str73INRA* hasta los 8,25 detectados para el *locus Ssa408UoS*. La heterozigosis media esperada por localidad para cada *locus*, fluctuaba desde un valor de 0,487 en el *locus Str15INRA* hasta 0,682 en el *locus Ssa408UoS*. En el caso de la muestra del centro piscícola de Bagà, el número total de alelos por *locus* variaba entre los 4 alelos detectados para los *locus Str73INRA* y *Str591INRA* y los 13 alelos observados para el *locus Ssa408UoS*. Únicamente el *locus Str591INRA* presentaba un número menor de alelos en el centro piscícola respecto al promedio observado dentro de las poblaciones naturales. Seguramente relacionado con este hecho, sólo en el *locus Str591INRA* la heterozigosis observada en el centro piscícola fue inferior al promedio detectado en las poblaciones naturales.

En relación a las muestras estudiadas, el número medio de alelos por localidad (N_a) se situaba entre los 3,67 detectados en Vallter y los 7,11 observados en Ainet (Tabla 4.3) mientras que la heterozigosis (H_e) oscilaba entre el 0,445 de Vallter y el 0,709 de Filià. En el caso de la muestra procedente del centro piscícola de Bagà, el número medio de alelos (7,78) superaba al valor medio de alelos en las muestras naturales y también era

4. Resultados

alta la heterozigosis detectada para este grupo de individuos. Aunque ningún alelo aparecía fijado en la muestra de Bagà, determinados alelos presentaban frecuencias significativamente elevadas en la muestra del centro piscícola respecto a las observadas en las muestras naturales: *Str591*148* (0,870 vs. 0,134), *Str73*146* (0,615 vs. 0,076), *SsoSL438*105* (0,292 vs. 0,016), *SsHaelll14.20*312* (0,313 vs. 0,029), *SsHaelll14.20*324* (0,276 vs. 0,041) y *SsHaelll14.20*322* (0,193 vs. 0,011).

Tabla 4.2. Valores de diversidad de cada *locus* para el conjunto de muestras naturales y para la muestra del centro piscícola de Bagà. *Loci* analizados (*Loci*); procedencia de las muestras (*Origen*); número de ejemplares analizados (*N*); número total de alelos detectados para cada *locus* (*A*); promedio del número de alelos detectado para cada *locus* y localidad (N_a); rango de tamaño en *bp* de los alelos detectados para cada *locus* (*Rango alelos*); promedio de heterozigosis observada (H_o) y heterozigosis esperada (H_e).

<i>Loci</i>	<i>Origen</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	N_a	<i>Rango alelos</i>	H_o	H_e
<i>SsoSL438</i>	Naturales	375	6	3,83	89 - 105	0,524	0,497
	C. piscícola	96	5		97 - 105	0,667	0,689
<i>Ssa85</i>	Naturales	372	8	4,75	102 - 118	0,658	0,641
	C. piscícola	96	5		104 - 116	0,646	0,684
<i>Str73INRA</i>	Naturales	375	5	3,08	134 - 146	0,530	0,524
	C. piscícola	96	4		140 - 146	0,552	0,552
<i>SSsp2213</i>	Naturales	374	15	6,50	152 - 208	0,650	0,673
	C. piscícola	96	12		152 - 212	0,865	0,860
<i>SsoSL417</i>	Naturales	366	22	7,42	167 - 217	0,590	0,662
	C. piscícola	96	11		167 - 197	0,802	0,855
<i>Str591INRA</i>	Naturales	374	16	5,00	148 - 198	0,408	0,568
	C. piscícola	96	4		148 - 168	0,229	0,234
<i>Str15INRA</i>	Naturales	374	6	3,75	219 - 231	0,476	0,487
	C. piscícola	96	5		223 - 231	0,594	0,594
<i>Ssa408UoS</i>	Naturales	373	20	8,25	203 - 279	0,698	0,682
	C. piscícola	96	13		203 - 255	0,906	0,884
<i>SsHaelll14.20</i>	Naturales	375	14	5,08	294 - 336	0,580	0,568
	C. piscícola	96	11		298 - 338	0,729	0,781

4.3. APLICABILIDAD AL ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL.

En las poblaciones naturales resultaron significativas un total de 20 sobre 117 comparaciones entre las proporciones genotípicas observadas y las esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg. El test de Fisher para el conjunto de los 9 *loci* sugirió desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en las localidades de Nuria, Ermita, Manyanet y Conangles atribuidos en todos los casos a un déficit de heterocigotos. El programa MICRO-CHECKER indicó que algunos de estos déficits de heterocigotos podían responder a la presencia de alelos nulos en el *locus SsoSL417* para las

poblaciones de la Ermita y Conangles, y en el *locus Str591INRA* para las muestras de Nuria, Manyanet y Conangles. Sin embargo, el test de probabilidades exactas realizado para todas estas muestras y excluyendo estos *loci* en los que se ha identificado la posible presencia de alelos nulos, mantuvo las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en las muestras de Nuria y Manyanet. Los análisis con el programa STRUCTURE indicaron que estas dos poblaciones estaban constituidas por más de una unidad genética. Cuando se incorporó la muestra de Bagà al análisis con STRUCTURE de ambas poblaciones, el número de unidades genéticas detectadas continuó siendo 2 y algunos ejemplares de estas muestras se agruparon con los ejemplares del stock de Bagà.

Tabla 4.3. Variabilidad genética en las localidades (año 2004). Tamaño muestral (N); número medio de alelos por población (N_a); heterozigosidad observada (H_o) y esperada (H_e); desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (F_{IS}) y su significación en los test de probabilidad exactas para un valor de $P < 0,05$ (*); test significativos en el análisis del desequilibrio de ligamiento en % ($L-des$); número de grupos genéticamente homogéneos presentes en cada muestra (K).

Cuenca	Localidades	N	N_a	H_o	H_e	F_{IS}	$L-des$	K
Ter	Vallter	55	3,67	0,430	0,445	0,036	0	1
	Nuria	71	6,00	0,484	0,523	0,076*	8,33	2
Llobregat	Riutort	10	4,11	0,580	0,606	0,042	0	1
Pallaresa	Pla de Boet	7	4,33	0,791	0,703	-0,136	0	1
	Palomera	28	5,89	0,595	0,661	0,101	0	1
	Ermita	19	6,00	0,579	0,627	0,079*	0	1
	Ainet	38	7,11	0,645	0,675	0,045	0	1
	Manyanet	46	6,22	0,572	0,605	0,055*	0	2
	Filià	14	6,22	0,714	0,709	-0,008	2,78	1
Ribagorzana	Conangles	34	4,78	0,385	0,455	0,147*	0	1
	Cavallers	37	5,11	0,550	0,532	-0,032	2,78	1
	Nicolau	18	4,11	0,494	0,524	0,055	0	1
Muestra de Bagà		96	7,78	0,666	0,682	0,024	0	1

De los 432 test de desequilibrios gaméticos entre pares de *loci* el 1,16% resultaron significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni. En la muestra de Nuria se observaron desequilibrios entre los pares de *loci* *SSsp2213-SsHaeIII14.20*, *Str591INRA-SsHaeIII14.20* y *Ssa408UoS-SsHaeIII14.20*. También se observaron desequilibrios en la muestra de Filià (*SsoSL417-SsHaeIII14.20*) y Cavallers (*SsoSL438-Ssa408UoS*). Aunque la muestra del centro piscícola de Bagà presentaba desequilibrios de Hardy-Weinberg en 4 de los 9 *loci* analizados, ninguno de ellos se mantenía al aplicar la corrección secuencial de Bonferroni (Tabla 4.3). En esta muestra tampoco se han detectado desequilibrios gaméticos tras aplicar la corrección secuencial

4. Resultados

de Bonferroni y el programa STRUCTURE sugiere una única unidad genética en este estoc.

La falta de diferenciación significativa entre las estimas por *locus* y *multilocus* de los valores de R_{ST} antes y después del proceso de permutación de los alelos (Tabla 4.4) sugiere que la información obtenida incorporando el tamaño de los alelos resulta tan informativa como aquella que se obtiene tan sólo con el uso de su abundancia (frecuencia). Debido a que los estadísticos basados en el tamaño de los alelos suelen sufrir una mayor varianza en el muestreo (Slatkin 1995; Gaggiotti *et al.* 1999; Balloux y Goudet 2002; Hardy *et al.* 2003) los resultados anteriores nos sugieren utilizar tan sólo estimadores basados en la frecuencia de los alelos para analizar la diferenciación poblacional.

Tabla 4.4. Valores medios de R_{ST} para cada *locus* antes (R_{ST} inicial) y después (R_{ST} permutación) de la permutación de los alelos. Valor de probabilidad ($P_{obs=esp}$) del test de permutación.

<i>Locus</i>	R_{ST} inicial	R_{ST} permutación	$P_{obs=esp}$
<i>SsoSL438</i>	0,254	0,280	0,752
<i>Ssa85</i>	0,177	0,169	0,888
<i>Str73INRA</i>	0,206	0,177	0,501
<i>SSsp2213</i>	0,262	0,299	0,636
<i>SsoSL417</i>	0,286	0,322	0,848
<i>Str591INRA</i>	0,675	0,374	0,059
<i>Str15INRA</i>	0,182	0,162	0,651
<i>Ssa408UoS</i>	0,283	0,269	0,874
<i>SsHaelll14.20</i>	0,316	0,282	0,768
Estima multilocus	0,380	0,305	0,089

El test de probabilidades exactas indica diferencias entre todos los pares de muestras a excepción de Ermita y Palomera (test de Fisher, $P = 0,291$). La diferenciación total en este trabajo entre las muestras naturales (F_{ST}) es 0,292 (Tabla 4.5), aunque no todos los *loci* seleccionados contribuyen en la misma medida a la diferenciación, los *loci* *Str591INRA*, *SsoSL417UoS* y *SSsp2213* son los más implicados en la diferenciación entre las poblaciones.

Los análisis jerárquicos agrupando las muestras según el río de procedencia, indicaron también importantes componentes de diferenciación local ($F_{SC} > F_{CT}$) en la mayoría de los *loci*. Sin embargo, el *locus* *SsoSL417* presenta mayor contribución a la diferenciación entre cuencas que dentro de cuencas ($F_{SC} < F_{CT}$). Los alelos *SsoSL417* *187 y *199

tipificaban la cuenca del Ter y del Freser, los alelos *167 y *197 eran abundantes en la Noguera Pallaresa y prácticamente no se detectaban en el resto del territorio, mientras que los alelos *189 y *201 eran característicos de la cuenca de la Noguera Ribagorzana. También resulta significativa la diferenciación entre las muestras naturales y el estoc de Bagà para todos los *loci* seleccionados (Tabla 4.5). El AMOVA realizado comparando la agrupación de las muestras naturales contra la muestra del centro piscícola de Bagà muestra la clara diferenciación de este stock (Tabla 4.5). Los *loci* más implicados en esta diferenciación son el *Str73INRA* y el *Str15INRA*. Los alelos *Str73INRA**146 y *Str15INRA**227 son muy abundantes en el estoc del centro piscícola mientras que resultan raros en las poblaciones naturales del Pirineo catalán.

Tabla 4.5. Análisis AMOVA. Análisis de las muestras naturales agrupándolas por cuencas. Análisis del conjunto de muestras naturales y la muestra del centro piscícola de Bagà. Diferenciación entre muestras (F_{ST}); diferenciación entre muestras dentro de cuencas (F_{SC}); diferenciación entre cuencas (F_{CT}). * $P < 0,05$

<i>Locus</i>	<i>Comparación entre cuencas naturales</i>			<i>Pool naturales vs Bagà</i>
	F_{ST}	F_{SC}	F_{CT}	F_{ST}
<i>SsoSL438</i>	0,300*	0,250*	0,067	0,238*
<i>Ssa85</i>	0,178*	0,157*	0,025	0,116*
<i>Str73INRA</i>	0,173*	0,153*	0,024	0,365*
<i>SSsp2213</i>	0,329*	0,247*	0,110*	0,097*
<i>SsoSL417</i>	0,366*	0,190*	0,218*	0,103*
<i>Str591INRA</i>	0,415*	0,335*	0,121*	0,298*
<i>Str15INRA</i>	0,156*	0,185*	-0,036	0,349*
<i>Ssa408UoS</i>	0,293*	0,230*	0,082	0,044*
<i>SsHaelll14.20</i>	0,300*	0,358*	-0,091	0,257*
<i>Estima multilocus</i>	0,292*	0,238*	0,071*	0,206*

4.4. VARIABILIDAD GENÉTICA EN LAS POBLACIONES EN EL AÑO 2006.

Los niveles de diversidad genética observados para las muestras del 2006 mostraron diferencias entre las cuencas analizadas. Las cuencas del Ter y de la Noguera Ribagorzana presentaban los niveles más bajos tanto en el número medio de alelos por población (4,89 y 5,09 respectivamente) como en la heterozigosis (0,461 y 0,508 respectivamente), mientras que los valores más elevados se observaron para las cuencas del Llobregat y de la Noguera Pallaresa (Tabla 4.6).

Tan sólo 13 sobre 117 de las comparaciones entre las proporciones genotípicas observadas y las esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg resultaron significativas

4. Resultados

una vez aplicada la corrección secuencial de Bonferroni. El test de Fisher para el total de 9 *loci* en las muestras detectó desequilibrios en 3 de las 13 localidades analizadas, Nuria, Tor y Erta (Tabla 4.6). En Nuria, como ya se había observado para la muestra del 2004, los desequilibrios ocurrían en los *loci Str591INRA* y *Str15INRA*; en la muestra de Tor, en el *locus SsoSL417*; y en Erta, en el *locus Ssa408UoS*. El programa MICRO-CHECKER detectó un exceso significativo de homocigotos debido a la presencia de alelos nulos en los *loci Str15INRA* y *SsoSL417* en las muestras de Nuria y Tor respectivamente como posible explicación de los desequilibrios. Aunque el test de probabilidades exactas realizado para estas muestras excluyendo los *loci* con alelos nulos no resultó significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni, los análisis con el programa STRUCTURE indicaron la presencia de más de una unidad genética en ambas poblaciones y también en las de Riutort y Filià. En el caso de Nuria, Riutort y Filià, el análisis con el programa STRUCTURE detecta como algunos ejemplares de estas muestras naturales se agrupan con los ejemplares del stock de Bagà.

Tabla 4.6. Niveles de diversidad intrapoblacional (año 2006). Tamaño muestral (N); número medio de alelos por población (N_a); heterozigosidad observada (H_o) y esperada (H_e); desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (F_{IS}) y su significación en los test de probabilidad exactas para un valor de $P < 0,05$ (*); test significativos en el análisis del desequilibrio de ligamiento en % ($L-des$); número de grupos genéticamente homogéneos presentes en cada muestra (K).

Cuenca	Localidades	N	N_a	H_o	H_e	F_{IS}	$L-des$	K
Ter	Vallter	65	3,33	0,379	0,393	0,034	0	1
	Nuria	155	6,44	0,489	0,529	0,065*	13,9	2
Llobregat	Riutort	56	6,22	0,623	0,630	0,011	11,1	2
Pallaresa	Palomera	55	6,78	0,654	0,664	0,015	0	1
	Ermita	46	6,78	0,683	0,663	-0,031	0	1
	Tor	43	4,89	0,380	0,421	0,099*	2,8	2
	Ainet	71	8,00	0,665	0,666	0,002	0	1
	Manyanet	104	5,56	0,577	0,594	0,029	0	1
	Filià	46	8,44	0,744	0,769	0,033	30,5	2
Ribagorzana	Conangles	45	5,56	0,457	0,484	0,054	0	1
	Cavallers	55	5,33	0,513	0,536	0,043	11,1	1
	Nicolau	43	5,56	0,530	0,555	0,046	0	1
	Erta	72	3,89	0,431	0,455	0,054*	2,8	1
Cuenca del Ter			4,89	0,434	0,461			
Cuenca del Llobregat			6,22	0,623	0,630			
Cuenca de la Pallaresa			6,74	0,617	0,630			
Cuenca de la Ribagorzana			5,09	0,483	0,508			
MEDIA 2006			5,73	0,539	0,557			
Muestra de Bagà		96	7,78	0,666	0,682	0,024	0	1

Aunque sólo el 5,55% de los test de disequilibrios gaméticos realizados resultaron significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni, 11 de ellos se detectaron en la muestra de Filià, 5 en la muestra de Nuria, 4 en cada una de las muestras de Riutort y Cavallers.

El programa BOTTLENECK sugirió que los niveles de diversidad génica en las poblaciones de Ermita y Tor podían ser consecuencia de cuellos de botella, sin embargo estos resultados no pudieron ser confirmados mediante el método gráfico de distribución de las frecuencias alélicas de Luikart *et al.* (1998).

4.5. ESTRUCTURA POBLACIONAL EN EL AÑO 2006.

Los coeficientes de diferenciación (F_{ST}) entre los pares de muestras del año 2006 fueron significativos excepto en el caso de la comparación Ermita y Palomera (Tabla 4.7), ambas muestras localizadas en el cauce principal de la Vallferrera, afluente de la Noguera Pallaresa ($F_{ST} = 0,003$). La máxima diferenciación fue observada entre Vallter, en la cuenca del Ter y Conangles ($F_{ST} = 0,475$), de la Noguera Ribagorzana. Los valores de diferenciación variaban en cada cuenca. Así, la diferenciación entre las localidades de la cuenca del Ter o de la Noguera Ribagorzana era elevada, mientras que resultaba menor entre las muestras de la cuenca de la Noguera Pallaresa. La diferenciación genética entre las muestras naturales y la muestra del centro piscícola de Bagà resultó significativa en todos los casos, con la mayor parte de los valores de F_{ST} próximos a 0,300, siendo menores en las localidades de Riutort ($F_{ST} = 0,190$) y en Filià ($F_{ST} = 0,116$). Sorprendentemente, para cada una de las localidades naturales analizadas la máxima diferenciación siempre fue observada con otra localidad natural y no con la muestra del centro piscícola de Bagà.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) asigna el 70,7% de la diversidad genética total de la especie en el territorio a las diferencias entre los individuos dentro de cada población, tan sólo el 29,3% de la diversidad resulta de la diferenciación interpoblacional (Tabla 4.8). La mayor parte de las diferencias entre las poblaciones fue asignada a la diferenciación entre las poblaciones pertenecientes a una misma cuenca (F_{SC}), mientras que un menor porcentaje fue atribuido a las diferencias entre cuencas (F_{CT}). Para analizar con más detalle la distribución espacial de la variabilidad genética se examinó la estructura poblacional dentro de las cuencas. La distribución jerárquica de la variabilidad genética de cada cuenca se realizó siguiendo criterios hidrográficos, agrupando las muestras en función del afluente de procedencia. Este análisis no pudo realizarse para la cuenca del Llobregat, ya que estaba representada por una única muestra, ni tampoco en

4. Resultados

la cuenca del Ter debido a que las dos muestras provienen cada una de un afluente diferente. Las muestras de la Noguera Pallaresa fueron agrupadas en base a su localización en los ríos Noguera de la Vallferrera, Noguera del Cardós y Flamisel, mientras que las de la Noguera Ribagorzana según su ubicación en la propia Noguera Ribagorzana, en el río Noguera de Tor y en el río Erta. En ambos casos, los AMOVAs indican una significativa diferenciación de las poblaciones dentro de los afluentes (Tabla 4.8) pero la diferenciación entre los afluentes (F_{CT}) de la Noguera Ribagorzana (13,6%) era notablemente superior a la detectada entre los de la Noguera Pallaresa (3,9%).

Tabla 4.7. Diferenciación genética y distancia hidrográfica. Bajo la diagonal, están representadas las estimas de los coeficientes de diferenciación F_{ST} (Weir y Cockerham 1984) entre las muestras del año 2006. Sobre la diagonal, se indica la distancia hidrográfica en Km existente entre los pares de muestras analizadas. *Diferenciación significativa entre muestras (5%).

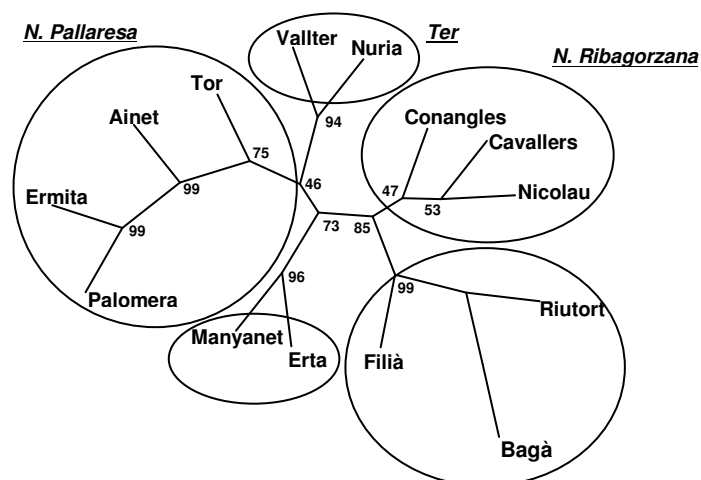
Localidades	Ter		Llobregat	Noguera Pallaresa						Noguera Ribagorzana			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Vallter	0,000	59,6	474,6	811,7	810,6	813,5	807,1	774,5	784,9	792,0	789,5	860,7	765,9
2. Nuria	0,354*	0,000	456,8	794,0	792,9	795,8	789,4	756,8	767,1	774,2	771,8	770,3	748,1
3. Riutort	0,391*	0,353*	0,000	644,0	642,9	645,8	639,4	606,8	617,1	624,2	621,8	620,3	598,1
4. Palomera	0,298*	0,217*	0,260*	0,000	1,12	6,9	19,4	56,0	91,6	274,4	272,0	270,4	248,3
5. Ermita	0,323*	0,199*	0,264*	0,003	0,000	5,8	18,3	80,1	90,5	273,3	270,9	269,3	247,2
6. Tor	0,419*	0,308*	0,397*	0,192*	0,175*	0,000	21,2	83,0	93,4	276,2	273,8	272,2	250,1
7. Ainet	0,335*	0,206*	0,259*	0,032*	0,025*	0,183*	0,000	76,6	87,0	269,8	267,4	265,8	234,7
8. Manyanet	0,379*	0,291*	0,305*	0,190*	0,187*	0,329*	0,171*	0,000	35,4	237,2	234,8	233,3	211,1
9. Filià	0,348*	0,261*	0,173*	0,121*	0,122*	0,266*	0,108*	0,158*	0,000	247,6	245,2	243,6	221,5
10. Conangles	0,475*	0,378*	0,364*	0,294*	0,281*	0,425*	0,253*	0,285*	0,247*	0,000	50,1	48,5	26,1
11. Cavallers	0,379*	0,329*	0,329*	0,193*	0,202*	0,273*	0,226*	0,312*	0,204*	0,334*	0,000	9,8	24,0
12. Nicolau	0,437*	0,319*	0,344*	0,203*	0,198*	0,392*	0,221*	0,250*	0,188*	0,331*	0,275*	0,000	22,4
13. Erta	0,421*	0,409*	0,288*	0,299*	0,324*	0,463*	0,310*	0,186*	0,264*	0,454*	0,405*	0,390*	0,000
14. Bagà	0,426*	0,366*	0,190*	0,275*	0,278*	0,390*	0,261*	0,309*	0,116*	0,317*	0,297*	0,298*	0,377*

Tabla 4.8. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) realizados para la totalidad del territorio y para las cuencas del Ter, la Noguera Pallaresa y la Noguera Ribagorzana de manera independiente. Índices de Fijación según Weir y Cockerham (1984) y porcentaje respecto a la diversidad total (%). * $P < 0,05$

	F_{ST}	%	F_{SC}	%	F_{CT}	%
Todo el territorio	0,293*	29,3	0,261*	25,1	0,042*	4,2
Ter	0,354*	35,4	-	-	-	-
Pallaresa	0,167*	16,7	0,133*	12,8	0,039	3,9
Ribagorzana	0,388*	38,8	0,292*	25,2	0,136	13,6

Las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán deducidas a partir del dendrograma de Neighbor-Joining (Fig. 4.1) y del escalado multidimensional (Fig. 4.2) fueron parecidas. Ambos análisis sugieren 5 grupos poblacionales que, con la excepción del grupo que reúne a las poblaciones de Manyanet en la N. Pallaresa y Erta en la N. Ribagorzana, se corresponden con las cuencas hidrográficas estudiadas y separan además aquellas poblaciones más afectadas por las repoblaciones (Filià y Riutort). Estos grupos recibieron un elevado soporte de *bootstrap*, a excepción de las localidades de la N. Ribagorzana, aunque su clara distinción por el MDS permite considerarlas como una entidad propia y diferenciada. Los métodos bayesianos del programa STRUCTURE sugieren resultados similares a los anteriores (Fig. 4.3). Las muestras del Pirineo se estructuraron básicamente en los 5 grupos observados (Fig. 4.3A). Así, las muestras de Ter, N. Pallaresa y N. Ribagorzana formaban un grupo propio de cada cuenca y persiste la agrupación entre las muestras de Manyanet y Erta pertenecientes a cuencas diferentes. La principal diferencia respecto a lo observado en los análisis anteriores radica en la asociación de la muestra de Conangles, perteneciente a la cuenca de la Noguera Ribagorzana, con las localidades más introgradadas, Riutort y Filià. Si en el análisis se incorpora la muestra de Bagà se obtienen únicamente 3 grupos (Fig. 4.3B). El primer grupo tipifica las muestras del Ter y las muestras Manyanet y Erta, el segundo es característico de las muestras de la N. Pallaresa y el tercero abunda en las muestras de la N. Ribagorzana, la del centro piscícola de Bagà y en aquellas localidades con mayor incidencia de repoblación (Filià y Riutort).

Figura 4.1. Relaciones genéticas entre las localidades analizadas obtenidas mediante el algoritmo Neighbor-Joining (NJ) a partir de la matriz de distancia genética D_A .



4. Resultados

Figura 4.2. Análisis de escalado multidimensional (MDS) a partir de la matriz de distancia genética D_A .

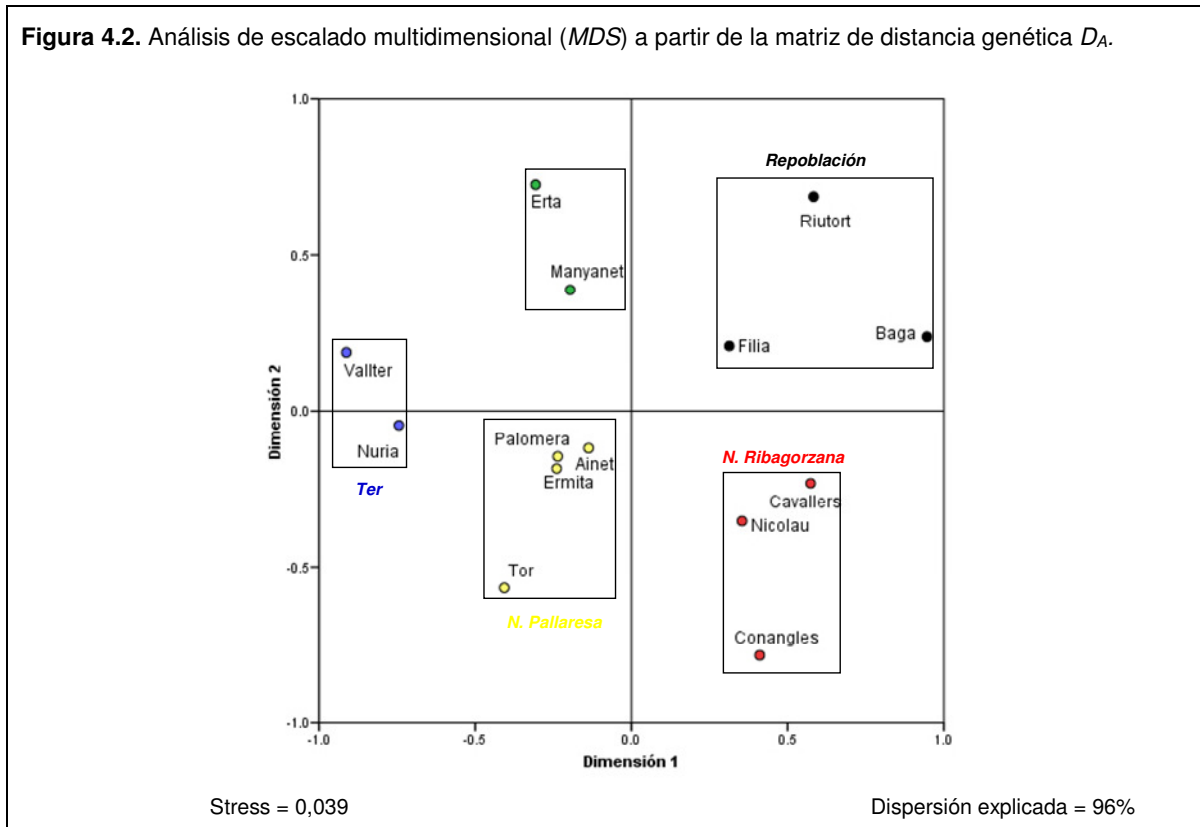


Figura 4.3. Agrupación de las diferentes localidades mediante el programa STRUCTURE. (A) Agrupación de las muestras naturales en 5 grupos: GRUPO 1 formado por las muestras del Ter; GRUPO 2 que incluye las muestras Manyanet y Erta; GRUPO 3 agrupa muestras de la Noguera Pallaresa; GRUPO 4 agrupa muestras de la Noguera Ribagorzana; GRUPO 5 formado por las muestras de Fília, Riutort y Conangles. (B) Agrupación de las muestras naturales y Bagà en 3 grupos: los GRUPOS 1 y 2 de carácter natural y el GRUPO 3 de influencia de repoblación.

