

Títol del treball: Efecte de les repoblacions sobre les poblacions de truita de la conca del riu Ter

Estudiant: Mercè Molas i Soler

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: mercee.15@gmail.com

Tutor: José Luis García-Marín

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona, Facultat de Ciències,
Laboratori d'Ictiologia Genètica

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: José Luis García-Marín

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: UdG, Facultat de Ciències, LIG

Correu(s) electrònic(s): joseluis.garcia@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

RESUM

L'alliberament al medi d'exemplars de races foranies està deteriorant la integritat genètica de les poblacions autòctones. Per poder millorar les estratègies de protecció i conservació cal identificar si els individus que formen les poblacions naturals són nadius o provenen d'aquests alliberaments. La truita de riu (*Salmo trutta*) és una de les espècies que des de fa temps pateix les repoblacions. En aquesta espècie és possible conèixer la informació genètica dels individus i estudiar els nivells d'introgressió de la població produïts per la introducció d'exemplars genèticament diferenciats. Es poden identificar i distingir genotips diferents, i caracteritzar els nivells de diversitat genètica (varietat d'al·lels i genotips presents) i la seva distribució.

En una població gran, on hi ha aparellament aleatori i no hi ha mutació, migració ni selecció, les freqüències al·lèliques i genotípiques arriben al cap d'una generació a unes proporcions estables. S'anomena l'equilibri de Hardy-Weinberg i és un model genètic crucial per la conservació de la diversitat poblacional i l'estudi genètic de les poblacions naturals.

En aquest estudi, es va caracteritzar la població de les truites (*Salmo trutta*) del riu Ter utilitzant 5 loci microsatèl·lits i el locus de la *LDH-C1*. També es va comprovar el nivell d'introgressió genètica amb els individus del centre piscícola de la Generalitat de Catalunya a Bagà, utilitzats habitualment pels alliberaments de truita als rius catalans. Tanmateix, es va estudiar la diferenciació genètica d'aquestes truites en relació a una altra població al riu de Núria, a la capçalera del Freser, que és el principal afluent del Ter.

Els resultats obtinguts mostraven que a la localitat del riu Ter només hi havia una població de truita i no presentava introgressió genètica. Per altra banda, i en relació als individus del riu Freser i de Bagà, es va concloure que hi ha una significativa diferenciació genètica entre els diferents grups estudiats. Així, els resultats van mostrar tres poblacions clarament diferenciades: Ter, Núria i Bagà. Tot i això, alguns individus del riu Freser presenten traces genètiques de les altres poblacions. Resultat que, per una banda, suggereix que la població analitzada del riu Freser està afectada pels alliberaments de truites del centre de Bagà, i, per l'altra, que hi ha contacte natural entre les poblacions de truites del Ter i del Freser.

RESUMEN

La liberación al medio de ejemplares de razas foráneas está deteriorando la integridad genética de las poblaciones autóctonas. Para poder mejorar las estrategias de protección y conservación es necesario identificar si los individuos que forman las poblaciones naturales son nativos o provienen de dichas sueltas. La trucha común (*Salmo trutta*) es una de las especies que desde hace tiempo se ha visto afectada por las repoblaciones. En esta especie es posible conocer la información genética de los individuos y estudiar los niveles de introgresión de la población producidos por la introducción de ejemplares genéticamente diferenciados. Se pueden identificar y distinguir genotipos diferentes, y caracterizar los niveles de diversidad genética (variedad de alelos y genotipos presentes) y su distribución.

En una población grande, donde hay apareamiento aleatorio y donde no hay mutaciones, ni migración, ni selección, las frecuencias alélicas y genotípicas llegan, al cabo de una generación, a unas proporciones estables. Se denomina el equilibrio de Hardy-Weinberg y es un modelo genético crucial para la conservación de la diversidad poblacional y el estudio genético de las poblaciones naturales.

En este estudio, se caracterizó la población de trucha (*Salmo trutta*) del río Ter utilizando 5 loci microsatélites y el locus de la *LDH-C1*. También se comprobó el nivel de introgresión genética con los individuos del centro piscícola de la “Generalitat de Catalunya” emplazado en Bagà, y utilizados habitualmente para la liberación de trucha en los ríos catalanes. Asimismo, se estudió la diferenciación genética de estas truchas en relación a otra población en el río Núria, en la cabecera del Freser, principal afluente del Ter.

Los resultados obtenidos mostraban que en la localidad del río Ter solamente había una población de trucha y no presentaba introgresión genética. No así, y en relación a los individuos del río Freser y de Bagà, se concluyó que hay una significativa diferenciación genética entre los diferentes grupos estudiados. De este modo, los resultados mostraron tres poblaciones claramente diferenciadas: Ter, Núria y Bagà. Sin embargo, algunos individuos del río Freser presentan trazas genéticas de otras poblaciones. Resultado que, por un lado, sugiere que la población analizada del río Freser está afectada por la liberación de truchas del centro de Bagà, y, por otro, que hay contacto natural entre las poblaciones de truchas del Ter y del Freser.

ABSTRACT

Releases of foreign specimens to wild populations is deteriorating genetic integrity of native populations. Identifying whether the origin of the individuals in wild populations is native or not, is crucial to improve protection and conservation management strategies. Brown trout (*Salmo trutta*) is suffering such releases. In this species, it is possible to know the genetic makeup of each individual and estimate the population levels of introgression caused by genetically differentiated foreign fish. Genetic studies allow to identify and to distinguish the different genotypes, the population level of genetic diversity (alleles range and present genotypes) and patterns of distribution of genetic variability among populations.

In a large population, where there is random mating and no mutation, neither migration nor selection, allele and genotype frequencies become stable in one generation. This is called the Hardy-Weinberg equilibrium law, which is a crucial genetic model for the conservation of the population diversity and the genetic study of natural populations.

By using genotype information at 5 microsatellite loci and at the *LDH-C1* locus, the present study characterized the brown trout (*Salmo trutta*) population in the upper reaches of the Ter River. The level of genetic introgression (caused by releases of trout cultivated at the Bagà hatchery) was estimated. The Bagà hatchery stock is used to reinforce wild populations in Catalanian Rivers. Furthermore, we also studied the genetic differentiation of the Ter River brown trout in relation to another population from the Freser River headwaters (the Núria stream), the most important Ter River tributary.

Results showed that there is only a single brown trout population at the studied Ter River location. This population did not present any genetic introgression. In relation to the Freser and Bagà fish, it was concluded that there is a significant genetic differentiation between the different studied trout collections. Thus, results showed three clearly differentiated populations: Ter, Núria and Bagà. In spite of this, some individuals from Freser River have genetic traces from the other populations. This finding indicated that the analysed trout population in the Freser River was affected by released Bagà trout, and, on the other hand, that there is natural contact between Ter and Freser brown trout populations.

Índex

Introducció	6
Objectius	8
Metodologia	
1. Localització de les mostres	9
2. Extracció de DNA i obtenció dels genotips	11
3. Identificació de genotips i anàlisis estadístiques	12
Resultats	
1. Diversitat local	15
2. Equilibri de Hardy-Weinberg	16
3. Població del Ter	18
4. Diversitat poblacional i anàlisi de la diversitat	20
Discussió	23
Conclusions	26
Bibliografia	27

Introducció

L'alliberament al medi d'exemplars de races foranies està deteriorant la integritat genètica de les poblacions autòctones. Per poder millorar les estratègies de protecció i conservació cal identificar si els individus que formen les poblacions naturals són nadius o provenen d'aquests alliberaments. La truita de riu (*Salmo trutta*) és una de les espècies que des de fa temps pateix les repoblacions, ja que s'alliberen exemplars criats a piscifactories per reforçar el nombre d'individus a les zones on se'n permet la pesca. En aquesta espècie és possible conèixer la informació genètica dels individus, identificar si es tracta d'híbrids, i, si és així, estudiar els nivells d'introgressió de la població produïts per la introducció d'exemplars genèticament diferenciats (Sanz et al., 2008). Aquests estudis permeten identificar i distingir genotips diferents, i caracteritzar els nivells de diversitat genètica i la seva distribució entre les poblacions. La diversitat genètica és la varietat d'al·lels i genotips presents a un grup que s'està estudiant (població, espècies o grup d'espècies). Per tal de caracteritzar l'extensió de la diversitat genètica s'utilitza la diversitat al·lèlica, la mitjana del nombre d'al·lels per locus o els nivells d'heterozigosis.

