

**Desenvolupament de marcadors moleculars per
detectar hibridació entre dues espècies de peixos:
Squalius laietanus i *Squalius cephalus*.**

Nom estudiant: Marçal Lombarte Sanchez

Correu electrònic: mlombarte33@gmail.com

Grau en: BIOLOGIA

Nom del tutor: Núria Pérez Bielsa

Correu electrònic: nuria.perez@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a través de la plataforma de TFG: 04/07/2024

ÍNDEX

RESUM.....	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT.....	iii
REFLEXIÓ D'ÈTICA	iv
REFLEXIÓ DE SOSTENIBILITAT.....	iv
REFLEXIÓ DE PERSPECTIVA DE GÈNERE	iv
1. INTRODUCCIÓ	1
2. OBJECTIVES.....	4
3. MATERIAL I MÈTODES	4
3.2 PCR i seqüenciació.....	7
3.2.2 Amplificació per PCR.....	8
3.2.3 Seqüenciació.....	11
3.3 Anàlisi de les seqüències.....	12
4 RESULTATS.....	12
4.1 Resultats PCR.....	12
4.2 Resultat posicions variables de les seqüències	14
4.2.1 BMP4:.....	14
4.2.2 ACTB:.....	15
4.2.3 IRBP:.....	16
4.2.4 EGR2:.....	17
4.3 Dianes de restricció	17
5 DISCUSSIÓ.....	18
5.1 Amplificació PCR.....	18
5.2 Posicions variables dels gens.....	19
5.3 Mapes de restricció	21
6 CONCLUSIONS.....	21
AGRAÏMENTS.....	21
7 BIBLIOGRAFIA.....	22

RESUM

Squalius laietanus, conegut comunament com la bagra catalana, és una espècie de peix endèmica de Catalunya. El seu hàbitat natural abasta els rius des de l'Ebre fins a Portbou i des del Tec fins a l'Aglí, al sud de França. Durant els anys 90, les poblacions de *S. laietanus* van experimentar un descens significatiu a causa d'una combinació de factors, incloent-hi la contaminació de l'aigua i la introducció d'espècies exòtiques. Aquestes amenaces han causat una degradació extensa de l'hàbitat i han plantejat greus reptes per a la supervivència de l'espècie. Mesures de protecció eficaces són essencials i han de centrar-se en diverses àrees crítiques: abordar la contaminació de l'aigua, controlar les pràctiques de pesca no regulades, mitigar la pèrdua d'hàbitat i gestionar l'impacte de les espècies invasores.

Aquest estudi té com a objectiu identificar i utilitzar marcadors moleculars per detectar la possible hibridació entre *S. laietanus* i *Squalius cephalus*. La hibridació suposa un risc significatiu per a la integritat genètica de *S. laietanus*, ja que pot comprometre la seva composició genètica única i els seus trets adaptatius. La investigació implica l'ús de gens nuclears per avaluar la variabilitat genètica ja que és en aquest tipus de gens que es pot detectar la hibridació. Aquest enfocament genètic és crucial per comprendre l'abast de la hibridació i el seu impacte en la diversitat genètica de *S. laietanus*. Per tant, mantenir la diversitat genètica és vital per a la resiliència i la supervivència a llarg termini de l'espècie, permetent-li adaptar-se a les condicions ambientals canviants i resistir les amenaces emergents

Els resultats del present treball indiquen que dels 8 gens a candidats a marcador, després d'un exhaustiu anàlisi bioinformàtic i un posterior treball al laboratori juntament amb una potent recerca bibliogràfica, han deixat com a candidats principals als gens *bmp4* i *actb*, ja que presenten polimorfismes que permeten diferenciar *S. laietanus* de *S. cephalus*. Aquest mateix procés ha permès descartar inicialment els gens *amh*, *rpl8* i *ef1a*, i amb el posterior procés els gens *irbp*, *egr2* i *rh* contrastant els resultats obtinguts amb estudis realitzats per altres autors

Les conclusions obtingudes en aquest estudi no només són aplicables a *S. laietanus* sinó que també ofereixen informació valuosa per a la conservació d'altres espècies dins del gènere.

Concloent, l'estudi recalca la importància de les eines moleculars en la biologia de la conservació.

RESUMEN

Squalius laietanus, conocido comúnmente como el bagre catalán, es una especie de pez endémica de Cataluña. Su hábitat natural abarca los ríos desde el Ebro hasta Portbou y desde el Tec hasta el Aglí, al sud-este de Francia. Durante los años 90, las poblaciones de *S. laietanus* experimentaron un descenso significativo debido a una combinación de factores, incluyendo la contaminación del agua y la introducción de especies exóticas. Estas amenazas han causado una degradación extensa del hábitat y han planteado graves retos para la supervivencia de la especie. Medidas de protección eficaces son esenciales y deben centrarse en: abordar la contaminación del agua, controlar las prácticas de pesca no reguladas, mitigar la pérdida de hábitat y gestionar el impacto de las especies invasoras.

Este estudio tiene como objetivo identificar marcadores moleculares para detectar la posible hibridación entre *S. laietanus* y *Squalius cephalus*. La hibridación supone un riesgo significativo para la integridad genética de *S. laietanus*, ya que puede comprometer su composición genética única y sus rasgos adaptativos. La investigación implica el uso de genes nucleares para evaluar la variabilidad genética, ya que es en este tipo de genes donde se puede detectar la hibridación. Este enfoque genético es crucial para comprender el alcance de la hibridación y su impacto en la diversidad genética de *S. laietanus*. Por tanto, mantener la diversidad genética es vital para la resiliencia y supervivencia a largo plazo de la especie, permitiéndole adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes y amenazas emergentes.

Los resultados del presente trabajo indican que de los 8 genes candidatos a marcador molecular, tras un exhaustivo análisis bioinformático y un posterior trabajo en el laboratorio junto con una potente investigación bibliográfica, han dejado como candidatos principales los genes *bmp4* y *actb*, puesto que presentan polimorfismos que permiten diferenciar *S. laietanus* de *S. cephalus*. Este mismo proceso ha permitido descartar los genes *amh*, *rpl8* y *ef1a*, y con el posterior análisis el resto de genes contrastando los resultados obtenidos con estudios realizados por otros autores.

Las conclusiones obtenidas en este estudio no solo son aplicables a *S. laietanus* sino que también ofrecen información valiosa para la conservación de otras especies dentro del género.

Concluyendo, esta investigación subraya la importancia de las herramientas moleculares en la biología de la conservación.

ABSTRACT

Squalius laietanus, commonly known as the Catalan chub, is a fish species endemic to Catalonia. Its natural habitat spans rivers from the Ebro to Portbou and from the Tec to the Aglí, on southeast of France. During the 1990s, populations of *S. laietanus* experienced significant declines due to a combination of factors, including water pollution and the introduction of exotic species. These threats have caused extensive habitat degradation and posed severe challenges to the survival of the species. Effective protection measures are essential and must focus on several critical areas: addressing water pollution, controlling unregulated fishing practices, mitigating habitat loss, and managing the impact of invasive species.

This study aims to identify and utilize molecular markers for detecting the possible hybridization between *S. laietanus* and *Squalius cephalus*. Hybridization poses a significant risk to the genetic integrity of *S. laietanus*, potentially compromising its unique genetic makeup and adaptive traits. The research involves the use of nuclear genes to assess genetic variability since it is in these types of genes that hybridization can be detected. This genetic approach is crucial for understanding the extent of hybridization and its impact on the genetic diversity of *S. laietanus*. Therefore, maintaining genetic diversity is vital for the resilience and long-term survival of the species, enabling it to adapt to changing environmental conditions and resist emerging threats.

The results of this study indicate that of the 8 candidate genes for molecular markers initially considered, after an exhaustive bioinformatic analysis and subsequent laboratory work along with extensive bibliographic research, the main candidates are the genes *bmp4* and *actb*, since they present polymorphisms that allow differentiating *S. laietanus* from *S. cephalus*. This same process allowed the initial exclusion of the genes *amh*, *rpl8*, and *ef1a*. In the subsequent process, the genes *irbp*, *egr2*, and *rh* were also excluded, comparing the results obtained with studies conducted by other authors.