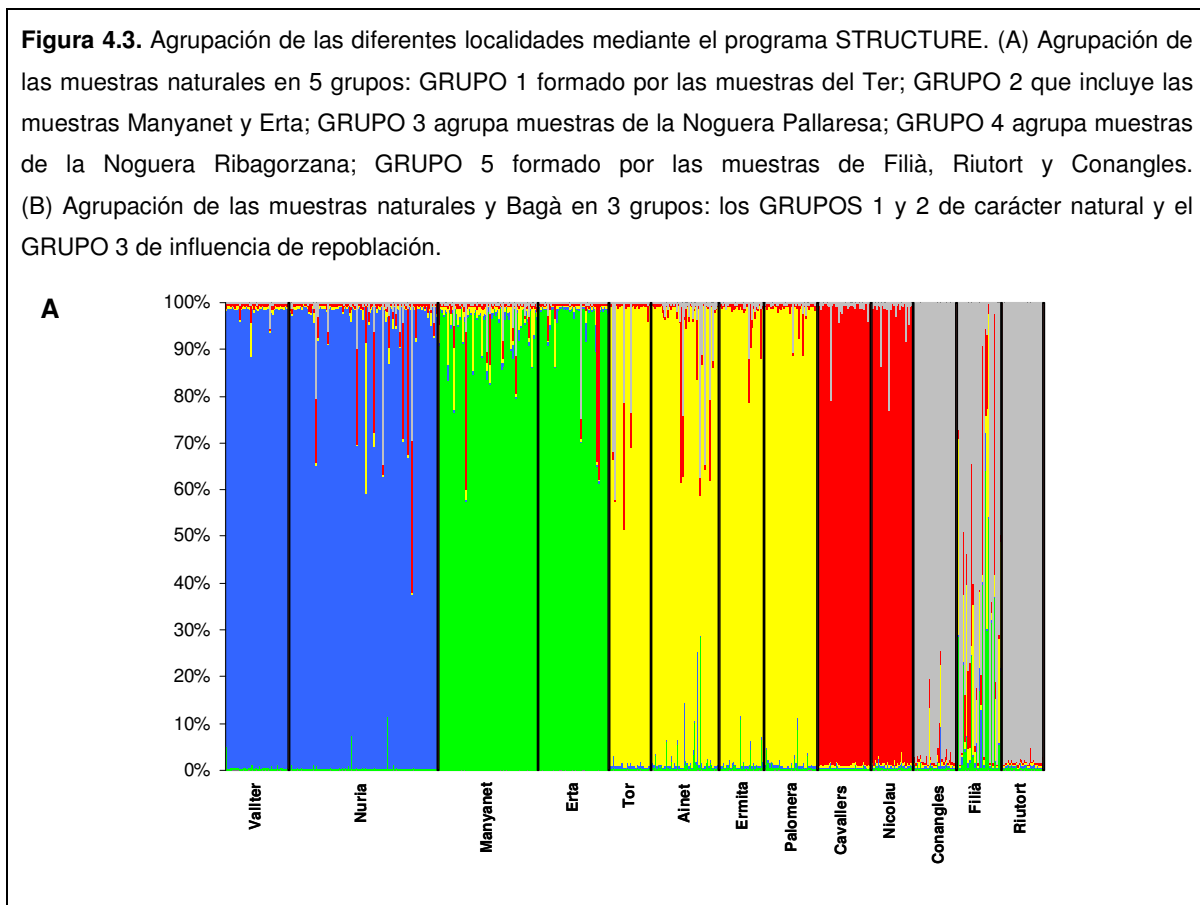
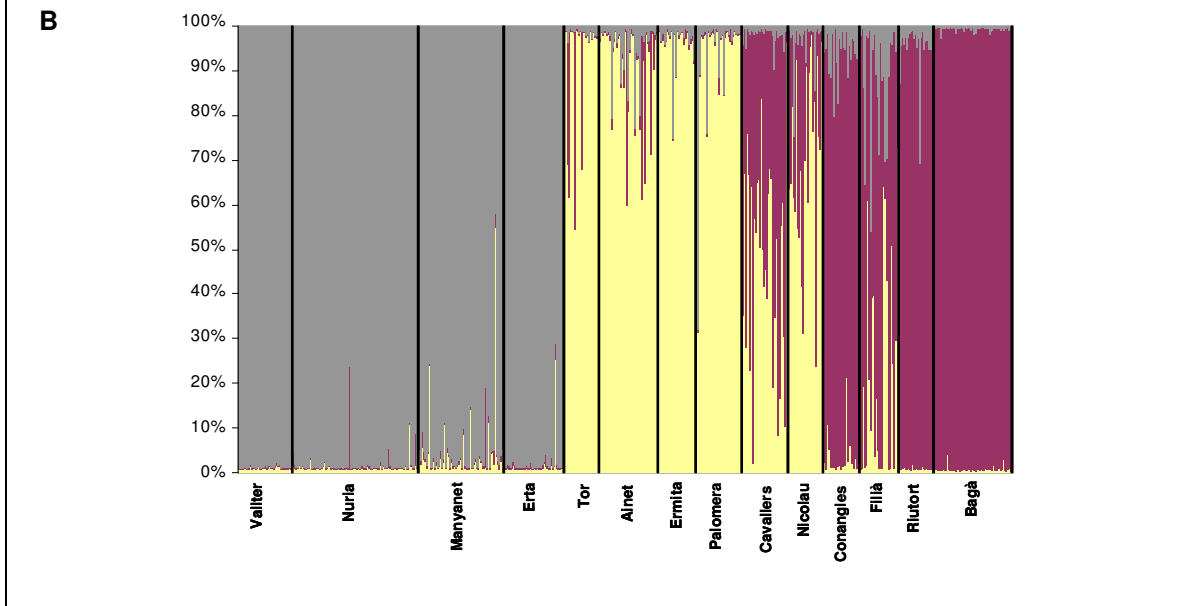


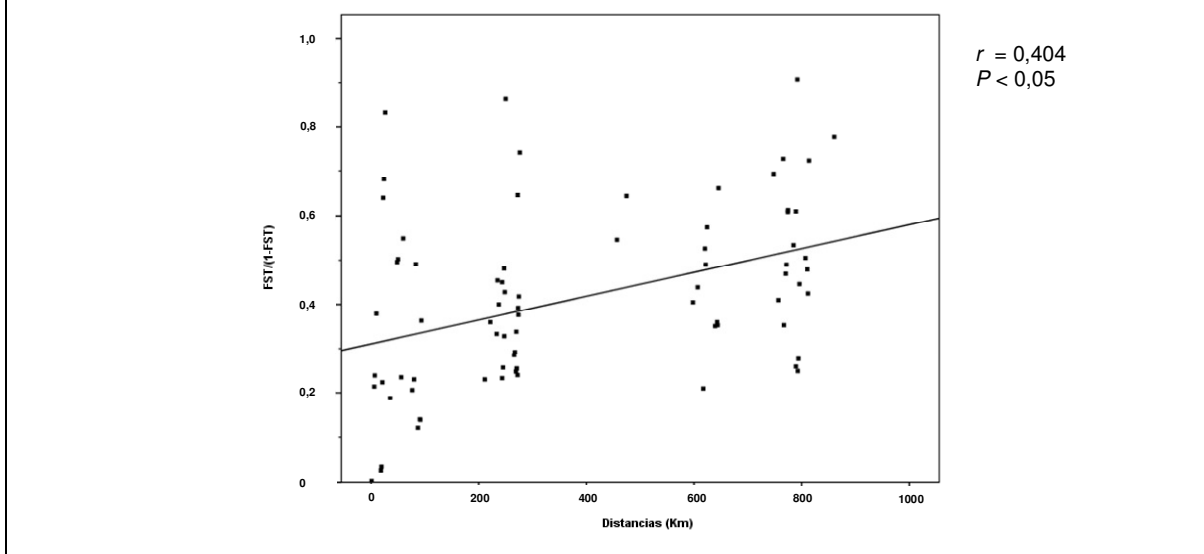
Figura 4.3. Continuación.



4.6. FLUJO GÉNICO.

Para el conjunto del territorio se detectó una baja aunque significativa correlación ($r = 0,404$, $P < 0,05$) entre la distancia genética [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] y la hidrográfica (Km) entre los pares de muestras (Fig. 4.4). Sin embargo, no se encontraron evidencias del mismo patrón al analizar por separado las cuencas de la N. Pallaresa ($r = 0,428$, $P = 0,089$) y la Ribagorzana ($r = -0,087$, $P = 0,574$) en las que se contaba con suficiente número de localidades muestreadas.

Figura 4.4. Aislamiento por distancia (*IBD*) para las localidades de trucha común. Los puntos representan los pares de valores de distancia genética [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] y hidrográfica (Km) entre localidades.



4. Resultados

Las tasas de migración actual entre las localidades dentro de las cuencas del Pirineo catalán fueron obtenidas mediante el programa BAYESASS 1.3. Según los autores del programa, la precisión de las estimas de migración depende en gran medida de que exista una mínima diferenciación genética entre las muestras analizadas ($F_{ST} > 0,02$). Los valores de diferenciación observados entre las muestras del Pirineo superaban dicho valor de referencia, con la excepción de la comparación entre las muestras de Palomera y Ermita y por ello, se optó por agruparlas. Las tasas de migración fueron por lo general bajas ($m = 0,001 - 0,002$) y no muy diferentes al valor calculado respecto a la muestra externa (Fig. 4.5). La única excepción a este patrón se observa entre las muestras de Ermita-Palomera situadas en el río N. Vallferrera y la muestra de Ainet del río N. de Cardós (Fig. 4.5C). Este intercambio era asimétrico y ocurría mayoritariamente desde la muestra Ermita-Palomera hacia la muestra de Ainet ($m = 0,094$), mientras que el desplazamiento en la dirección contraria ($m = 0,004$) resultaba prácticamente no significativo. La mayor incidencia debida al aporte de ejemplares de repoblación desde el centro piscícola de Bagà se observa en las muestras de Riutort ($m = 0,010$, Fig. 4.5B) y Filià ($m = 0,076$, Fig. 4.5C). En el resto de localidades las estimas de la tasa de flujo desde el centro piscícola son prácticamente nulas.

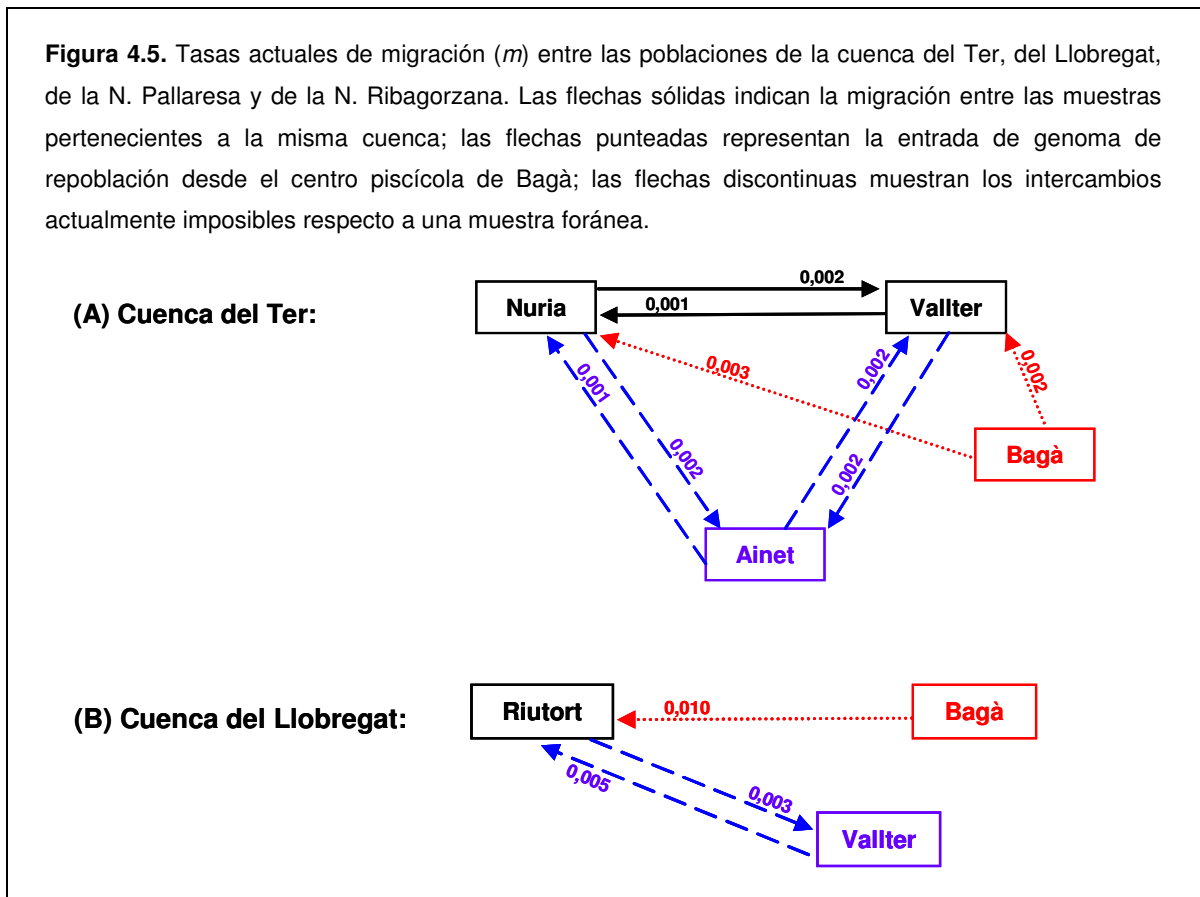
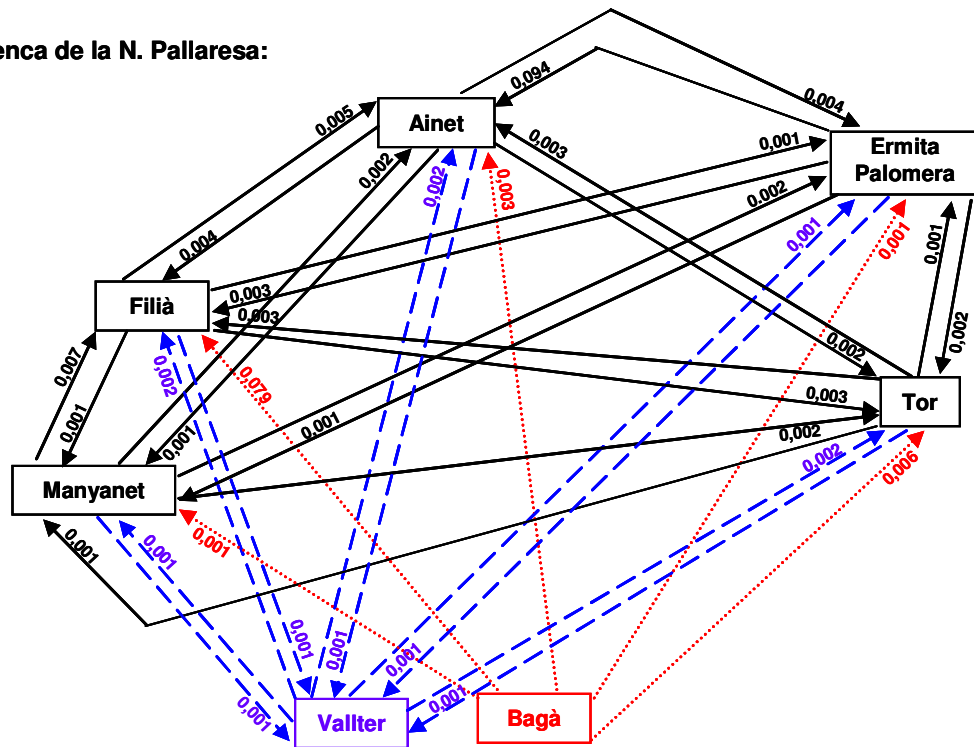
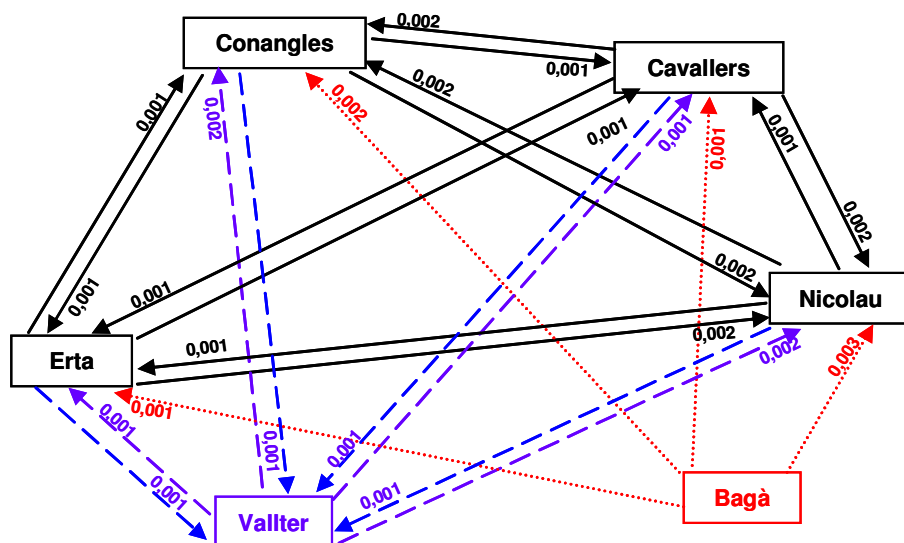


Figura 4.5. Continuación.

(C) Cuenca de la N. Pallaresa:



(D) Cuenca de la N. Ribagorzana:



4. Resultados

4.7. ESTABILIDAD TEMPORAL EN LOS PATRONES DE DIVERSIDAD Y DE LA INCIDENCIA DE LA REPOBLACIÓN.

Los AMOVAS jerárquicos espacio-temporales indicaron la escasa incidencia de los cambios temporales en la estructura poblacional de la trucha común dentro de la región analizada (Tabla 4.9). Sin embargo también mostraron como las fluctuaciones temporales pueden ser importantes en algunas localidades.

Tabla 4.9. Fluctuaciones temporales ocurridas a escala territorial y local en las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán según los AMOVAs. * $P < 0,05$

Estructura predefinida

Fluctuación temporal a nivel territorial (territorio - año): $F_{TA} = -0,030$

Fluctuación temporal a nivel local (año - localidad): $F_{AL} = 0,283^*$

En el global del territorio se observaron sólo ligeras fluctuaciones en el patrón de diferenciación entre las poblaciones en los tres años de muestreo (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Evolución del patrón de diferenciación poblacional en base a los AMOVAs realizados en los años 1993, 2004 y 2006. * $P < 0,05$

Año	F_{ST}	%	F_{SC}	%	F_{CT}	%
1993	0,322*	32,1	0,301*	29,1	0,030	3,0
2004	0,290*	29,0	0,238*	22,2	0,068*	6,8
2006	0,293*	29,3	0,261*	25,1	0,042*	4,2

La Tabla 4.11 resume las fluctuaciones temporales ocurridas en cada una de las muestras analizadas durante el periodo 1993 - 2006. Únicamente las localidades de Ainet y Manyanet pertenecientes a la cuenca de la Noguera Pallaresa, presentaron estabilidad temporal a lo largo de todo el periodo. Los cambios temporales más importantes han sido detectados en Pla de Boet ($F_{ST} = 0,143$). Aunque sólo la población de Filià parecía sufrir cambios genéticos sustanciales a corto plazo, también se observaron cambios significativos de menor magnitud en las localidades de Vallter, Manyanet y Cavallers en el

periodo 2004 - 2006. Los cambios en Manyanet parecen restituir la población original después de la presencia de repoblación detectada en el 2004.

Tabla 4.11. Coeficientes de diferenciación (F_{ST}) asociados a los cambios genéticos temporales ocurridos dentro de cada localidad durante el periodo analizado. * $P < 0,05$

LOCALIDADES	PERIODOS		
	1993-2006	1993-2004	2004-2006
Vallter	0,030 *	0,018 *	0,013 *
Nuria	0,046 *	0,032 *	0,004
Riutort ^a	0,046 *	0,099 *	0,012
Pla de Boet	-	0,143 *	-
Palomera	-	-	0,005
Ermita	-	-	0,000
Tor	0,023 *	-	-
Ainet	0,004	0,007	0,000
Manyanet	0,007	0,009	0,014 *
Filià	0,054 *	0,048 *	0,083 *
Conangles	0,023 *	0,034 *	0,000
Cavallers	0,027 *	0,026 *	0,009 *
Nicolau	0,015 *	0,008	0,012

^a Riutort periodo 1990 - 2006.

El análisis de los niveles de introgresión en el Pirineo catalán mostró como una parte sustancial de las muestras analizadas ya estaban afectadas por las repoblaciones en las primeras capturas del 1993 y que sólo Vallter parece haber conservado un patrimonio genético nativo durante todo el periodo analizado (Fig. 4.6). Los coeficientes de introgresión individuales sugieren la presencia de ejemplares de repoblación (valores $1-q$ próximos a 0) liberados en momentos próximos a la época de muestreo en las localidades analizadas en 1993 en Riutort, Pla de Boet y Sant Nicolau. Asimismo, los valores de introgresión individuales sugieren que Filià (cuena de la Noguera Pallaresa) y Cavallers (cuena de la Noguera Ribagorzana), eran poblaciones muy introgresadas ya en ese momento. En Manyanet y Nuria, las gráficas de introgresión individual permiten observar ejemplares repoblados en la muestra del año 2004.

4. Resultados

Figura 4.6. Evolución del genoma nativo individual ($1-q$) en las localidades analizadas. El eje X representa el número de ejemplares analizados en cada muestra; en el eje Y, está representada la proporción de genoma nativo ($1-q$) de cada ejemplar; las barras verticales indican los intervalos de confianza 90% para cada uno de los ejemplares. Valor medio de introgresión de genoma de repoblación (q) en cada muestra.

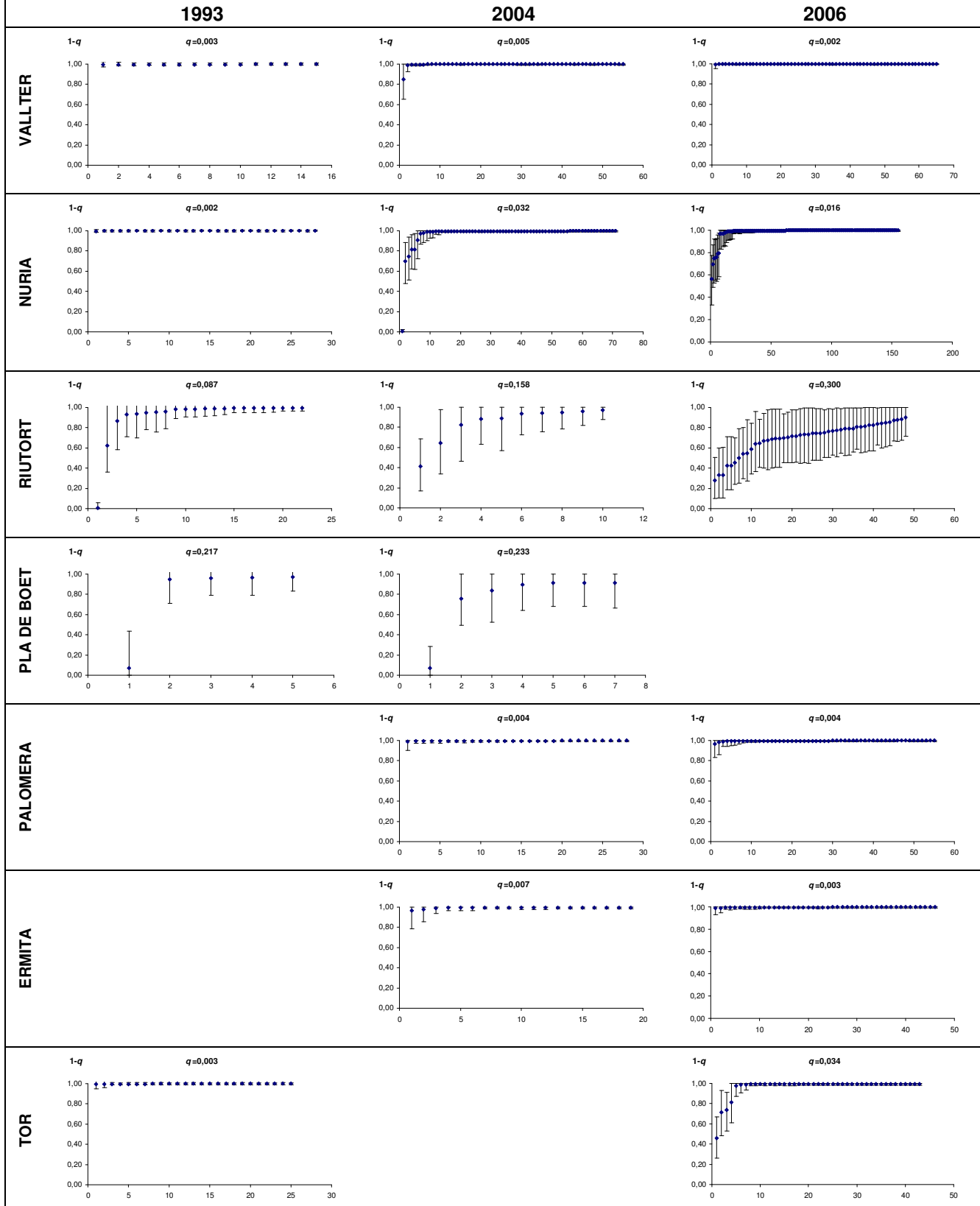
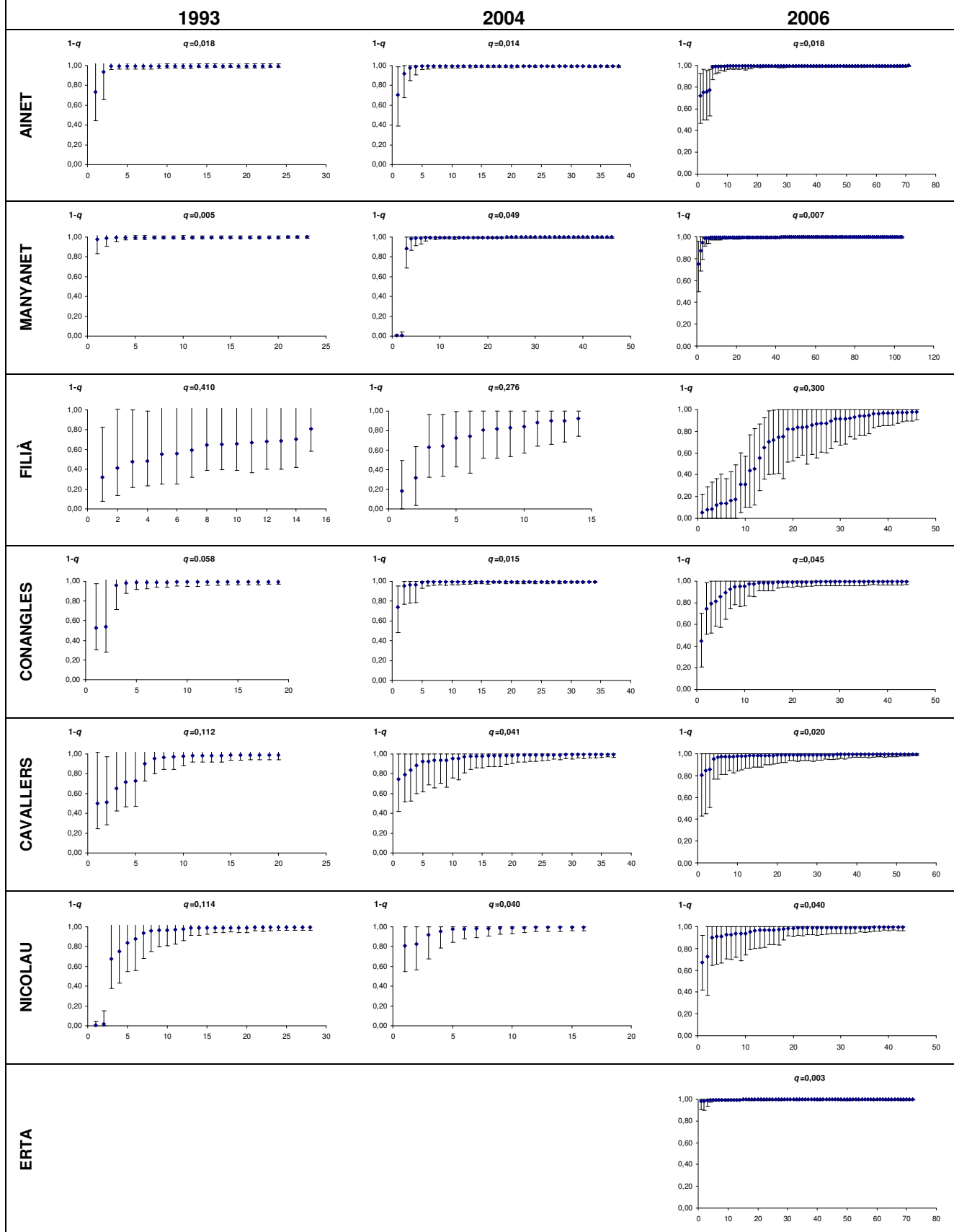


Figura 4.6. Continuación.