En el cas d'una població gran, on hi ha aparellament aleatori i no hi ha mutació, migració ni selecció, les freqüències al·lèliques i genotípiques arriben al cap d'una generació a unes proporcions estables. Aquest equilibri s'anomena equilibri de Hardy-Weinberg i és crucial per la conservació de la diversitat poblacional i l'evolució. Hi ha diversos factors que poden influenciar les freqüències dels al·lels i genotips a una població (Frankham et al., 2004). L'equilibri de Hardy-Weinberg es pot presentar com un model matemàtic que relaciona les freqüències al·lèliques amb les proporcions genotípiques esperades. En una població que s'aparella aleatòriament i on un locus amb 2 al·lels (A_1 i A_2) presenta unes freqüències relatives p i q ($p+q=1$), les freqüències genotípiques esperades pels genotips A_1A_1 , A_1A_2 i A_2A_2 són p^2 , $2pq$ i q^2 , respectivament. Aquestes freqüències genotípiques de l'equilibri de Hardy-Weinberg proporcionen una base per poder detectar desviacions de l'aparellament aleatori, permeten modelar els efectes de l'endogàmia (encreuament entre individus emparentats), i avaluar-ne l'efecte de la selecció. També permeten conèixer les forces responsables de la divergència genètica entre les poblacions.

Les proporcions genotípiques de l'equilibri de Hardy-Weinberg s'espera que es produeixin a tots els loci, excepte als que estan localitzats als cromosomes sexuals. Per tenir l'equilibri de Hardy-Weinberg assumim (Campbell & Reece, 2007):

- Tamany de la població extremadament gran

- Absència de flux gènic o transferència d'al·lels entre poblacions
- Absència de mutacions
- Aparellament aleatori o unió aleatòria de gàmetes.
- Absència de selecció natural, ja que l'èxit reproductiu i de supervivència dels individus que tenen diferents genotips altera les proporcions genotípiques i les freqüències dels al·lels.

Per poder mesurar la diversitat genètica, actualment s'utilitzen tècniques d'anàlisi del DNA, com per exemple, els loci de microsatèl·lits, els genotips dels quals s'obtenen per reaccions PCR (*Polymerase Chain Reaction*) específiques. Els microsatèl·lits, són marcadors genètics altament polimòrfics que presenten repeticions en tàndem de 2 a 6 parells de bases de DNA (Lagoda, 1996). La variació genètica en molts loci de microsatèl·lits està caracteritzada per la presència de molts al·lels i una alta heterozigosi. Els microsatèl·lits permeten determinar quant temps fa que dues poblacions van divergir o estimar el flux gènic entre poblacions que sorgeix de la migració i la dispersió dels exemplars (Ellegren, 2004). En els estudis genètics de les espècies de peixos, per detectar la introgressió d'exemplars de piscifactories a la població salvatge, normalment, s'utilitzen de 6 a 10 loci de microsatèl·lits (Sanz et al., 2008).

El Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona (LIG), durant els últims anys, ha realitzat diversos estudis sobre les truites de riu, *Salmo trutta*. En aquests treballs del grup es va estudiar la diversitat en les seqüències completes de la regió de control del genoma mitocondrial per establir les relacions filogenètiques i la història biogeogràfica de les poblacions de truita als rius Mediterranis de la Península Ibèrica (Cortey et al., 2004). Més recentment, el grup ha treballat en les relacions entre l'estructura de la població de truites i les seves relacions familiars al llarg del riu Mediterrani. Amb aquests estudis s'esperava veure com la disposició física d'individus emparentats influeix en el patró de l'estructura genètica de la població (Vera et al., 2010).

Una de les estratègies més esteses per augmentar la població de truites a algunes regions mediterrànies és la introducció al medi d'exemplars criats a piscifactories. Aquests alliberaments provoquen introgressió genètica a les poblacions de truites natives i posa en perill la conservació de l'espècie autòctona. Per tal de mantenir o millorar les poblacions de truites silvestres, a proposta del LIG de la UdG, l'any 1997 la Generalitat de Catalunya va crear una estratègia de gestió que consistia en establir refugis genètics de truites on es vetava l'alliberament d'exemplars de piscifactories. Regularment, des del LIG, s'avalua l'estat d'integritat genètica de les poblacions de truita dins dels refugis quantificant els nivells d'introgressió de peixos de piscifactoria. La comparació dels nivells abans i després de la

designació del refugi, permet avaluar l'èxit d'aquesta estratègia de gestió, per poder millorar la gestió de les poblacions autòctones (Araguas et al., 2009). Tanmateix, per estandarditzar l'ús dels microsatèl·lits en l'avaluació de la introgressió a les poblacions natives, el LIG va comparar tant l'eficiència de diferents mètodes estadístics (STRUCTURE, NEWHYBRIDS, BAPS i GeneClass), com la dels *aloenzims* i la dels microsatèl·lits (Sanz et al., 2008).

Els cinc microsatèl·lits que s'utilitzen en aquest estudi ja havien estat utilitzats al treball de Sanz et al. (2008) per tal de detectar híbrids i introgressions a les poblacions natives. Des del punt de vista genètic, el locus de la lactat deshidrogenasa ocular (*LDH-C1*) també té un interès especial ja que permet avaluar l'impacte de la repoblació a les poblacions natives i es pot co-amplificar amb els loci dels microsatèl·lits en una única PCR (Chat et al., 2008). Aquest locus de la *LDH-C1* és un marcador genètic que permet identificar truites natives i d'importació de centre Europa. Presenta dos al·lels, el 90 i el 100. El primer és un al·lel característic de les poblacions de truita del nord-est d'Europa, mentre que l'al·lel 100 ho és de les poblacions de truita del sud-est d'Europa (Ferguson & Flemming, 1983). El polimorfisme és degut a una mutació puntual (A/G) que afecta a la primera base de l'exó 4. L'adenina està present a l'al·lel 100 i la guanina al 90 (McMeel et al., 2001). Així doncs, les truites que presenten l'al·lel 100 es consideren natives de la població Ibèrica i les que presenten l'al·lel 90 provenen de piscifactoria (Sanz et al., 2008).

Objectius

Using genetic diversity at 5 microsatellite loci and at the *LDH-C1* locus, the main objective of this research work is to characterize the brown trout population in the upstream of the Ter River, to assess levels of introgression by released hatchery fish and to estimate genetic divergence between these fish at the one inhabiting upstream stretches of the Freser River, a Ter River tributary.

Metodologia

1. Localització de les mostres

A la **Figura 1** es mostren els punts on s'han obtingut les truites per realitzar aquest estudi: el centre piscícola de la Generalitat de Catalunya al costat del riu Bastareny situat al municipi de Bagà, el riu de Núria (Núria) al municipi de Queralbs i el riu Ter aigües amunt del municipi de Setcases. Al municipi de Bagà, el centre piscícola de la Generalitat de Catalunya es dedica a la cria de truites d'origen centre-europeu i genèticament diferents de les natives (Sanz et al., 2008) amb la finalitat de repoblar els rius catalans. Les truites del riu de Núria van ser capturades a pocs metres de la desembocadura d'aquest riu al Freser. A la **Figura 2** es pot observar el curs que segueixen el riu Ter i el riu Freser. Tots dos rius neixen al Pirineu de Girona, essent el Freser el principal afluent del Ter.