The conclusions obtained in this study are not only applicable to *S. laietanus* but also provide valuable information for the conservation of other species within the genus. In conclusion, this research underscores the importance of molecular tools in conservation biology.

REFLEXIÓ D'ÈTICA

El peix *Squalius laietanus*, conegut com a bagra catalana, és endèmic de Catalunya, distribuint-se des de rius catalans fins a francesos. La protecció i seguiment de les seves poblacions és crucial per a la preservació d'espècies autòctones. Durant els anys 90, la contaminació de les aigües i la introducció d'espècies exòtiques van provocar una forta disminució de les seves poblacions. Controlar aquests factors, així com la pesca descontrolada, és vital per a la seva protecció.

La reducció de la contaminació requereix que les fàbriques siguin conscients de l'impacte ambiental dels seus residus. Referent a la pesca, és essencial conscienciar la població sobre els seus efectes negatius. Preservar l'espècie *S. laietanus* implica abordar causes com la pèrdua d'hàbitat, la contaminació i el canvi climàtic, a més de gestionar les espècies exòtiques per minimitzar el seu impacte.

REFLEXIÓ DE SOSTENIBILITAT

En el desenvolupament de l'estudi, hem posat un fort èmfasi en realitzar el treball de laboratori sota les condicions òptimes per garantir la seguretat tant del personal com de l'entorn. Això adherint-se de manera estricta a les normatives de seguretat establertes, assegurant un maneig segur i eficient dels reactius i equips. A més, hem implementat pràctiques per minimitzar la generació de residus, optant per un reciclatge adequat segons les directrius de reciclatge de la institució i les regulacions pertinents. En el context de la sostenibilitat ambiental, hem prioritzat la selecció de tècniques de laboratori que redueixin el consum d'energia i l'ús de recursos com aigua i materials. Aquest enfocament protegeix el medi ambient i també promou pràctiques responsables dins del marc de la recerca científica.

REFLEXIÓ DE PERSPECTIVA DE GÈNERE

Les desigualtats de gènere en entorns acadèmics i científics es manifesten de diverses maneres, com ara la menor visibilitat i reconeixement de les dones al llarg de les seves carreres en comparació amb els homes, així com una menor participació en equips de recerca.

Al Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona (UdG), el 55% dels 20 investigadors són dones, mentre que el 45% són homes (Universitat de Girona, 2024). Això demostra l'esforç de la UdG i el seu laboratori per fomentar la representació femenina i combatre la desigualtat de gènere en la recerca.

Personalment, considero crucial no jutjar el treball d'una persona pel seu gènere, encara que actualment hi hagi diferències evidents entre gèneres. Promoure la igualtat de gènere és essencial per avançar cap a una comunitat acadèmica més justa i equitativa.

1. INTRODUCCIÓ

El gènere *Squalius* pertany a la família dels ciprínids, la més gran de peixos d'aigua dolça (Wang *et al.*, 2012). Es troba present des de rius de la Península Ibèrica fins a conques fluvials properes als Urals (Doadrio *et al.*, 2007). Aquest gènere de peixos presenta dues línies evolutives diferenciades: una ha conduït a l'evolució del llinatge mediterrani i l'altra al llinatge euroasiàtic (Perea *et al.*, 2010). El llinatge euroasiàtic mostra una proximitat més marcada amb l'espècie *Squalius cephalus*, conegut popularment com a bagra europea (Waap *et al.*, 2011). Ambdues línies evolutives es troben a la Península Ibèrica tot i que hi ha estudis on s'esmenta que aquesta última podria haver arribat a aquesta regió de forma posterior al llinatge mediterrani (Doadrio and Carmona, 2003; Sanjur *et al.*, 2003). Dins aquesta regió peninsular s'hi troba una ampla distribució d'espècies del gènere: la zona oest/ sud-oest de la Península s'hi troben *Squalius aradensis*, *Squalius torgalensis*, a l'est *Squalius cephalus*, *Squalius laietanus* i *Squalius pyrenaicus*. Al nord *Squalius carolitertii* i al sud *Squalius malacitanus* (Waap *et al.*, 2011; Sanjur *et al.*, 2003; Perea *et al.*, 2010).

L'espècie *Squalius laietanus*, conegut comunament com a bagra catalana, va ser descrita per primer cop recentment, l'any 2007. Fins aquesta data es creia que les poblacions de bagra dels rius del sud-est de França i dels rius catalans pertanyien a l'espècie *S. cephalus* com a la majoria de la resta de rius centroeuropeus. Aquests rius catalans inclouen la Tordera, el Fluvià, la Muga, el Ter, les conques del baix Ebre i el Segre fins al riu de Portbou, entre d'altres. Els rius del sud-est de França inclouen l'Aglí, el Tech, el Têt i la Massana (Doadrio *et al.*, 2007; Denys *et al.*, 2013).

Morfològicament l'espècie *S. laietanus* **[Figura 1]** s'assembla molt a l'espècie *S. cephalus*. *S. laietanus* presenta un cos allargat i gruixut. Les escates del cos són d'un color bru, amb un cert matís daurat metal·litzat, fosques a la part dorsal. La part ventral té una coloració platejada en les femelles i més groguenca en mascles. Les aletes tenen una tonalitat grisosa o d'un marró clar. Les aletes caudal i dorsal tenen un marge fosc als extrems. En l'època de reproducció, les aletes pelvianes i anal dels mascles poden adoptar una lleugera coloració ataronjada. Aquesta però és menys intensa que la que s'observa en individus de l'espècie de bagra europea *S. cephalus*. A més, *S. laietanus* posseeix una boca situada lleugerament per sota de la línia central, amb un llavi superior que sobresurt una mica i la punta de la mandíbula inferior queda coberta pel llavi superior **[Figura 2]**. (Doadrio *et al.*, 2007; Aparicio *et al.*, 2016).



Figura 1. Recuperada de Doadrio et al., 2007. Exempler de *Squalius laietanus* del riu Aglí del sud-est de França. Longitud de l'exemplar 158,0 mm.

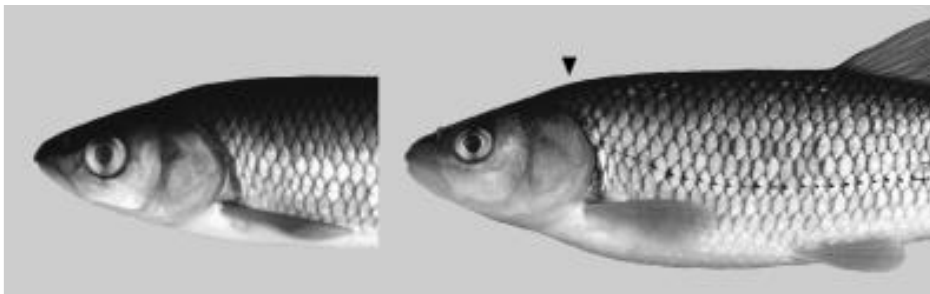


Figura 2. Recuperada de Doadrio et al., 2007. Cap d'exemplar de *S. laietanus* (esquerra) i *S. cephalus* (dreta) mostrant la mandíbula inferior inclosa en el llavi superior en *S. laietanus* i una discontinuïtat a la nuca en *S. cephalus*.

La bagra és un peix que pot habitar una gran varietat d'ecosistemes, des de pantans amb nivells moderats d'eutrofització i temperatures relativament elevades (d'uns 30°C) fins a rius de muntanya amb aigües cristal·lines on presentaria unes millors condicions de supervivència. En termes de conservació, les poblacions de bagra estan fragmentades però ben repartides per tot el territori que ocupen. Malgrat això, la contaminació de l'aigua, les alteracions dels seus hàbitats naturals i la presència d'espècies exòtiques o invasores suposen amenaces greus per a la seva supervivència (Aparicio et al., 2016). Segons la llista d'espècies protegides de la UICN (Freyhof, J. & Kottelat, M., 2008) a nivell global es classifica a l'espècie *S. laietanus* com a **least concern (LN)** o preocupació menor, indicant així que no està en perill d'extinció en un futur proper. Tot i que aquesta categorització requereix revisió, i tant a França com a Espanya està considerada com a vulnerable.