4. Resultados

El valor medio de introgresión de genoma de repoblación (q) observado dentro del territorio en las muestras del 2006 se situó en torno al 6% (Tabla 4.12). Aparentemente, el grado de introgresión promedio de las poblaciones en la zona de estudio ha disminuido con el tiempo desde el 0,094 en 1993 al 0,061 en el 2006. Sin embargo, la mayoría de las localidades analizadas no parecen haber experimentado cambios notorios de la tasa de introgresión durante el periodo 1993 - 2006 y en dos de ellas (Nuria y Riutort) se observa un aumento significativo del genoma de repoblación. Además, en tres localidades (Riutort, Pla de Boet y Filià) se detectaron niveles de introgresión superiores al 20 %.

Tabla 4.12. Niveles medios de introgresión de cada muestra (q) en el periodo analizado y variaciones temporales en los mismos.

LOCALIDADES	1993	2004	2006
Vallter	0,003	0,005	0,002
Nuria	0,002	0,032	0,016*
Riutort ^a	0,087	0,158	0,300*†
Pla de Boet ^b	0,217	0,233	-
Palomera	-	0,004	0,004
Ermita	-	0,007	0,003
Tor	0,003	-	0,034
Ainet	0,018	0,014	0,018
Manyanet	0,005	0,049	0,007
Filià	0,410	0,276	0,300
Conangles	0,058	0,015	0,045
Cavallers	0,112	0,041	0,020*
Nicolau	0,114	0,040	0,040
PROMEDIO	0,094	0,073	0,061

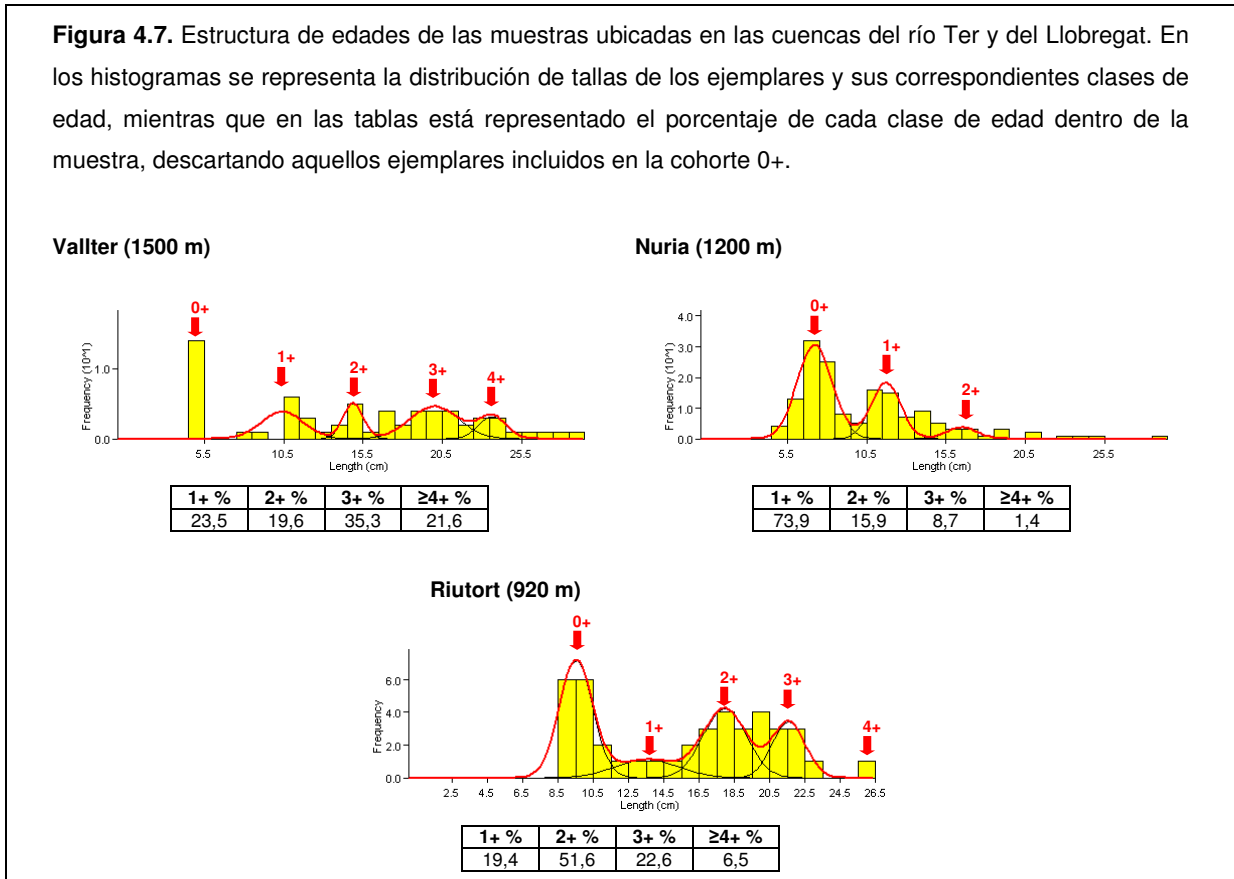
† Cambio significativo respecto a la muestra precedente ($P < 0,05$).

* Cambio significativo durante el periodo 1993-2006 ($P < 0,05$).

4.8. ESTRUCTURA DE EDADES.

La pesca eléctrica utilizada para llevar a cabo este muestreo es una técnica selectiva debido a que los ejemplares de menor tamaño, correspondientes a la clase 0+, pueden resultar difíciles de muestrear (Borgstrom y Skaala 1993). Además, la abundancia relativa de la clase 0+ puede estar determinada por las condiciones del sitio de muestreo. Por ello y para facilitar la comparación de la representación de las clases de edad entre las diferentes localidades, los ejemplares de la clase 0+ fueron excluidos del cómputo de abundancia relativa dentro de las muestras. Esta cohorte 0+ está representada sin embargo en la distribución de tamaños de las muestras.

La asignación de clases de edad a cada rango de tamaño en las muestras del río Ter fue facilitada por la relación entre la longitud y la lectura de escamas de los ejemplares de la localidad de Carboners analizada en Rocaspana (2006) y situada en el cauce principal del Ter, a escasa distancia aguas abajo de la localidad de Vallter. En la muestra de Vallter la distribución de las frecuencias de tallas permitió reconocer 5 grupos de edad (Fig. 4.7), desde la cohorte 0+ a la 4+, representadas en proporciones parecidas, aunque la clase 3+ resultó ligeramente más abundante que las demás. Por el contrario, en la muestra de Nuria prácticamente sólo se detectaron ejemplares de las clases de edad 0+, 1+ y 2+. El grupo de ejemplares de mayor tamaño no pudo ser asignado a una cohorte determinada debido a su escasa representación en la muestra y a las diferencias de tamaño entre los ejemplares. La talla media de las clases 0+, 1+ y 2+ de la muestra de Nuria fue superior a la observada para las mismas cohortes en la muestra de Vallter.



La muestra de Riutort en la cuenca del Llobregat fue la capturada más tardíamente (a principios de octubre) y es la que se situó a menor altitud dentro de todo el conjunto de muestras analizadas (Fig. 4.7). Lamentablemente, el trabajo de Rocaspana (2006) no incluye muestras pertenecientes a esta cuenca, por lo que no se pudo disponer de una

4. Resultados

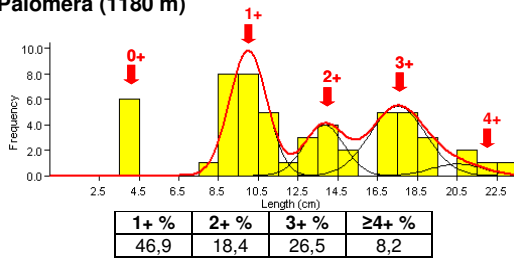
referencia para asignar las clases de edad observadas. Sin embargo, la distribución de tallas observada dentro de esta muestra no se aleja de la detectada en las dos anteriores, lo que permitió deducir la estructura de edades considerando que, como esta localidad está a una cota de altitud inferior y la captura fue más tardía, se espera un mayor tamaño de los peces (Hunter *et al.* 1991; Heggenes *et al.* 1993). Así, los ejemplares entre los 8,5 y los 10,5 cm se asignaron a la clase 0+. El mayor tamaño medio de la cohorte respecto a lo observado en las muestras de la cuenca del Ter también sería válido para definir las cohortes 1+, 2+ y 3+. Además de estas 4 cohortes, en la muestra también se detectó un ejemplar de gran tamaño, que probablemente perteneciese a la clase 4+ o superior.

Las localidades de la cuenca de la Noguera Pallaresa fueron muestreadas a finales del mes de julio con apenas un día de diferencia entre ellas. Para facilitar la asignación de las diferentes cohortes de las muestras de la Noguera Pallaresa, se seleccionó como referencia la muestra de Vallferrera del trabajo de Rocaspana (2006). Esta muestra, situada en el cauce principal del río Vallferrera, se localizaba a 1395 m de altitud, sobre el pueblo de Àreu, aguas arriba de las localidades de Palomera y Ermita analizadas en el presente trabajo. Aunque en un principio se consideró utilizar la muestra de Flamisell del trabajo de Rocaspana (2006) como de referencia para las muestras de este río (Manyanet y Filià), los problemas que estos autores tuvieron por el escaso número de ejemplares capturados para el retrocálculo de las tallas y la dificultad de precisar los *annuli* de las muestras, llevó a utilizar como única referencia para todas nuestras localidades de la Noguera Pallaresa la anteriormente citada muestra de Vallferrera de Rocaspana (2006).

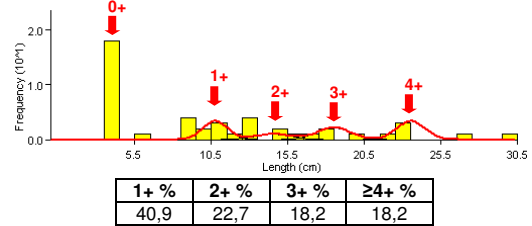
En general, en las localidades de la Noguera Pallaresa, se detectaron ejemplares entre las clases de edad 0+ a 4+ (Fig. 4.8). En algunos casos, como en Ermita y Ainet, se intuye incluso la presencia de cohortes superiores dada la presencia de ejemplares que superaron los 30 cm de longitud. Asimismo, en todas las muestras salvo en Filià, la clase 1+ fue la más abundante y destacó el elevado porcentaje de esta cohorte en la muestra de Manyanet. En este sentido, en las muestras de Palomera y Ainet la clase de edad 2+ fue menos abundante que la 3+, lo que podría sugerir problemas puntuales de reclutamiento, que también podrían explicar los resultados obtenidos en Filià respecto a la cohorte 1+. Otra posible explicación a este hecho podría estar relacionada con una situación de dominancia de los ejemplares de mayor talla (3+ y 4+) sobre los ejemplares más jóvenes y que por tanto podrían ser desplazados del tramo.

Figura 4.8. Estructura de edades de las muestras pertenecientes a las cuencas de la Noguera Pallaresa (Palomera, Ermita, Tor, Ainet, Manyanet y Filià) y Noguera Ribagorzana (Conangles, Cavallers, Nicolau, Erta). Histogramas con la distribución de tamaños de los ejemplares y sus correspondientes clases de edad y tablas con la representación de cada clase de edad dentro de la muestra, excluyendo a los ejemplares pertenecientes a la cohorte 0+.

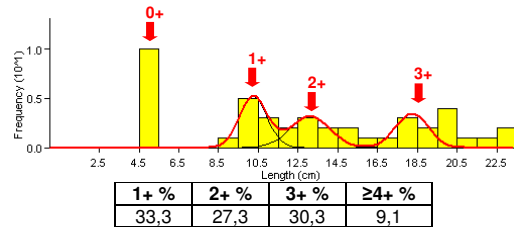
Palomera (1180 m)



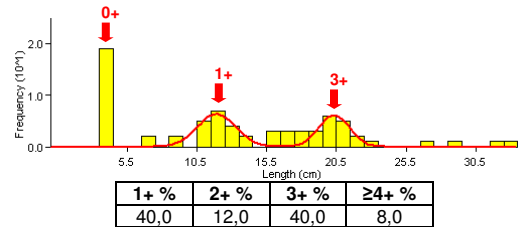
Ermita (1120 m)



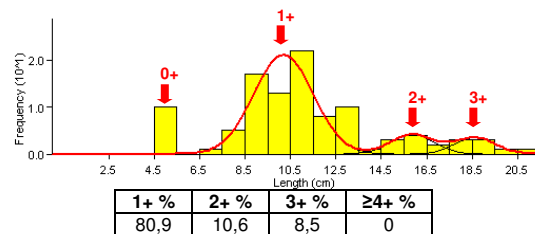
Tor (1460 m)



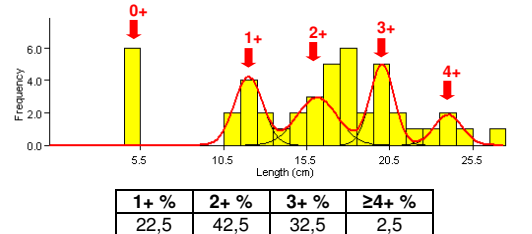
Ainet (940 m)



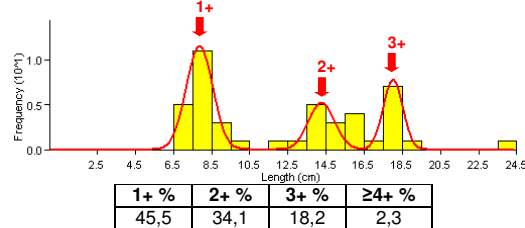
Manyanet (1038 m)



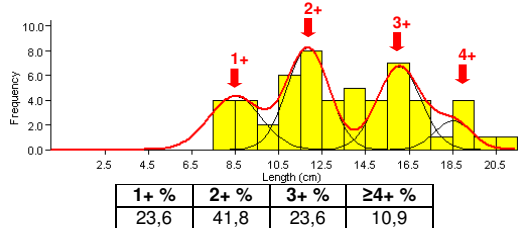
Filià (1928 m)



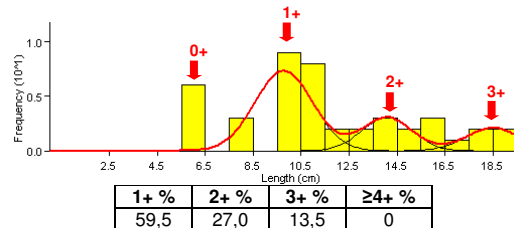
Conangles (1620 m)



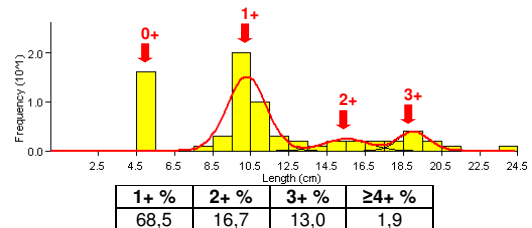
Cavallers (1780 m)



Nicolau (1500 m)



Erta (1540 m)



4. Resultados

Al igual que la Noguera Pallaresa, la cuenca de la Noguera Ribagorzana también fue muestreada a finales del mes de julio. Todas las capturas se realizaron en puntos a una altitud superior a los 1500 m. Como en el trabajo de Rocaspana (2006) la única muestra perteneciente a esta cuenca la constituía un escaso número de ejemplares y se localizaba a 1105 m de altitud, se decidió usar para fines comparativos la muestra de Varradós (1595 m) perteneciente a la cuenca del Garona, ya que a estas altitudes, cabe esperar que la baja temperatura del agua afecte notablemente a la ralentización del crecimiento de las truchas (Rocaspana 2006).

En las muestras de la cuenca situadas a menor altitud (Nicolau y Erta) fueron detectados individuos de pequeño tamaño (4,5 - 6,5 cm de LF) que se asignaron a la clase 0+. Siguiendo esta asignación, la clase 1+ tendría un tamaño modal de unos 10,5 cm. Estas interpretaciones llevaron a sugerir la ausencia de la clase 0+ en las muestras a mayor altitud (Conangles y Cavallers) y la primera moda, en torno a los 8,5 cm fue asignada a ejemplares de la clase 1+. A partir de estas interpretaciones, las cohortes detectadas en todas estas muestras son básicamente las 1+, 2+ y 3+, aunque en Cavallers se observó la presencia de ejemplares mayores (4+) y éstos también se intuían en las muestras de Erta y Conangles. En general, la cohorte 1+ fue la más abundante en todas las muestras a excepción de Cavallers, donde se observó una mayor representación de ejemplares con tallas grandes ($\geq 2+$).

4.9. TAMAÑOS EFECTIVOS.

Las estimas de los tamaños efectivos (N_e) obtenidas mediante las diferentes alternativas del método temporal no resultaron homogéneas ni dentro del territorio ni entre los diferentes métodos (Tabla 4.13). Los valores se sitúan en el rango comprendido entre los 8,3 (Pla de Boet, método de Nei y Tajima) y los 507,6 (Tor, método TM3). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el rango de valores obtenidos a partir de los diferentes estimadores para cada población según las pruebas de U-Mann-Whitney. Este resultado sugiere que ningún método en particular presenta las mayores o menores estimas de N_e y que las pautas interpoblacionales deducibles son en general válidas independientemente de la metodología aplicada. En este sentido, Pla de Boet es siempre la población con un tamaño efectivo más bajo, resultado concordante con la baja abundancia de ejemplares en los diferentes años de captura y que llevaron a no muestrear la localidad en el año 2006. En general, las poblaciones en las cuencas interiores de Cataluña (ríos Ter y Llobregat) presentan tamaños efectivos más bajos que los observados en las muestras de la Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana, con excepción de la población de Filià.

Tabla 4.13. Tamaños efectivos (método temporal) de cada una de las muestras analizadas en el Pirineo catalán obtenidos a partir de diferentes estimadores: Waples 1989 (W_{89}), Nei y Tajima 1981 (NyT), Berthier *et al.* 2002 (TM3) y Wang 2001 (W_{01}) y sus intervalos de confianza (CI) al 95%.

	W_{89}		NyT	TM3		W_{01}	
	N_e	CI (95%)	N_e	N_e	CI (95%)	N_e	CI (95%)
<i>Vallter</i>	50,1	(16,5; 271,3)	44,0	34,8	(19,2; 72,7)	60,6	(29,1; 188,7)
<i>Nuria</i>	59,0	(31,3; 115,0)	43,4	92,8	(68,1; 157,2)	238,9	(29,4; 697,9)
<i>Riutort</i>	33,0	(19,5; 55,0)	17,4	63,8	(44,9; 78,1)	47,8	(34,4; 68,3)
<i>Pla de Boet</i>	9,0	(4,2; 21,8)	8,3	17,0	(10,4; 22,9)	21,0	(10,9; 65,2)
<i>Tor</i>	136,0	(44,1; ∞)	42,0	507,6	(141,6; 1000)	132,0	(64,9; 543,6)
<i>Ainet</i>	200,6	(75,5; ∞)	187,5	96,5	(60,6; 223,3)	226,2	(108,5; 1000)
<i>Manyanet</i>	100,6	(40,0; 459,7)	100,0	79,9	(49,5; 124,3)	222,9	(94,7; 1000)
<i>Filia</i>	28,1	(16,9; 47,6)	26,4	36,6	(24,3; 47,4)	46,0	(32,0; 71,4)
<i>Conangles</i>	85,0	(34,1; 462,4)	187,5	104,4	(51,5; 167,5)	118,0	(60,7; 408,6)
<i>Cavallers</i>	53,2	(24,9; 133,1)	49,1	175,3	(26,3; 550,2)	148,0	(66,0; 1000)
<i>Nicolau</i>	136,8	(51,7; 1433)	100,3	85,2	(56,2; 178,1)	91,4	(51,4; 217,6)

Tabla 4.14. Tamaños efectivos por generación (N_e) y número efectivos de reproductores (N_b) que dieron lugar a los juveniles de las localidades del 2006 obtenidas mediante el método del desequilibrio de ligamiento, corregidas para el tamaño muestral según Waples (2006) y sus intervalos de confianza (CI) al 95%.

MUESTRAS	N	N_e	CI (95%)	N	N_b	CI (95%)
<i>Vallter</i>	65	53,7	(27,7; 154,1)	22	14,6	(6,2; 51,2)
<i>Nuria</i>	155	49,5	(38,0; 65,4)	68	12,4	(9,4; 16,0)
<i>Riutort</i>	43	29,9	(21,9; 42,9)	22	26,5	(18,6; 40,3)
<i>Palomera</i>	55	485,1	(118,0; ∞)	32	109,9	(46,9; ∞)
<i>Ermita</i>	46	145,3	(71,0; 1414,6)	17	75,2	(23,5; ∞)
<i>Tor</i>	43	6,0	(3,7; 8,5)	20	3,3	(2,4; 7,3)
<i>Ainet</i>	71	499,4	(175,0; ∞)	26	167,8	(47,1; ∞)
<i>Manyanet</i>	104	227,1	(108,4; 2080,8)	86	227,1	(104,3; 8334,3)
<i>Filia</i>	46	18,7	(15,7; 22,4)	29	26,8	(20,1; 37,6)
<i>Conangles</i>	44	31,5	(22,1; 48,1)	32	33,9	(22,2; 62,6)
<i>Cavallers</i>	55	47,0	(30,8; 81,2)	35	259,8	(20,3; 69,0)
<i>Nicolau</i>	43	235,7	(75,0; ∞)	36	34,7	(61,8; ∞)
<i>Erta</i>	72	38,8	(23,9; 70,5)	48	93,8	(31,3; ∞)

4. Resultados

Con el método del desequilibrio de ligamiento se obtiene también un amplio rango en las estimas de los tamaños efectivos, que va de los 6 individuos en Tor a los 499 sugeridos para Ainet (Tabla 4.14). El patrón geográfico es similar al descrito anteriormente. En este caso, sin embargo, la cuenca de la Noguera Pallaresa presenta tanto la estima más baja (Tor) como la más alta (Ainet). El número efectivo de reproductores (N_b), estimado a partir de los genotipos en las clases juveniles (1+ y 2+) de las muestras capturadas en el año 2006, oscila entre los 3,3 y los 259,8 (Tabla 4.14).

Las pruebas de U-Mann-Whitney entre los tamaños efectivos estimados a partir del desequilibrio de ligamiento y aquellas obtenidas mediante las fluctuaciones temporales de las frecuencias alélicas tampoco detectaron diferencias significativas. Sin embargo, se observó que los intervalos de confianza de las estimas obtenidas en base al desequilibrio de ligamiento eran en general más amplios que los obtenidos a partir del método temporal.

4.10. ANÁLISIS DE CONSANGUINIDAD Y PARENTESCO.

El valor medio de los coeficientes individuales de consanguinidad (F_{ind}) fue generalmente menor que la estima de la consanguinidad poblacional (F_{pop}), pero en la mayoría de las muestras el primero se encontraba dentro del intervalo de confianza al 95% del segundo (Tabla 4.15). Únicamente el valor medio de consanguinidad en los individuos capturados en las muestras de Nuria, Ainet y Erta estaba fuera del intervalo de confianza de la estimación poblacional. En ninguna de las muestras, las pruebas de U-Mann-Whitney apreciaron diferencias significativas entre la distribución de coeficientes de consanguinidad individual de la muestra real y la de aquella obtenida de los ejemplares simulados no emparentados generados a partir de las frecuencias alélicas de los juveniles de cada localidad (Fig. 4.9).

Sin embargo, la distribución de los coeficientes de parentesco entre pares de individuos juveniles (Fig. 4.9) detectó diferencias significativas entre las muestras reales y las simulaciones de ejemplares no emparentados, tanto en el caso de emplear como referencia la propia población juvenil como cuando se utilizan las posibles cohortes de adultos. Estos resultados sugieren una distribución de los individuos emparentados que va más allá de lo esperado por simples procesos aleatorios y panmixia de la población. En Nuria, los coeficientes de parentesco entre los individuos de la muestra real fueron significativamente superiores a los obtenidos de las simulaciones basadas tanto en las frecuencias alélicas de los propios juveniles como las obtenidas de las frecuencias en los adultos, sugiriendo la presencia de diferentes grupos familiares reproductivamente

separados. Este patrón reproductivo sería probablemente el responsable de los desequilibrios detectados en esta población (Tabla 4.6). En el resto de localidades analizadas, excepto Palomera, el grado de parentesco real de los individuos es inferior al esperado con las simulaciones a partir de la composición genética de los propios juveniles. Esta situación apunta a la presencia de numerosos grupos de hermanos de reducido tamaño dentro de las cohortes juveniles que no compartirían progenitores.

Tabla 4.15. Coeficientes de consanguinidad poblacionales e individuales para cada una de las muestras analizadas. Coeficiente de consanguinidad poblacional (F_{pop}) y su intervalo de confianza al 95% ($CI_{95\%}$); valor medio de los coeficientes individuales de consanguinidad (F_{ind}).

MUESTRAS	F_{pop}	$CI_{95\%}$	F_{ind}
Vallter	0,034	(-0,031; 0,099)	0,029
Nuria	0,065	(0,006; 0,124)	-0,016
Riutort	0,008	(-0,077; 0,093)	-0,017
Palomera	-0,002	(-0,061; 0,056)	-0,024
Ermita	-0,039	(-0,124; 0,046)	-0,042
Tor	0,103	(-0,034; 0,240)	0,100
Ainet	-0,005	(-0,057; 0,047)	0,058
Manyanet	0,025	(-0,008; 0,057)	0,029
Filià	0,033	(-0,006; 0,072)	0,044
Conangles	0,085	(0,022; 0,147)	0,045
Cavallers	0,040	(-0,032; 0,112)	0,007
Nicolau	0,045	(-0,046; 0,137)	-0,010
Erta	0,051	(-0,012; 0,113)	-0,016

La comparación de la distribución de los coeficientes de parentesco entre la muestra real y de ejemplares no emparentados calculados a partir de la frecuencia de los adultos tenía como objetivo analizar hasta que punto los ejemplares adultos capturados eran los progenitores de los juveniles de la muestra y, cuando los valores de parentesco son significativamente inferiores a los de la correspondiente muestra simulada, valorar la posible participación en las puestas de ejemplares foráneos. Sólo en las muestras de Ermita, Ainet, Manyanet y Conangles la muestra de adultos parece ser representativa del *pool* de genes que han dado lugar al grupo de juveniles (Fig. 4.9). En el caso de Nicolau y Filià, el parentesco real resultaba significativamente superior al simulado. En el caso de Nicolau, este hecho podría ser debido al bajo número de adultos analizados (13,5% de ejemplares excluyendo la clase 0+, Fig. 4.8) que resultaría en una pobre estimación de las frecuencias alélicas en el grupo de adultos. En Filià, donde los adultos capturados fueron abundantes (el 35% de ejemplares, excluyendo la clase 0+) podría reflejar el hecho de que no todos esos adultos muestreados forman parte del grupo de reproductores que originaron las cohortes juveniles.

4. Resultados

Figura 4.9. Distribución de los coeficientes de consanguinidad (F), parentesco (R) y fraternidad (Δ) para cada localidad expresados en %. Línea negra lisa: distribución de los valores de relación de los datos reales; línea roja con cuadrados: distribución de los valores de relación de ejemplares no emparentados calculados a partir de las frecuencias de referencia del grupo de juveniles ($sim-J$). Línea azul con triángulos: distribución de los valores de parentesco entre ejemplares no emparentados calculados a partir de las frecuencias de referencia del grupo de adultos ($sim-A$).