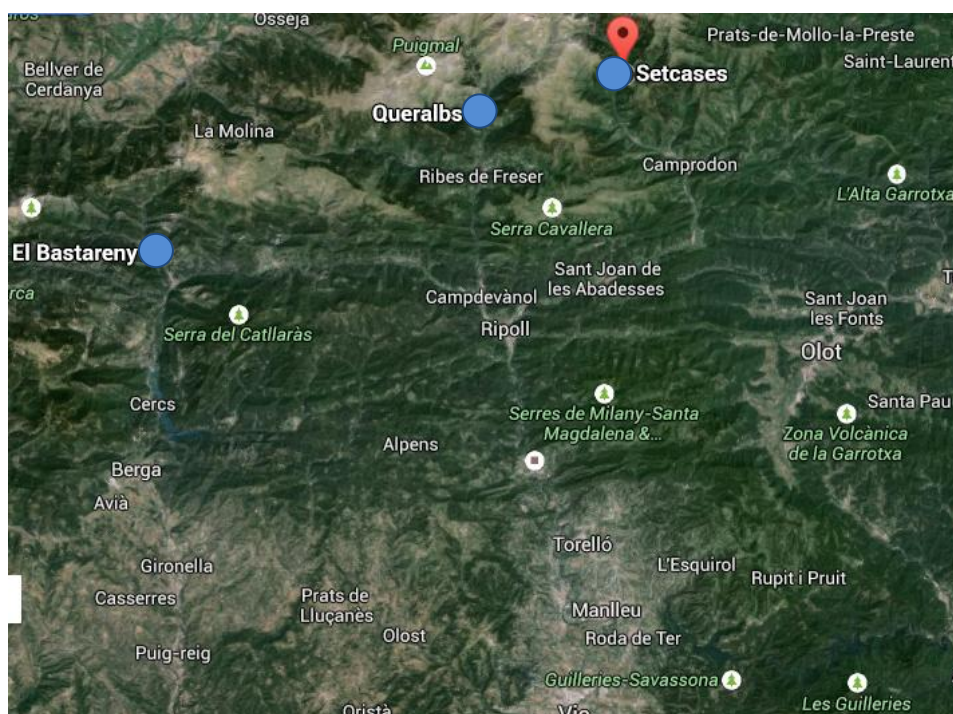


Figura 1. Mapa de Google Earth (www.google.es/maps). Els punts blaus indiquen els llocs on es van capturar les truites (*Salmo trutta*), a Bagà, Queralbs (Núria) i Setcases (Ter).

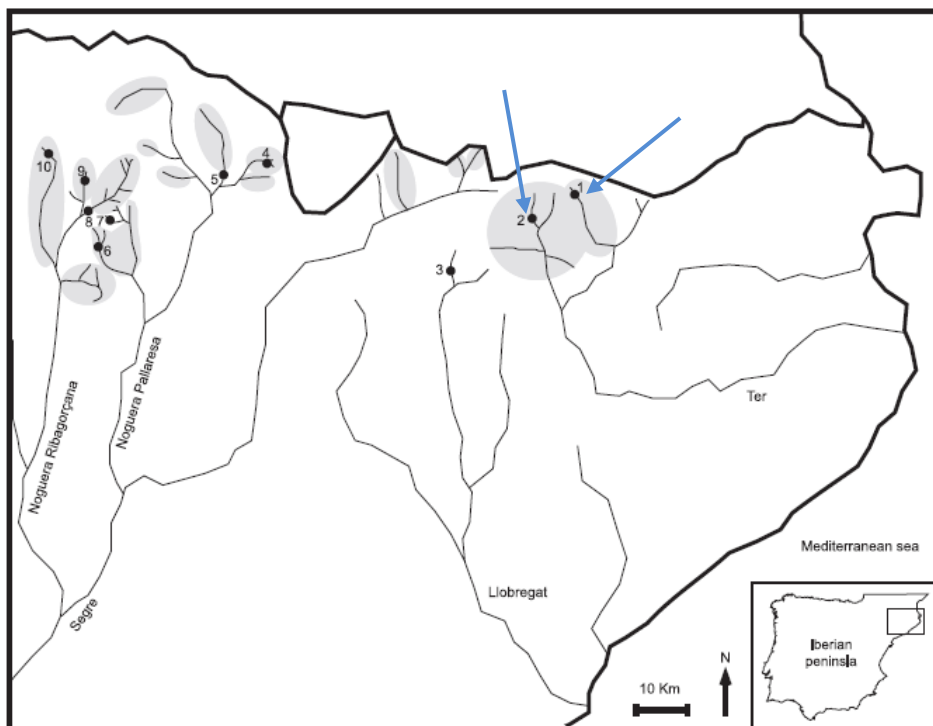


Figura 2. Localitzacions geogràfiques de les mostres de truita (*Salmo trutta*) obtingudes. Les zones representades amb un color més fosc són les que formen part dels refugis genètics (Araguas et al., 2008). Els punts 1 i 2 són els corresponents al riu Ter i al Freser (Núria).

Les truites del riu de Núria i del Ter es van capturar l'any 2014 gràcies a la pesca elèctrica. És la tècnica més eficient per rius de poca fondària, provoca pocs danys als peixos i permet obtenir mostres representatives de tota la població. Aquest mètode consisteix en produir un camp de corrent elèctric dins l'aigua, de manera que es provoca una paràlisi al peix i és més fàcil la seva captura amb salabres (Junta de Extremadura, 2014). Els exemplars són anestesiats per a la seva manipulació amb metasulfonat de tricaina (MS-222). Un cop les truites havien estat mesurades (per altres estudis que es fan al LIG) i s'havia obtingut l'aleta adiposa (veure [Figura 3](#)), es deixaven recuperar de l'anestèsic i es retornaven al seu hàbitat natural. Les mostres del centre piscícola de Bagà es van capturar amb salabre des de la vorera de les piscines on es crien al centre. El nombre d'exemplars caracteritzats de cada mostra, el lloc de captura i l'any, es mostra a la [Taula 1](#).



Figura 3. Imatge de la truita de riu (*Salmo trutta*) (White, 2003). L'aleta adiposa (assenyalada amb la fletxa) és la que s'ha utilitzat per fer l'anàlisi.

Taula 1. Mostres utilitzades per realitzar aquest estudi, lloc i any de pesca de les truites (*Salmo trutta*) i nombre d'exemplars totals per cada mostra.

Mostra	Lloc	Any	Nombre d'exemplars
Riu Ter	Setcases (camí de Vallter)	2014	54
Riu Freser	Queralbs (riu de Núria)	2014	41
Bagà	Centre Piscícola de Bagà	2003	96

2. Extracció de DNA i obtenció del genotips

En aquest treball només s'han obtingut els genotips de les mostres del Ter. Per les mostres dels altres punts s'han utilitzat els genotips ja disponibles al Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona. Per fer el genotipatge dels microsatèl·lits primer es va extreure el DNA utilitzant el procediment de *Chellex - proteïnasa K* (Estoup *et al.*, 1996), i després es van amplificar 5 loci de microsatèl·lits: *SsaSL438*, *Ssa85*, *Str73*, *Str591*, *SsHaeIII* i el locus de la *LDH-C1*. Tots ells estaven marcats amb un fluorocrom distintiu a l'extrem 5' del primer forward. Es va realitzar una PCR pel mix de primers dels 5 microsatèl·lits i una altra pel locus de la *LDH-C1*. En el cas dels microsatèl·lits, la PCR múltiplex (10 µL) contenia 1µL de l'extracció de DNA, 5 µL de KitGoTaq 2x (Promega) (400µM dATP, dGTP, dTTP i 4mM de MgCl₂), mix de primers 10x (concentració final *SsaSL438*, *Ssa85*, *Str73*, *SsHaeIII* era 0,2 µM i pel *Str591* era 0,4 µM) i 3 µL d'aigua lliure de RNasa. Les condicions de la PCR eren les següents: inicialment es desnatura el DNA a 94°C durant 2 minuts; a continuació hi ha 35 cicles (desnatura a 95°C 1 minut, alineament a 54°C durant 1 minut i elongació a 72°C durant 1 minut), una elongació final a 72°C durant 15 minuts i, llavors, les mostres es conserven a 4°C.

La PCR per la *LDH-C1* (10 µL) contenia 1µL de l'extracció de DNA, 1 µL de *Buffer 1x*, 0.3 µL de $MgCl_2$ (1.5 mM), 1 µL de dNTPs (200µM), 0.15 µL de *primer F* (0.15 µM), 0.1 µL de *primer R* (0.1 µM), 0.15 µL de *primer 90* (0.15 µM), 0.1 µL de *primer 100* (0.1 µM), 6.1 µL d'aigua lliure de RNasa i 1.3 µL de *Taq Gold*. El DNA inicialment es desnatura a 94°C durant 15 minuts; a continuació hi ha 30 cicles (desnaturalització a 94°C 1 minut, alineament a 55°C durant 1 minut i elongació a 72°C durant 1 minut), una elongació final a 72°C durant 5 minuts i, llavors, les mostres es conserven a 4°C.