Després d'haver realitzat diferents estudis on es van analitzar les seqüències de les diferents poblacions de *S. laietanus* del sud de França es va veure introgressió de material genètic que pertanyia a l'espècie *S. cephalus*. Aquesta troballa suggereix la possible formació d'híbrids entre les dues espècies. La hipòtesi es reforça amb la detecció d'individus que presenten trets morfològics característics de totes dues espècies, indicant una hibridació natural (Denys et al., 2013; Rose et al., 2020).

Aquesta introgressió de material genètic representa una problemàtica perquè juntament amb la deriva genètica pot comportar la pèrdua d'al·lels propis de l'espècie i, per tant, un augment en les dificultats d'evolució de poblacions petites (Rhymer & Simberloff 1996). A més, aquest fenomen podria acabar amb l'extinció de l'espècie tal i com es coneix actualment.

Per tal d'avaluar la possible hibridació entre espècies en aquest estudi s'han utilitzat el que es coneixen com a marcadors moleculars.

Un marcador molecular és una de les eines genètiques utilitzades per l'anàlisi i comparació de les variacions genètiques entre individus d'una mateixa espècie o població. Aquests permeten detectar la possible variabilitat genètica existent en grups d'organismes relacionats, és a dir, poden detectar els polimorfismes. La seva aplicació facilita la caracterització genètica d'un gran nombre de genotips mitjançant processos experimentals. A més a més, la utilització de marcadors moleculars contribueix a l'estudi de la distribució geogràfica de les espècies, la seva taxonomia i la identificació precisa d'organismes (Serrote *et al.*, 2020).

Hi ha molts tipus de marcadors moleculars però, en aquest estudi s'han analitzat un total de vuit possibles candidats **[Taula 1]**. Aquests són gens nuclears del gènere *Squalius* utilitzats en, els estudis filogenètics prèviament realitzats per Perea *et al.*, 2021 i Waap *et al.*, 2011 on ja s'ha treballat amb aquests gens.

Taula 1. Marcadors moleculars analitzats: amh, bmp4, egr2, ef1a, rpl8, irbp, rho/rh, actb. Nom complet, abreviació i breu descripció de la funció de cada marcador.

GEN	ABREVIACIÓ	FUNCIÓ
Anti-Mullerian Hormone	Amh	Involucrat en processos de diferenciació sexual (Waap <i>et al.</i> , 2011).
Bone Morphogenetic Protein 4	Bmp4	Indueix la formació d'estructura òssia (Chen <i>et al.</i> , 2004).
Early Growth Response Protein 2	Egr2	Expressió durant el desenvolupament de l'embrió (Waap <i>et al.</i> , 2011).
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Ef1a	Factor involucrat en la traducció de proteïnes (Li <i>et al.</i> , 2023).
Ribosomal Protein L8	Rpl8	Component de la subunitat 60S del ribosoma i involucrat en la síntesi de proteïnes. (Sun <i>et al.</i> , 2023).
Interphotoreceptor retinoid-binding protein	Irbp	Involucrat en la visió: transport de lípids entre la RPE (epiteli pigmentat de la retina) i la retina, transferència de retinoids Zeng <i>et al.</i> , 2020).
Rhodopsin	Rho/Rh	Involucrat en la visió: actua com a fotoreceptor (la rodopsina). (Goren <i>et al.</i> , 2014).
Beta Actin Protein	Actb	Implicat en processos de divisió cel·lular, expressió gènica i migració cel·lular (Guo <i>et al.</i> , 2013).

Els gens que apareixen a la [Taula 1] són nuclears perquè així es pot veure la possible hibridació entre espècies, ja que si fossin gens mitocondrials, en ser heretats per via materna la introgressió genètica no seria detectable.

Alguns d'aquests marcadors moleculars ja han estat utilitzats en treballs previs per estudiar la filogènia del gènere *Squalius*. Com per exemple, l'estudi fet per Almada *et al.*, 2010 on s'utilitzava el gen nuclear Beta Actin Protein (actb) i el gen mitocondrial citocrom b (cyt b) com a marcadors moleculars per veure diferències genètiques entre les poblacions que viuen al nord de la Península Ibèrica amb les que viuen al sud. Els estudis fets per Perea *et al.*, 2021 i Waap *et al.*, 2011 també s'utilitzaven aquests marcadors per poder construir diferents arbres filogenètics i entendre millor la història evolutiva d'aquest gènere a la Península Ibèrica.

2. OBJECTIVES

This study focuses on the native Catalan fish species *Squalius laietanus*, aiming to identify molecular markers that can detect hybridization with *Squalius cephalus*. The research seeks to determine the most effective marker or markers for distinguishing between these two species.

Based on this background various objectives are set:

- To identify potential molecular markers that can detect hybridization between *S. laietanus* and *S. cephalus* through molecular and genetic analysis.
- To perform bioinformatic analysis using a dataset of different molecular markers and their sequences to determine which markers are most effective in distinguishing between the species *S. laietanus* and *S. cephalus*.

Furthermore, it is hypothesized that these findings will contribute to a deeper understanding of the genetic diversity relationships within the *Squalius* genus, providing valuable insights for conservation efforts.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 Cerca de marcadors a la bibliografia

Els gens seleccionats per l'estudi han estat escollits perquè ja han estat utilitzats prèviament en diferents estudis de filogènia amb el gènere *Squalius*. Com a exemple hi ha els treballs de Waap *et al.*, 2011 i Perea *et al.*, 2020 entre d'altres molts.

Les seqüències s'han recuperat dels estudis realitzats per Waap *et al.*, 2011 estudi de la filogènia del bagra de la regió oest de la Península Ibèrica; Jesus *et al.*, 2013 treball sobre les relacions de filogènia de la subfamília Leuciscinae de l'oest de la Península Ibèrica;

Perea et al., 2020 també és un estudi sobre la filogènia del gènere *Squalius* a la Península Ibèrica. L'estudi de *Schönhuth et al., 2018* tracta sobre la filogènia de la família dels ciprínids. El de *Benovics et al., 2023* és un treball sobre l'evolució d'un tipus de paràsits del bagra tenint en compte la filogènia d'aquest; *Palandačić et al., 2010* en aquest estudi, els autors utilitzen anàlisis genètiques per revisar i clarificar la classificació taxonòmica del *Phoxinellus*; *Behren-Chapuis et al., 2015* explora l'ús de dades de rodopsina nuclear per resoldre les discrepàncies identificades mitjançant el marcador mitocondrial COI en els ciprínids; *Sousa-Santos et al., 2006* on es va analitzar la substitució gairebé completa de l'ADN mitocondrial (mtDNA) típic de *Squalius pyrenaicus* per l'ADN mitocondrial de *Squalius alburnoides*.

Les seqüències han estat cercades a GenBank utilitzant una cerca avançada filtrant per nom del marcador i el gènere estudiat.

Taula 2. Nombre de seqüències per cada espècie de *Squalius* per cada gen analitzat amb BioEdit 7.7.1 (Hall, 1999).

	amh	bmp4	egr2	ef1a	rpl8	irbp	rh	actb
<i>Squalius cephalus</i>	1	1	1	1	1	5	35	0
<i>Squalius laietanus</i>	0	0	0	0	0	1	14	0
<i>Squalius aradensis</i>	2	2	3	3	2	3	3	1
<i>Squalius pyrenaicus</i>	16	16	73	74	17	18	18	99
<i>Squalius carolitertii</i>	6	6	42	47	6	7	7	51
<i>Squalius alburnoides</i>	0	0	0	0	0	0	2	111
<i>Squalius castellanus</i>	0	0	1	1	0	0	0	1
<i>Squalius torgalensis</i>	2	2	3	3	2	3	2	15
<i>Squalius malacitanus</i>	0	0	5	5	0	0	0	5
<i>Squalius valentinus</i>	0	0	3	3	0	0	0	3
<i>Squalius fellowesii</i>	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Squalius illyricus</i>	0	0	0	0	0	2	1	0
<i>Squalius lepidus</i>	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Squalius lucumonis</i>	0	0	0	0	0	2	1	0
<i>Squalius orientalis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Squalius orpheus</i>	0	0	0	0	0	3	2	0
<i>Squalius pamvoticus</i>	0	0	0	0	0	2	1	0
<i>Squalius peloponensis</i>	0	0	0	0	0	2	1	0
<i>Squalius platyceps</i>	0	0	0	0	0	2	1	0
<i>Squalius prespensi</i>	0	0	0	0	0	3	2	0
<i>Squalius pursakens</i>	0	0	0	0	0	2	3	0
<i>Squalius squalus</i>	0	0	0	0	0	4	3	0
<i>Squalius svallize</i>	0	0	0	0	0	2	1	0
<i>Squalius tenellus</i>	0	0	0	0	0	2	1	0
<i>Squalius sp</i>	0	0	0	0	0	1	8	0
<i>Squalius vardarensis</i>	0	0	0	0	0	2	1	0
<i>Squalius keadicus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Squalius zrmanjae</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Squalius microlepis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0

De totes les seqüències disponibles entre tots els marcadors [Taula 2], només s'han trobat seqüències corresponents a l'espècie *S. laietanus* als gens *irbp* i *rh*.