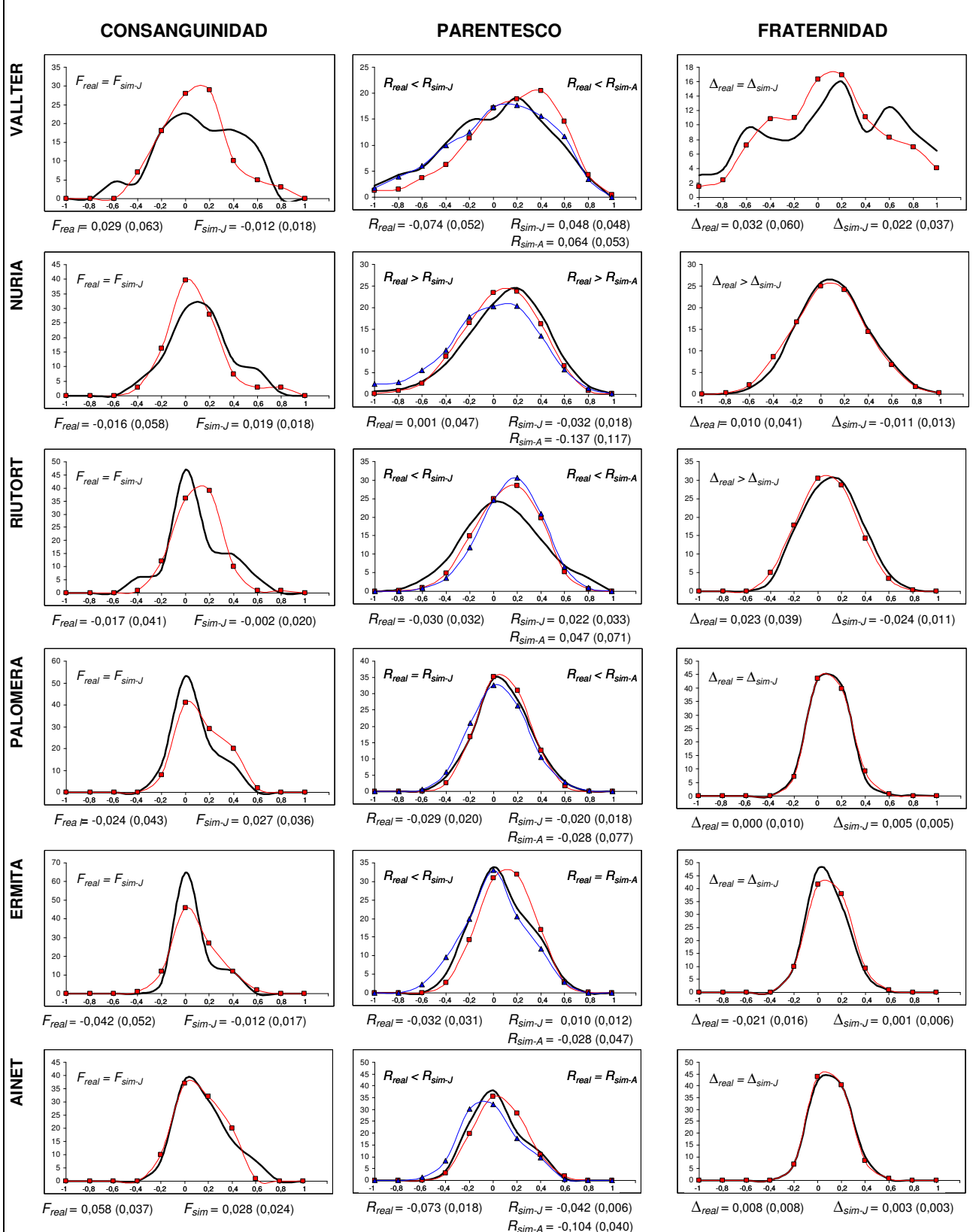
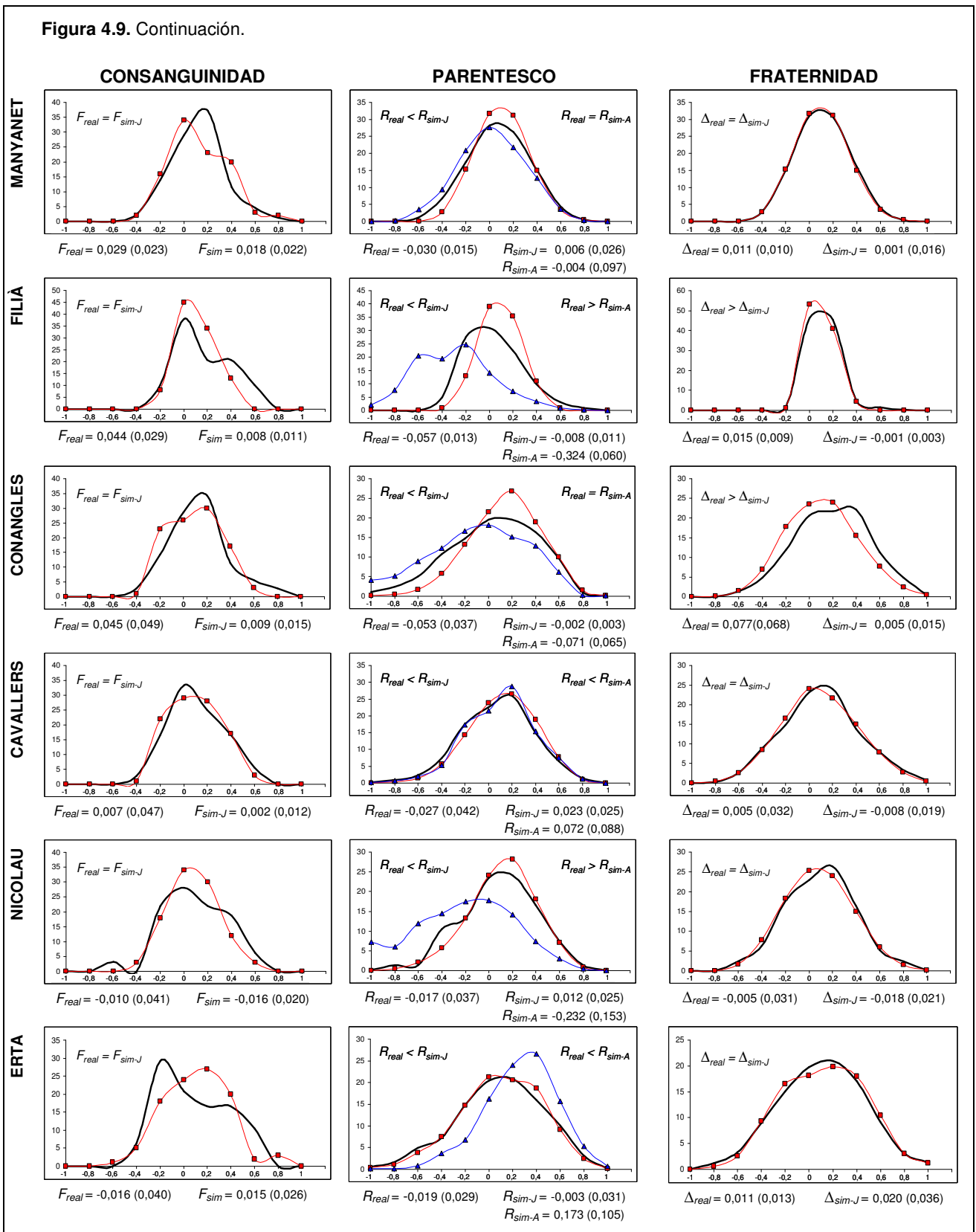


Figura 4.9. Continuación.



4. Resultados

En una gran parte de las muestras, la distribución de los coeficientes reales de fraternidad era similar a la esperada en la muestra simulada de ejemplares no emparentados (Fig. 4.9). Sólo en las muestras de Nuria, Riutort, Filià y Conangles, la distribución de coeficientes de fraternidad en los juveniles de la muestra real resultaba significativamente superior a la observada en la muestra simuladas, lo que sugiere una alta representatividad de algunas familias de hermanos en las muestra.

4.11. ANÁLISIS DE GRUPOS FAMILIARES.

La reconstrucción de las relaciones familiares entre los ejemplares juveniles de cada muestra (Fig. 4.10) indican por lo general un reducido tamaño familiar, que oscilaba entre un único ejemplar y los 7 ejemplares observados en una familia de hermanos completos (*FS*) de Nuria. El número medio de individuos de las *FS* que se obtienen en una determinada muestra se sitúa entre los 1,23 observados en Ainet y los 2,45 detectados en Erta. Hay también diferencias tanto en el número de familias como en el tamaño de familias de medio-hermanos (*HS*) entre las diferentes muestras analizadas. Así el tamaño observado de las *HS* osciló desde un ejemplar hasta los 17 detectados en la familia "D" de la muestra de Manyanet.

En ningún caso se detectaron diferencias significativas para las medias del tamaño de las *FS* y *HS* entre las muestras reales y las simuladas. Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas entre las varianzas para las distribuciones de *FS* de las muestras reales y simuladas de Riutort y Filià. En ambos casos, la varianza de las distribuciones de ejemplares de las *FS* de las muestras reales superaba a la de las simuladas como resultado del excesivo tamaño de algunas familias de hermanos completos. También se detectaron diferencias significativas entre las varianzas de las distribuciones de individuos en las *HS* de las muestras reales y simuladas de Ermita y Filià.

Los índices de variabilidad del tamaño familiar (V_k/K) observados en las muestras del Pirineo estaban comprendido entre 0,15-1,46 y no se detectaron diferencias significativas en este índice entre las muestras reales y las muestras simuladas. Los valores de V_k/K de las muestras localizadas en los ríos que forman parte de las cuencas internas de Cataluña (Vallter, Nuria y Riutort) superaban a los detectados en los ríos pertenecientes a la cuenca del Ebro.

Figura 4.10. Reconstrucción de la estructura familiar en la muestra real y simulada de cada localidad. Número de ejemplares analizados (M); número de familias de medio hermanos (HS); número de familias de hermanos verdaderos (FS); número medio de ejemplares que forman una familia de FS (K); varianza del número de ejemplares por familia de FS (V_K); índice de variabilidad del tamaño familiar (V_K/K). Los rectángulos de la fila superior se corresponden con las HS de cada localidad y se identifican con letras. Los rectángulos de la fila inferior; representan a las FS y el número que aparece dentro de cada una corresponde al número de ejemplares contenidos en la misma.

VALLTER	<p>Real: $N = 22$ $K = 2,00$ $HS = 6$ $V_K = 2,04$ $FS = 11$ $V_K/K = 1,02$</p> <p>Simulada: $N = 22$ $K = 2,00$ $HS = 3$ $V_K = 2,20$ $FS = 11$ $V_K/K = 1,10$</p>	
NURIA	<p>Real: $N = 68$ $K = 2,34$ $HS = 9$ $V_K = 1,88$ $FS = 29$ $V_K/K = 1,10$</p> <p>Simulada: $N = 68$ $K = 2,06$ $HS = 10$ $V_K = 1,18$ $FS = 33$ $V_K/K = 0,57$</p>	
RIJORT	<p>Real: $N = 34$ $K = 1,83$ $HS = 10$ $V_K = 2,68$ $FS = 18$ $V_K/K = 1,46$</p> <p>Simulada: $N = 34$ $K = 1,42$ $HS = 8$ $V_K = 0,34$ $FS = 24$ $V_K/K = 0,24$</p>	
PALOMERA	<p>Real: $N = 32$ $K = 1,60$ $HS = 9$ $V_K = 0,57$ $FS = 20$ $V_K/K = 0,36$</p> <p>Simulada: $N = 32$ $K = 1,32$ $HS = 11$ $V_K = 0,31$ $FS = 25$ $V_K/K = 0,23$</p>	
ERMITA	<p>Real: $N = 17$ $K = 1,29$ $HS = 7$ $V_K = 0,22$ $FS = 14$ $V_K/K = 0,17$</p> <p>Simulada: $N = 17$ $K = 1,31$ $HS = 8$ $V_K = 0,23$ $FS = 13$ $V_K/K = 0,17$</p>	
TOR	<p>Real: $N = 20$ $K = 1,54$ $HS = 6$ $V_K = 0,94$ $FS = 13$ $V_K/K = 0,61$</p> <p>Simulada: $N = 20$ $K = 1,57$ $HS = 7$ $V_K = 0,88$ $FS = 14$ $V_K/K = 0,57$</p>	
AINET	<p>Real: $N = 26$ $K = 1,23$ $HS = 11$ $V_K = 0,18$ $FS = 21$ $V_K/K = 0,15$</p> <p>Simulada: $N = 26$ $K = 1,30$ $HS = 9$ $V_K = 0,22$ $FS = 20$ $V_K/K = 0,17$</p>	

4. Resultados

Figura 4.10. Continuación.

MANYANET	<p>Real: $N = 84$ $K = 2,02$ $HS = 10$ $V_K = 0,74$ $FS = 40$ $V_K/K = 0,37$</p> <p>Simulada: $N = 84$ $K = 2,00$ $HS = 12$ $V_K = 0,86$ $FS = 43$ $V_K/K = 0,43$</p>	
FILIA	<p>Real: $N = 29$ $K = 1,65$ $HS = 11$ $V_K = 1,49$ $FS = 17$ $V_K/K = 0,90$</p> <p>Simulada: $N = 29$ $K = 1,26$ $HS = 13$ $V_K = 0,20$ $FS = 23$ $V_K/K = 0,16$</p>	
CONANGLES	<p>Real: $N = 35$ $K = 1,94$ $HS = 9$ $V_K = 1,11$ $FS = 18$ $V_K/K = 0,57$</p> <p>Simulada: $N = 35$ $K = 1,59$ $HS = 9$ $V_K = 0,73$ $FS = 22$ $V_K/K = 0,46$</p>	
CAVALLERS	<p>Real: $N = 36$ $K = 1,89$ $HS = 10$ $V_K = 1,43$ $FS = 19$ $V_K/K = 0,76$</p> <p>Simulada: $N = 36$ $K = 1,89$ $HS = 9$ $V_K = 1,10$ $FS = 19$ $V_K/K = 0,58$</p>	
NICOLAU	<p>Real: $N = 32$ $K = 1,45$ $HS = 9$ $V_K = 0,26$ $FS = 22$ $V_K/K = 0,18$</p> <p>Simulada: $N = 32$ $K = 1,52$ $HS = 10$ $V_K = 0,46$ $FS = 21$ $V_K/K = 0,30$</p>	
ERTA	<p>Real: $N = 48$ $K = 2,45$ $HS = 7$ $V_K = 1,21$ $FS = 20$ $V_K/K = 0,49$</p> <p>Simulada: $N = 48$ $K = 2,18$ $HS = 7$ $V_K = 0,75$ $FS = 22$ $V_K/K = 0,34$</p>	

5. DISCUSIÓN

5.1. SELECCIÓN DE *LOCI*/MICROSATÉLITES.

Los *loci* microsatélites son marcadores moleculares ampliamente utilizados en estudios genéticos a nivel poblacional y también permiten realizar análisis a nivel familiar e individual. El desarrollo de estas aplicaciones a nivel individual ha supuesto un importante avance en el campo de la genética de poblaciones y de la conservación (Estoup *et al.* 1998a; Hansen *et al.* 2001a; Chistiakov *et al.* 2006; Schwartz *et al.* 2007). Para poder utilizar tales aplicaciones se requiere la utilización de un número de *loci* entre medio y elevado (6-10) (Bernatchez y Duchesne 2000; Koskinen *et al.* 2004). Sin embargo, la tendencia a incrementar el número de *loci* microsatélites analizados en los trabajos conlleva un aumento del gasto, por lo que en ocasiones se emplean estrategias que permiten minimizar estos costes (Johnson *et al.* 2007). Una de estas estrategias es el desarrollo de sistemas *multiplex*. La utilización de los sistemas *multiplex*, además de reducir los costes (O'Reilly *et al.* 1996; Paterson *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2007), también permiten disminuir el tiempo del genotipado, aún teniendo en cuenta el invertido en el desarrollo del propio sistema (Lerceteau-Köhler y Weiss 2006).

De los 9 *loci* seleccionados para ser incluidos en el sistema *multiplex* con la finalidad de realizar análisis genéticos eficientes y rutinarios en las poblaciones mediterráneas de trucha común, seis se incluyen entre los recomendados por la "Acción Concertada en la

5. Discusión

Identificación, Gestión y Explotación de los Recursos Genéticos de la Trucha Común (*Salmo trutta*)” (EU FAIR CT97-3882) para el análisis de poblaciones de trucha común europeas: *Str15INRA* y *Str73INRA* (Estoup *et al.* 1993), *Str591INRA* (Presa y Guyomard 1996), *Ssa85* (O’Reilly *et al.* 1996), *SsoSL417* (Slettan *et al.* 1995) y *SsoSL438* (Slettan *et al.* 1996). Además, el uso de estos 6 *loci* ha sido habitual en los estudios poblaciones de trucha común dentro de su ámbito de distribución. Los otros tres *loci* añadidos al sistema: *Ssa408UOS* (Cairney *et al.* 2000), *SSsp2213* (Paterson *et al.* 2004) y *SsHaeIII14.20* (Goodier, no publicado, Nº acceso al GenBank U10050), también han sido utilizados en el estudio de diferentes poblaciones de trucha común europeas (Tabla 5.1).

En paralelo a este estudio, otros trabajos han incorporado algunos de estos *loci* en reacciones *multiplex*. Así, Lerceteau-Köhler y Weiss (2006) han desarrollado un sistema compuesto también por dos reacciones *multiplex* para amplificar un total de 12 *loci* microsatélite de trucha común en el que se incluyen seis de los 9 *loci* seleccionados en nuestro trabajo (*SsoSL438*, *Ssa85*, *Str73INRA*, *SsoSL417*, *Ssa408Uos*, *SSsp2213*). Anteriormente, Paterson *et al.* (2004) amplificaron simultáneamente un total de 7 *loci* microsatélites en salmón, entre los que se encontraba el *locus* *SSsp2213*.

En general, los niveles de diversidad genética observados para cada uno de estos 9 *loci* no diferían notablemente de los detectados en otras poblaciones de trucha común (Tabla 5.1). Sin embargo, la diversidad mostrada por algunos *loci* en el Pirineo catalán resultaba inferior a la observada en poblaciones anádromas de la especie (Hansen *et al.* 2001b, 2002; Hansen 2002; Carlsson *et al.* 2002; Was y Wenne 2003; Jensen *et al.* 2005; Serbezov *et al.* 2010b). Los niveles de diversidad para los *loci* *SsoSL438*, *SsoSL417*, *Str15INRA* y *SsHaeIII14.20* en el conjunto de territorio resultaron ligeramente inferiores a los observados por Vera *et al.* (2010) en las poblaciones de la Noguera de la Vallferrera. Estos autores utilizaron además los *loci* *T3-13* (Estoup *et al.* 1993) y *Ssa197* (O’Reilly *et al.* 1996) que por problemas técnicos fueron desestimados para formar parte del sistema *multiplex* aquí desarrollado. La diversidad en los *loci* *Str73INRA* y *Str15INRA* en este trabajo ha resultado superior a la observada en poblaciones mediterráneas del sur de Francia (Estoup *et al.* 1993; Poteaux *et al.* 1999) y similar a la observada en poblaciones atlánticas de los Pirineos franceses (Aurelle *et al.* 2002).

Tabla 5.1. Comparación de los niveles de diversidad para cada uno de los 9 *loci* seleccionados en este trabajo. Se indica la cuenca (mediterránea o atlántica), el territorio del estudio y la diversidad observada en este trabajo y en trabajos realizados por otros autores. Número total de alelos observados (A); diversidad génica (H_e).

Cuenca	Territorio	Referencia	SsoSL438		Ssa85		Str73INRA		SSsp2213		SsoSL417		Str591INRA		Str15INRA		Ssa408LoS		Ss-Haell114.20	
			A	He	A	He	A	He	A	He	A	He	A	He	A	He	A	He	A	He
MED	Península-Pirineos	Este trabajo	6	0,497	8	0,641	5	0,524	15	0,673	22	0,662	16	0,568	6	0,487	20	0,662	14	0,568
MED	Francia-Pirineos	Estoup <i>et al.</i> (1993)					2	0,180							2	0,180				
MED	Francia-Pirineos	Poteaux <i>et al.</i> (1999)					4	0,480												
MED	Balcánes-sur	Apostolidis <i>et al.</i> (2008)										5	0,234	6	0,215					
MED	Península-Pirineos	Vera <i>et al.</i> (2010)	7	0,579			7	0,534			27	0,834			8	0,514			21	0,665
AT	Península-varios	Cagigas <i>et al.</i> (1999)											11		5					
AT	Península-Duero	Corujo <i>et al.</i> (2004)													8	0,519				
AT	Península-Portugal	Antunes <i>et al.</i> (2006)											13							
AT	Península-Duero	Martínez <i>et al.</i> (2007)	22	0,515	10	0,339	5	0,335			68	0,763	12	0,305	8	0,244				
AT	Península-Galicia	Campos <i>et al.</i> (2007)									44	0,900								
AT	Europa-Dinamarca	Hansen <i>et al.</i> (2001)	6	0,605	7	0,745	4	0,550			11	0,800			5	0,685			11	0,820
AT	Europa-Francia	Aurelle <i>et al.</i> (2002)					6	0,534							6	0,502				
AT	Europa-Norte	Carlsson y Carlsson (2002)	3	0,530			3	0,660							5	0,620	13	0,870		
AT	Europa-Dinamarca	Hansen (2002)	6	0,647	8	0,714	5	0,564			14	0,808			7	0,716			10	0,798
AT	Europa-Dinamarca	Hansen <i>et al.</i> (2002)	7	0,625	8	0,681	5	0,584			13	0,797			7	0,674				
AT	Europa-Suecia	Dannewitz <i>et al.</i> (2003)			6	0,790	3	0,650			7	0,780			5	0,740				
AT	Europa-Polonia	Was & Wenne (2003)			5	0,690	4	0,581					3	0,204	5	0,740				
AT	Europa-Dinamarca	Hansen y Jensen (2005)		0,590		0,523	0,530				0,690					0,620				
AT	Europa-Austria	Lerceteau-Kölher & Weis (2006)	8		6		3		17	11										
AT	Europa-Noruega	Serbezov <i>et al.</i> (2010b)			5	0,734			8	0,775										

5. Discusión

Los resultados obtenidos a partir del análisis con el programa MICRO-CHECKER indicaron que del total de 9 *loci* analizados, sólo los *loci Str591INRA* y *SsoSL417* eran susceptibles de presentar alelos nulos en algunas localidades. Para el *locus Str591INRA* se detectó esta situación en las muestras de Nuria, Manyanet y Conangles, mientras que en el caso del *SsoSL417* fueron las muestras de Ermita y Conangles las que presentaron este tipo de alelos. Ambos *loci* están incluidos en la lista recomendada por la “Acción Concertada en la Identificación, Gestión y Explotación de los Recursos Genéticos de la Trucha Común (*Salmo trutta*)” (EU FAIR CT97-3882) y han sido ampliamente utilizados para el análisis de poblaciones de la especie de diferente procedencia (Ruzzante *et al.* 2001; Dannewitz *et al.* 2003; Was y Wenne 2003; Ruzzante *et al.* 2004; Lerteteau-Köhler y Weiss 2006; Ostergaard *et al.* 2003; Jensen *et al.* 2005; Martínez *et al.* 2007; Hansen *et al.* 2009; Vera *et al.* 2010), a pesar de que en algunos de estos trabajos se han observado también alelos nulos. Así, Jensen *et al.* (2005) detectaron posibles alelos nulos en el *locus SsoSL417*, mientras que Martínez *et al.* (2007) observaron esta posibilidad para el *Str591INRA*.

La presencia de alelos nulos puede sobreestimar los valores de diferenciación entre las poblaciones, así como reducir el poder estadístico a la hora de asignar individuos a una determinada población (Chapuis y Estoup 2007; Johnson *et al.* 2007; Carlsson 2008). Sin embargo, la mayoría de trabajos que detectan alelos nulos en alguno de los *loci* utilizados acaban incluyendo esos *loci* en sus análisis sin realizar ninguna corrección ya que su efecto en los patrones de diversidad suele ser pequeño cuando las frecuencias de los alelos nulos son bajas o moderadas (Dakin y Avise 2004; Chapuis y Estoup 2007; Johnson *et al.* 2007; Carlsson 2008). La presencia de alelos nulos sí plantea problemas en otro tipo de análisis como son las pruebas de paternidad (Dakin y Avise 2004).

El número de *loci* microsatélites necesarios para llevar a cabo estudios poblacionales es un tema en permanente debate (Koskinen *et al.* 2004). Aunque las simulaciones sugieren valores teóricos del orden de 30 (Takezaki y Nei 1996) a cientos (Pollock *et al.* 1998), la mayor parte de los trabajos realizados en poblaciones naturales de peces utilizan una media de 6 *loci* microsatélites (Koskinen *et al.* 2004, media de 89 estudios publicados). En los trabajos de los últimos años realizados en poblaciones de trucha común, el número de *loci* utilizados fluctúa entre 3 y 12, con pocos trabajos superando los 9 *loci* (Tabla 5.2). Las discrepancias entre los criterios teóricos y las aplicaciones prácticas responden a las dificultades de amplificación de un moderado número de *loci* microsatélite debido a las limitaciones económicas (Koskinen *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2007). Aunque experiencias realizadas en poblaciones naturales indican que el aumento en el número de *loci* microsatélites utilizados mejora los resultados obtenidos

(Koskinen *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2007), otros trabajos sugieren que el número de alelos por *locus*, el grado de divergencia entre las poblaciones o la finalidad del análisis determinan el número de *loci* a utilizar (Bernatchez y Duchesne 2000). Algunos autores recomiendan el uso de *loci* microsatélites con moderada diversidad alélica (entre 6 y 10 alelos), rango en el que sitúa la mayoría de *loci* seleccionados en este trabajo (Tabla 5.1). En este sentido, los 9 *loci* microsatélite seleccionados en este estudio han detectado una significativa diferenciación entre todas las muestras analizadas, a excepción de Palomera y Ermita. Además, para estos *loci* las localidades analizadas presentan por lo general una alta diversidad, no observada anteriormente en la zona ni con los marcadores alozímicos (García-Marín *et al.* 1999; Sanz *et al.* 2002) ni con el estudio del DNAmT (Cortey *et al.* 2004; Vera 2006). El nivel de diferenciación entre las muestras ($F_{ST} = 0,292$) es notablemente superior al observado entre poblaciones anádromas de la especie y entre poblaciones mediterráneas del sur de Francia. Los *loci* que contribuyen más a esta diferenciación son el *Str591INRA* ($F_{ST} = 0,415$), el *SsoSL417* ($F_{ST} = 0,366$), el *SSsp2213* ($F_{ST} = 0,329$), el *SsoSL438* ($F_{ST} = 0,300$) y el *SsHaeIII14.20* ($F_{ST} = 0,300$). Mientras que el *locus SsoSL417* contribuye básicamente a la diferenciación entre las cuencas, los otros cuatro *loci* detectan principalmente las diferencias entre las poblaciones pertenecientes a una misma cuenca, aunque *SSsp2213* y *Str591INRA* tienen también una significativa contribución a la diferenciación entre cuencas. Ni los estudios previos basados en el DNAmT (Cortey *et al.* 2004; Vera 2006), ni aquellos basados en alozimas (Sanz *et al.* 2002; Araguas *et al.* 2004) habían identificado *loci* capaces de diferenciar las cuencas de origen de las muestras obtenidas en el Pirineo catalán.

La ausencia de diferencias significativas entre la aplicación de los estadísticos basados en la abundancia del alelo (F_{ST} , F_{SC} , F_{CT}) frente a los basados también en el tamaño del alelo (R_{ST} , R_{SC} , R_{CT}) sugiere una mayor importancia de la deriva frente a la mutación como motor evolutivo de las poblaciones de trucha en la zona de estudio. Tal situación ocurre cuando hace poco tiempo del aislamiento entre las poblaciones (Estoup *et al.* 1998a), como se supone entre las poblaciones residentes de trucha común de los diferentes ríos del Pirineo catalán, aislados sólo desde el final del último periodo glacial (Sanz *et al.* 2002; Cortey y García-Marín 2002; Vera 2006).

La incorporación al sistema *multiplex* diseñado en este trabajo de *loci* con elevado nivel de polimorfismo y estructuración hidrográfica permite tanto su uso para la asignación de ejemplares a las diferentes poblaciones, como también llevar a cabo análisis de la estructuración familiar dentro de ellas y determinar las relaciones de parentesco entre los individuos. En el caso de los análisis de parentesco, el éxito en el establecimiento de las relaciones entre ejemplares depende del número de *loci* y de la probabilidad de

5. Discusión

exclusión, la cual, está directamente relacionada con la diversidad alélica (Estoup *et al.* 1998b). Entre los *loci* que forman parte del sistema *multiplex* diseñado en este trabajo, los *loci* *SSsp2213*, *SsoSL417*, *Str591INRA*, *Ssa408UoS* y *SsHaelll14.20*, presentan dentro de las localidades del Pirineo catalán estudiadas un promedio de 5 o más alelos (Tabla 4.2, p. 46). El uso de *loci* con elevada diversidad alélica resulta beneficioso en este tipo de análisis, ya que permite utilizar un número relativamente bajo de *loci* para alcanzar estimas fiables de parentesco (Estoup *et al.* 1998b; Bernatchez y Duchesne 2000). En este sentido, Bernatchez y Duchesne (2000) sugieren que la utilización de 7 *loci* con una media de 13 alelos es suficiente para obtener el 90% de éxito en la asignación de progenitores a partir de simulaciones con 300 posibles progenitores. Trabajos realizados con rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) apuntan a que 4 y 5 *loci* con un número medio de alelos de entre 9 y 14 son suficientes para alcanzar un éxito de asignación del 90% en pruebas de paternidad sobre 30 posibles progenitores (Estoup *et al.* 1998b). Una proporción algo superior al 90% de éxito se obtuvo con 76 posibles progenitores naturales de *Salmo salar* utilizando sólo 5 *loci* y un promedio de 14 alelos (Garant *et al.* 2001).

Tabla 5.2. Comparación del número de *loci* utilizado, de los patrones de diversidad genética y del grado de diferenciación en poblaciones de trucha común de diferentes localizaciones geográficas observados a partir de *loci* microsatélites. Número medio de alelos observado (N_a); promedio de heterozigosidad esperada (H_e); promedio de diferenciación entre poblaciones (F_{ST}) dentro del territorio analizado.