Per injectar a l'analitzador genètic, Applied Biosystems 3730 xl Genetic Analyzer, es preparen les mostres a un volum final de 10µL en cada pouet (10 µL formamida, 0.25 µL marcador Liz, 1µL PCR mix, 1 µL producte de PCR LDH). Es centrifuguen 10 segons a màxima velocitat i es posen al termociclador durant 3 minuts a 94°C perquè es desnatura el DNA.

3. Identificació de genotips i anàlisi estadístiques

El programa utilitzat per identificar els genotips dels individus a partir del cromatograma obtingut a l'analitzador genètic és el software GENEMAPPER® (Applied Biosystems). Per comprovar si es compleix l'equilibri de Hardy-Weinberg s'utilitza el test de probabilitats exactes del programari FSTAT (Goudet, 2005). Aquest programa també proporciona els estimadors de diversitat genètica dins i entre les localitats estudiades. Per detectar al·lells nuls, és a dir, al·lells que no es van amplificar a la PCR, s'ha emprat el programa MICRO-CHECKER. Aquests al·lells poden provocar errors en els genotips i produir falses desviacions de l'equilibri de Hardy-Weinberg, també poden esbiaixar l'anàlisi de diversitat poblacional (Van Oosterhout et al., 2004).

Per tal de determinar quantes poblacions de truita hi ha realment a la mostra del riu Ter s'utilitza el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Aquest programa es fa servir també per identificar la introgressió resultant de les repoblacions en el riu Ter, i per determinar les diferències genètiques entre les tres mostres estudiades. Les opcions seleccionades a cada anàlisi es detallen a continuació.

En primer lloc es crea un *New project*, se selecciona el fitxer de dades que es vol utilitzar en cada cas i el directori on es volen guardar els resultats. També s'introdueix el nombre d'individus que hi ha a cada fitxer que s'analitzarà, tal com es mostra a la [Taula 2](#).

Taula 2. Nombre total d'individus utilitzats per cada anàlisi realitzat amb el programa STRUCTURE i objectius per cada grup d'individus.

	Ter	Núria	Bagà	Total	Objectiu
Ter	52	-	-	52	Unitats presents
Ter_Bagà	52	-	96	148	Efectes de les repoblacions
Ter_Núria_Bagà	52	41	96	189	Divergències entre les poblacions

A continuació es configura el *New Parameter Set*. A la pestanya de **Run Length: Length of Burnin Period** és 50.000 (correspon al nombre de simulacions que el programa farà abans de processar les dades per minimitzar l'efecte de la configuració d'inici) (Pritchard et al., 2000). El *Number of Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) Reps after Burnin* és 200.000, per trobar aquest nombre de *runs* s'han realitzat diverses proves i s'ha determinat que aquest dona resultats consistents.

A la pestanya d'**Ancestry Model**:

- **A les anàlisis de Ter i Ter_Núria_Bagà:** *Use admixture model* → *Advanced* → *Configure* → seleccionar *Separate Alpha for each Population*. Els individus pot ser que tinguin ancestres comuns com a resultat de la migració o de l'alliberament d'exemplars. L'individu *i* ha heretat alguna fracció del genoma dels ancestres en la població *k*. L'*output* del programa dona l'estimació d'aquestes proporcions per cada individu i la mitjana de la localitat per a cada possible valor de *k* assajat (on *k* seria el nombre possible de poblacions ancestrals) (Pritchard et al., 2000).
- **A l'anàlisi de Ter_Bagà:** *Use Population Information to test for migrants* → *Advanced* → GENSBACK:0 i MIGRPRIOR:0 , *Admixture Model* → *Configure* → seleccionar *Separate Alpha for each Population*. Aquest model utilitza la informació genètica de la mostra de Bagà per catalogar els individus del Ter indicant per cadascun d'ells l'estimació de genoma originari dels exemplars del centre piscícola (Pritchard et al., 2000).

A la pestanya **Allele Frequency Model** se selecciona *Allele Frequencies Correlated* quan s'analitzen les dades del Ter, en aquesta situació es considera que les freqüències a les diferents unitats poblacionals poden ser semblants (probablement per migració o ancestres comuns) (Pritchard et al., 2000). I s'escull *Allele Frequencies Independent* quan les freqüències al·lèliques a les diferents poblacions són diferents (Pritchard et al., 2000). Aquesta opció és la utilitzada quan s'analitzen les dades de Ter_Bagà i Ter_Núria_Bagà.

Finalment, a la pestanya **Advanced**, en el cas del Ter i Ter_Núria_Bagà, es mantenen les opcions que presenta el programa per defecte. En canvi, per Ter_Bagà també s'ha de seleccionar *Update allele frequencies using only individuals with POPFLAG=1 data*, que en el cas que ens ocupa, són els exemplars del centre piscícola de Bagà. D'aquesta manera, s'indica al programa que és la mostra de referència a la que cal assignar o no els altres exemplars.

Per realitzar l'anàlisi, es configura un *New job*. Per tots els anàlisis s'han fet 25 iteracions. I, pel que fa a les k , pel Ter s'ha fet d'1 a 4, pel Ter_Bagà només $k=2$ i per Ter_Núria_Bagà d'1 a 6.

Un cop obtingudes les dades amb el programa STRUCTURE s'ha d'avaluar el valor de k i les iteracions per determinar el nombre de grups genètics que més bé expliquen les dades. Per fer-ho, s'entren els resultats del programa STRUCTURE a l'STRUCTURE HARVESTER (Earl et al., 2012) (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) que es basa en el mètode d'Evanno (Evanno et al., 2005). No obstant, aquest mètode no és efectiu per determinar com a millor opció $k=1$, per tant, s'ha de comprovar. Si la k resultant és 2, hauria de tenir associada una millor probabilitat que $k=1$ en els resultats directes de STRUCTURE. Si no és així, i la millor probabilitat és la de $k=1$, es determina que aquest és el resultat correcte, per tant, tots els exemplars analitzats seran de la mateixa unitat genètica.

Resultats

Un cop obtinguts els genotips amb el software GENEMAPPER® (Applied Biosystems) s'han eliminat de l'anàlisi els individus 25 i 36 del Ter, ja que no es van obtenir els genotips dels loci analitzats a causa d'una mala amplificació a la PCR múltiple, probablement, com a conseqüència de la mala qualitat de l'extracció. Per tant, dels 54 individus capturats inicialment se'n descarten dos i es continua l'estudi amb 52 truites provinents del riu Ter.

1. Diversitat local

El programa FSTAT proporciona els estimadors de diversitat genètica de les localitats estudiades. A la **Taula 3** es presenta el nombre d'al·lels resultants per cada població i el total d'al·lels detectats en el conjunt de les mostres. Aquest nombre està influenciat pel tamany de la mostra. Per tant, com que a Bagà hi ha 96 individus, el nombre d'al·lels serà major que per Ter i Núria que n'hi ha 52 i 41, respectivament.

Taula 3. Resultats del programa FSTAT. Nombre d'al·lels per cada locus microsatèl·lit i per la *LDH-C1*.

	TER	NÚRIA	BAGÀ	AL·LELS TOTALS
<i>SsHaeIII</i>	5	4	11	15
<i>Ssa85</i>	7	8	5	9
<i>SsaSL438</i>	4	6	5	6
<i>Str591</i>	3	4	4	8
<i>Str73</i>	2	4	4	4
<i>LDH_C</i>	1	2	2	2

Per això, per fer comparacions, és millor fer servir la riquesa al·lèlica per cada locus (veure **Taula 4**), aquest paràmetre teòric està calculat a partir de les freqüències al·lèliques de mostres de la mateixa grandària a totes les localitats. El locus *SsHaeIII* és el que presenta la major riquesa d'al·lels com a resultat de la diversitat present en els peixos del centre piscícola de Bagà. A les poblacions naturals el locus amb més diversitat al·lèlica és el *Ssa85*. Pel que fa als loci *SsaSL438*, *Str591*, *Str73* i *LDH-C1* la població amb menys riquesa al·lèlica és la del Ter.

Taula 4. Resultats del programa FSTAT. Riquesa al·lèlica per cada locus i població. Està basat en una mostra de 40 individus diploides.