Una vegada recollides totes les seqüències del GenBank, aquestes han estat alineades utilitzant el programa BioEdit 7.7.1 (Hall, 1999). Aquest alineament s'ha realitzat amb l'objectiu d'identificar possibles polimorfismes entre les seqüències de *S. laietanus* i *S. cephalus*, i s'ha complementat amb altres espècies per tal d'observar la variabilitat dels marcadors dins el gènere.

Per afegir més seqüències i incrementar la quantitat de dades, s'ha utilitzat l'eina BLAST genome del NCBI juntament amb una seqüència de referència per a cada marcador, per tal de buscar regions homòlogues d'aquestes seqüències dins de genomes sencers de diferents espècies del gènere *Squalius*, [Taula 3] amb un total de 12 genomes.

Taula 3. Nom de les espècies del gènere *Squalius* i número de genomes seqüenciats per espècie. Genomes trets de GenBank.

ESPÈCIE	Nº DE GENOMES SEQÜENCIATS
<i>Squalius cephalus</i>	5
<i>Squalius pyrenaicus</i>	2
<i>Squalius carolitertii</i>	2
<i>Squalius squalus</i>	1
<i>Squalius alburnoides</i>	1
<i>Squalius sp</i>	1

Algunes de les seqüències obtingudes de GenBank són de RNA (emmagatzemades com a cDNA). Als diferents alineaments fets només s'hi ha afegit la part corresponent del genoma que solapa amb el mRNA corresponents perquè aquests no contenen introns. En els casos de cDNA aquest problema s'ha solucionat gràcies al programa BioEdit 7.7.1 (Hall, 1999), que permet editar i ajustar les seqüències de manera eficient.

Per als gens per als quals no es disposa de seqüències de l'espècie *S. laietanus*, s'ha decidit seleccionar aquells amb un alt potencial per a ser utilitzats com a marcadors moleculars i procedir amb la seva seqüenciació. Per identificar aquests candidats, s'ha analitzat la variabilitat interespecífica de les seqüències d'altres organismes disponibles a la base de dades GenBank. Aquesta anàlisi ha permès identificar els gens que mostren una major variabilitat en els polimorfismes entre diferents espècies.

A més, és fonamental que aquests gens es puguin amplificar en regions d'exons, ja que els introns poden presentar una variabilitat excessiva, cosa que podria dificultar tant l'amplificació com la seqüenciació. Per tant, la selecció de gens que es poden amplificar sobre exons assegura una major eficiència i precisió en els processos d'amplificació i seqüenciació, garantint al mateix temps la fiabilitat dels marcadors moleculars obtinguts.

A més dels gens seleccionats, és crucial incloure l'anàlisi del gen *rh* (Rhodopsin), ja que es disposa de múltiples seqüències per *S. laietanus*. Aquest gen ha estat objecte d'estudis previs, com el de Denys *et al.*, (2013), on s'ha realitzat una anàlisi exhaustiva i s'han extret conclusions que es discutiran més endavant en aquest treball.

Els gens s'han seleccionat basant-se en la presència de polimorfismes significatius entre les espècies amb seqüències disponibles, així com en la funció biològica que exerceixen en l'organisme. Els gens *irbp* i *rh* estan implicats en la visió, el *bmp4* en el desenvolupament ossi, *egr2* en el desenvolupament embrionari, i *actb* en la divisió cel·lular. Aquest últim, en particular, exerceix funcions principals que, a primera vista, semblen ser molt conservades al llarg del temps, donada la seva funció biològica.

En el cas dels gens descartats, com ara el *rpl8* i l'*ef1a*, es tracta de gens que assumeixen funcions essencials a la maquinària cel·lular, on s'espera que hagin experimentat poques variacions al llarg del temps pel funcionament òptim de l'organisme. El gen *amh* s'ha exclòs per raons logístiques, ja que no es pot abastar totes les opcions possibles en el marc d'aquest treball.

Els gens *actb*, *egr2*, *bmp4* i *irbp* són els considerats potencials a marcador molecular i dels quals es pretén obtenir més seqüències per poder fer un posterior anàlisi més exhaustiu i precís.

3.2 PCR i seqüenciació

3.2.1 Selecció de mostres

Per a cada marcador s'ha utilitzat un total de 12 mostres [Taula 4]: nou mostres de *S. laietanus* i tres de *S. cephalus*, aquestes últimes amb la finalitat de ser utilitzades com a controls.

Taula 4. Mostres utilitzades, del riu on s'han extret [Figura 3] i codi de referència per cada una.

ESPÈCIE	RIU	CODI
<i>Squalius laietanus</i>	Tordera	TOS-1
		TOS-2
		TOS-3
	Francolí	FRM-1
		FRM-2
		FRM-3
	Llobregat	LRC-1
		LRC-2
		LRC-3
<i>Squalius cephalus</i>	Segre (Ebre)	ESS-1
		ESS-3
	Luxemburg	ECHI-1
		LEI-1
		LUM5

Aquestes mostres [Taula 4] van ser proporcionades pel Servei de Pesca Continental de Catalunya, extretes dels punts marcats a la [Figura 3], i l'assignació de l'espècie s'havia realitzat prèviament per part del Laboratori d'Ictiologia Genètica utilitzant el marcador mitocondrial COI (citocrom oxidasa 1), habitual en *barcoding* per a espècies de peixos. Aquestes mostres havien estat extretes seguint el protocol de Chellex® i conservades a -40°C en un congelador al laboratori de l'Aulari Comú de la Universitat de Girona.



Figura 3. Mapa de Catalunya que mostra els diferents punts de mostreig als rius: Ebre, Llobregat, Tordera i Francolí. Aquests llocs han estat seleccionats per a la recollida de mostres per a l'estudi. Elaborat amb QGis v. 3.36.

3.2.2 Amplificació per PCR

Per a realitzar la corresponent seqüenciació dels gens, és imprescindible l'ús de primers específics. Els primers utilitzats [Taula 5] per a cada marcador molecular han estat seleccionats a partir d'estudis previs realitzats per diversos autors. Aquests primers són els mateixos amb els quals es van obtenir les seqüències esmentades anteriorment [Taula 2], les quals s'havien extret de GenBank. Per tal d'utilitzar els primers en la PCR, s'ha realitzat un tractament de dilució amb aigua (1/10). Partint d'una concentració inicial en stock de 100 µM, s'han diluït fins a obtenir una concentració final de 10 µM.

Taula 5. Nom dels marcadors moleculars analitzats, nom de cada primer mida de seqüència que amplifiquen, la seqüència d'aquests i la referència d'on s'ha extret la informació de cadascun dels primers

GENS	NOM PRIMER	MIDA (APROXIMADA)	SEQÜÈNCIA	REFERÈNCIA
Bmp4	bmp4ef2	710 (bp)	Forward: 5'- CATCCCAGAGGAGGAAGTCA-3'	<i>Waap et al., 2011</i>
	bmp4r2		Reverse: 5'- SCCYTCSACYACCATYTCCTG-3'	<i>Waap et al., 2011</i>
Egr2	egr2bF	830 (bp)	Forward: 5'- AGTTTTCCATCGACTCSCAGTA-3'	<i>Waap et al., 2011</i>
	egr2bR		Reverse: 5'- AGGTGGATTTTGGTGTGTCTYTT-3'	<i>Waap et al., 2011</i>
Irbp	irbp-F	850 (bp)	Forward: 5'- AACTACTGCTCRCCACAAAARC-3'	<i>Waap et al., 2011</i>
	irbp-R		Reverse: 5'- GGAAATGCATAGTTGTCTGGAA-3'	<i>Waap et al., 2011</i>
Actb	actb-F	1062 (bp)	Forward: 5'-ATGGATGATGAAATTGCCGC-3'	<i>Robalo et al., 2006</i>
	actb-R		Reverse: 5' AGGATCTTCATGAGGTAGTC-3'	<i>Robalo et al., 2006</i>

En aquest estudi s'han realitzat quatre PCR específiques (una per cada marcador) en les quals s'han amplificat les extraccions de DNA de les 12 mostres de bagra. A més, a més s'hi ha afegit un control negatiu per poder assegurar la validesa dels resultats i descartar falsos positius.