Vertiente	Forma	Región	Referencia	Localidades	Nº <i>loci</i>	N_a	H_e	F_{ST}
Mediterránea	Residente	Pirineo catalán	Este trabajo	12	9	5,30	0,589	0,279
Mediterránea	Residente	Sur de Francia	Estoup <i>et al.</i> 1998a	2	6	3,64	0,418	0,263
Mediterránea	Residente	Sur de Francia	Poteaux <i>et al.</i> 1999	4	3	12,66	0,665	0,100
Mediterránea	Residente	Pirineo catalán	Vera 2006	6	8	6,90	0,681	-
Mediterránea	Residente	Balcanes	Apostolidis <i>et al.</i> 2008	10	9	2,51	0,271	0,545
Atlántica/Medit.	Anádr/Resid	Duero/Ebro	Cagigas <i>et al.</i> 1999	4	3	3,30	0,415	0,328
Atlántica	Residente	Bajo Duero	Antunes <i>et al.</i> 2006	11	4	2,10	0,252	0,697
Atlántica	Residente	Río Sella	Campos <i>et al.</i> 2006	5	4	2,55	0,315	0,604
Atlántica	Residente	Duero	Martínez <i>et al.</i> 2007	16	12	4,92	0,455	0,348
Atlántica	Anádr/Resid	Duero/Sil/Lérez	Corujo <i>et al.</i> 2004	9	6	6,41	0,594	0,154
Atlántica	Anádroma	Dinamarca	Ruzzante <i>et al.</i> 2001	32	7	5,71	0,629	0,049
Atlántica	Anádroma	Dinamarca	Hansen <i>et al.</i> 2002	2	8	7,14	0,686	0,037
Atlántica	Anádroma	Báltico-Polonia	Was y Wenne 2003	6	7	6,81	0,660	-
Atlántica	Anádroma	Cantábrico	Ayllón <i>et al.</i> 2006	3	5	12,66	0,768	0,111
Atlántica	Anádroma	Costa Gallega	Campos <i>et al.</i> 2007	6	5	13,42	0,869	0,024

Finalmente, el grado de diferenciación observado entre las muestras naturales y la muestra del centro piscícola de Bagà ($F_{ST} = 0,206$) sugiere que el número de *loci* microsatélites seleccionados en este trabajo también es suficiente para detectar la introgresión por efecto de las repoblaciones. Los *loci* *Str73INRA* y *Str15INRA* son los que contribuyen en mayor medida a esta diferenciación entre muestras naturales y ejemplares del centro piscícola de Bagà, con valores de F_{ST} superiores a 0,300, pero también es importante la contribución de otros *loci* como *Str591INRA*, *SsHaeIII14.20* y *SsoSL438* que presentan valores de F_{ST} comprendidos entre 0,200 y 0,300. Recientemente en Sanz *et al.* (2009) se ha comprobado que la batería de los 9 *loci* microsatélites utilizada en este trabajo permite identificar tanto los ejemplares alóctonos procedentes del centro piscícola como los ejemplares híbridos de primera y segunda generación en las muestras del Pirineo catalán.

5.2. VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL.

Los valores de diversidad intrapoblacional (N_a , H_e) observados en este estudio (Tabla 5.2) son altos y se mantienen dentro del rango observado para poblaciones mediterráneas de trucha común (Estoup *et al.* 1998a; Poteaux *et al.* 1999; Vera *et al.* 2010). Las diferencias con otros estudios pueden atribuirse a los diferentes conjuntos de *loci* utilizados, por ejemplo, en la cuenca de la Noguera de la Vallferrera se habían observado valores ligeramente superiores con una diferente selección de *loci* (Vera *et al.* 2010). Los niveles de diversidad detectados previamente en las poblaciones de trucha del Pirineo mediante alozimas y *DNAmt* eran bajos e incluso se identificaron poblaciones monomórficas (Sanz *et al.* 2002; Cortey *et al.* 2004). Según los análisis alozímicos, las poblaciones de trucha de la vertiente mediterránea se caracterizan por tener poca diversidad intrapoblacional y alta diferenciación (Sanz *et al.* 2002). En promedio, el nivel de diversidad alozímica dentro de estas poblaciones era de 0,029 ($H_s = 0,000 - 0,072$). El nivel de diversidad observado a partir de la secuenciación de la región de control del DNA mitocondrial tampoco era elevado a pesar de la presencia simultánea de dos linajes evolutivos en el 38% de las localidades estudiadas, así la diversidad haplotípica (h) promedio se estimó en 0,220 (0,000 - 0,800) y la nucleotídica (d) en 0,000801 (0,000000 - 0,004069) (Cortey *et al.* 2004). Resultados similares obtuvo Vera (2006) en las localidades de trucha del Pirineo catalán que se han analizado en este estudio ($h = 0,264$, 0,000 - 0,750; $d = 0,001368$, 0,000000 - 0,003938). Estos trabajos atribuyeron los reducidos niveles de diversidad a intensos procesos de deriva genética como consecuencia del reducido censo poblacional que caracteriza a las poblaciones mediterráneas de la especie. En los *loci* microsatélites parece que la elevada tasa de

5. Discusión

mutación propia de este tipo de marcadores favorece un mayor polimorfismo dentro de las poblaciones estudiadas (Estoup *et al.* 1998a).

La cantidad diversidad genética de la trucha común no está distribuida de manera homogénea dentro de las poblaciones del Pirineo catalán. Las poblaciones de la cuenca del Ter presentan valores de diversidad inferiores a los observados en las otras cuencas analizadas (Tabla 4.6, p. 50). Estas diferencias entre las cuencas se atribuyen generalmente a una acción diferencial de la deriva genética como consecuencia de las diferencias en la abundancia de ejemplares, las pautas de gestión y las condiciones del medio (Antunes *et al.* 2006; Campos *et al.* 2006). Resultados similares habían sido observados a partir de algunos estudios con alozimas (Sanz *et al.* 2002; Araguas *et al.* 2004) y con *DNAmt* (Cortey *et al.* 2004; Vera 2006) y son habituales entre las poblaciones residentes de la especie en otros territorios del sur de Europa (Estoup *et al.* 1998a; Poteaux *et al.* 1999; Antunes *et al.* 2006; Vera 2006; Martínez *et al.* 2007; Apostolidis *et al.* 2008). Los análisis con *DNAmt* situaron los valores de diversidad más elevados en aquellas localidades del Pirineo catalán en las que coexistían clados pertenecientes a los dos linajes autóctonos (ME y AD) detectados en la zona (Cortey *et al.* 2004). De igual manera, los análisis con alozimas relacionaron los máximos valores de diversidad con altos valores de introgresión (Araguas *et al.* 2004), tal y como había señalado Berrebi *et al.* (2000) en las poblaciones mediterráneas del Pirineo francés. La distribución heterogénea de la diversidad genética de las poblaciones residentes de trucha común contrasta con la habitual distribución homogénea de la misma en las poblaciones anádromas de la especie (Campos *et al.* 2007).

5.3. DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL.

Los niveles de diferenciación detectados entre las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán mediante los 9 *loci* microsatélites utilizados en este estudio eran similares a los detectados mediante este tipo de marcadores en poblaciones mediterráneas situadas en el sur de Francia (Tabla 5.2), en las que el coeficiente de diferenciación osciló entre 0,100 - 0,263 (Estoup *et al.* 1998a; Poteaux *et al.* 1999). Sin embargo, todos estos valores detectados entre las poblaciones mediterráneas del Pirineo son inferiores a los registrados entre poblaciones residentes en Galicia ($F_{st} = 0,348$, Martínez *et al.* 2007) y substancialmente menores a los descritos en territorios con poblaciones residentes en declive (rango 0,545 - 0,697; Antunes *et al.* 2006; Campos *et al.* 2006; Apostolidis *et al.* 2008). No obstante, el grado de diferenciación entre las poblaciones del Pirineo catalán es superior al detectado habitualmente entre las poblaciones anádromas de la especie (Tabla 5.2), donde el elevado intercambio de ejemplares tiende a homogeneizar las

poblaciones y a disminuir la diferenciación genética entre las mismas (Bouza *et al.* 1999; Ruzzante *et al.* 2001; Hansen *et al.* 2002).

Los estudios previos realizados en el Pirineo catalán con otros marcadores moleculares sugerían altas diferencias entre las poblaciones de trucha común, por ejemplo, los análisis con DNAmT de Vera (2006) manifestaron una elevada divergencia ($F_{ST} = 0,635$). No obstante, el valor medio de diferenciación observado mediante estudios de la diversidad en alozimas para las muestras del 1993 analizadas en este trabajo ($G_{ST} = 0,396$, Araguas *et al.* 2004) resulta muy similar al obtenido en este estudio con microsatélites ($F_{ST} = 0,322$, Tabla 4.10, p. 58). Este parecido entre las estimas *multiloci* de F_{ST} obtenidas a partir de alozimas y microsatélites también ha sido observado en otras poblaciones mediterráneas de la especie y se ha atribuido a la baja presión selectiva sobre los *loci* analizados para ambos tipos de marcadores moleculares (Estoup *et al.* 1998a). El hecho de que las estimas con genes nucleares sean inferiores a las detectadas en el estudio con DNAmT probablemente refleja la mayor intensidad de la deriva genética en este último marcador, dado que su herencia materna reduce el tamaño efectivo de la población transmisora.

Los análisis previos llevados a cabo con alozimas y ADNmt señalaron la existencia de una compleja estructura poblacional en los ríos mediterráneos. Esta complejidad refleja los contactos secundarios entre diferentes linajes ocurridos durante las expansiones de rango en los periodos glaciares del Cuaternario, y el aislamiento y deriva como resultado del aumento de la temperatura y la sequía estival de la región mediterránea en la época postglacial (Sanz *et al.* 2002; Cortey *et al.* 2004; Vera 2006). Estas últimas circunstancias son las responsables de que las poblaciones de trucha común de la zona estén actualmente restringidas a las zonas de cabecera de los ríos (Muñoz y Casadevall 1997). El presente estudio confirma que la mayor parte de la diferenciación entre las poblaciones de trucha común de la región pirenaica se observa entre las localidades pertenecientes a una misma cuenca ($F_{SC} > F_{CT}$, Tabla 4.8, p. 52). Este patrón es común a diversas especies de salmónidos (Costello *et al.* 2003; Lin *et al.* 2008), y poblaciones residentes de trucha común en otros territorios (Estoup *et al.* 1998; Carlsson *et al.* 1999; Carlsson y Nilsson 2000; Heggenes y Roed 2006; Martínez *et al.* 2007). Aunque en ocasiones esta diferenciación local parece estar provocada por la existencia de barreras que impiden de manera total o parcial el flujo de individuos entre las poblaciones (Estoup *et al.* 1998a; Carlsson *et al.* 1999; Heggenes y Roed 2006), también se ha observado su aparición en ausencia de barreras aparentes que dificulten la dispersión de los ejemplares (Carlsson y Nilsson 2000; Martínez *et al.* 2007).

5. Discusión

Las estimas de flujo génico entre la mayor parte de las muestras analizadas en este trabajo confirman el aislamiento entre las poblaciones y descartan la posibilidad de que los ejemplares de trucha común realicen grandes desplazamientos dentro de las cuencas. Los análisis genéticos sugieren tan sólo un flujo de ejemplares, a pequeña escala, desde las localidades de la Vallferrera (Ermita y Palomera) hacia la de Ainet en el río Noguera de Cardós (Fig. 4.5, p. 57). Este resultado confirma el obtenido previamente por Vera *et al.* (2010) y contrasta con el aislamiento observado entre las localidades de la Vallferrera y las de su afluente el río Tor, a pesar de que los puntos muestreados en este último caso estuviesen más próximos. Tal observación sugiere la existencia de factores adicionales a la distancia hidrográfica para justificar el intercambio de ejemplares entre las localidades, que a su vez serían los responsables de la ausencia de un patrón de aislamiento por distancia entre las poblaciones dentro de las cuencas analizadas.

No hay un consenso respecto al patrón de movilidad que presentan los ejemplares residentes en diferentes especies de salmónidos. Algunos autores sugieren que los ejemplares permanecen en la misma región del río a lo largo de toda su vida y que los desplazamientos que realizan no exceden los 20 - 50 m (Gerking 1959; Bachman 1984; Okland *et al.* 2004). Sin embargo, otros trabajos realizados en diferentes especies de salmónidos a partir de metodologías de captura-recaptura, telemetría o análisis genéticos detectan desplazamientos sustanciales de ejemplares residentes a lo largo del río (Meyers *et al.* 1992, Gowan *et al.* 1994; Young 1994, Rodríguez 2002; Hojesjo *et al.* 2007). Algunos autores coinciden en señalar la existencia de dos grupos de ejemplares dentro de las poblaciones residentes de trucha común, aquellos más sedentarios y otros más propensos a la dispersión. Sólo una pequeña parte de los ejemplares pertenecerían a esta componente "móvil" de la población (Rodríguez 2002; Hojesjo *et al.* 2007), mientras que la mayoría de los ejemplares formarían parte de la componente "sedentaria", con una movilidad que aunque puede variar a lo largo del año, quedaría restringida a desplazamientos de no más de 20 m en verano y de 100 m durante el periodo reproductor. Las estimas de flujo génico entre las poblaciones dentro de las cuencas del Pirineo, con las excepciones detectadas entre las dos muestras de la Vallferrera y la de estas localidades con la de Cardós, apuntan a una movilidad restringida que favorece la diferenciación genética de las poblaciones a escala microgeográfica. Sorprendentemente, los estudios con DNAm_t en las cuencas de la Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana, sí detectaron un significativo patrón de aislamiento por distancia lo que podría sugerir un comportamiento migratorio diferencial entre los dos sexos de esta especie, tal y como se ha observado en otras especies de salmónidos. Los sesgos de dispersión pueden afectar tanto a machos (Hutchings y

Gerber 2002; Klemetsen *et al.* 2003; Bekkevold *et al.* 2004; Brunelli *et al.* 2010) como a hembras (Fraser *et al.* 2004; Koizumi *et al.* 2006) y parecen contribuir a reducir la competición en el momento del apareamiento (Hutchings y Gerber 2002). Sin embargo, algunos autores señalan la ausencia de dispersión diferencial entre sexos (Olsen *et al.* 2006; Consuegra y García de Leaniz 2007) y las diferencias observadas las relacionan con desviaciones en la proporción de sexos en las poblaciones y en sus diferentes estrategias biológicas (Consuegra y García de Leaniz 2007).

Superpuesto al patrón local de diferenciación, las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán presentan, según los *loci* microsatélites estudiados, un patrón de estructuración hidrográfico a tenor de los resultados obtenidos mediante los diferentes análisis de agrupación (Fig. 4.1 y 4.2, p. 53 y 54). Aunque según el análisis jerárquico de la varianza molecular este patrón de diferenciación representa tan sólo el 4,2% de toda la diversidad detectada en esos *loci* (Tabla 4.8, p. 52), genera una correlación positiva y significativa entre la distancia genética y la geográfica en todo el territorio. Tan sólo las localidades de Manyanet y Erta, y aquellas más influenciadas por las repoblaciones con ejemplares de origen centroeuropeo (Filià y Riutort) parecen escapar a este patrón. Esta estructuración entre las cuencas no ha sido descrita anteriormente en las poblaciones mediterráneas de la especie, pero resulta habitual en las poblaciones anádromas de la cuenca atlántica (Ruzzante *et al.* 2001; Morán *et al.* 1995a; Bouza *et al.* 1999; Ayllón *et al.* 2006; Campos *et al.* 2007). En las poblaciones anádromas de trucha común, esta estructura hidrográfica es el resultado de los diferentes niveles de flujo génico existente entre las poblaciones dentro y entre ríos (Morán *et al.* 1995a; Hansen y Mensberg 1998; Carlsson *et al.* 1999; Ruzzante *et al.* 2001; Hansen *et al.* 2002), por lo que cabe suponer la existencia de contactos entre las cuencas del Pirineo en tiempos pasados. Esta diferenciación entre las cuencas del Pirineo ya se intuía en los análisis con DNAm llevados a cabo por Vera (2006), donde los AMOVAs jerárquicos entre los diferentes afluentes del Ebro indicaron que el 23% de la diversidad mitocondrial representaba diferencias entre esos afluentes. No obstante, esos estudios con DNAm indicaron que la asociación principal entre las localidades obedece a la abundancia relativa de los linajes AD y ME.

El aislamiento postglacial ocurrido entre las diferentes cuencas del Pirineo catalán seguramente es el responsable de la presencia de alelos singulares en cada una de ellas. Sin embargo, los procesos históricos que afectaron a las cuencas durante las glaciaciones del Cuaternario también podrían explicar una parte de la diferenciación observada entre las poblaciones de trucha en estas cuencas del Pirineo catalán. Durante el periodo de máxima extensión de los hielos las poblaciones de trucha se situaban

5. Discusión

aguas abajo de las zonas actuales (Muñoz y Casadevall 1997) lo que seguramente favoreció el flujo génico entre los diferentes tributarios de una cuenca. Además, parte de la cadena pirenaica quedó cubierta por un continuo de glaciares (Bianco 1990). Según los datos recogidos en el Mapa Geológico del Cuaternario de los Pirineos (IGME 2009) en esta zona de hielos continuos estaban incluidas las cabeceras de los ríos Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana por lo que las poblaciones de trucha actuales son por tanto de colonización postglacial. Estudios realizados en poblaciones de trucha común introducidas en territorios vírgenes, como son las Islas Kerguelen situadas en la región subantártica, indican la rápida diferenciación genética de las poblaciones situadas entre ríos vecinos en escasamente 20 años (4 generaciones) (Ayllon *et al.* 2006). Las cabeceras de los ríos Ter y Llobregat quedaron sin embargo excluidas de la zona continua de hielos y por consiguiente sus poblaciones se habrían mantenido durante el periodo glacial. De esta manera no es de extrañar que el nivel de diferenciación detectado entre los dos afluentes del Ter ($F_{ST} = 0,354$, Tabla 4.8, p. 52) sea superior al observado en las cuencas de la Noguera Pallaresa ($F_{CT} = 0,039$, Tabla 4.8) o Noguera Ribagorzana ($F_{CT} = 0,136$, Tabla 4.8). Análisis previos basados en DNAmT han mostrado la coexistencia de los linajes AD y ME en todas las cuencas del territorio excepto en la del Llobregat (Vera 2006). Además, en esta cuenca se detecta un clado del linaje ME altamente diferenciado respecto del resto de clados del linaje (Vera 2006), lo que indicaría una alta singularidad de las poblaciones de trucha en este río.

5.4. EL EFECTO DE LAS REPOBLACIONES EN LA DIVERSIDAD POBLACIONAL.

Desde finales del siglo XIX se llevan realizando repoblaciones de trucha común en los ríos de la Península Ibérica (Muñoz 1988). En general, se ha observado que el éxito de estas repoblaciones es mayor en las poblaciones residentes (Almodóvar *et al.* 2006). En las poblaciones residentes de trucha común del norte de Europa también se observa una mayor hibridación con los estocs utilizados en la repoblación (Hansen *et al.* 2000; Ruzzante *et al.* 2004). Se cree que las complejas adaptaciones que presentan las poblaciones anádromas de la especie para poder desarrollar su ciclo de vida completo podrían protegerlas en cierto grado de estas hibridaciones (Utter 2001; Ruzzante *et al.* 2004).

Los ejemplares de trucha común utilizados para repoblar las poblaciones naturales del Pirineo catalán pertenecen al linaje AT, genéticamente muy diferente de los linajes nativos ME y AD existentes en las poblaciones de la zona (Cortey *et al.* 2004). Estas repoblaciones fueron realizadas durante muchos años a partir de un único estoc

originario de centroeuropa y mantenido básicamente en el centro piscícola de Bagà (García-Marín *et al.* 1998). En los últimos años, con la creación de la figura de gestión de las reservas genéticas, se ha reducido la suelta de ejemplares en buena parte de las cabeceras de los ríos del territorio (Araguas *et al.* 2008).

Diversos estudios han intentado evaluar el grado de introgresión de las poblaciones mediterráneas en los últimos años (Poteaux *et al.* 1998a; Berrebi *et al.* 2000; Sanz *et al.* 2002, Araguas *et al.* 2004; Aparicio *et al.* 2005; Almodóvar *et al.* 2006; Sanz *et al.* 2006; Vera 2006; Araguas *et al.* 2008). A pesar de los diferentes marcadores utilizados (*DNAmt*, alozimas o microsatélites), los trabajos coinciden en señalar tanto evidencias de introgresión en la mayor parte de las localidades estudiadas, como el desigual éxito de las sueltas entre las localidades pertenecientes a una misma cuenca o región (García-Marín *et al.* 1998; Poteaux *et al.* 1998a; Poteaux *et al.* 2001; Sanz *et al.* 2002; Araguas *et al.* 2004, 2008; Vera 2006). Por ejemplo, en el año 2006, tan sólo 3 (Vallter, Ermita y Erta) de las 13 localidades estudiadas en este trabajo pueden considerarse como compuestas por ejemplares nativos (Fig. 4.6, p. 60 y 61), lo que confirma un elevado porcentaje de localidades con indicios de introgresión (77%) en la zona de estudio, pero dentro del rango descrito en estudios previos alozímicos (65 - 89%, Araguas *et al.* 2004; 2008; Aparicio *et al.* 2005). Estos valores son claramente superiores a los detectados mediante el análisis del *DNAmt* en la zona (29%, Vera 2006). Las discrepancias entre los resultados obtenidos con *DNAmt* y a partir de genes nucleares son habituales en estudios de poblaciones de trucha común de la vertiente mediterránea (Sanz *et al.* 2006; Poteaux *et al.* 1998b, 2001), así como en algunas poblaciones atlánticas (Hansen *et al.* 2000; Mezzera y Largiader 2001) y sugieren la conveniencia de usar los marcadores nucleares para el estudio del efecto de las repoblaciones.

A pesar del elevado porcentaje de muestras con indicios de introgresión, la mayor parte de los ejemplares capturados o eran nativos o presentaban una alta proporción de genoma nativo (Fig. 4.6, p. 60 y 61). El nivel medio de introgresión en las localidades fue del 6% en el año 2006 (Tabla 4.12, p. 62) y únicamente las localidades de Filià y Riutort presentaron valores de introgresión muy por encima de ese valor medio (30%), resultado ya sugerido en estudios anteriores (Araguas *et al.* 2004, 2008; Aparicio *et al.* 2005; Vera 2006). En este sentido se puede destacar también que mientras en 1993 se observaba una correlación positiva entre la diversidad génica de las localidades y su grado de introgresión ($r = 0,627$, $P = 0,039$), esa correlación desaparece en las muestras obtenidas en 2006 ($r = 0,504$, $P = 0,079$). En el Pirineo catalán, como consecuencia de la creación de las reservas genéticas desde el año 1997 y el aumento de las zonas de pesca sin muerte, ha disminuido el número de ejemplares liberados desde los centros

5. Discusión

piscícolas (Araguas *et al.* 2009). Diferentes trabajos proponen que en las poblaciones naturales de trucha común, tras el cese de las repoblaciones se reducen progresivamente las frecuencias de los alelos introducidos por la repoblación debido a procesos de selección en contra de los ejemplares portadores (Poteaux *et al.* 1998a; Hansen *et al.* 2000). Estos procesos selectivos podrían estar relacionados con propiedades de los ejemplares procedentes de centros piscícolas tales como un crecimiento más lento, o unas menores tasas de fecundidad y de supervivencia, que les hacen estar menos adaptados a las características locales (Hansen *et al.* 1995; Almodovar *et al.* 2001; Ruzzante *et al.* 2004). La disminución de los alelos de repoblación también podría ser consecuencia de los efectos de la deriva genética.

5.5. ESTABILIDAD TEMPORAL DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA E INCIDENCIA DE LAS REPOBLACIONES.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la diversidad genética de las poblaciones de salmónidos suele permanecer estable a lo largo del tiempo (Morán *et al.* 1995; Carlsson *et al.* 1999; Nielsen *et al.* 1999; Tesier y Bernatchez 1999; Hansen 2002; Laikre *et al.* 2002; Palm *et al.* 2003; Ayllón *et al.* 2006; Campos *et al.* 2007) y que las fluctuaciones temporales suelen ser menos relevantes que la estructura espacial (Hansen 2002; Nielsen *et al.* 1999). Este patrón se detecta habitualmente en aquellas localidades constituidas por un elevado número de ejemplares que limitan los efectos de la deriva genética y de la migración (Frankham 1995b). En otras situaciones se ha detectado que las poblaciones de salmónidos presentan fluctuaciones significativas de las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo. Por ejemplo, Jorde y Ryman (1996) detectaron cambios alélicos entre muestras recogidas con 15 años de separación en poblaciones suecas de trucha común y que atribuyeron a la intensa deriva génica consecuencia del reducido tamaño efectivo de las poblaciones analizadas. Procesos similares se detectaron en las poblaciones danesas del lago Hald en un periodo de 13 años (Jensen *et al.* 2005). Algunos autores consideran que esas fluctuaciones temporales en los patrones de diversidad responden a una inestabilidad de las poblaciones de trucha común como reflejo de la inestabilidad de su hábitat. En tales situaciones, los cambios genéticos reflejarían tanto los procesos de deriva genética relativos al reducido número de efectivos como los efectos fundadores asociados a extinciones locales y la posterior recolonización del área por parte de las poblaciones adyacentes que sobreviven a los periodos adversos (Laikre *et al.* 2002; Ostergaard *et al.* 2003).

Los análisis realizados hasta el momento en las poblaciones mediterráneas del Pirineo catalán a partir de alozimas y DNAm indicaron la existencia de fluctuaciones temporales

significativas en las frecuencias alélicas de la mayor parte de las localidades de esta región a medio plazo (Araguas *et al.* 2004; Vera 2006). Esos estudios mostraron que los cambios afectaban básicamente a alelos o haplotipos nativos y sólo en casos puntuales se observan variaciones en los niveles de introgresión. Sin embargo, en la vertiente francesa del Pirineo se ha observado como la introgresión de genoma procedente de repoblación actúa como el principal factor responsable de la estructura poblacional (Berrebi *et al.* 2000). La presencia de genes exógenos ha provocado la desaparición del patrón nativo de estructuración genética de estas poblaciones. Un efecto similar se estaba produciendo en las poblaciones del Pirineo catalán entre 1993 y 1996, con un aumento del 50% en la tasa media de introgresión y una reducción significativa de la diferenciación entre poblaciones, de 0,396 a 0,287 (Araguas *et al.* 2004). La tasa media de introgresión estimada en 2006 parece ser inferior a la estimada en 1993 (Tabla 4.12, p. 62), sin embargo es evidente una reducción de la diferenciación entre localidades entre 1993 y 2004 (Tabla 4.10, p. 58). Las poblaciones de Riutort y Filià, altamente introgresadas, aparecen claramente asociadas a la muestra del centro piscícola de Bagà (Fig. 4.1, 4.2 y 4.3, p. 53, 54 y 55) y aunque las muestras de Conangles, Cavallers y Nicolau de la cuenca de la Ribagorzana se encuentran afectadas por las repoblaciones, en ellas la presencia de ejemplares híbridos es inferior y por eso, las poblaciones de trucha de la Noguera Ribagorzana conservan aun entidad propia. Las repoblaciones apenas han afectado la estructura poblacional de la cuenca del Ter y de la N. Pallaresa en la zona del presente estudio, ambas cuencas mantienen sólidas poblaciones nativas.

Las alteraciones temporales en la composición genética entre 1993 y 2006 en 8 de las 10 localidades analizadas en este trabajo están de acuerdo con las observaciones previas en esta zona del Pirineo catalán (Araguas *et al.* 2004; Vera 2006). Aunque hay cambios locales significativos, no se ha producido una alteración sustancial de la estructura poblacional de la trucha común en el conjunto del territorio (Tabla 4.9, p. 58) y sólo en 3 localidades se han detectado modificaciones en el nivel de introgresión (Tabla 4.12, p. 62). Los estudios con alozimas (Araguas *et al.* 2004) o DNAmT (Vera 2006) habían sugerido una tendencia a la homogenización entre las poblaciones de todo el Pirineo catalán debida al impacto de las repoblaciones desde un único estoc originario del centro piscícola de Bagà. En el presente trabajo con *loci* microsatélites, los cambios detectados sugieren tan sólo una pequeña alteración del patrón espacial de diversidad mediante la reducción de la diferenciación entre las poblaciones dentro de cuencas (F_{SC}) (Tabla 4.10, p. 58). Esta tendencia a la homogeneización entre las localidades de la misma cuenca, en un contexto en el que se mantiene la diferenciación entre las cuencas, sugiere que

5. Discusión

procesos locales y no solo la repoblación común desde el centro piscícola de Bagà, son responsables de los cambios detectados.

A medio plazo, dos o tres generaciones (1993 - 2004), la mayoría de las localidades mostraron cambios significativos mientras que fueron menores las significaciones obtenidas de las comparaciones a corto plazo (2004 - 2006), donde únicamente 4 de las 11 localidades monitorizadas (Vallter, Manyanet, Filià y Cavallers) presentaron cambios significativos. En Manyanet, la muestra de 2004 detectó ejemplares de repoblación que habían desaparecido en 2006 (Fig. 4.6, p. 60 y 61), parece acertado considerar que en este caso los resultados indicarían la introducción de ejemplares de repoblación en 2004.