	TER	NÚRIA	BAGÀ	TOTAL
<i>SsHaelll</i>	4.567	3.976	8.918	10.156
<i>Ssa85</i>	6.435	7.976	4.963	7.806
<i>SsaSL438</i>	4.000	6.000	4.992	5.930
<i>Str591</i>	2.784	4.000	3.607	6.124
<i>Str73</i>	2.000	3.951	3.998	4.000
<i>LDH_C</i>	1.000	2.000	1.965	2.000

2. Equilibri de Hardy-Weinberg

A la **Taula 5** es pot observar la diversitat genètica, estimada com la proporció d'heterozigots esperats en equilibri de Hardy-Weinberg, per locus i per cada població estudiada. El locus de *SsHaelll* és el que presenta una diferència més considerable entre les dues poblacions natives (Ter i Núria) i la de piscifactoria (Bagà). La *LDH-C1* a la població del Ter no presenta cap heterozigot, mentre que a Núria i a Bagà sí que n'hi ha.

Taula 5. Resultats del programa FSTAT. Diversitat genètica per cada locus (rang entre 0 i 1).

	TER	NÚRIA	BAGÀ
<i>SsHaelll</i>	0.202	0.398	0.781
<i>Ssa85</i>	0.609	0.827	0.684
<i>SsaSL438</i>	0.696	0.739	0.689
<i>Str591</i>	0.346	0.585	0.234
<i>Str73</i>	0.404	0.277	0.553
<i>LDH_C</i>	0.000	0.200	0.061

Taula 6. Resultats del programa FSTAT. *Fis* per població.

	TER	NÚRIA	BAGÀ
<i>SsHaelll</i>	-0.069	0.204	0.067
<i>Ssa85</i>	-0.264	0.027	0.056
<i>SsaSL438</i>	0.144	0.274	0.033
<i>Str591</i>	-0.021	0.102	0.022
<i>Str73</i>	0.141	0.121	0.002
<i>LDH_C</i>	NA	0.878	-0.027
Mitjana	-0.011	0.190	0.039

A la **Taula 6** es mostren els resultats de *Fis per població*, i la seva significació s'indica a la **Taula 7**. *Fis* és una mesura del desequilibri de Hardy-Weinberg. Quan *Fis* val 0, la població compleix les proporcions genotípiques esperades en l'equilibri. Els nombres negatius indiquen un excés d'heterozigots i els positius un dèficit.

Taula 7. Resultats del Test de probabilitats exactes dins de les mostres obtinguts amb el programa FSTAT. Els p-valors significatius estan marcats amb un asterisc (*).

	TER	NÚRIA	BAGÀ
<i>SsHaelll</i>	1.000	0.0611	0.1417
<i>Ssa 85</i>	0.9972	0.4194	0.2139
<i>SsaSL438</i>	0.0611	0.0111	0.3417
<i>Str591</i>	0.7111	0.1917	0.4000
<i>Str73</i>	0.2750	0.2694	0.5861
<i>LDH-C1</i>	NA	0.0028*	1.000
Total	0.5972	0.0028*	0.1139

Els resultats dels test de probabilitats exactes del programa FSTAT només indica com a significatiu el valor de *Fis* al locus de la *LDH-C1* a la població del riu Núria. Aquesta significació és important ja que fa que el test combinat amb tots els loci d'aquesta mateixa població també sigui significatiu. És per això, que es pot determinar que la població del riu de Núria no compleix amb alguna o vàries de les condicions de l'equilibri de Hardy-Weinberg.

Taula 8. Resultats obtinguts amb el programa MICRO-CHECKER, els microsatèl·lits (*SsaSL438*, *Ssa85*, *Str73*, *Str591*, *SsHaelll*) per cada població estudiada (Ter, Núria i Bagà). No: no presenten al·lels nuls. Sí: presenten al·lels nuls.

	TER	NÚRIA	BAGÀ
MICROSATÈL·LITS			
<i>Str73</i>	No	No	No
<i>SsHaelll</i>	No	No	No
<i>Str591</i>	No	No	No
<i>SsaSL438</i>	No	Sí	No
<i>Ssa85</i>	No	No	No

Per detectar al·lels que no s'han amplificat correctament amb la PCR (al·lels nuls) s'utilitza el programa MICRO-CHECKER. A la **Taula 8** es mostren els resultats obtinguts per cada mostra de truites en relació a si els microsatèl·lits presenten al·lels nuls, o no. Només la població de

truites de Núria presentaria al·lels nuls al locus *SsaSL438*, però, tot i que aquest fet podria provocar resultats significatius en els test de Hardy-Weinberg, en els anàlisis realitzats anteriorment amb el programa FSTAT no s'ha vist aquest efecte i cal suposar que la freqüència de l'al·lel nul és baixa.

3. Població del Ter

A la [Taula 9](#) es mostren els resultats obtinguts a l'STRUCTURE HARVESTER després de carregar el fitxer del Ter resultant de les 25 execucions del programa STRUCTURE. Com ja s'ha explicat anteriorment, l'STRUCTURE HARVESTER no pot decidir la k més petita ni la més gran entre els valors assajats, que, en aquest cas, són $k=1$ i $k=4$. El programa va donar com a resultat $k=2$ ja que presenta un valor de Delta k més gran que $k=3$.

Taula 9. Resultats de l'STRUCTURE HARVESTER per la població de truites del Ter. Es mostren els possibles nombres de poblacions (k) que hi podria haver a la localitat del riu Ter.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	25	-420.1400	0.4021	NA	NA	NA
2	25	-438.8440	13.8267	-18.704000	30.324000	2.193153
3	25	-427.2240	8.7932	11.620000	6.504000	0.739663
4	25	-422.1080	2.5604	5.116000	NA	NA

Per tal d'evitar resultats erronis causats per aquestes limitacions es comprova manualment si la k proposada presenta el *Mean LnP(K)* més gran. Atès que $P(K)$ és un estimació de la probabilitat de que hi hagi aquella k i com més gran és el logaritme (Ln) de la probabilitat més probable és aquell succés (Pritchard et al., 2000). Comprovant els *Mean LnP(K)* de la [Taula 9](#), es pot determinar que el més gran és -420.1400 i correspon a $k=1$. Per tant, només hi haurà una població de truites al punt de mostreig del Ter. Aquest criteri també es pot visualitzar al gràfic que es mostra a la [Figura 4](#), on hi ha la representació gràfica del *Mean LnP(K)* de la [Taula 9](#) per cadascun dels valors de k que s'han avaluat amb el programa STRUCTURE.

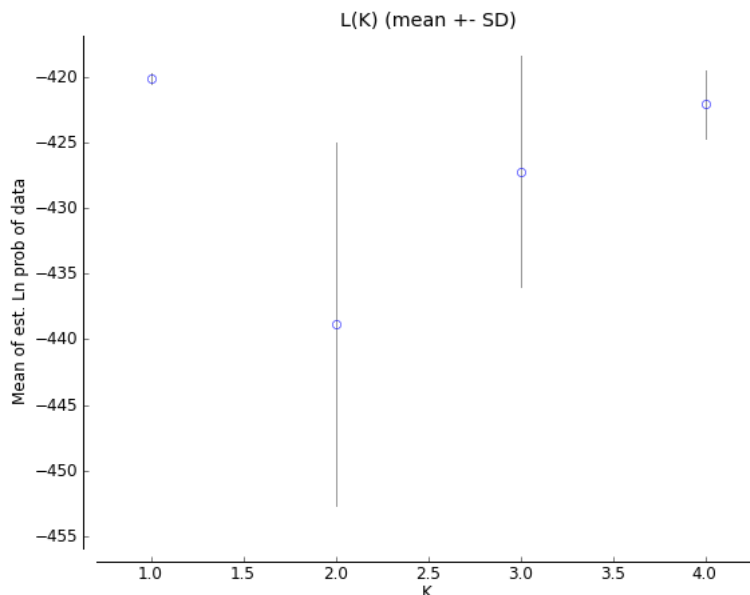


Figura 4. Gràfic de la probabilitat de k amb la seva desviació estàndard. S'ha obtingut amb el programa STRUCTURE HARVESTER.

En aquest estudi també es volia comprovar si la població de truites del Ter estava influenciada pels alliberaments de truites criades al centre piscícola de Bagà. Per fer-ho, s'ha utilitzat el programa STRUCTURE, però executant uns altres paràmetres per poder determinar la proporció de genoma del centre piscícola que té cada un dels individus de la localitat del Ter. Els resultats es mostren a la **Figura 5**.