Per tal de dur a terme la PCR, és necessari preparar una Mix de PCR, que és una solució que conté tots els components essencials per a la reacció PCR **[Taula 6]**. Aquesta Mix es prepara amb un volum suficient per a cada mostra i per al control negatiu, a més d'un volum addicional per precaució compensar els possibles errors de pipeteig. Aquest procediment garanteix que es disposi de prou solució per a totes les reaccions. Entre els components de la Mix de la PCR destaca la Màster Mix.

Abans de la preparació de la PCR, tot el material ha estat irradiat durant 15 minuts amb llum ultraviolada, excepte les mostres, els primers i la Master Mix, amb l'objectiu de garantir la seva esterilitat.

Les extraccions per tal de ser descongelades es centrifuguen a 12.000 rpm durant 10 minuts. Per a cada mostra corresponen un volum total de 24 µL de Mix més 1 µL de la mostra, sumant un total de 25 µL. Aquests són els volums sobre els quals es realitzarà la PCR.

Taula 6. Components de la Mix de PCR i les quantitats de cadascun per preparar 1 volum i el 14 volums preparats en el laboratori.

PRODUCTE	QUANTITAT 1 VOLUM (µL)	QUANTITAT 14 VOLUMS (µL)	CONCENTRACIÓ FINAL
GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix 2X	12,5	175	1X
Primer-XF	1	14	0,1-1 µM
Primer-XR	1	14	0,1-1 µM
H₂O	9,5	133	<250 ng
TOTAL	24	336	N.A.

Per cada marcador analitzat s'han utilitzat unes mostres [Taula 7] i condicions de PCR [Taula 8] específiques.

Taula 7. Mostres utilitzades per la PCR i en quins gens s'ha utilitzat. També s'indica l'espècie de *Squalius* de cada mostra.

MOSTRA	ESPÈCIE	GEN
TOS-1	<i>Squalius laietanus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
TOS-2	<i>Squalius laietanus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
TOS-3	<i>Squalius laietanus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
FRM-1	<i>Squalius laietanus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
FRM-2	<i>Squalius laietanus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
FRM-3	<i>Squalius laietanus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
LRC-1	<i>Squalius laietanus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
LRC-2	<i>Squalius laietanus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
LRC-3	<i>Squalius laietanus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
LEI-1	<i>Squalius cephalus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
LUM-5	<i>Squalius cephalus</i>	actb; bmp4; egr2; irbp
ESS-1	<i>Squalius cephalus</i>	bmp4
ESS-3	<i>Squalius cephalus</i>	actb; egr2
ECHI-1	<i>Squalius cephalus</i>	irbp
CONTROL -	-	actb; bmp4; egr2; irbp

Taula 8. Condicions de PCR utilitzades per amplificar cada gen. Informació recuperada de Waap et al., 2011; Robalo et al., 2006.

GENS	CICLES PCR										
	DESNATURALITZACIÓ INICIAL		DESNATURALITZACIÓ		HIBRIDACIÓ		EXTENSIÓ		Nº CICLES	EXTENSIÓ FINAL	
	TEMP (°C)	Temps (seg)	TEMP (°C)	Temps (seg)	TEMP (°C)	Temps (seg)	TEMP (°C)	Temps (seg)		TEMP (°C)	Temps (seg)
bmp4	95	300	95	60	62	30	72	60	35	72	600
actb	94		94	30	55	40	72	90	35	72	600
irbp	95	240	95	40	55	40	72	65	35	72	420
egr2	95	240	95	40	55	40	72	75	35	72	600

Un cop s'ha acabat la PCR és necessari fer un gel d'agarosa al 2% per visualitzar els resultats corresponents.

Es van carregar 5 µL de mostra de PCR més 3 µL de tampó de càrrega, sumant un total de 8 µL, i, s'hi ha aplicat un voltatge de 100V durant 1 hora. Els resultats s'han visualitzat mitjançant una càmera GD-1000 de Axygen, amb la qual s'ha aplicat una llum UV de 330 nm durant 3 segons per capturar la imatge del gel.

3.2.3 Seqüenciació

Abans de preparar la placa corresponent amb les mostres resultants de la PCR per ser seqüenciades mitjançant el mètode de Sanger. S'ha quantificat i avaluat la puresa dels àcids nucleics d'aquestes amb un espectrofotòmetre NanoDrop™.

Les mostres han estat seqüenciades a MacroGen, Inc. A la **[Taula 9]** es detalla la direcció de seqüenciació de cada gen i les concentracions ajustades segons els requeriments de l'empresa.

Taula 9. Concentració (ng/µL) de l'ADN amplificat pels gens actb, bmp4, egr2, irbp. S'indica la direcció de seqüenciació Forward (F) i Reverse (R).

GEN	DIRECCIÓ	CONCENTRACIÓ (ng/ µL)
actb	Forward (F) i Reverse (R)	517,73
bmp4	Forward (F) i Reverse (R)	502,95
egr2	Forward (F)	479,09
irbp	Reverse (R)	491,83

3.3 Anàlisi de les seqüències

Un cop obtingudes les seqüències de les mostres, s'ha utilitzat el programa Chromas LITE 2.01 (Technelysium Pty Ltd, 1998) per revisar els cromatogrames corresponents. Aquesta revisió ha permès comprovar que les seqüències obtingudes són correctes i crear una única seqüència consens per a cada mostra en aquelles que s'han seqüenciat en ambdós sentits.

Un cop feta la revisió, s'ha realitzat un alineament utilitzant el programa BioEdit 7.7.1 amb les seqüències obtingudes per a cada marcador. Addicionalment, per cada marcador s'ha realitzant un altre alineament tenint en compte totes les seqüències anteriors afegint les seqüències descarregades de GenBank [**Taula 2**], per tal d'incorporar informació addicional per valorar quin o quins dels candidats són potencials marcadors.

Finalment s'ha seleccionat les seqüències més representatives de cada espècie per poder donar una versió més simplificada en l'apartat de resultats. Per mostrar els resultats de les posicions variables en forma de taula s'ha utilitzat el programa MEGA X 11.0.13 (Kumar *et al.*, 2018).

S'ha utilitzat el programa NEBcutter V3.0. per analitzar si les posicions dels polimorfismes trobats després de l'alineament de les seqüències obtingudes es troben en dianes d'enzims de restricció.

4 RESULTATS

4.1 Resultats PCR

La [**Figura 4**] correspon als resultats obtinguts del procés de la PCR per cada gen. En tots quatre gels, les bandes en els carrils corresponents a les mostres de *S.laietanus* (2-10) i *S. cephalus* (12-14, excepte en Gel A que són 11-13) són clares i ben definides, indicant una amplificació exitosa dels gens ***bmp4***, ***actb***, ***irbp*** i ***egr2*** a excepció únicament del carril 11 del gel A que correspon a la mostra ESS-1 de *S. cephalus* que no ha amplificat. Els controls negatius (14 en Gel A, 15 en Gels B, C i D) no mostren cap banda, la qual cosa confirma l'absència de contaminació en les reaccions de PCR. Els resultats mostren una alta qualitat i precisió en l'amplificació dels gens estudiats.