Las repoblaciones efectuadas en el Pirineo catalán no parecen ser por tanto las principales responsables de los cambios génicos ocurridos en las localidades estudiadas. Tan sólo en Nuria, Riutort y Tor, se observan aumentos en los niveles de introgresión, básicamente producidos con anterioridad al año 2004 (Fig. 4.6, p. 60 y 61). De hecho, algunos resultados sugieren que el valor medio de introgresión en las poblaciones del Pirineo catalán podrían estar disminuyendo en los últimos años (Tabla 4.12, p. 62; Araguas *et al.* 2008).

Los análisis previos relacionaron los cambios temporales de diversidad génica en las localidades de la zona estudiada con la pérdida de alelos consecuencia de la deriva genética (Araguas *et al.* 2004), tal y como se ha descrito también en otras poblaciones mediterráneas de la especie (Apostolidis *et al.* 1996; Berrebi *et al.* 2000; Sanz *et al.* 2002). Sin embargo, en la mayor parte de las muestras analizadas en este trabajo, los datos con microsatélites no han detectado una reducción de la diversidad genética. De hecho, los niveles de diversidad genética se han mantenido en el tiempo o incluso aumentaron en algún caso (Tabla 5.3).

El trabajo de Vera (2006) atribuyó los cambios temporales de haplotipos nativos ocurridos en algunas poblaciones del territorio a las migraciones entre afluentes cercanos. En este sentido, los cambios temporales en la composición genética de las poblaciones del Pirineo podrían estar causados por un intercambio de ejemplares entre afluentes cercanos. Así, los cambios podrían ser explicados por los mecanismos que controlan y alteran el flujo génico entre las poblaciones dentro del sistema hídrico, que pueden responder a situaciones de inestabilidad ambiental o fluctuaciones demográficas en las poblaciones (Palstra *et al.* 2007). A diferencia de aquello que se observa en ríos con caudales estables, las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán, y en general todas aquellas en ríos mediterráneos, presentarían una estructura microgeográfica compuesta por un sistema dinámico de pequeños demos interconectados con un elevado

potencial de flujo génico (Vera 2006; Vera *et al.* 2010; Sanz *et al.* 2011), tal y como se había propuesto para poblaciones que ocupan hábitats inestables en el norte de Europa (Laikre *et al.* 2002; Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005) y de la Península Ibérica (Ayllon *et al.* 2006). No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo no encajan perfectamente con los resultados esperables bajo dicho patrón. En primer lugar, las bajas estimas de flujo génico dentro de las cuencas (Figura 4.5, p. 56 y 57) no se corresponden con el dinamismo esperado de la estructuración poblacional sugerida para hábitats inestables (Laikre *et al.* 2002; Østergaard *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2005, Ayllon *et al.* 2006). En segundo lugar, en hábitats inestables la componente temporal de diferenciación superaba notablemente a la componente espacial (Ostergaard *et al.* 2003; Jensen *et al.* 2005), situación contraria a la observada para las poblaciones del Pirineo. Sin embargo no se puede descartar que tal estructura exista a pequeña escala geográfica, de tan sólo unos pocos Km. A esa escala se justificaría la poca diferenciación entre las localidades de Ermita y Palomera en la Vallferrera. También en esa situación el flujo génico entre localidades relativamente próximas pero de diferentes afluentes sólo ocurriría de manera puntual, como por ejemplo entre la Noguera de Vallferrera y la Noguera de Cardós. Seguramente estos contactos puntuales se producen con posterioridad a situaciones de extrema inestabilidad ambiental que quizás no se han producido durante el periodo de estudio. En este sentido, quizás las condiciones del medio en el Pirineo catalán durante el periodo estudiado no habrían sido tan extremas como las descritas en Ostergaard *et al.* (2003).

Tabla 5.3. Evolución de la diversidad genética para cada una de las localidades analizadas en el Pirineo catalán.

<i>Localidades</i>	<i>1993</i>		<i>2004</i>		<i>2006</i>	
	<i>N_a</i>	<i>H_e</i>	<i>N_a</i>	<i>H_e</i>	<i>N_a</i>	<i>H_e</i>
Vallter	3,11	0,440	3,67	0,445	3,33	0,393
Nuria	3,22	0,463	5,22	0,511	6,44	0,529
Riutort	3,78	0,391	4,11	0,606	6,22	0,630
Pla de Boet	2,78	0,639	4,00	0,664	-	-
Palomera	-	-	5,89	0,661	6,78	0,664
Ermita	-	-	6,00	0,627	6,78	0,663
Tor	3,11	0,408	-	-	4,89	0,421
Ainet	6,78	0,638	7,11	0,675	8,00	0,666
Manyanet	4,22	0,614	4,67	0,581	5,56	0,594
Filià	7,11	0,778	6,22	0,709	8,44	0,769
Conangles	4,22	0,550	4,78	0,455	5,56	0,484
Cavallers	4,11	0,381	5,11	0,532	5,33	0,536
Nicolau	5,00	0,563	4,11	0,524	5,56	0,555
Erta	-	-	-	-	3,89	0,455
PROMEDIO	4,31	0,533	5,33	0,578	5,91	0,566

5.6. DEMOGRAFÍA GENÉTICA.

5.6.1. Estructura de edades.

Las poblaciones de trucha común de los ríos españoles presentan importantes variaciones en la longitud media de las clases de edad (Lobón-Cerviá *et al.* 1997; Nicola y Almodóvar 2002; Almodóvar y Nicola 2004) ya que el crecimiento de los ejemplares está influenciado por un elevado número de factores ambientales (Nicola y Almodóvar 2004; Lobón-Cerviá y Mortensen 2005; Rocaspana 2006). El análisis de la estructura de edades de las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán analizadas en este trabajo coincide con estas observaciones y con las realizadas previamente en la región pirenaica por Rocaspana (2006). Este trabajo determinó que no era posible establecer una única longitud por clase de edad debido a los diferentes factores locales que influían el crecimiento. Por ejemplo, este autor detectó una correlación negativa y significativa entre la altitud y el tamaño de la cohorte 3+, pero la regresión simple entre ambos parámetros únicamente explicaba un 53,79% de la variabilidad del tamaño medio de esta clase de edad. En general, la altitud se relaciona con la temperatura del agua, de tal manera que a mayor altitud, menor temperatura del aire y del agua, condiciones en las que las truchas presentan una menor actividad metabólica (Hunter *et al.* 1991; Heggenes *et al.* 1993). Las muestras de Rocaspana (2006) presentaban una clina de tamaño de la clase 3+ a 1200 m de altitud, que no ha sido detectada en este trabajo, ya que la correlación entre las variables altitud y longitud media de los ejemplares de la clase 3+ aunque negativa, no ha resultado significativa ($P = 0,185$). Resultados análogos fueron obtenidos para las clases de edad 1+ y 2+. En su análisis, Rocaspana (2006) también observó que en los puntos de menor crecimiento de la clase 3+ la conductividad del agua era inferior a 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$, valores característicos de aguas muy oligotróficas y poco productivas por tener una baja concentración de sales y nutrientes.

En la mayor parte de las muestras capturadas en el año 2006, se detectó la presencia de las cohortes comprendidas entre las clases 0+ y 3+, sin embargo se observaron diferencias en la representatividad de las mismas. Así por ejemplo, frente a la elevada presencia (> 65%) de ejemplares pertenecientes a la cohorte 1+ en las muestras de Manyanet, Nuria y Erta destacó la escasa presencia de esta cohorte (< 25%) en Filià, Vallter y Cavallers. Lo mismo ocurrió respecto a las clases de mayor tamaño, la alta representatividad de la clase 3+ (> 30%) en Ainet, Filià, Vallter y Tor contrastó con la escasez de la misma en muestras como Manyanet y Nuria. Estas diferencias podrían relacionarse con la existencia de hábitats más o menos propicios para determinadas clases de edad en cada una de las localidades muestreadas (Milner *et al.* 2003).

La cohorte 0+ es a menudo de difícil captura con el equipo de pesca eléctrica empleado (Borgstrom y Skaala 1993), lo que justificaría la baja presencia de ejemplares 0+ en algunas muestras. Sin embargo en otras localidades la baja presencia de la cohorte 0+ podría indicar problemas puntuales de reclutamiento en esas poblaciones para ese año (Lobón-Cerviá 2009a). De igual forma, podemos suponer problemas puntuales de reclutamiento en aquellas localidades donde se ha detectado una baja proporción de ejemplares 1+ en relación a los detectados para la 2+ o 3+ (Riutort, Fig. 4.7, p. 63; Cavallers, Fig. 4.8, p. 65), o de la 2+ en función de lo observado para la 3+ (Palomera, Filià y Conangles, Fig. 4.8, p. 65).

En la mayoría de las muestras del año 2006 había una escasez de ejemplares de tamaño superior a los 21 cm, la talla mínima de captura establecida por el reglamento de pesca en el territorio catalán. Resultados similares ya habían sido descritos previamente en algunos ríos de la zona por Prat *et al.* (2007). La poca representatividad de ejemplares de gran tamaño en las muestras puede ser debida al método de muestreo utilizado, ya que estos ejemplares suelen ocupar las zonas más profundas del cauce del río (Elliot 1994; Gowan *et al.* 1994), de difícil acceso con el equipo portátil de pesca eléctrica utilizado. Sin embargo, esta situación podría responder también a la mortalidad adicional de los ejemplares adultos debido a la actividad pesquera (Reyes-Gavilán *et al.* 1995; Almodóvar y Nicola 2004). En algunas poblaciones españolas de trucha común la pesca recreativa ha provocado la reducción en la edad media de los ejemplares de las poblaciones y del número de ejemplares que superan el tamaño mínimo en secciones explotadas (Almodóvar y Nicola 2004). Como consecuencia, en esas poblaciones son pocos los ejemplares sustraídos del río que han tenido la oportunidad de reproducirse. Por ejemplo, el análisis de la estructura de edades realizado por Prat *et al.* (2007) en ríos pertenecientes a la cuenca de la Noguera del Cardós (Noguera Pallaresa) atribuyó la escasez de ejemplares de tallas superiores a los 21 cm a la excesiva presión de pesca ejercida en las poblaciones naturales de la especie. Sin embargo, esa situación no debería afectar en gran medida a las poblaciones de alta montaña del Pirineo catalán ya que diferentes trabajos señalan que la madurez sexual ocurre durante el tercer año de vida, que se corresponde con la cohorte 2+ (Rocaspana 2006). Así, la mayor parte de los ejemplares que alcanzan la talla mínima de pesca en los ríos de la región son de las cohortes 3+ o 4+, y como mínimo han participado ya en una temporada de puesta.

5.6.2. Tamaño efectivo de las poblaciones.

Aunque las estimas de tamaño efectivo de las poblaciones de trucha común analizadas en este trabajo difirieron en función de la aproximación de cálculo aplicada

5. Discusión

(Tablas 4.13 y 4.14, p. 67), en general se obtuvieron patrones bastante concordantes entre ellas y ninguno de los procedimientos utilizados parece suministrar valores substancialmente mayores o menores respecto a los demás. Diferentes estudios han valorado el comportamiento de los procedimientos de cálculo de N_e en diferentes situaciones. Así, señalan que las estimas de N_e obtenidas mediante procedimientos de máxima verosimilitud resultan similares a las observadas mediante el método temporal estándar (W_{89} y NyT) tan sólo en el caso de que las frecuencias alélicas de la población sean moderadas. Cuando hay muchos alelos con frecuencias bajas, las estimaciones de N_e basadas en procedimientos de máxima verosimilitud suelen ser más precisas (Berthier *et al.* 2002; Tallmon *et al.* 2004; Palstra y Ruzzante 2008). Sin embargo, los métodos de máxima verosimilitud pueden generar infraestimaciones cuando la muestra a analizar está constituida por un escaso número de ejemplares (< 50), ya que no incorporan una corrección explícita para el tamaño muestral (Berthier *et al.* 2002; Palstra y Ruzzante 2008). Entre las muestras analizadas del Pirineo catalán hay diferencias respecto al número de alelos a baja frecuencia y en los tamaños muestrales, así que estos factores podrían incidir en la precisión de las estimas obtenidas por los distintos métodos temporales. Estudios previos en poblaciones peninsulares de truchas (Vera 2006) y salmones (Borrell *et al.* 2008) sugieren que los procedimientos basados en máxima verosimilitud suministran las mayores estimas de N_e . Tampoco se observan diferencias sustanciales entre las estimas de N_e obtenidas por los métodos temporales y las suministradas por el método del desequilibrio de ligamiento (LD). Aunque algunos autores han descrito discrepancias entre los N_e estimados a partir de métodos temporales y del método de desequilibrio de ligamiento (Hutchison y Templeton 1999; Whitlock y McCauley 1999; Palstra y Ruzzante 2008), si las poblaciones se mantienen estables durante varias generaciones, las estimas obtenidas de ambas aproximaciones deberían coincidir.

Recientemente Waples y Yokota (2007) aconsejaron tener cierta precaución al interpretar las estimas de tamaños efectivos procedentes de metodologías temporales en especies que presentan generaciones solapadas debido a la dificultad de capturar la complejidad de la estructura de edades cuando se ajusta a un modelo de generaciones discretas. Este problema puede ser minimizado al aumentar el efecto de la deriva espaciando en el tiempo las réplicas temporales (Hauser *et al.* 2002). En este sentido podría ser que la señal de la deriva entre réplicas temporales separadas 5-10 generaciones fuese lo suficientemente fuerte como para minimizar el efecto de no considerar la estructura de edades de la población (Waples y Yokota 2007). El distanciamiento en unas 4 generaciones entre las réplicas temporales del presente estudio podría reducir esa

tendencia a la infraestimación del N_e debida al solapamiento de generaciones. En las muestras analizadas en el Pirineo, la mayor parte de los individuos capturados pertenecen a las cohortes 1+ y 2+ (Fig. 4.7 p. 63 y 4.8, p. 65). En consecuencia, los muestreos realizados en estas poblaciones reflejan principalmente las frecuencias alélicas del grupo de juveniles, situación que provoca una sobreestimación en la tasa de cambio genético y que genera la infraestima del N_e de las poblaciones (Waples y Yokota 2007). En este sentido, los resultados obtenidos (Tabla 4.13, p. 67) sugieren una mayor disparidad entre las estimas de las diferentes aproximaciones en aquellas localidades donde, según las muestras del 2006, hay una menor número de cohortes representadas (Nuria) y una menor variancia entre las estimas de tamaño efectivo en aquellos casos donde las clases adultas 3+ y 4+ están mejor representadas (Fig. 4.7 y 4.8).

Aunque los distintos procedimientos de cálculo han producido resultados diferentes en valor, las localidades de las cuencas interiores (Ter y Llobregat) presentan valores de N_e en torno a los 50 ejemplares. También en las poblaciones residentes de trucha común del norte de Europa se han observado estimas de N_e próximas a los 50 individuos. Por ejemplo, el rango de estimas de N_e detectado por Palm *et al.* (2003) en poblaciones aisladas del centro de Suecia se situaba entre los 19 y 48 ejemplares. Asimismo, Jensen *et al.* (2005) observaron estimas de N_e comprendidas entre los 24 - 79 al analizar réplicas temporales de 3 poblaciones de trucha común espaciadas 13 años y situadas en tres tributarios diferentes de un lago danés aislado por una presa del resto del sistema hidrológico. Sin embargo, los valores de N_e detectados en las localidades muestreadas en los afluentes del Ebro rondaban o superaban los 100 ejemplares. Estos resultados corroboran las estimas de N_e (aprox. 150 ejemplares) propuestas por Vera (2006) en el río Noguera de la Vallferrera, perteneciente a la cuenca de la Noguera Pallaresa. Estos valores de N_e destacan entre los descritos para poblaciones residentes europeas de la especie, pero son inferiores a los observados en diferentes poblaciones anádromas de trucha común del norte de Europa (185,3 – 430,8) (Hansen *et al.* 2002, 2007; Østergaard *et al.* 2003).

Los N_e estimados en las poblaciones del Pirineo no parecen asociarse con los niveles de diversidad genética de las poblaciones (Tabla 4.13 y 4.14, p. 67; Tabla 5.3, p. 91). Esta situación ha sido ya descrita en otras poblaciones residentes de la especie y generalmente se relaciona con la conectividad y el flujo génico entre localidades (Jorde y Ryman 1996; Heggenes *et al.* 2009). Los N_e de las poblaciones del Pirineo podrían estar infraestimados por el hecho de haber sido calculados sin tener en cuenta la migración de los ejemplares (Palstra y Ruzzante 2008). En una población, el aporte de diversidad debida a la migración puede contrarrestar el efecto de la deriva genética, por lo que la

5. Discusión

migración puede tener una importante repercusión en las estimas de N_e . Las estimas de los tamaños efectivos teniendo en cuenta el efecto del flujo génico entre localidades pueden ser calculadas en base al método temporal desarrollado por Wang y Whitlock (2003) que puede ser implementado en el programa MLNE 2.0. Sin embargo, el cálculo de las estimas de m por este programa asume que durante el periodo de tiempo analizado hay un flujo constante de individuos desde una población fuente hasta una población sumidero y que la distribución de las frecuencias alélicas de la población sumidero permanece estable durante el mismo. La dinámica de migración tipo fuente-sumidero no encaja con la estructura poblacional propuesta para las poblaciones de trucha común de la región (apartado 5.3; Vera *et al.* 2010) y por ello, en este trabajo se estimaron los tamaños efectivos sin tener en cuenta el efecto del flujo génico. Las consecuencias de ignorar el efecto de la inmigración dependen principalmente del tipo y de la magnitud de la propia migración (Wang y Whitlock 2003; Fraser *et al.* 2007a; Palstra y Ruzzante 2008). Si el intercambio de ejemplares entre poblaciones con una diferenciación genética moderada y significativa es intermitente, las estimas de N_e deberían estar infraestimadas, mientras que si el intercambio de individuos entre poblaciones es continuo y apenas muestran diferencias genéticas significativas, las estimas de N_e deberían estar sobreestimadas para estas localidades. Los análisis de flujo génico (apartado 5.3) sugieren que en las poblaciones de trucha del Pirineo sólo existe intercambio de ejemplares entre localidades próximas y dentro del mismo tramo fluvial. De hecho, la estructura microgeográfica supuesta en este territorio y que consiste en un sistema dinámico de pequeños demos interconectados, parece ser la principal responsable de la composición genética de estas poblaciones (Vera *et al.* 2010; Sanz *et al.* 2011).

Las repoblaciones con ejemplares procedentes de centros piscícolas también han podido provocar cambios en las frecuencias alélicas en alguna de las poblaciones de la región y por tanto haber creado desequilibrios entre los *loci* que también conducen a infraestimar los tamaños efectivos (Araki *et al.* 2007b). Diferentes trabajos indican un menor éxito reproductor de los individuos de repoblación frente a los nativos (Araki *et al.* 2007a, 2008, 2009; Mclean *et al.* 2008; Theriault *et al.* 2011), lo que hace aumentar la varianza del número de ejemplares que componen las familias de peces y la consecuente reducción del tamaño efectivo de la población (Frankham *et al.* 2002). Esta situación observada en diferentes especies de salmónidos (Hedrick *et al.* 2000; Araki *et al.* 2007a; 2009; Mclean *et al.* 2008) podría explicar los bajos valores de N_e detectados en las muestras de Filià, Riutort y Pla de Boet, que presentan valores elevados de introgresión.

Diferentes autores estiman que las poblaciones naturales deben tener un tamaño efectivo mínimo de 50 individuos para minimizar el efecto de la depresión consanguínea y de 500 ejemplares para mantener la viabilidad de dicha población a largo plazo (Hedrick y Miller 1992; Franklin y Frankham 1998). Las estimas de tamaño efectivo en las poblaciones del Pirineo catalán analizadas en este trabajo sugieren que ninguna de ellas tendría suficiente potencial evolutivo para garantizar su conservación a largo plazo.

5.6.3. Análisis de las relaciones familiares.

En las poblaciones de trucha del Pirineo catalán no se han detectado valores elevados de consanguinidad. Sorprende este resultado porque en poblaciones de tamaño reducido cabe esperar que ocurran apareamientos entre ejemplares emparentados que conlleven al aumento progresivo de los niveles de consanguinidad (Frankham *et al.* 2002; Wright *et al.* 2008). El reducido tamaño efectivo estimado para buena parte de las poblaciones de trucha del Pirineo catalán encaja dentro de esta situación y por lo tanto, cabría esperar que los niveles de consanguinidad y parentesco entre los individuos de estas poblaciones fueran superiores a los estimados en simulaciones de individuos no emparentados. Además, algunos autores han observado el comportamiento gregario de grupos familiares de trucha común en tramos cortos de río (Hansen *et al.* 1997). El trabajo de Hansen y Jensen (2005) relacionó los bajos valores de parentesco en muestras constituidas por mezcla de cohortes (1+, 2+ y 3+) con la participación de diferentes progenitores para cada una de las cohortes de la muestra, particularmente cuando hay evidencias de episodios recientes de cuello de botella. En el caso de las muestras del Pirineo, sin embargo, el análisis realizado minimizaría el efecto de posibles diferencias entre las cohortes de la muestra ya que únicamente se han utilizado ejemplares juveniles de las cohortes 1+ y 2+ capturados en el mismo muestreo. En este caso, sólo es posible una relación de hermanos o medio-hermanos, ya que es mínima la aportación paterna de la clase 2+ a la 1+ y la eliminación de los ejemplares adultos de la muestra evita las interferencias que su presencia puede provocar sobre las inferencias de las relaciones de fraternidad. Además, la exclusión de ejemplares 0+ minimiza el efecto de agrupación de individuos de la misma familia por emergencia de los nidos (Hansen *et al.* 1997; Vera *et al.* 2010). Finalmente, la falta de evidencias de recientes cuellos de botella y de fluctuaciones a corto plazo en la composición genética de la mayoría de las muestras del Pirineo, no apuntan a importantes diferencias genéticas entre las cohortes 1+ y 2+ de cada localidad.

En el Pirineo, los coeficientes individuales de consanguinidad no son significativamente diferentes de aquellos esperados en grupos simulados de ejemplares no emparentados.

5. Discusión

Este resultado sugiere la existencia de mecanismos encaminados a evitar situaciones de consanguinidad y a contrarrestar por tanto el reducido tamaño efectivo de algunas poblaciones. En multitud de especies existen diversos sistemas dirigidos a evitar situaciones de consanguinidad (revisiones Waldman y McKinnon 1993; Pusey y Wolf 1996). Así, por ejemplo, en peces se ha documentado la existencia de patrones de dispersión que separan parientes cercanos (Waldman y McKinnon 1993), el reconocimiento de parientes (Frommen y Bakker 2006), la formación de agrupaciones de individuos no emparentados (Buston *et al.* 2007) y los sistemas de apareamiento múltiple (Awise *et al.* 2002), como posibles mecanismos que permiten evitar los apareamientos consanguíneos. Concretamente en salmónidos se ha descrito la capacidad de identificar individuos emparentados del resto de congéneres y la existencia de comportamientos diferenciales basados en esta capacidad (Brown y Brown 1992, 1996; Ojanguren y Braña 1999), como puede ser la distribución de los individuos dentro de las poblaciones dependiendo del grado de parentesco (*kin distribution*) (Hansen *et al.* 1997; Carlsson *et al.* 2003). También se han observado otros mecanismos como los sistemas de paternidad múltiple (Martínez *et al.* 2000; García-Vazquez *et al.* 2001; Sanz *et al.* 2011) y diferentes estrategias reproductivas que pueden contribuir a disminuir el grado de consanguinidad de las poblaciones (Serbezov *et al.* 2010a).

En las localidades del Pirineo catalán, los valores de parentesco entre los individuos juveniles coinciden con la situación descrita en otras poblaciones naturales de trucha común. Así, la presencia de un elevado número de reproductores en una población podría dar lugar a un elevado número de familias formadas por un reducido número de ejemplares como consecuencia de los mecanismos de mortalidad dependientes de la densidad habituales en los ejemplares juveniles de la especie (Elliott 1994), particularmente en el caso de que la varianza de la mortalidad de las familias no fuese muy elevada (Carlsson *et al.* 2003). En determinadas localidades de los afluentes del Ebro (Palomera, Ermita, Ainet, Manyanet, Cavallers, Erta) los bajos valores de parentesco podrían responder a esta situación dibujada por Carlsson *et al.* (2003) ya que en ellas se aprecia un elevado número efectivo de reproductores (N_b) (Tabla 4.14, p. 67). La presencia de inmigrantes procedentes de las poblaciones próximas puede también reducir los valores de parentesco entre los individuos de una población (Ruzzante *et al.* 2001; Hansen y Jensen 2005). En las poblaciones del Pirineo se han sugerido movimientos de ejemplares entre poblaciones vecinas (apartado 4.6; Vera *et al.* 2010; Sanz *et al.* 2011). Estos movimientos posibilitan que ejemplares adultos de diferentes puntos del río puedan participar en las puestas de una determinada localidad. Recientemente, también se ha sugerido que los ejemplares adultos del sistema

hídrico Vallferrera-Cardós podrían realizar desplazamientos de hasta varios kilómetros (Vera *et al.* 2010).

En poblaciones anádromas de trucha común del norte de Europa, donde el tamaño efectivo es elevado, el nivel medio de consanguinidad individual supera al coeficiente poblacional de consanguinidad (Ruzzante *et al.* 2001). En esos casos, la diferencia entre el nivel medio de consanguinidad individual y el poblacional se relacionó con la mezcla de individuos diferenciados más que con una verdadera agrupación familiar de los mismos. La situación de las poblaciones anádromas danesas diverge notablemente de lo observado en las poblaciones del Pirineo catalán, a excepción de la muestra de Nuria. En esta localidad, la probable repoblación con ejemplares alóctonos en 2004 parece haber generado una estructuración de la población en dos grupos (nativo y repoblación) lo que genera valores de parentesco y fraternidad superiores a los esperados en la distribución aleatoria de los ejemplares. En salmones se ha constatado que los ejemplares criados en cautividad tienen un menor éxito reproductivo, así como también los ejemplares híbridos resultantes del cruce entre nativos y domésticos (Araki *et al.* 2006; Mclean *et al.* 2008). En esta localidad, como en Filia y Riutort, las familias más numerosas parecen estar construidas por ejemplares básicamente nativos. Un comportamiento cooperativo entre los congéneres nativos de la población, les permitiría tener una mayor supervivencia frente a los ejemplares de origen doméstico. Este tipo de comportamientos cooperativos entre ejemplares emparentados han sido descritos en diferentes poblaciones de la especie (Waldman *et al.* 1988; Fontaine y Dobson 1999; Carlsson y Carlsson 2002).

Otros factores como el tiempo de incubación, la ubicación de los nidos o el tamaño del huevo pueden afectar a la supervivencia en los primeros estadios del desarrollo (Lobón-Cerviá *et al.* 1997; Lobón-Cerviá 2000; Carlsson *et al.* 2003; Mclean *et al.* 2008) y por tanto al éxito de los individuos reproductores de la población (Araki *et al.* 2006; Mclean *et al.* 2008). En el caso de la muestra de Nuria las agrupaciones familiares parecían responder a su posible condición como zona de freza. En este sentido, en el tramo de río muestreado había gran abundancia de ejemplares de la cohorte 0+ y poca representación de ejemplares adultos (Fig. 4.7, p. 63). Además, esta muestra fue la única en donde los valores de parentesco entre individuos juveniles resultaron significativamente superiores a los de la simulación, indicando un exceso de agrupación de individuos emparentados. Esta estructuración parecía deberse a la permanencia de grupos familiares en las proximidades de la zona de freza y la baja dispersión de los ejemplares juveniles podría estar favorecida además por la presencia de un azud situado aguas abajo del tramo de río muestreado.

5. Discusión

El patrón de estructuración familiar en las poblaciones puede variar a escala espacial y temporal. Por ejemplo, en el aspecto espacial se ha observado que en poblaciones de trucha común del norte de Europa pertenecientes a la misma región, se detectan diferentes estructuras familiares, así mientras que en una de las poblaciones había una correlación negativa entre la distancia y el coeficiente de parentesco entre pares de individuos, en la otra no se detectó dicha correlación (Carlsson *et al.* 2003). En el aspecto temporal, Hansen y Jensen (2005) detectaron elevados valores de parentesco entre los ejemplares de trucha común de dos tributarios daneses, cuando entre los ejemplares de la muestra histórica de la zona, capturada 50 años antes, los valores eran muy bajos. En ocasiones, el patrón de parentesco y estructuración familiar puede diferir entre las cohortes de una misma muestra (Hansen *et al.* 1997; Ruzzante *et al.* 2001; Carlsson *et al.* 2003; Vera *et al.* 2010). Sin embargo, entre las muestras de juveniles de trucha común analizadas en el presente trabajo no se observan importantes diferencias en dichos patrones.