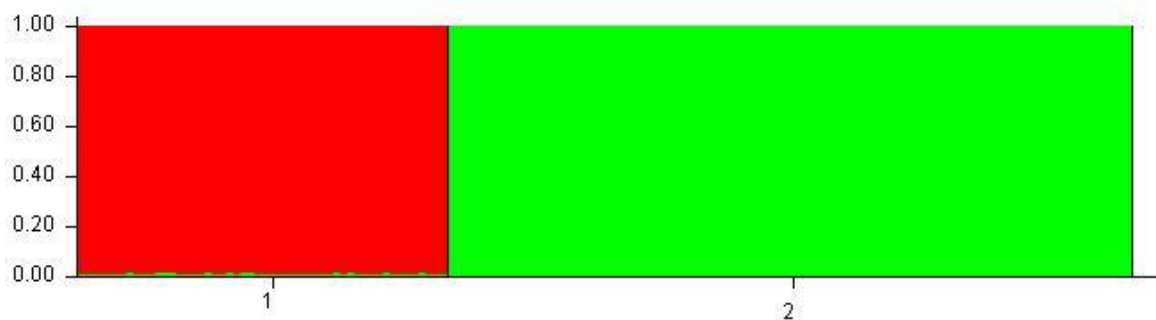


Figura 5. Estimació de la proporció de genoma natiu i de repoblació dels individus capturats al riu Ter. Cada individu està representat per una línia vertical, amb longituds de colors proporcionals a cada clúster ($k=2$) indicat. Els números 1 i 2 corresponen a les poblacions de Ter i Bagà, respectivament. Aquest gràfic s'ha obtingut amb el programa STRUCTURE i correspon a la millor execució de les 25 assajades, amb un $\text{LnP(D)} = -29985.5$

Tal com es pot observar a la **Figura 5**, la població 1, que correspon al Ter (vermell), és clarament diferent a la població 2, que correspon a Bagà (verd). Les traces de Bagà que es

poden observar al Ter són residuals, i, per tant, no es consideren significatives. Així doncs, es pot concloure que no hi ha influència de Bagà sobre la població de truites del Ter.

4. Diversitat poblacional i anàlisi de la diversitat

Els anàlisis de diversitat poblacional que es poden observar a la **Taula 10**, mostren la mitjana d'heterozigosi observada per locus (H_o), l'esperada (H_s), la total (H_T) i la diferenciació genètica entre poblacions (G_{ST}). Les dues primeres columnes, que són H_o i H_s , presenten uns valors molt propers a tots els loci, per tant, l'heterozigosi observada és similar a l'esperada, fet que està d'acord amb els pocs desequilibris de Hardy-Weinberg detectats.

Pel que fa a la G_{ST} mesura la diferenciació genètica entre les diferents poblacions estudiades i permet incloure un número il·limitat d'al·lels per loci. Si el valor de G_{ST} és 0 indica que les freqüències al·lèliques són iguals a totes les poblacions, no hi ha hagut diferenciació. Mentre que si una població està fixada amb al·lels diferents tindrà un valor d'1 (Nei, 1978).

Taula 10. Resultats de l'Anàlisi de Diversitat Gènica de Nei obtinguts amb el programa FSTAT. H_o : mitjana d'heterozigosi observada per locus. H_s : heterozigosi esperada. H_T : diversitat total en el conjunt del territori. G_{ST} : proporció de diversitat resultant de la diferenciació entre les poblacions analitzades.

Locus	H_o	H_s	H_T	G_{ST}
<i>SsHaelll</i>	0.421	0.461	0.771	0.402
<i>Ssa85</i>	0.740	0.707	0.819	0.137
<i>SsaSL438</i>	0.600	0.708	0.791	0.105
<i>Str591</i>	0.369	0.388	0.717	0.459
<i>Str73</i>	0.381	0.412	0.699	0.411
<i>LDH_C</i>	0.029	0.087	0.461	0.812
Total	0.423	0.460	0.710	0.351

Així doncs, es pot determinar que els loci *Ssa85* i *SsaSL438* són els que presenten menor diferenciació entre les freqüències al·lèliques de les tres mostres. En canvi, en el cas de *SsHaelll*, *Str591* i *Str73* les freqüències al·lèliques són altament diferents. En relació al locus de la *LDH-C1*, amb un valor de 0.812, es pot concloure que, generalment, les poblacions tenen fixats al·lels diferents. De fet, els resultats obtinguts pels dos al·lels del locus de la *LDH-C1*, el 90 i el 100, demostren que a la població del Ter l'al·lel 100 estava fixat amb una freqüència d'1.000 i a la de Núria amb 0.890, mentre que a Bagà només presentaven aquest al·lel amb una freqüència de 0.032. Això indica que al centre piscícola hi domina la presència de l'al·lel 90.

Finalment, per saber si els individus capturats a cada punt (riu Ter, riu Núria i Bagà) provenien de poblacions diferents s'ha realitzat un altre anàlisi amb l'STRUCTURE HARVESTER emprant el fitxer obtingut del programa STRUCTURE, on es va utilitzar com a fitxer de dades inicial el que hi constaven els individus de totes tres localitats (Ter, Núria i Bagà).

A la **Taula 11** es mostren els resultats obtinguts a l'STRUCTURE HARVESTER. En aquest cas, la k determinada pel programa és 2. A la **Figura 6** es pot observar el gràfic de $Mean LnP(K)$ on també es pot veure que $k=2$ és el resultat que millor explica aquestes dades.

Taula 11. Sortida de l'STRUCTURE HARVESTER per determinar quantes poblacions hi ha en el conjunt de mostres de Ter, Núria i Bagà. Es mostren els possibles nombres de poblacions (d'1 a 6) que hi podria haver.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	25	-3329.3440	0.0507	NA	NA	NA
2	25	-2246.4160	0.3727	1082.928000	1267.468000	3400.837498
3	25	-2430.9560	704.6547	-184.540000	595.104000	0.844533
4	25	-2020.3920	7.9104	410.564000	362.004000	45.763166
5	25	-1971.8320	46.7419	48.560000	33.984000	0.727057
6	25	-1957.2560	8.4801	14.576000	NA	NA

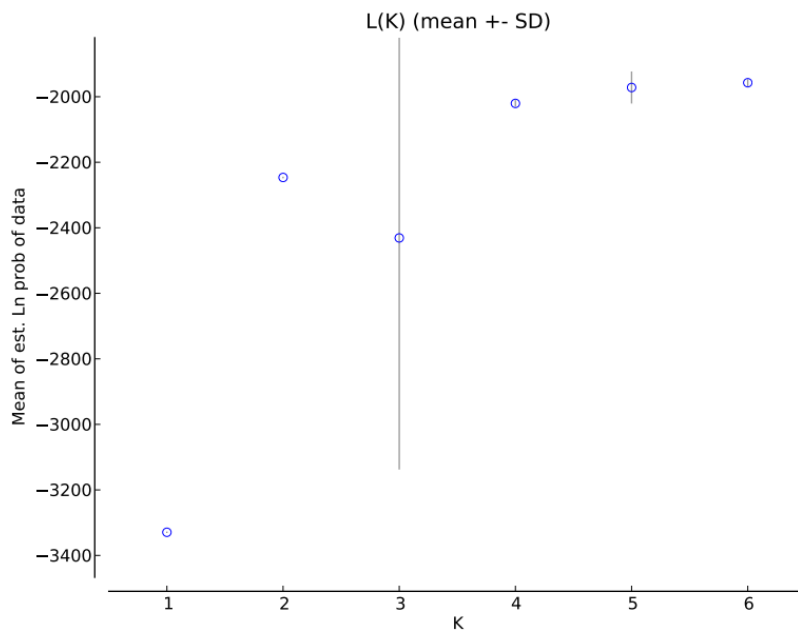


Figura 6. Gràfic de la probabilitat de k amb la seva desviació estàndard. S'ha obtingut amb el programa l'STRUCTURE HARVESTER.