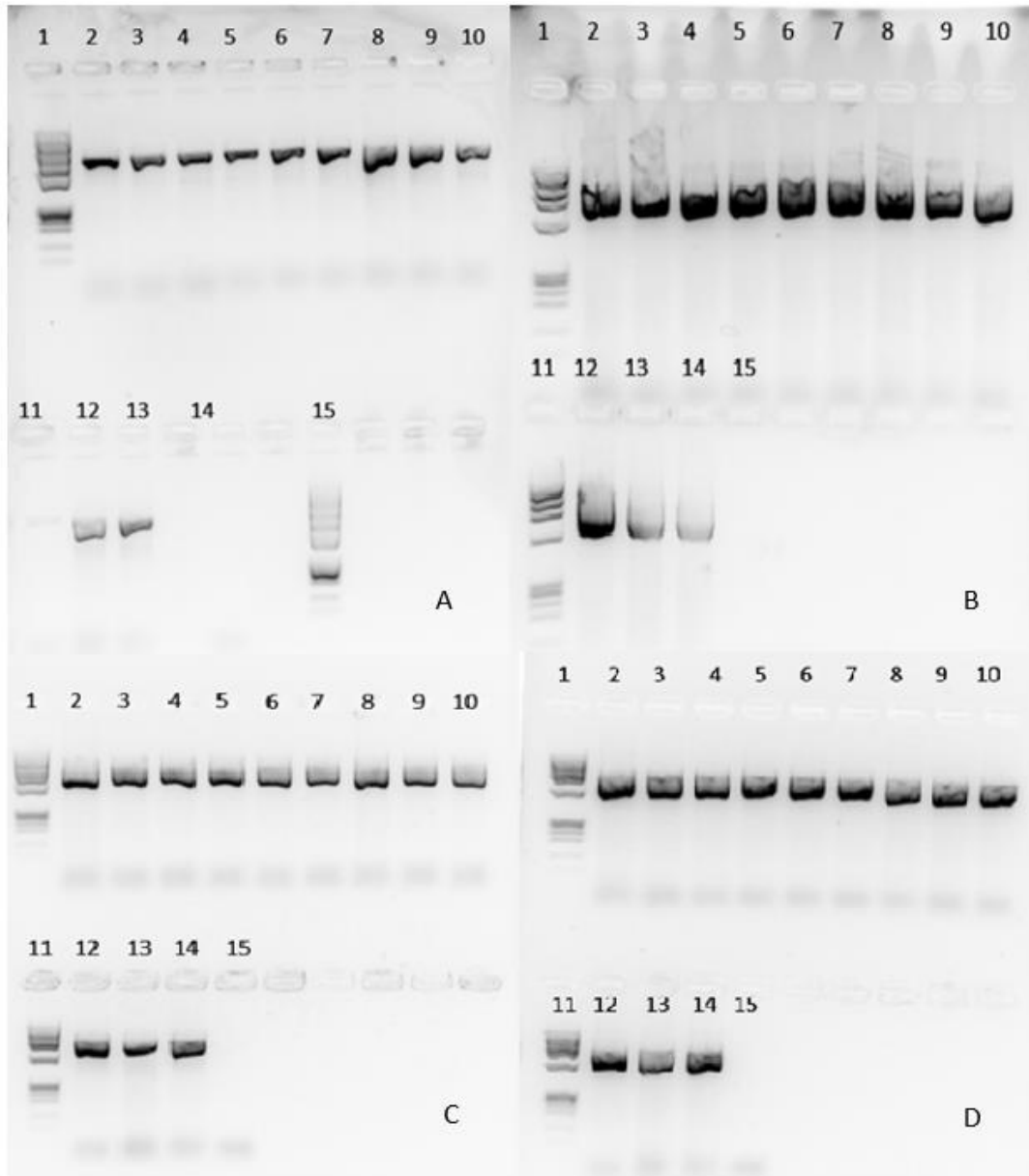


Figura 4. Visualització gel d'agarosa 2% dels quatre gens candidats: A. *bmp4*; B. *actb*; C. *irbp*; D. *Egr2*. Carregades les mostres resultants de la PCR amplificades amb els primers corresponents de cada gen [Taula 5]. Carrils 1 i 11 pes molecular PM (B, C i D) carrils 1 i 15 (A); carrils 2-4 producte PCR mostres TOS (1-3); carrils 5-7 producte PCR mostres FRM (1-3); carrils 8-10 producte PCR mostres LRC (1-3); carril 11 producte PCR mostra ESS-1 (A) control negatiu (B, C i D); carril 12 producte PCR mostra ESS-3 (B i D) mostra ECHI-1 (C); 13 producte PCR mostra LEI-1; 14 producte PCR mostra LUM-5; 15 control negatiu (C-) (B, C i D). A la [Taula 7] hi ha informació més detallada sobre les mostres.

4.2 Resultat posicions variables de les seqüències

4.2.1 BMP4:

En aquesta taula [Taula 10] es presenten les posicions variables de diverses seqüències del gen *bmp4*, incloent les mostres seqüenciades i d'altres estudis com el de Waap *et al.*, 2011 i Jesus *et al.*, 2013, de diferents espècies de *Squalius*. En aquest cas destaquen les posicions 162 i 173 de l'alineament com a posicions variables exclusives dels individus de l'espècie *S. laietanus*.

Taula 10. Gen *bmp4*: les posicions de les bases (bp) es troben a la part superior de la taula, mentre que les files contenen les diferents seqüències amb les seves variacions en aquestes posicions específiques. Les lletres indiquen les bases presents en cada posició per cada seqüència, mentre que els símbols "-" i "." representen respectivament la manca de nucleòtids i posicions invariables en les seqüències. S'ha destacat en groc les posicions variables 162 i 173 de l'alineament perquè són polimorfismes únics dels exemplars de l'espècie *S. laietanus* i no es troben compartits amb la resta d'espècies.

Posició (bp)	2	3	4	83	1	1	1	2	2	4	4	5	6
					0	6	7	8	5	6	2	2	8
					3	2	3	6	8	1	6	9	2
LUM-5 (<i>Squalius cephalus</i>)	A	A	C	A	A	G	G	C	C	C	A	A	C
LEI-1 (<i>Squalius cephalus</i>)	-	-	-
FRM-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	G	A	T	.	.	.	G	.	.
FRM-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	-	.	.	.	A	T	.	.	.	G	.	.
FRM-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	G	A	T	.	.	.	G	.	.
LRC-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	-	-	.	.	A	T	.	.	.	G	.	.
LRC-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	A	T	.	.	.	G	.	.
LRC-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	G	A	.	.	A	T	.	.	.	G	.	.
TOS-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	A	T	.	.	.	G	.	.
TOS-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	G	A	T	.	.	.	G	.	.
TOS-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	A	T	.	.	.	G	.	.
JN413288.1 (<i>Squalius aradensis</i>)	-	-	-	G	G	C	.	T	.	G	G	G	.
JN413272.1 (<i>Squalius carolitertii</i>)	-	-	-	.	G	C	.	T	.	G	G	.	T
JN413278.1 (<i>Squalius pyrenaicus</i>)	-	-	-	.	G	C	.	T	T	G	G	.	T
KC836219.1 (<i>Squalius pyrenaicus</i>)	-	-	-	.	G	C	.	T	Y	G	G	.	T

4.2.2 ACTB:

Aquesta taula [Taula 11] mostra les posicions variables en diverses seqüències del gen *actb* per diferents espècies de *Squalius*. Algunes són les seqüències extretes a partir de les mostres de PCR i altres són d'estudis previs com el de Perea *et al.*, 2020; Sousa-Santos *et al.*, 2006. Les posicions que presenten polimorfismes propis de *S. laietanus* són la posició 187, la 477 i la 660 de l'alineament.

Taula 11. Gen *actb*: les posicions de les bases (bp) es troben a la part superior de la taula, mentre que les files contenen les diferents seqüències amb les seves variacions en aquestes posicions específiques. Les lletres indiquen les bases presents en cada posició per cada seqüència, mentre que els símbols "-" i "." representen respectivament la manca de nucleòtids i posicions invariables en les seqüències. S'ha destacat en groc la posició variable 187 de l'alineament perquè és un polimorfisme únic dels exemplars de l'espècie *S. laietanus* i no es troba compartit amb la resta d'espècies.