En poblaciones de salmónidos se ha observado que la variación en el tamaño de las familias es una de las principales causas que reducen su tamaño efectivo en relación al censo de la población (Araki *et al.* 2007b). Sin embargo, aunque con diferencias entre las cuencas, los valores de la varianza en el tamaño familiar que en general se detectan en las poblaciones pirenaicas de trucha común analizadas en este estudio, son bajos y, por tanto, no cabe esperar una disminución en los tamaños efectivos. La relación entre la varianza en la progenie (V_K) y el tamaño medio de las familias (K) puede ser interpretada en términos de éxito reproductor de los adultos. En poblaciones de salmónidos este valor es muy variable y en algunos ríos alcanza valores del orden de 17 como consecuencia del gran éxito reproductor de un reducido número de ejemplares (Araki *et al.* 2007b), siendo particularmente remarcable la elevada contribución de los machos de mayor tamaño en poblaciones residentes de trucha común (Serbezov *et al.* 2010a). Valores altos de la varianza sugieren también que una fracción notoria de los adultos podría no reproducirse durante la estación de puesta y por consiguiente, no contribuir al patrimonio genético de la siguiente generación (Frankham *et al.* 2002). La estima de esta fracción es imposible de conocer a partir de la simple asignación de juveniles a familias de hermanos y medio hermanos (Anderson *et al.* 2011). En general, los resultados de esta tesis en este aspecto deben ser valorados además bajo la precaución que impone el proceso de muestreo aplicado, restringido a una única muestra por localidad, en un limitado tramo de río y durante el periodo no reproductor. Aún así, el cociente V_K/K nos informa sobre el grado de agregación espacial de los miembros de las familias en la zona analizada. En las localidades con valores próximos a 1, la distribución del tamaño familiar en el punto

de muestreo se ajusta a la distribución de Poisson. En estos casos (cuencas internas de Cataluña: Ter y Llobregat) es por tanto probable encontrar tanto familias de pocos ejemplares como otras mucho más numerosas. Sin embargo, en las localidades donde el cociente se acerca a 0, la distribución del tamaño familiar es más uniforme, de manera que todas las familias tienen aproximadamente la misma representación en el punto de muestreo (cuenca del Ebro). En general, los resultados sugieren que en las clases 1+ y 2+ las familias tienden a disgregarse y poco a poco a expandirse a lo largo del tramo fluvial. Sin embargo, estudios en las poblaciones del Pirineo indican que el alcance de esa dispersión estaría reducido a unos pocos kilómetros desde las zonas de puesta (Vera *et al.* 2010).

5.7. DEMOGRAFÍA GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LA TRUCHA COMÚN EN EL PIRINEO CATALÁN.

Las cuencas estudiadas en el Pirineo catalán presentan diferencias tanto en el grado de estructura poblacional (F_{ST}), como en los tamaños efectivos (N_e) actuales estimados para sus poblaciones, como también en la estructura familiar (Tabla 5.4). Conocer hasta qué punto estas diferencias están relacionadas resulta complicado ya que estos parámetros pueden ser el resultado de procesos evolutivos ocurridos a diferentes escalas espacio-temporales.

Tabla 5.4. Principales características genéticas de las poblaciones de trucha común en las cuencas del Pirineo catalán. Diversidad génica (H_e); nivel de introgresión de genoma de repoblación (q); diferenciación interpoblacional (F_{ST}); tamaño efectivo (N_e); tamaño medio de las familias de hermanos completos (K); varianza en el tamaño de las familias (V_K). Los datos provienen de las tablas 4.6, 4.8, 4.12, 4.14 y de la figura 4.10.

		H_e	q	F_{ST}	N_e	K	V_K
Ter	Media:	0,461	0,009	0,354	51,6	2,17	1,96
	Rango:	0,393-0,529	0,002-0,019		49,5-53,7	2,00-2,34	1,88-2,04
Noguera	Media:	0,630	0,061	0,167	230,3	1,55	0,69
Pallaresa	Rango:	0,412-0,769	0,003-0,300		6,0-499,4	1,23-2,02	0,18-1,49
Noguera	Media:	0,508	0,035	0,388	107,2	1,93	0,94
Ribagorzana	Rango:	0,455-0,555	0,020-0,045		38,8-235,7	1,45-2,45	0,26-1,43

5. Discusión

La estructura poblacional de la trucha común del Pirineo catalán es el reflejo de su aislamiento y deriva postglacial (García-Marín *et al.* 1996; Sanz *et al.* 2002; Cortey *et al.* 2004; Vera 2006). En este sentido, las estimas de flujo génico obtenidas entre las localidades (Figura 4.5, p. 56 y 57) son por lo general reducidas en todo el territorio. Así, la mayor diferenciación detectada entre las poblaciones del Ter respecto a la observada entre las poblaciones de la Noguera Pallaresa podría ser el reflejo de los menores tamaños efectivos detectados en la primera cuenca. No obstante, esta relación entre la diferenciación y el tamaño efectivo no parece aplicable de forma general, ya que se han observado valores de diferenciación similares entre las poblaciones de la cuenca del Ter y de la Noguera Ribagorzana cuando en esta última cuenca las poblaciones presentan tamaños efectivos superiores (Tabla 5.4). Tampoco parece que la menor diferenciación entre las poblaciones de la Noguera Pallaresa sea el resultado de una mayor incidencia de las repoblaciones y su consecuente efecto homogeneizador ya que en esa cuenca, si se excluye la población de Filià, el efecto de las repoblaciones no es muy diferente al detectado en las otras cuencas. Además, las repoblaciones en la localidad de Filià han provocado su semejanza con el estoc del centro piscícola de Bagà y su diferenciación del resto de poblaciones de la cuenca (Fig. 4.1 y 4.2, p. 53 y 54).

Aunque estudios realizados en la cuenca del río Son indican una baja relación entre varianza en el tamaño familiar y tamaño efectivo en esa población del Pirineo catalán (Sanz *et al.* 2011), los resultados aquí obtenidos detectan mayores varianzas en las poblaciones donde los tamaños efectivos estimados son menores. De hecho se observa una correlación negativa entre el tamaño efectivo y la varianza en el tamaño de las familias. Sin embargo, los resultados también indican unos valores reducidos de varianza en todas las cuencas. Todo ello sugiere que la estrategia reproductora de las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán limita los efectos de la deriva. Los estudios clásicos sobre la relación entre el tamaño efectivo y la varianza en la progenie indican que a menor varianza mayores tamaños efectivos. Cuando el valor de la varianza está próximo a 2, como ocurre en las muestras de la cuenca del Ter, el tamaño efectivo de la población se ajusta bastante bien al censo reproductor, mientras que si el valor de la varianza se acerca a 0, como ocurre en muestras de la cuenca de la Noguera Pallaresa y de la Noguera Ribagorzana, el tamaño efectivo podría doblar al censo reproductor (Frankham *et al.* 2002).

En este trabajo no se ha encontrado ninguna relación significativa entre el tamaño efectivo de las poblaciones y su diversidad génica, aunque los valores de diversidad son más altos en las poblaciones de la Noguera Pallaresa, donde también son superiores los tamaños efectivos (Tabla 5.4). Tampoco se ha detectado asociación significativa entre los

valores de diversidad de las poblaciones y el tamaño o la varianza de las familias en las mismas.

Se ha sugerido que las poblaciones mediterráneas de trucha común están constituidas por pequeños demos interconectados que constituyen metapoblaciones (Vera 2006; Sanz *et al.* 2011). Los contactos entre estos demos favorecen el mantenimiento de los niveles de diversidad y limitan los efectos de la deriva, que puntualmente podría ser muy intensa dado el estiaje que presentan los ríos mediterráneos asociado a la climatología propia del territorio. La extensión espacial de cada uno de estos demos sería reducida, seguramente alcanzaría unos pocos kilómetros a lo largo de un mismo tramo fluvial y habría un elevado aislamiento entre los tributarios (apartado 5.3, Sanz *et al.* 2011). A pesar de las diferencias observadas, las distribuciones de los grupos familiares tanto en las cuencas interiores como en los afluentes del Ebro, favorecen la presencia de un gran número de familias a lo largo del tramo fluvial y, ante la posibilidad de que alguna sección del río se seque en la época estival, esta estrategia permitiría la supervivencia de una alta diversidad génica en cada uno de los tramos con agua, a partir de los cuales y en épocas favorables, se podrían recuperar las poblaciones de las zonas afectadas.

6. CONCLUSIONES

A continuación se detallan las principales conclusiones desprendidas de los resultados y la discusión de la presente tesis doctoral:

1. La batería de *loci* microsatélites desarrollada en este trabajo, compuesta por 2 reacciones *multiplex* y su lectura conjunta en el analizador genético, permite obtener de manera rápida y eficaz el genotipo de 9 *loci*. Este conjunto de *loci* resulta válido para analizar la diversidad genética, el grado de introgresión de genoma de repoblación y las relaciones familiares entre los ejemplares de las poblaciones de trucha común en el Pirineo catalán.
2. Las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán presentan una elevada diversidad intrapoblacional, no observada anteriormente en la zona a partir de alozimas y DNAmT.
3. El análisis con estos microsatélites revela una estructuración hidrográfica no detectada hasta el momento en las poblaciones mediterráneas de trucha común. Esta estructuración hidrográfica parece ser consecuencia del efecto de la última glaciación sobre la distribución de las poblaciones de trucha en los diferentes ríos analizados y del comportamiento diferencial de los agentes evolutivos dentro de cada cuenca tras la época glacial. La ausencia de glaciares en las cuencas internas de Cataluña (Ter y Llobregat) ha permitido la subsistencia de poblaciones durante un mayor periodo de tiempo, lo que ha favorecido su diferenciación. En las cuencas del Ebro (Noguera

6. Conclusiones

Pallaresa y Ribagorzana), la estructura poblacional parece ser el reflejo de las recolonizaciones y los contactos secundarios ocurridos tras la retracción de los hielos.

4. El flujo de individuos entre las poblaciones de trucha común del Pirineo catalán está limitado por la distancia hidrográfica y por otros factores hidrológicos y ambientales. Este aislamiento favorece la diferenciación de las poblaciones a nivel microgeográfico, de escasos kilómetros.

5. La mayoría de los ejemplares de las poblaciones del Pirineo tienen genotipos nativos. En consecuencia, las repoblaciones han tenido un escaso impacto en la estructuración población de la trucha en el Pirineo.

6. En la mayoría de localidades se ha detectado una pequeña pero significativa diferenciación en su constitución génica en el periodo 1993-2006. La deriva y el intercambio de ejemplares entre poblaciones próximas podrían ser los responsables de esas fluctuaciones a medio plazo en las frecuencias alélicas de las poblaciones.

7. Diversos factores locales parecen influir en el crecimiento de los ejemplares de trucha común de la región pirenaica analizada y no ha resultado posible establecer una única longitud para cada clase de edad. Además, la distribución de las clases de edad sugiere problemas puntuales de reclutamiento en algunas localidades.

8. Aunque los diferentes métodos de cálculo no coinciden en sus estimas, los tamaños efectivos en las cuencas internas de Cataluña se sitúan en torno a los 50 ejemplares, al igual que ocurre en otras poblaciones residentes europeas, mientras que para la mayor parte de las poblaciones de los afluentes del Ebro rondan o superan los 100 ejemplares. Estos valores indican que algunas poblaciones de trucha del Pirineo catalán podrían tener problemas para su conservación a largo plazo.

9. Los bajos niveles de consanguinidad y parentesco observados entre los ejemplares juveniles de las poblaciones del Pirineo sugieren la presencia de algún mecanismo que contrarresta el reducido tamaño efectivo de las poblaciones. En este sentido, la estrategia reproductiva de las poblaciones del Pirineo catalán parece encaminada a generar bajas varianzas en los tamaños familiares a nivel local para así limitar los efectos de la deriva.

10. Para el conjunto de poblaciones de trucha común del Pirineo catalán no se ha podido establecer un único patrón general que relacione los principales parámetros que definen la estructura poblacional y la demografía genética, probablemente debido a la complejidad local de los procesos evolutivos y a la diferente escala espacio-temporal en la que éstos han tenido lugar.

11. No obstante, los resultados encajan con la propuesta de Vera (2006) según la cual las poblaciones de trucha común del Pirineo se estructuran en metapoblaciones formadas por pequeños demos interconectados. De esta manera se mantienen los niveles de diversidad de las poblaciones y se limitan los efectos de la deriva genética en las mismas. La deriva e interconexión entre los demos podría explicar la inestabilidad temporal observada a medio plazo en algunas de las poblaciones de trucha del Pirineo. La interconexión de los demos favorece que un elevado número de reproductores participe en las puestas, principalmente en las poblaciones de los afluentes del Ebro.

7. REFERENCIAS

- Agència Catalana de l'Aigua. 2003. Desenvolupament d'un índex d'integritat biòtica (IBICAT) basat en l'ús dels peixos com indicadors de la qualitat ambiental dels rius a Catalunya. Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya.
- Agència Catalana de l'Aigua 2005 Caracterització de masses d'aigua i anàlisi del risc d'incompliment dels objectius de la Directiva Marc de l'Aigua (2000/60/CE) a Catalunya (conques intra i intercomunitàries) en compliment als articles 5, 6 i 7 de la Directiva. Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya.
- Alanärä, A., Burns, M.D., Metcalfe, N.B. 2001. Intraespecific resource partitioning in brown trout: the temporal distribution of foraging is determined by social rank. *J. Anim. Ecol.* 70: 980-986.
- Allendorf, F.W., Luikart, G. 2006. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, USA.
- Almodóvar, A., Suarez, J., Nicola, G.G., Nuevo, M. 2001. Genetics introgression between wild and stocked brown trout in Douro River basin, Spain. *J. Fish Biol.* 59 (Sup. A): 68-74.
- Almodóvar, A., Nicola, G.G. 2004. Angling impact on conservation of Spanish stream-dwelling brown trout *Salmo trutta*. *Fisheries Manag. Ecol.* 11: 173-182.
- Almodóvar, A., Nicola, G.G., Elvira, B., García-Marín, J.L. 2006. Introgression variability among Iberian brown trout Evolutionary Significant Units: The influence of local management and environmental features. *Freshw. Biol.* 51: 1175-1187.
- Anderson, J.H., Ward, E.J., Carlson, S.M. 2011. A Model for Estimating the Minimum Number of Offspring to Sample in Studies of Reproductive Success. *J. Hered.* Doi:10.1093/jhered/esr060.
- Antunes, A., Faria, R., Johnson, W.E., Guyomard, R., Alexandrino, P. 2006. Life on the Edge: The long-term persistence and contrasting spatial genetic structure of distinct brown trout life histories at their ecological limits. *J. Hered.* 93: 193-205.
- Aparicio, E., García-Berthou, E., Araguas, R.M., Martínez, P., García-Marín, J.L. 2005. Body pigmentation pattern to assess introgression by hatchery stocks in native *Salmo trutta* from Mediterranean streams. *J. Fish Biol.* 67: 931-949.
- Apostolidis, A. P., Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C. 1996. Genetic divergence and phylogenetic relationships among *Salmo trutta* L. (brown trout) populations from Greece and other European countries. *Heredity* 76: 551-560.

7. Referencias

- Apostolidis, A., Madeira, M.J., Hansen, M.M., Machordom, A. 2008. Genetic structure and demographic history of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the southern Balkans. *Fresw. Biol.* 53: 1555-1566.
- Araguas, R.M., Sanz, N., Pla, C., García-Marín, J.L. 2004. Breakdown of the brown trout evolutionary history due to hybridization between native and cultivated fish. *J. Fish Biol.* 6 (Supplement A): 28-37.
- Araguas, R.M., Sanz, N., Fernández, R., Utter, F.M., Pla, C., García-Marín, J.L. 2008. Genetic refuges for a self-sustained fishery: experience in wild brown trout populations in eastern Pyrenees. *Ecol. Fresw. Fish* 17: 610-616.
- Araguas, R.M., Sanz, N., Fernández, R., Utter, F.M., Pla, C., García-Marín, J.L. 2009. Role of Genetic Refuges in the Restoration of Native Gene Pools of Brown Trout. *Conserv. Biol.* 23: 871-878.
- Araki, H., Ardren, W.R., Olsen, E., Cooper, B., Blouin, M.S. 2007a. Reproductive Success of Captive-Bred Steelhead Trout in the Wild: Evaluation of Three Hatchery Programs in the Hood River. *Conserv. Biol.* 21: 181-190.
- Araki, H., Waples, R.S., Ardren, W.R., Cooper, B., Blouin, M.S. 2007b. Effective population size of steelhead trout: influence of variance in reproductive success, hatchery programs, and genetic compensation between life-history forms. *Mol. Ecol.* 16: 953-966.
- Araki, H., Berejikian, B.A., Ford, M.J., Blouin, M.S. 2008. Fitness of hatchery-reared salmonids in the wild. *Evol. Appl.* 1: 342-355.
- Araki, H., Blouin, M.S., Cooper, B. 2009. Carry-over effect of captive breeding reduces reproductive fitness of wild-born descendants in the wild. *Biol. Lett.* 5: 621-624.
- Arias, J., Sánchez, L., Martínez, P. 1995. Low stocking incidence in brown trout populations from north-western Spain monitored by LDH-5* diagnostic marker. *J. Fish Biol.* 47: 170-176.
- Aurelle, D., Cattaneo-Berrebi, G., Berrebi, P.L. 2002. Natural and artificial secondary contact in brown trout (*Salmo trutta*, L.) in the French western Pyrenees assessed by allozymes and microsatellites. *Heredity* 89: 171-183.
- Avise, J.C. 1989. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends Ecol. Evol.* 4: 279-281.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J.C., Jones, A.G., Walder, D., DeWoody, J.A. 2002. Genetic mating systems and reproductive natural histories of fishes: lesson for ecology and evolution. *Ann. Rev. Genet.* 36: 19-45.
- Ayllon, F., Moran, P., García-Vásquez, E. 2006. Maintenance of a small anadromous subpopulation of brown trout (*Salmo trutta* L.) by straying. *Freshw. Biol.* 51: 351-358.
- Bachman, R.A. 1984. Foraging behavior of free-ranging wild and hatchery brown trout in a stream. *T. Am. Fish. Soc.* 113: 1-32.
- Bekkevold, D., Hansen, M.M., Mensberg, K-L. D. 2004. Genetic detection of sex-specific dispersal in historical and contemporary populations of anadromous brown trout *Salmo trutta*. *Mol. Ecol.* 13: 1707-1712.
- Bernatchez, L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55: 351-379.
- Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Mol. Ecol.* 1: 161-173.
- Bernatchez, L., Duchesne, P. 2000. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 57: 1-12.
- Berrebi, P., Poteaux, C., Fissier, M., Cattaneo-Berrebi, G. 2000. Stocking impact and allozyme diversity in brown trout from Mediterranean southern France. *J. Fish Biol.* 56: 949-960.
- Berthier, P., Beaumont, M.A., Cornuet, J-M., Luikart G. 2002. Likelihood-based estimation of the effective population size using temporal changes in allele frequencies: a genealogical approach. *Genetics* 160: 741-751.
- Bianco, G. 1990. Potential role of the palaeohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 1: 167-184.
- Blanco, M.C. 1994. *La trucha: cria industrial*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Blanco, G., Cagigas, E., Vázquez, E., Sánchez, J. A. 1998. Genetic impact of introduced domesticated strain on Spanish native populations of brown trout (*Salmo trutta*). En: *Stocking and introduction of fish* (Cowx, I.G.). Blackwell, UK: p. 371-380.

- Blouin, M.S. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol. Evol.* 18: 503-511.
- Borgström, R., Skaala, Ø. 1993. Size-dependent catchability of brown trout and Atlantic salmon parr by electrofishing in a low conductivity stream. *Nord. J. Freshwater Res.* 68: 14-21.
- Borrel, Y.J., Bernado, D., Blanco, G., Vázquez, E., Sánchez, J.A. 2008. Spatial and temporal variation of genetic diversity and estimation of effective population size in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) populations from Asturias (Northern Spain) using microsatellites. *Conserv. Genet.* 9: 807-819.
- Bouza, C., Arias, J., Castro, J., Sánchez, L., Martínez, P. 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.
- Bremset, G. 2000. Seasonal and diel changes in behaviour, microhabitat use and preferences by young pool-dwelling Atlantic salmon, *Salmo salar*, and brown trout, *Salmo trutta*. *Environ. Biol. Fish.* 59: 163-179.
- Brown, G.E., Brown, J.A. 1992. Do rainbow trout and Atlantic salmon discriminate kin?. *Can. J. Zool.* 70: 1636-1640.
- Brown, G.E., Brown, J.A. 1996. Kin discrimination in salmonids. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 6: 201-219.
- Brunelli, J.P., Steele, C.A., Thorgaard, G.H. 2010. Deep divergence and apparent sex-biased dispersal revealed by a Y-linked marker in rainbow trout. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56: 983-990.
- Buston, P.M., Bogdanowicz, S.M., Wong, A., Harrison, R.G. 2007. Are clownfish groups composed of close relatives? An analysis of microsatellite DNA variation in *Amphiprion percula*. *Mol. Ecol.* 16: 3671-3678.
- Cagigas, M.E., Vázquez, E., Blanco, G., Sánchez, J.A. 1999. Genetic effects of introduced hatchery stocks on indigenous brown trout (*Salmo trutta* L.) populations in Spain. *Ecol. Freshw. Fish* 8: 141-150.
- Cairney, M., Taggart, J.B., Høyheim, B. 2000. Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) and cross-species amplification in other salmonids. *Mol. Ecol.* 9: 2155-2234.
- Campos, J.L., Posada, D., Morán, P. 2006. Genetic variation at MHC, mitochondrial and microsatellite loci in isolated populations of brown trout (*Salmo trutta*). *Conserv. Genet.* 7: 515-530.
- Campos, J.L., Posadas, D., Caballero, P., Morán, P. 2007. Spatio-temporal genetic variability in sea trout (*Salmo trutta*) populations from north-western Spain. *Freshw. Biol.* 52: 510-524.
- Carlsson, J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *J. Hered.* 99: 616-623.
- Carlsson, J., Olsén, K.H., Nilsson, J., Overli, O., Stabell, O.B. 1999. Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. *J. Fish Biol.* 55: 1290-1303.
- Carlsson, J., Nilsson, J. 2000. Population genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) within a northern boreal forest stream. *Hereditas* 132: 173-181.
- Carlsson, J., Carlsson, J.E.L. 2002. Micro-scale distribution of brown trout: an opportunity for kin selection?. *Ecol. Freshw. Fish* 11: 234-239.
- Carlsson, J., Carlsson, J.E.L., Olsen, K.H., Hansen, M.M., Eriksson, T., Nilsson, J. 2003. Kin-biased distribution in brown trout: an effect of redd location or kin recognition? *Heredity* 92: 53-60.
- Carlsson, J., Aarestrup, K., Nordwall, F., Näslund, I., Eriksson, T., Carlsson, J.E.L. 2004. Migration of landlocked brown trout in two Scandinavian streams as revealed from trap data. *Ecol. Freshw. Fish* 13: 161-167.
- Caughley, G. 1994. Directions in Conservation Biology. *J. Anim. Ecol.* 63: 215-244.
- Chapuis, M-P., Estoup, A. 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24: 621-631.
- Chistiakov, D., Hellemans, B., Volckaert, F.A.M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference in fish genetics. *Aquaculture* 255: 1-29.
- Clarke, G.M., Young, A.G. 2000. Introduction: genetics demography and the conservation of fragmented population. En: *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations* (Young A.G., Clarke G.M.). Cambridge University Press. UK: p. 1-6.
- Consuegra, S., García de Leániz, C. 2007. Fluctuating sex ratios, but no sex-biased dispersal, in a promiscuous fish. *Evol. Ecol.* 21: 229-245.
- Cornuet, J-M., Luikart, G. 1996. Description and evaluation of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Cortey, M., García-Marín, J.L. 2002. Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout. *J. Fish Biol.* 60: 1058-1063.

7. Referencias

- Cortey, M., Pla, C., García-Marín, J.L. 2004. Historical biogeography of mediterranean trout. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33: 831-844.
- Cortey, M., Vera, M., Pla, C., García-Marín, J.L. 2009. Northern and Southern expansions of Atlantic brown trout (*Salmo trutta*) populations during the Pleistocene. *Biol. J. Linn. Soc.* 97: 904-917.
- Corujo, M., Blanco, G., Vázquez, E., Sánchez, J.A. 2004. Genetic structure of northwestern Spanish brown trout (*Salmo trutta* L.) populations, differences between microsatellite and allozyme loci. *Hereditas* 141: 258-271.
- Costello, A.B., Down, T.E., Pollard, S.M., Pacas, C.J., Taylor, E. B. 2003. The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: an examination of microsatellite DNA variation in bull trout, *salvelinus confluentus* (Pisces: Salmonidae). *Evolution* 57: 328-344.
- Crisp, D.T. 1993. Population-densities of juvenile trout (*Salmo trutta*) in five upland streams and their effects upon growth, survival and dispersal. *J. Appl. Ecol.* 30: 759-771.
- Crow, J.F., Kimura, M. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper y Row Publishers, New York.
- Crozier, W.W., Moffatt, I.J.J. 1989. Experimental production of triploid brown trout, *Salmo trutta* L., using heat shock. *Aquac. Fish. Manag.* 20: 343-353.
- Cruz, F., Pérez, M., Presa, P. 2005. Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene* 346: 241-247.
- Cunjak, R.A., Power, G. 1986. Winter habitat utilization by stream resident brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and brown trout (*Salmo trutta*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 1970-1981.
- Dakin, E.E., Avise, J.C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.
- Dannewitz, J., Petersson, E., Prestegard, T., Järvi, T. 2003. Effects of sea-ranching and family background on fitness traits in brown trout *Salmo trutta* reared under near-natural conditions. *J. Appl. Ecol.* 40: 241-250.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garca, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M. 1994. Mutational processes of simple sequence repeats in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3168-3170.
- Dieringer, D., Schlötterer, C. 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data set. *Mol. Ecol. Notes* 3 (1): 167-169.
- Doadrio, I. 2001. *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid, Spain.
- Elliot, J.M. 1989. Wild brown trout, *Salmo trutta*: an important national and international resource. *Freshwater Biol.* 21: 1-5.
- Elliot, J.M. 1994. *Quantitative Ecology and the Brown trout*. Oxford University Press, Oxford.
- England, P.R., Cornuet, J.-M., Berthier, P., Tallmon, D.A., Luikart, G. 2006. Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. *Conserv. Genet.* 7: 303-308.
- Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D., Guyomard R. 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., Largiadier, C.R., Perrot, E., Chourrout, D. 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., Rousset, F., Michalakis, Y., Cournet, J.M., Adriamanga, M., Guyomard, R. 1998a. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Mol. Ecol.* 7: 339-353.
- Estoup, A., Gharbi, K., SanCristobal, M., Chevalet, C., Haffrey, P., Guyomard, R. 1998b. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 715-725.
- Estoup, A., Angers, B. 1998. Microsatellites and minisatellites for Molecular Ecology: theoretical and empirical considerations. En: *Advances in Molecular Ecology* (Carvalho, G.). IOS Press, Amsterdam: p. 55-86.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Department of Genetics, SK-50, University of Washington, Seattle, WA.
- 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., Taggart, J.B. 1991. Genetic differentiation among sympatric brown trout (*Salmo trutta*) in Loch Melvin, Ireland. *Biol. J. Linn. Soc.* 43: 221-237.
- Fontaine, P.M., Dobson, J.J. 1999. An analysis of the distribution of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in nature as a function of relatedness using microsatellites. *Mol. Ecol.* 8: 189-198.
- Frankham, R. 1995a. Inbreeding and Extinction: A Threshold Effect. *Conserv. Biol.* 9: 792-799.
- Frankham, R. 1995b. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conserv. Biol.* 10: 1500-1508.
- Frankham, R. 1995c. Effective population-size adult-population size ratios in wildlife - a review. *Genet. Res.* 66: 95-107.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Franklin, I.R., Frankham, R. 1998. How large must populations be to retain evolutionary potential?. *Anim. Conserv.* 1: 69-73.
- Fraser, D.J., Lippé, C., Bernatchez, L. 2004. Consequences of unequal population size, asymmetric gene flow and sex-biased dispersal on population structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Mol. Ecol.* 13: 67-80.
- Fraser, D.J., Hansen, M.M., Østergaard, S., Tessier, N., Legault, M., Bernatchez, L. 2007. Comparative estimation of effective population sizes and temporal gene flow in two contrasting population systems. *Mol. Ecol.* 16: 3866-3889.
- Frommen, J.G., Bakker, T.C.M. 2006. Inbreeding avoidance through non-random mating in Sticklebacks. *Biol. Lett.* 2: 232-235.
- Garant, D., Dodson, J.J., Bernatchez, L. 2001. A genetic evaluation of mating system and determinants of individual reproductive success in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *J. Hered.* 92: 137-145.
- García de Jalón, D., Barceló, E. 1987. Estudio sobre la alimentación de la trucha común en los ríos pirenaicos. *Ecología* 1: 263-269.
- García de Jalón, D., Schmidt, G. 1995. Manual práctico para la gestión sostenible de la pesca fluvial. A.E.M.S., Girona.
- García-Marín, J.L., Jorde, P.E., Ryman, N., Utter, F., Pla, C. 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., Pla, C. 1996. Origins and relationships of native populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Heredity* 77: 313-323.
- García-Marín, J.L., Sanz, N., Pla, C. 1998. Proportions of native and introduced brown trout in adjacent fished and unfished Spanish rivers. *Conserv. Biol.* 12 (2): 313-319.
- García-Marín, J.L., Sanz, N., Pla, C. 1999. Erosion of the native and genetic resources of brown trout in Spain. *Ecol. Freshw. Fish* 8: 151-158.
- García-Vazquez, E., Moran, P., Martínez, J.L., Pérez, J., Gaudemar, B., Beall, E. 2001. Alternative mating strategies in Atlantic salmon and brown trout. *J. Hered.* 92: 146-149.
- Gerking, S.D. 1957. The restricted movement of fish populations. *Biol. Rev.* 34: 221-242.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86: 485-486.
- Gowan, C., Young, M.K., Fausch, K.D., Riley, S.C. 1994. Restricted movement in resident stream salmonids: a paradigm lost?. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 2626-2637.
- Hansen, M.M. 2002. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Mol. Ecol.* 11: 1003-1013.