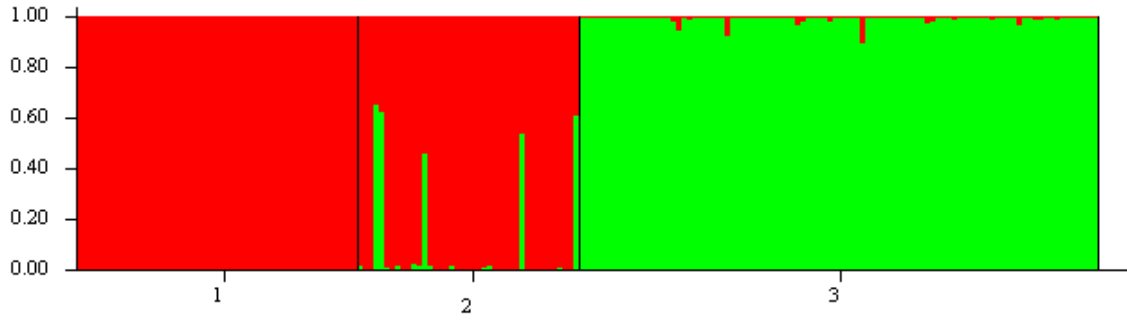


Figura 7. Estimació de la proporció del genoma dels dos clústers identificats per STRUCTURE a cadascun dels individus analitzats. La proporció està representada per una línia vertical amb k colors diferents, la longitud de cada color és proporcional a la proporció de genoma de cada clúster k . Els números 1, 2 i 3 corresponen a les poblacions de Ter, Núria i Bagà, respectivament. S'ha obtingut amb el programa STRUCTURE i correspon a la q_run_50 amb un $\text{LnP}(D) = -2245.8$

Els individus del riu Ter i del riu de Núria són molt semblants entre ells i clarament diferents dels que provenen del centre piscícola de Bagà. A Núria (grup 2) hi ha exemplars que presenten parts del genoma provinents dels individus del centre piscícola, així doncs, es pot determinar que és una població afectada pels alliberaments.

Discussió

La població de truites del riu Ter i del riu de Núria formen part dels refugis genètics creats per la Generalitat de Catalunya des de l'any 1997 (Araguas et al., 2008). Regularment, des del LIG, s'avalua l'estat d'integritat genètica d'aquestes poblacions quantificant els nivells d'introgressió de peixos de piscifactoria. Durant els anys 1993, 1999, 2004 i 2006 es van agafar mostres de truites en unes mateixes localitats per tal d'analitzar la seva variació genètica. Aquestes anàlisis es basaven en el locus *LDH-C1* atès que permet distingir les poblacions de truita natives (homozigòtiques per l'al·lel *100) de les exògenes que provenen de piscifactories (on l'al·lel *90 està pràcticament fixat) (Chat et al., 2008). Pel que fa a la població de truites del riu Ter, no es va detectar introgressió genètica del 1993 al 2006. En canvi, a les aigües del riu de Núria, a partir de l'any 2004 es van començar a detectar petits nivells d'introgressió de peixos de piscifactoria (Araguas et al., 2008), i, deu anys més tard, s'han confirmat en aquest treball.

Un dels objectius d'aquest treball era estudiar el nombre de poblacions que formaven les truites de la localitat del riu Ter capturades l'any 2014. Gràcies a les diferents anàlisis realitzades, s'ha pogut determinar que al Ter només hi ha una població de truites. D'altra banda, també s'ha estudiat si aquesta població presentava introgressió genètica d'individus provinents del centre piscícola (Bagà). S'ha conclòs que les truites del Ter no presenten l'al·lel *LDH-C1*90* i, per tant, no hi ha introgressió genètica d'exemplars de piscifactoria. Així doncs, durant els últims disset anys, les poblacions de truita en el refugi genètic del Ter no ha patit alliberaments de truites de Bagà, i són, bàsicament, poblacions natives.

Respecte a la caracterització genètica d'aquestes truites en relació a altres individus del riu Freser (Núria) i del centre piscícola (Bagà), les anàlisis realitzades amb el programa STRUCTURE HARVESTER han mostrat la presència de dues unitats genètiques clarament diferenciades: la dels rius (Ter i Núria) i la de Bagà. Per tant, segons aquests resultats, es podria concloure que les truites del riu Ter i del riu Núria formen part d'una mateixa població i no presenten característiques genètiques diferents. No obstant, estudis anteriors suggereixen que en els rius de la conca Mediterrània, les truites presenten una diversitat fenotípica alta entre les poblacions naturals (Sanz et al., 2002). Utilitzant arbres filogenètics de la regió de control del DNA mitocondrial es va veure que les truites provinents del riu de Núria a Queralbs eren més properes al llinatge anomenat Adriàtic (per la seva abundància en rius d'aquest mar), mentre que les truites del riu Ter ho eren del llinatge Mediterrani (veure [Figura 8](#), Cortey et al., 2004).

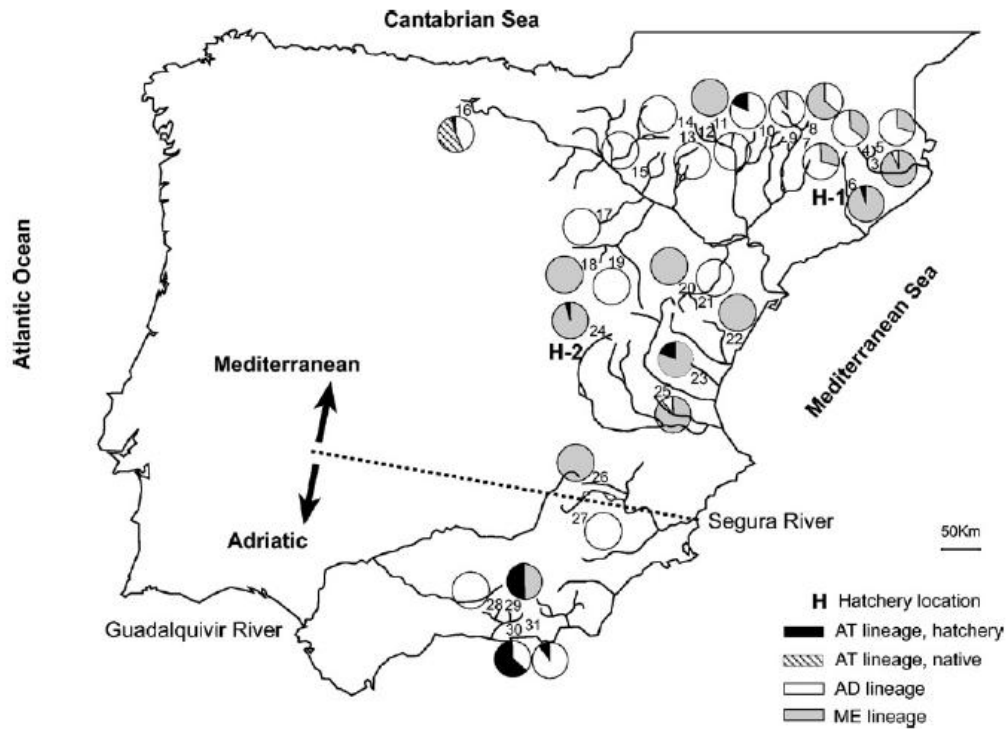


Figura 8. Llocs on es van obtenir les mostres de les truites del treball de Cortey et al. (2004) i distribució dels llinatges de truita als rius Mediterranis de la Península Ibèrica. La línia de punts indica la frontera entre els llinatges Mediterrani (ME) i Adriàtic (AD) tal com va suggerir Machordom et al. (2000). La mostra número 3 correspon al Ter i la número 4 a Queralbs (Núria).

És per aquest motiu que, tot i haver obtingut dues poblacions resultants (rius i centre piscícola), com que el nombre d'individus emprats per l'anàlisi divergeix (52, 41 i 96, a Ter, Núria i Bagà, respectivament) s'ha realitzat una comprovació del nombre de poblacions entre els dos rius. S'han introduït les dades de Ter i Núria al programa STRUCTURE i s'han analitzat seleccionant les mateixes opcions que per Ter_Núria_Bagà (explicat a 3. Identificació de genotips i anàlisis estadístiques, de l'apartat de Metodologia) amb uns valors de k d'1 a 4. Els resultats obtinguts a l'STRUCTURE HARVESTER són els que es mostren a la [Taula 12](#).