Posició (bp)	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	6	1	1	1	1	1	1	4	5	6	7	
	9	0	1	2	3	4	6	7	9	1	2	4	4	1	3	4	4	6	8	7	0	6	8	
														0	4	6	9	6	7	7	5	0	8	
ECHI-1 (<i>Squalius cephalus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	T	T	T	T	A	T	T	G	G	
LUM-5 (<i>Squalius cephalus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	C	C	C	G	.	C	.	A	.
LEI-1 (<i>Squalius cephalus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	C	C	C	G	.	C	.	A	.
TOS-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	.	C	C	.	G	G	C	.	A	.
TOS-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	.	C	C	.	G	G	C	.	A	.
TOS-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	.	C	C	.	G	G	C	.	A	.
LRC-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	.	C	C	.	G	G	C	.	A	.
LRC-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	.	C	C	.	G	G	C	.	A	.
LRC-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	.	C	C	.	G	G	C	.	A	.
FRM-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	T	G	T	G	C	A	G	C	G	A	T	C	C	.	C	C	.	G	G	C	.	A	.	
FRM-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	A	T	T	G	C	A	A	G	C	G	A	T	T	.	C	C	.	G	G	C	.	A	.	
MT051739.1 (<i>Squalius carolitertii</i>)	A	T	G	T	G	C	A	G	C	G	A	T	T	.	C	.	.	G	
DQ150332.1 (<i>Squalius pyrenaicus</i>)	A	T	G	T	G	C	A	G	C	G	A	T	T	.	C	.	.	G	.	.	A	.	A	

4.2.3 IRBP:

La **[Taula 12]** mostra les posicions variables que hi ha entre les seqüències extreïdes del gen *irbp* a partir de les mostres de PCR i les d’altres estudis com el de Waap., *et al* 2011; Schönhuth *et al.*, 2018 després d’haver-les alineat. No s’aprecia cap polimorfisme propi de *S. laietanus* entre totes les posicions variables observades per aquest gen.

Taula 12. Gen *irbp*: les posicions de les bases (bp) es troben a la part superior de la taula, mentre que les files contenen les diferents seqüències amb les seves variacions en aquestes posicions específiques. Les lletres indiquen les bases presents en cada posició per cada seqüència, mentre que els símbols “-” i “.” representen respectivament la manca de nucleòtids i posicions invariables en les seqüències.

Posició (bp)	8	4	8	1	2	3	4	4	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	7	4	6	4	1	6	7	1	2	6	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9
		4	9	9	5	3	7	8	3	4	5	7	8	0	1	2	3	4	5	6	7	9	0	1				
MG806557.1 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	C	C	C	C	C	C	C	G	G	T	T	G	A	G	T	G	C	A	G	C	A	G	A	G	A	G	A
FRM-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	.	.	T	.	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRM-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	.	.	T	.	T	.	.	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRM-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	-	.	.	T	.	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRC-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	C	.	.	T	.	T	.	.	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRC-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	G	.	.	T	.	T	.	.	A	.	G	A	G	T	G	C	A	G	C	A	G	A	G	A	G	A	G	A
LRC-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	C	.	.	T	.	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOS-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	C	.	.	T	.	T	.	.	K
TOS-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	C	.	.	T	.	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOS-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	C	.	.	T	.	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JN413331.1 (<i>Squalius cephalus</i>)	-
ESS-3 (<i>Squalius cephalus</i>)	-
LUM-5 (<i>Squalius cephalus</i>)	C
LEI-1 (<i>Squalius cephalus</i>)	C	K
JN413338.1 (<i>Squalius pyrenaicus</i>)	-	T	.	G
JN413349.1 (<i>Squalius aradensis</i>)	-	T	T	.	T	.	T	T	.	G
JN413333.1 (<i>Squalius carolitertii</i>)	-	T	.	G

4.2.4 EGR2:

La [Taula 13] mostra les posicions variables entre les seqüències extreïdes a partir de les mostres que s'ha realitzat la PCR pel gen *egr2*. En aquest cas no es veuen posicions variables amb polimorfismes exclusius de *S. laietanus*. Les úniques posicions variables trobades entre totes les seqüències es trobarien a la part final d'aquesta, més concretament a les posicions 639 i 781 de l'alineament. La resta de l'alineament es troben posicions invariables i compartides tant per *S. laietanus* com per *S. cephalus*.

Taula 13. Gen egr2: les posicions de les bases (bp) es troben a la part superior de la taula, mentre que les files contenen les diferents seqüències amb les seves variacions en aquestes posicions específiques. Les lletres indiquen les bases presents en cada posició per cada seqüència, mentre que els símbols "-" i "." representen respectivament la manca de nucleòtids i posicions invariables en les seqüències.

Posició (bp)	639	781
LEI-1 (<i>Squalius cephalus</i>)	C	G
ESS-3 (<i>Squalius cephalus</i>)	.	A
LUM-5 (<i>Squalius cephalus</i>)	.	-
FRM-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	.	.
FRM-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	A	-
FRM-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	.	.
LRC-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	.	.
LRC-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	.	.
LRC-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	.	.
TOS-1 (<i>Squalius laietanus</i>)	.	.
TOS-2 (<i>Squalius laietanus</i>)	.	.
TOS-3 (<i>Squalius laietanus</i>)	.	.

4.3 Dianes de restricció

L'anàlisi de les dianes de restricció dels gens amb polimorfismes propis de *S. laietanus* es veu representat a la [Figura 5]. Ni en el gen *bmp4* ni en el gen *actb* cap de les posicions destacades a la [Taula 10] i [Taula 11] respectivament coincideixen amb una diana de restricció en cap de les dues espècies.

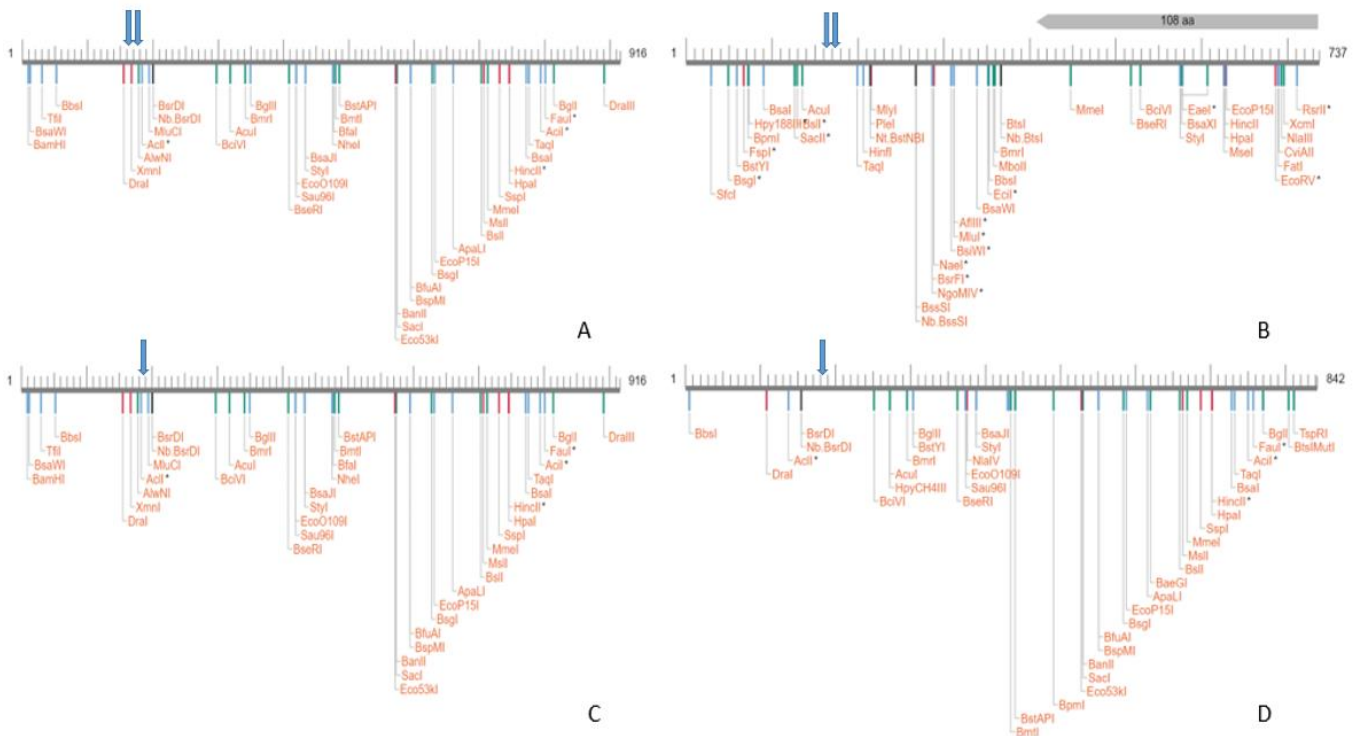


Figura 5. A) Mapa de dianes de restricció de l'espècie *S. laietanus* pel gen *bmp4*. Les línies verticals de l'eix de la longitud de la seqüència marquen 10 bp. Els noms en taronja són els diferents enzims de restricció que actuen en les posicions indicades al mapa. B) Mapa de dianes de restricció de l'espècie *S. cephalus* pel gen *bmp4*. C) . Mapa de dianes de restricció de l'espècie *S. laietanus* pel gen *actb*. D) Mapa de dianes de restricció de l'espècie *S. cephalus* pel gen *actb*. Les fletxes blaves indiquen la posició on hi ha la posició variable exclusiva de cada espècie.