7. Referencias

- Hansen, M.M., Nielsen, E.E., Mensberg, K-L.D. 1997. The problem of sampling families rather than populations: relatedness among individuals in samples of juvenile brown trout *Salmo trutta* L. Mol. Ecol. 6: 469-474.
- Hansen, M.M., Mensberg, K.D. 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., Nielsen, E.E., Ruzzante, D.E., Bouza, C., Mensberg, K-L.D. 2000. Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta* L.), using microsatellite DNA markers. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57: 2130-2139.
- Hansen, M.M., Kenchington, E., Nielsen, E.E. 2001a. Assigning individuals fish to populations using microsatellite DNA markers. Fish Fish. 2: 93-112.
- Hansen, M.M., Nielsen, E.E., Bekkevold, D., Mensberg, K-L.D. 2001b. Admixture analysis and stocking impact assessment in brown trout (*Salmo trutta*), estimated with incomplete baseline data. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 58: 1853-1860.
- Hansen, M.M., Ruzzante, D.E., Nielsen, E.E., Bekkevold, D., Mensberg, K-L.D. 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., Jensen, L.F. 2005. Sibship within samples of brown trout (*Salmo trutta*) and implications for supportive breeding. Conserv. Genet. 6: 297-305.
- Hansen, M.M., Skaala, Ø., Jensen, L.F., Bekkevold, D., Mensberg, K-L.D. 2007. Gene flow, effective population size and selection at major histocompatibility complex genes: brown trout in the Hardanger Fjord, Norway. Mol. Ecol. 16: 1413-1425.
- Hansen, M.M., Fraser, D.J., Meier, K., Mensberg, K.D. 2009. Sixty years of anthropogenic pressure: a spatio-temporal genetic analysis of brown trout populations subject to stocking and population declines. Mol. Ecol. 18: 2549-2562.
- Hardy, O.J., Vekemans, X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol. Ecol. Notes 2: 618-620.
- Hardy, O.J., Carbonnel, N., Freville, H., Heuertz, M. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. Genetics 163: 1467-1482.
- Hauser, L., Adcock, G.J., Smith, P.J., Ramirez, J.H.B. and Carvalho, G.R. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). P. Natl. Acad. Sci. USA 99: 11742-11747.
- Heath, D.D., Busch, C., Kelly, J., Atagi, D.Y. 2002. Temporal change in genetic structure and effective population size in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Ecol. 11: 197-214.
- Hedrick, P.W. 1996. Conservation Genetics and molecular techniques: a perspective. En: Molecular genetic approaches to conservation, (Smith, T.B., Wayne, R.K.). Oxford University Press, New York: p. 459-477.
- Hedrick, P.W. 2000. Applications of population genetics and molecular techniques to Conservation Genetics. En: Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations (Young, A.G., Clarke, G.M.). Cambridge University Press. UK: p. 113-125.
- Hedrick, P. W., Miller, P S. 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. Ecol. Appl. 2: 30-46.
- Heggenes, J., Krog, O.M.W., Lindis, O.R., Dokk, J.G. , Bremnes, T. 1993. Homeostatic behavioural responses in a changing environment: brown trout (*Salmo trutta*) become nocturnal during winter. J. Anim. Ecol. 62: 295-308.
- Heggenes, J., Baglinière, J.L. , Cunjak, R.A. 1999. Spatial niche variability for young Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*S. trutta*) in heterogeneous streams. Ecol. Freshw. Fish 8: 1-21.
- Heggenes J, Røed K.H. 2006. Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. Ecol. Freshw. Fish 15: 366-375.
- Heggenes, J., Røed, K.H., Jorde, P.E., Brabrand, A. 2009. Dynamic micro-geographic and temporal genetic diversity in vertebrates: the case of lake-spawning populations of brown trout (*Salmo trutta*). Mol. Ecol. 18: 1100-1111.
- Héland, M., Gaudin, P., Bardonnnet, A. 1999. First behavioural adjustments in relation to habitat use after emergence in running water salmonids. B. Fr. Peche Piscic 337: 191-197.
- Hill, W.G. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. Genet. Res. 38: 209-216.

- Hindar, K., Jonsson, N., Ryman, N., Stahl F.M.G. 1991a. Genetics relationship among landlocked, resident and anadromous brown trout, *Salmo trutta* L. *Heredity* 66: 83-91.
- Hindar, K., Ryman, N., Utter, F. M. 1991b. Genetic effects of aquaculture on natural fish populations. *Aquaculture* 98: 259-261.
- Höjesjö, J., Økland, F., Sundström, L.F., Pettersson, J., Johnsson, J. I. 2007. Movement and home range in relation to dominance; a telemetry study on brown trout *Salmo trutta*. *J. Fish Biol.* 70: 257-268.
- Hunter, C.J., Palmer T., Meloy E. 1991. Better trout habitat: a guide to stream restoration and management. Island Press, USA.
- Hutchings, J.A., Gerber, L. 2002. Sex-biased dispersal in a salmonid fish. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 269: 2487-2493.
- Hutchinson, D. W., Templeton, A. R. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*: 53: 1898-1914.
- Izquierdo J.I., Castillo A.G.F., Ayllon F., Hoz J., García-Vazquez E. 2006. Stocks transfers in Spanish brown trout populations: A long-term assessment. *Environ. Biol. Fish.* 75: 153-157.
- Jensen, L.F., Hansen, M.M., Carlsson, J., Loeschcke, V., Mensberg K-L.D. 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.
- Johnson, N. A., Rexroad, C. E., Hallerman, E. M., Vallejo, R. L., Palti, Y. 2007. Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture* 266: 53-62.
- Jonsson, B. 1989. Life history and habitat use of Norwegian brown trout (*Salmo trutta*). *Freshw. Biol.* 21: 71-86.
- Jones, A.G., Ardren, W.R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.* 12: 2511-2523.
- Jones, O.R., Wang, J. 2010. Molecular marker-based pedigrees for animal conservation biologists. *Anim. Conserv.* 13: 26-34.
- Jorde, E., Ryman, N. 1996. Demographic genetics of brown trout (*Salmo trutta*) and estimation of effective population size from temporal changes of allele frequencies. *Genetics* 143: 1369-1381.
- Kane, N.C., King, M.G. 2009. Using parentage analysis to examine gene flow and spatial genetic structure. *Mol. Ecol.* 18: 1551-1552.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.A., Depson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M. F. , Mortensen, E. 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.
- Koizumi, I., Yamamoto, S., Maekawa K. 2006. Female-biased migration of stream-dwelling Dolly Varden in the Shiisorapuchi River, Hokkaido, Japan. *J. Fish Biol.* 68: 1513-1529.
- Koskinen, M. T., Hirvonen, H., Landry, P-A., Primmer, C. R. 2004. The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective. *Heredity* 141: 61-67.
- Krimbas, C.B., Tsakas, S. 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.
- Lagarrigue, T. 2000. Croissance de la truite commune (*Salmo trutta* L.) dans les Pyrénées françaises. Analyse régionale et locale des principaux facteurs de variabilité en rivière de montagne. Tesis Doctoral. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Lahti, K., Laurila, A., Enberg, K., Piironen J. 2001. Variation in aggressive behaviour and growth rate between populations and migratory forms in the brown trout, *Salmo trutta*. *Anim. Behav.* 62: 935-944.
- Laikre, L. 1999. Conservation Genetic Management of Brown Trout (*Salmo trutta*) in Europa. Concerted action on identification, management and exploitation of genetic resources in the brown trout (*Salmo trutta*): TROUTCONCERT. EU FAIR CT97-3882.
- Laikre, L., Jarvi, T., Johansson, L., Palm, S., Rubin, J.F., Glimsater, C.E., Landergren, P., Ryman, N. 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.

7. Referencias

- Largiader, C.R., Estoup, A., Lecerf, F., Champigneulle, A., Guyomard, R. 2001. Microsatellite analysis of polyandry and spawning site competition in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Genet. Sel. Evol.* 33 (Suppl. 1): 205-222.
- Leberg, P.L. 2005. Genetic approaches for estimating the effective size of populations. *J. Wildlife Manage* 69: 1385-1399.
- Leberg, P.L., Firmin, B.D. 2008. Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes. *Mol. Ecol.* 17: 334-343.
- Leblois, R., Estoup, A., Rousset, F. 2003. Influence of mutational and sampling factors on the estimation of demographic parameters in a "continuous" population under isolation by distance. *Mol. Biol. Evol.* 20: 491-502.
- Lerceteau-Köhler, E., Weiss, S. 2006. Development of a multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potencial application for the genus. *Aquaculture* 258: 641-645.
- Levinson, G., Gutman, G.A. 1987a. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4: 203-221.
- Lin, J., Quinn, T.P., Hilborn, R., Hauser, L. 2008. Fine-scale differentiation between sockeye salmon ecotypes and the effect of phenotype on straying. *Heredity* 101: 341-350.
- Litt M., Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actine gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Lobón-Cerviá J. 1991. Dinámica de Poblaciones de Peces. Pesca Eléctrica y Métodos de Capturas Sucesivas en la Estima de Abundancias. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid.
- Lobón-Cerviá J. 2000. Determinants of parr size variations within a population of brown trout *Salmo trutta* L. *Ecol. Freshw. Fish* 9: 92-102.
- Lobón-Cerviá, J. 2009. Why, when and how do fish populations decline, collapse and recover? The example of brown trout (*Salmo trutta*) in Rio Chaballos (northwestern Spain). *Freshw. Biol.* 54: 1149-1162.
- Lobón-Cerviá, J., Utrilla, C.G., Rincón, P.A., Amezcua, F. 1997. Environmentally induced spatio-temporal variations in the fecundity of brown trout *Salmo trutta* L.: trade-offs between egg size and number. *Freshw. Biol.* 38: 277-288.
- Lobón-Cerviá, J., Mortensen, E. 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.
- Loiselle, B.A., Sork, V.L., Nason, J., Graham, C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 82: 1420-1425.
- Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M., Sherwin, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* 89: 238-247.
- Luikart, G., Cornuet, J.M., Allendorf, F.W. 1999. Temporal changes in allele frequencies provide estimates of population bottleneck size. *Conserv. Biol.* 13: 523-530.
- Lynch, M., Walsh, J.B. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Assocs. Inc, USA.
- Lynch, M., Ritland, K. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152: 1753-1766.
- Machordom, A., García-Marín, J.L., Sanz, N., Almodóvar, A., Pla, C. 1999. Allozyme diversity in brown trout (*Salmo trutta*) from Central Spain. Genetic consequences of restocking. *Freshw. Biol.* 41: 707-718.
- Machordom, A., Suárez, J., Almodóvar, A., Bautista, J.M. 2000. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations. *Mol. Ecol.* 9: 1325-1338.
- Madeira M.J., Gómez-Moliner B.J., Machordom A.B. 2005. Genetic introgression on freshwater fish populations caused by restocking programmes. *Biol. Invasions* 7: 117-125.
- Maise, G., Blaglinière, J.L. 1991. Biologie de la truite commune (*Salmo trutta* L.) dans les rivières françaises. En: La truite. Biologie et ecologie (Baglinière, J.L., Maise, G.). INRA, Paris: p. 25-45.
- Mäki-Petäys, A., Muotka, T., Huusko, A., Tikkanen, P., Whelan, K. F. 1997. Seasonal changes in habitat use and preference by juvenile brown trout, *Salmo trutta*, in a northern boreal river. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 520-530.
- Martínez, J.L., Moran, P., Perez, J., De Gaudemar, B., Beall, E., García-Vazquez, E. 2000. Multiple paternity increases effective size of southern Atlantic salmon populations. *Mol. Ecol.* 9: 293-298.

- Martínez, P., Bouza, C., Castro, J., Hermida, M., Pardo, B.G., Sánchez, L. 2007. Analysis of a secondary contact between divergent lineages of brown trout *Salmo trutta* L. from Duero basin using microsatellites and mtDNA RFLPs. *J. Fish Biol.* 71 (Supl. B): 195-213.
- McLean, J.E., Seamons, T.R., Dauer, M.B., Bentzen, P., Quinn, T.B. 2008. Variation in reproductive success and effective number of breeders in a hatchery population of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*): examination by microsatellite-based parentage analysis. *Conserv. Genet.* 9: 295-304.
- Meyers, L.S., Theumler, T. F., Kornley, G.W. 1992. Seasonal movements of brown trout in Northeast Wisconsin. *N. Am. J. Fish. Manage.* 12: 433-441.
- Mezzera, M., Largiadèr, C. R. 2001. Evidence for selective angling of introduced trout and their hybrids in a stocked brown trout population. *J. Fish Biol.* 59, 287-301.
- Milligan, B.G., Leebens-Mack, J., Strand, A.E. 1994. Conservation Genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Mol. Ecol.* 3: 423-435.
- Mills, L.S., Smouse, P.E. 1994. Demography consequences of inbreeding in remnant population. *Am. Nat.* 144: 412-431.
- Milner, N.J., Elliott, J.M., Armstrong, J.D., Gardiner, R., Welton, J.S., Ladle, M. 2003. The natural control of salmon and trout populations in streams. *Fish. Res.* 62: 111-125.
- Morán, P., Pendas, A.M., García-Vazquez, E., Izquierdo, J.I., Lobón-Cervlá, J. 1995a. Estimates of gene flow among neighbouring populations of brown trout. *J. Fish Biol.* 46: 593-602.
- Morán, P., Pendas, A.M., Izquierdo, J.I., Lobón-Cervia, J., García-Vazquez, E. 1995b. Temporal stability of isozyme allele frequencies in wild populations of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Hereditas* 123: 221-225.
- Muñoz, G. 1988. Crónica piscícola continental hispana. ICONA. Madrid.
- Muñoz, M., Casadevall, M. 1997. Fish remains from Arbreda Cave (Serinyà, Girona), northeast Spain, and their palaeoecological significance. *J. Quaternary Sci.* 12: 111-115.
- Nei, M., Tajima, F. 1981. Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics* 98: 625-640.
- Nei, M., Tajima, F., Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19: 153-170.
- Nicola G.G., Almodóvar A. 2002. Reproductive traits of stream-dwelling brown trout *Salmo trutta* in contrasting neighbouring rivers of central Spain. *Freshw. Biol.* 47: 1353-1365.
- Nicola, G.G., Almodóvar, A. 2004. Growth pattern of stream-dwelling brown trout under contrasting thermal conditions. *T. Am. Fish. Soc.* 133: 66-78.
- Nielsen, E.E., Hansen, M.M., Loeschcke, V. 1999. Genetic variation in time and space: microsatellite analysis of extinct and extant populations of Atlantic salmon. *Evolution* 53: 261-268.
- Nielsen, E.E., Bach, L.A., Kotlicki, P. 2006. Hybridlab (version 1.0): a program for 519 generating simulated hybrids from population samples. *Mol. Ecol. Notes* 6: 971-973.
- Nunney, L., Campbell, K.A. 1993. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 8: 234-239.
- Nunney, L., Elam, D.R. 1994. Estimating the effective population size of conserved populations. *Conserv. Biol.* 8: 175-184.
- O'Reilly, P.T., Hamilton, L.C., McConell, S.K., Wright, J.M. 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.
- Ojanguren, A.F., Braña F. 1999. Discrimination against water containing unrelated conspecifics and a marginal effect of relatedness on spacing behaviour and growth in juvenile brown trout, *Salmo trutta* L. *Ethology* 105: 937-948.
- Okland, F., Thorstad, E. B., Næsje, T. F. 2004. Is Atlantic salmon production limited by number of territories? *J. Fish Biol.* 65: 1047-1055.
- Olsen E.M., Vøllestad L.A. 2005. Small-scale spatial variation in age and size at maturity of stream-dwelling brown trout, *Salmo trutta*. *Ecol. Freshw. Fish* 14: 202-208.
- Olsen, J.B., Wuttig, K., Fleming, D., Kretschmer, E.J., Wenburg, J.K. 2006. Evidence of partial anadromy and resident-form dispersal bias on a fine scale in populations of *Oncorhynchus mykiss*. *Conserv. Genet.* 7: 613-619.
- Orcutt, D.R., Pullian B.R., Aethur, A.R.P. 1968. Characteristic of steelhead trout redd in Idaho streams. *T. Am. Fish. Soc.* 97: 42-45.

7. Referencias

- Oscoz, J., Escala, M. C., Campos, F. 2000. La alimentación de la trucha común (*Salmo trutta* L., 1758) en un río de Navarra (N. España). *Limnetica* 18: 29-35.
- Oscoz, J., Leunda, P. M., Campos, F., Escala, M. C., Miranda R. 2005. Diet of 0+ brown trout (*Salmo trutta* L., 1758) from the river Erro (Navarra, North of Spain). *Limnetica* 24: 319-326.
- Ostergaard, S., Hansen, M.M., Loeschcke, V., Nielsen, E.E. 2003. Long-term temporal changes of genetic composition in brown trout (*Salmo trutta* L.) populations inhabiting an unstable environment. *Mol. Ecol.* 12: 3123-3135.
- Pakkasmaa, S., Piironen, J. 2001. Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biol. J. Linn. Soc.* 72: 231-239.
- Palm, S., Laikre, L., Jorde, P.E., Ryman, N. 2003. Effective population size and temporal genetic change in stream resident brown trout (*Salmo trutta*, L.). *Conserv. Genet.* 4: 249-264.
- Palstra, F.P., O'Connell, M.F., Ruzzante, D.E. 2007. Population structure and gene flow reversals in Atlantic salmon (*Salmo salar*) over contemporary and long-term temporal scales: effects of population size and life history. *Mol. Ecol.* 16: 4504-4522.
- Palstra, F.P., Ruzzante, D.E. 2008. Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Mol. Ecol.* 17: 3428-3447.
- Palstra, F.P., O'Connell, M.F., Ruzzante D.E. 2009. Age structure, changing demography and effective population size in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Genetics* 182: 1233-1249.
- Parker, K.M., Hughes, K., Kim, T.J., Hedrick, P.W. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci from the Gila topminnow (*Poeciliopsis occidentalis*) and their utility in guppies (*Poecilia reticulata*). *Mol. Ecol.* 7: 357-363.
- Paterson, S., Piertney, S.B., Knox, D., Gilbey, J., Verspoor, E. 2004. Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites. *Mol. Ecol. Notes* 4: 160-162.
- Peel, D., Ovenden, J.R., Peel, S.L. 2004. NeEstimator: software for estimating effective population size, Version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries.
- Piry, S., Bouquet, G. 1999. POP100GENE v1.1.02 (INRA, France).
- Pollak, E. 1983. A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. *Genetics* 104: 531-548.
- Pollock, D.D., Bergman, A., Feldman, M.W., Goldstein, D.B. 1998. Microsatellite behavior with range constraints: parameter estimation and improved distances for use in phylogenetic reconstruction. *Theor. Popul. Biol.* 53: 256-271.
- Poteaux, C., Bonhomme, F., Berrebi P. 1998b. Differences between nuclear and mitochondrial introgressions of brown trout populations from a restocked main river and its unstocked tributary. *Biol. J. Linn. Soc.* 63: 379-392.
- Poteaux, C., Beaudou, D., Berrebi, P. 1998a. Temporal variations of genetic introgression in stocked brown trout populations. *J. Fish Biol.* 53: 701-713.
- Poteaux, C., Bonhomme, F., Berrebi, P. 1999. Microsatellite polymorphism and genetic impact of restocking in Mediterranean brown trout. *Heredity* 82: 643-653.
- Poteaux, C., Berrebi, P., Bonhomme, F. 2001. Allozymes, mtDNA and microsatellites study introgression in a stocked trout population in France. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 10: 281-292.
- Prat, N., Sostoa, A., Pla, C. 2007. Diagnosi de la situació ecològica i genètica de les poblacions de peixos als rius de la Vall de Cardós: la problemàtica de la pesca. Informe científic. Direcció General de Medi Natural, Departament de Medi Ambient i Habitatge. Generalitat de Catalunya.
- Presa, P., Guyomard, R. 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *J. Fish. Biol.* 49: 1326-1329.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Punsey, A., Wolf, M. 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends Ecol. Evol.* 11: 201-206.
- Queller, D.C., Goodnight, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995a. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.

- Raymond, M., Rousset, F. 1995b. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumincism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Reyes-Gavilán, F.G., Garrido, R., Nicieza, A.G., Toledo, M.M., Braña, F. 1995. Variability in growth, density and age-structure of brown trout populations under contrasting environmental and managerial conditions. En: *The Ecological Basis for River Management* (Harper, D.M, Ferguson, A.J.D.). John Wiley y Sons, UK: p. 389-403.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Richard, G-F., Paques, F. 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO reports* 1, 122-126.
- Richard, M., Thorpe, R.S. 2001. Can Microsatellites Be Used to Infer Phylogenies? Evidence from Population Affinities of the Western Canary Island Lizard (*Gallotia galloti*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 20: 351-360.
- Richards, R.I., Sutherland, G.R. 1994. Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nature Genet.* 6: 114-116.
- Robinson J.C. 2001. Using 'sustainable use' approaches to conserve exploited populations. En: *Conservation of Exploited Species* (Reynolds J.D., Mace G.M., Redford K.H. and Robinson J.G., eds). Cambridge University Press, Cambridge: p. 485-498.
- Rocaspana, R. 2006. Estudi de la mida mitjana de la truita en les zones d'alta muntanya de Catalunya. Informe científic. Àrea de Pesca Continental. Departament de Medi Ambient i Habitatge. Generalitat de Catalunya.
- Rodriguez, M.A. 2002. Restricted movement in stream fish: the paradigm is incomplete, not lost. *Ecology* 83 (1): 1-13.
- Roussel, J.M., Bardonnnet, A. 1999. Ontogeny of diel pattern of stream-margin habitat use by emerging brown trout, *Salmo trutta*, in experimental channels: influence of food and predator presence. *Environ. Biol. Fish.* 56: 253-262.
- Rubin, J.F., Glimsater, C., Jarvi, T. 2005. Spawning characteristics of the anadromous brown trout in a small Swedish stream. *J. Fish Biol.* 66: 107-121.
- Ruzzante, D.E., Hansen, M.M., Meldrup, D. 2001. Distribution of individual inbreeding coefficients, relatedness and influence of stocking on native anadromous brown trout (*Salmo trutta*) population structure. *Mol. Ecol.* 10: 2107-2128.
- Ruzzante, D.E., Hansen, M.M., Meldrup, D, Ebert, K. 2004. Stocking impact and migration pattern in an anadromous brown trout (*Salmo trutta*) complex: where have all the stocked spawning sea trout gone?. *Mol. Ecol.* 13: 1433-1445.
- Sakamoto, T., Okamoto, N., Ikeda, Y., Nakamura, Y., Sato, T. 1994. Dinucleotide-repeat polymorphism in DNA of rainbow trout and its application in fisheries science. *J. Fish Biol.* 44: 1093-1096.
- Sambroock, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanz, N., García-Marín, J.L., Pla, C. 2000. Divergence of brown trout (*Salmo trutta*) within glacial refugia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57: 2201-2210.
- Sanz, N., García-Marín, J.L., Pla, C. 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., Cortey, M., Pla, C., García-Marín, J.L. 2006. Hatchery introgression blurs ancient hybridization between brown trout (*Salmo trutta*) lineages as indicated by complementary allozymes and mtDNA markers. *Biol. Conserv.* 130: 278-289.
- Sanz, N., Araguas, R.M., Fernández, R., Vera, M., García-Marín, J.L. 2009. Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Conserv. Genet.* 10: 225-236.
- Sanz, N., Fernández-Cebrián, R., Casals, F., Araguas, R.M., García-Marín, J.L. 2011. Dispersal and demography of brown trout, *Salmo trutta*, inferred from population and family structure in unstable Mediterranean streams. *Hydrobiologia* 671: 105-119.
- Schlötterer, C., Tautz, D. 1993. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20: 211-215.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. 2000. Arlequin, Version 2.000: a software for populations genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Schwartz, M.K., Tallmon, D.A., Luikart, G. 1998. Review of DNA-based census and effective population size estimators. *Anim. Conserv.* 1: 293-299.
- Schwartz, M.K., Luikart, G., Waples, R.S. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol. Evol.* 22: 25-33.

7. Referencias

- Serbezov D., Bernatchez L., Olsen E.M. and Vøllestad L.A. 2010a. Mating patterns and determinants of individual reproductive success in brown trout (*Salmo trutta*) revealed by parentage analysis of an entire stream living population. *Mol. Ecol.* 19: 3193-3205.
- Serbezov, D., Bernatchez, L., Olsen, E.M., Vøllestad, L.A. 2010b. Quantitative genetic parameters for wild stream-living brown trout: heritability and parental effects. *J. Evol. Biol.* 23: 1631-1641.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, O. 1995. Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311 and SSOSL417 loci. *Anim. Genet.* 26: 277-285.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, O. 1996. Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL438, SSOSL439 and SSOSL444 loci. *Anim. Genet.* 27: 57-64.
- Takezaki, N., Nei, M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389-399.
- Tallmon, D.A., Luikart, G., Beaumont, M.A. 2004. Comparative Evaluation of a New Effective Population Size Estimator Based on Approximate Bayesian Computation. *Genetics* 167: 977-988.
- Tessier, N., Bernatchez, L. 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.
- Thériault, V., Moyer, G.R., Jackson, L.S., Blouin, M.S., Banks, M.A. 2011. Reduced reproductive success of hatchery coho salmon in the wild: insights into most likely mechanisms. *Mol. Ecol.* 20: 1860-1869.
- Utter, F.M. 2001. Patterns of subspecific anthropogenic introgression in two salmonid genera. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 10: 265-279.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535-538.
- Vera, M. 2006. Estudio de las variaciones espaciales y temporales de la diversidad genética de la trucha común, *Salmo trutta*, en ríos de la Península Ibérica. Tesis doctoral. Laboratori d'ictiologia Genètica. Universitat de Girona.
- Vera M., Sanz N., Hansen M.M. Almodovar A. and García-Marín J-L. 2010. Population and family structure of brown trout, *Salmo trutta*, in a Mediterranean stream. *Mar. Freshwater Res.* 61: 676-685.
- Vilas, R., Bouza, C., Castro, J., López, A., Martínez, P. 2010. Management units of brown trout from Galicia (NW: Spain) based on spatial genetic structure analysis. *Conserv. Genet.* 11: 897-906.
- Waldick, R. C., Kraus, S., Brown, M., White, N.B. 2002. Evaluating the effects of historic bottleneck events: an assessment of microsatellite variability in the endangered, North Atlantic right whale. *Mol. Ecol.* 11: 2241-2249.
- Waldman, B., Frumhoff, P.C., Sherman, P.W. 1988. Problems of kin recognition. *Trends Ecol. Evol.* 3: 8-13.
- Waldman, B., McKinnon, J.S. 1993. Inbreeding and outbreeding in fishes, amphibians, and reptiles. En: *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives* (Thornhill, N.W.), University of Chicago Press, USA: P.250-282.
- Wang, J. 2001. A pseudo-likelihood method for estimating effective population size from temporally spaced samples. *Genet. Res. Camb.* 78: 243-257.
- Wang, J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203-1215.
- Wang, J. 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166: 1963-1979.
- Wang, J., Whitlock, M.C. 2003. Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *Genetics* 163: 429-446.
- 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. 1991. Genetic methods for estimating the effective size of Cetacean populations. Report of the International Whaling Commission Special Issue 13: 279-300.
- Waples, R.S. 2005. Genetic estimates of contemporary effective population size: to what time periods do the estimates applied?. *Mol. Ecol.* 14: 3335-3352.
- Waples, R.S. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conserv. Genet.* 7: 167-184.
- Waples, R.S., Do, C. 2007. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Resources* 8: 753-756.

- Waples, R.S., Yokota, M. 2007. Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generation. *Genetics* 175: 219-233.
- Was, A., Wenne, R. 2003. Microsatellite DNA polymorphism in intensely enhanced populations of sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic. *Mar. Biotechnol.* 5: 234-243.
- Weber, J.L., May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms. *Genomics* 7: 388-396.
- Weber, J.L., Wong, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Humans Mol. Genet.* 2: 1123-1128.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Welch, J.W., Maloney, D.H, Fogel, S. 1990. Unequal crossing-over and gene conversion at the amplified CUP1 locus of yeast. *Mol. Gen. Genet.* 222: 304-310.
- Whitlock, M.C., McCauley, D.E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} doesn't equal $1/(4Nm+1)$. *Heredity* 82: 117-125.
- Williamson, E.G., Slatkin, M. 1999. Using maximum likelihood to estimate population size from temporal changes in allele frequencies. *Genetics* 152: 755-761.
- Wilson, A.C., Cann, R., Carr, S.M., George, M.J., Gyllsten, U.B., Helm-Bychowsky, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., Stoneking, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Lin. Soc.* 26: 375-400.
- Wilson, A.J., Ferguson, M.M. 2002. Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications and practical considerations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 1696-1707.
- Wilson, G.A., Rannala, B. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163: 1177-1191.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Wright, L.I., Tregenza, T., Hosken, D.J. 2008. Inbreeding, inbreeding depression and extinction. *Conserv. Genet.* 9: 833-843.
- Young, M.K. 1994. Brown trout mobility in south-central Wyoming streams. *Can. J. Zool.* 72: 2078-2083.