Taula 12. Sortida de l'STRUCTURE HARVESTER per determinar quantes poblacions hi ha en el conjunt de mostres de Ter i Núria. Es mostren els possibles nombres de poblacions (d'1 a 4) que hi podria haver.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	25	-1116.5960	0.0351	NA	NA	NA
2	25	-920.7520	0.2143	195.844000	122.452000	571.349565
3	25	-847.3600	12.9855	73.392000	25.704000	1.979433
4	25	-799.6720	1.1190	47.688000	NA	NA

Tal com es pot observar a la [Taula 12](#), la k determinada pel programa és 2. Però, per tal d'evitar resultats erronis causats per les limitacions del programa, es comprova manualment si la k proposada presenta el $Mean LnP(K)$ més alt. Atès que aquest fet es complex, es descarta la possibilitat que hi hagi una sola població i es valida el resultat. Així doncs, els individus del Ter i de Núria no formen una població, sinó que en formen dues de diferents.

El fet que a la [Figura 7](#) el programa STRUCUTRE només hagi detectat dues poblacions (rius i Bagà) pot ser degut al nombre d'individus de Bagà, ja que eren 96, aproximadament el doble, que a les mostres del Ter i de Núria per separat. El programa, per defecte, ha agrupat les poblacions en grups de mostres similars, de manera que, han quedat dos grans grups (Bagà amb 96 individus i Ter-Núria amb 93) que han estat separats resultant-ne dues poblacions, considerant que la principal divergència es trobava entre les truites natives dels rius i les de Bagà.

Com s'ha demostrat a la darrera anàlisi realitzada, les truites del Ter, del Freser (Núria) i de Bagà formen tres poblacions diferents. A la [Figura 9](#) es mostra el gràfic corresponent, on es pot observar que alguns individus del Ter tenen proporcions del genoma provinents dels peixos del Freser i viceversa. I que, les truites del Freser (Núria) continuen presentant nivells d'introgressió genètica d'exemplars de piscifactoria, degut a alliberaments furtius durant els últims anys; fet que ja es va manifestar a l'estudi d'Araguas et al. (2008).

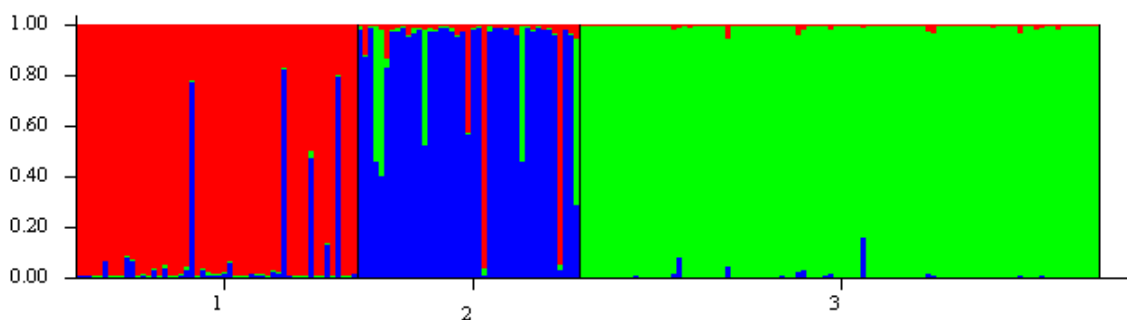


Figura 9. Estimació de la proporció del genoma dels tres clústers identificats per STRUCTURE a cada un dels individus analitzats. La proporció està representada per una línia vertical amb k colors diferents, la longitud de cada color és proporcional a la proporció del genoma de cada clúster k . Els números 1, 2 i 3 corresponen a les poblacions de Ter, Núria i Bagà, respectivament. Aquest gràfic mostra els resultats obtinguts en la comprovació del nombre de poblacions de truita dels tres punts mostrejats (Ter, Núria i Bagà). S'ha obtingut amb el programa STRUCTURE i correspon a la q_run_67 amb un $LnP(D) = -2063.5$

Conclusions

The present study characterized the brown trout (*Salmo trutta*) population in the upstream of the Ter River by using genotype information at 5 microsatellite loci and at the *LDH-C1* locus. Our results show that there is only a single brown trout population in the upper reaches of the Ter River. To assess levels of hatchery fish (Bagà) introgression another test was done and the results proved that there was no introgression of Bagà trouts. Therefore, the Ter River basin is, since 1997, a “genetic refuge” which contributes to persistence of brown trout wild populations.

Furthermore, we also studied the genetic differentiation of the Ter River brown trout in relation to another population from the Freser River headwaters (the Núria stream). Estimation of genetic divergence among Ter River fishes, the ones inhabiting upstream stretches of the Freser River (Ter River tributary) and hatchery fishes, showed that there are three clearly differentiated populations: Ter, Núria and Bagà.

However, these results detect that some brown trout from Núria River have genetic characteristics from Ter and Bagà fishes. This finding indicates that the analysed trout population in the Freser River was affected by released Bagà trout, and, on the other hand, that there is natural contact between Ter and Freser brown trout populations.

Bibliografia

- 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 the eastern Pyrenees. *Ecology of Freshwater Fish*, 17(4), 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. *Conservation Biology : The Journal of the Society for Conservation Biology*, 23(4), 871-878.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biología* (p. 1532). Ed. Médica Panamericana. Retrieved May 04, 2015, from <https://books.google.com/books?id=QcU0yde9PtK&pgis=1>
- Chat, J., Manicki, A., & Merchernek, N. (2008). Typing for brown trout LDH-C1* alleles together with microsatellites by automated sequencing. *Conservation Genetics*, 9(6), 1669-1671.
- Cortey, M., Pla, C., & García-Marín, J.-L. (2004). Historical biogeography of Mediterranean trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(3), 831-844.
- Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews. Genetics*, 5(6), 435-445.
- Estoup, A., Largiader, C. R., Perrot, E., & Chourrout, D. (1996). Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5, 295-298.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2004). A primer of Conservation Genetics (p. 236). New York: *Cambridge University Press*.
- Ferguson, A., & Flemming, C. (1983). *Evolutionary and Taxonomic Significance of Protein Variation in the Brown Trout (Salmo trutta L) and Other Salmonid Fishes Protein polymorphism: Adaptive and Taxonomic Significance*. *Academic Press*, London.
- Goudet, J. (2005). FSTAT. Retrieved May 07, 2015, from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Junta de Extremadura. (2014). Pesca y Ríos en Extremadura - POBLACIÓN PISCÍCOLA: PESCA ELÉCTRICA - Seguimiento de los ríos extremeños. Retrieved May 05, 2015, from <http://pescayrios.juntaextremadura.es/pescayrios/web/guest/seguimiento-de-los-rios->

extremenos?p_p_id=101_INSTANCE_2A8h&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-3&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_2A8h_struts_action=/asset_publisher/view_content&_101_INSTANCE_2A8h_urlTitle=poblacion-piscicola:-pesca-electrica&_101_INSTANCE_2A8h_type=content&redirect=/pescayrios/web/guest/seguimiento-de-los-rios-extremenos

- Lagoda, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Elsevier Science Ltd*, 5347(October), 424–429.
- Machordom, A., Suárez, J., Almodóvar, A., & Bautista, J.M., (2000). Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Spanish brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Mol. Ecol.*, 9, 1324-1338.
- McMeel, O. M., Hoey, E. M., & Ferguson, A. (2001). Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1*90 and *100 alleles. *Molecular Ecology*, 10(1), 29–34.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583–590.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945–959
- Raymond M. & Rousset F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86, 248-249.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*, 8, 103-106.
- Sanz Ball-Ilosera, 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, *Hewitt 2000*, 385–400.
- Sanz, N., Araguas, R. M., Fernández, R., Vera, M., & García-Marín, J.-L. (2008). Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Conservation Genetics*, 10(1), 225–236.
- 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. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538.
- Vera, M., Sanz, N., Hansen, M. M., Almodóvar, A., & García-Marín, J.-L. (2010). Population and family structure of brown trout , *Salmo trutta*, in a Mediterranean stream. *Marine and Freshwater Research*, 61, 676–685.

White, J. (2003). CalPhotos: Salmo trutta; Brown Trout. Retrieved May 10, 2015, from http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0903+0030