5 DISCUSSIÓ

5.1 Amplificació PCR

Els resultats obtinguts mitjançant la tècnica de PCR, visibles a les **[Figura 4]** per a tots els gens analitzats, són fiables i precisos. Aquesta afirmació es fonamenta en l'observació que els controls negatius no han mostrat cap amplificació, presentant carrils nets que indiquen l'absència de contaminació, tal com s'esperava. La claredat i nitidesa de les bandes en les mostres analitzades en tots els gels demostren una bona amplificació, suggerint que els primers utilitzats han estat efectius en l'amplificació dels gens d'interès, permetent així la seva posterior seqüenciació. A més que s'ha obtingut per cada marcador un amplicó corresponent a la mida esperada.

Cal destacar una excepció en aquests resultats: la mostra ESS-1, corresponent a l'espècie *S. cephalus*, mostrada a la **[Figura 4]**. En aquest cas, no s'ha observat l'amplificació esperada. Aquest fet podria atribuir-se a un error experimental ocorregut durant el processament de les mostres, prèvia al procés de PCR. Atès que la resta de mostres s'han amplificat correctament, és raonable descartar problemes tant en els primers com en els processos posteriors a la PCR.

Per tant, la robustesa dels resultats obtinguts, juntament amb l'excepció mencionada, proporciona una base sòlida per afirmar l'eficàcia del protocol de PCR emprat, així com la qualitat dels reactius i les condicions experimentals establertes. La consistència de l'amplificació en la resta de mostres reforça la validesa de les dades i permet avançar amb confiança cap a la seqüenciació dels gens d'interès.

5.2 Posicions variables dels gens

Analitzant els resultats obtinguts a partir de la seqüenciació els gens **bmp4** i **actb**, són els que es poden considerar candidats a marcadors moleculars.

El gen **bmp4** presenta dos polimorfismes propis de *S. laietanus* a les posicions 162 i 173 [Taula 10]. Els canvis observats en la posició 162 entre l'espècie *S. cephalus* i *S. laietanus* són entre purines (Adenina (A) i Guanina (G)) mentre que amb la resta d'espècies el canvi és entre una purina com l'adenina (A) i una pirimidina com és la citosina (C). La substitució pot canviar un codó en l'ARNm, possiblement alterant l'aminoàcid corresponent en la proteïna final. Si el canvi provoca la substitució d'un aminoàcid per un altre amb propietats diferents (per exemple, polaritat, càrrega), pot afectar l'estructura i funció de la proteïna. La variació en la seqüència del gen BMP4, que està implicat en el desenvolupament i la morfogènesi, podria contribuir a diferències morfològiques entre *S. laietanus* i *S. cephalus*. Per exemple, les observades a la [Figura 2], explicant així les diferències en característiques físiques com la forma del cap o la grandària del cos.

El gen **actb** presenta un sol polimorfisme propi de *S. laietanus* a la posició 187 [Taula 11]. Aquest també és un canvi de purines, és a dir, una adenina (A) per les seqüències corresponents a *S. cephalus*, *S. carolitertii* i *S. pyrenaicus*, i una guanina (G) per l'espècie *S. laietanus*. Si la substitució de G per A es troba en una posició que codifica un aminoàcid, podria resultar en un canvi d'aminoàcid en la proteïna final. Aquest canvi podria afectar l'estructura i funció de la proteïna, amb possibles conseqüències fenotípiques per l'organisme. També pot proporcionar informació sobre la divergència evolutiva entre les espècies analitzades. La presència de (G) en la posició 187 en *S. laietanus* en comparació amb (A) en les altres espècies podria indicar un esdeveniment de mutació després de la separació evolutiva de *S. laietanus* dels seus ancestres comuns amb les altres espècies.

Aquestes posicions trobades permeten diferenciar entre espècies, però seria interessant poder repetir l'estudi amb un nombre de mostres més elevat per tal de verificar i confirmar que aquestes posicions variables es troben conservades a nivell d'espècie. També seria interessant analitzar si corresponen a algun codó sinònim entre les espècies.

En referència al gens *irbp* i *egr2* s'han trobat posicions variables en ambdós casos. Malgrat això no hi ha cap polimorfisme entre tots els identificats que sigui exclusiu de *S. laietanus*.

Respecte el gen *egr2* només s'ha detectat dues posicions variables i a les posicions finals de la seqüència. Aquest fet podria suggerir que la seqüència del gen es troba sota una forta pressió selectiva per mantenir-la conservada. Això es podria deduir pel fet que aquest gen està implicat en processos del desenvolupament de l'embrió (Waap *et al.*, 2011).

És important destacar el gen *rh/rho*, que presenta seqüències de *S. laietanus* al GenBank i ha estat considerat com a possible candidat a marcador molecular. En l'anàlisi de les seqüències del gen, s'han identificat posicions variables entre les diferents espècies del gènere *Squalius*, incloent *S. laietanus*. No obstant això, cap de les variacions trobades és exclusiva d'aquesta espècie. La falta de polimorfismes exclusius implica que el gen de la rodopsina no pot diferenciar específicament *S. laietanus* d'altres espècies del mateix gènere. A conseqüència d'aquesta manca de variabilitat exclusiva ha estat descartat com a candidat a marcador molecular per a aquesta espècie. Aquesta decisió es veu reforçada per l'estudi realitzat per Denys *et al.*, 2013, que corrobora la conclusió que el gen *rh/rho* no és adequat com a marcador molecular exclusiu per a *S. laietanus*.

Per tant, a partir de tota la informació que s'ha obtingut es pot afirmar que un bon marcador molecular nuclear per a la diferenciació d'espècies típicament posseeix diverses característiques clau. En primer lloc, ha de mostrar tant un cert grau de conservació entre espècies, però que hi hagi certa variabilitat interespecífica: la conservació assegura la similitud entre espècies estretament relacionades, mentre que la variabilitat permet distingir entre diferents espècies. En segon lloc, ha de ser eficientment amplificable utilitzant tècniques com la PCR, facilitant el seu estudi i comparació entre mostres. En tercer lloc, la facilitat de seqüenciació és crucial; el marcador ha de tenir una seqüència clarament definida que permeti una seqüenciació precisa i reproduïble. A més, és preferible que el marcador resideixi en una regió genòmica amb una baixa taxa de recombinació per mantenir els patrons d'herència esperats al llarg de les generacions. I finalment ha de demostrar estabilitat evolutiva assegurant així que és un bon marcador al llarg del temps.

5.3 Mapes de restricció

S'ha analitzat si les posicions exclusives de *S. laietanus* coincideixen amb les posicions de tall dels enzims de restricció [Figura 5] per tal de detectar possibles hibridacions entre les espècies estudiades. Durant la visualització dels resultats de la PCR digerida amb enzims de restricció, si l'individu és heterozigot per un polimorfisme de restricció (RFLP), es poden obtenir tres bandes diferents que corresponen als dos al·lels: un que és tallat per l'enzim i l'altre que no ho és. En el cas dels homozigots s'observaria una sola banda per una de les espècies i a l'altra dues. Aquest seria el millor escenari possible, és a dir, que en una espècie el polimorfisme es trobi dins la diana de restricció i en l'altra no.

Aquest procediment és interessant perquè permet estalviar el procés de seqüenciació, ja que aquesta es fa externament, estalviant així recursos. Tanmateix, com que no s'ha trobat cap diana de restricció, es proposa un mecanisme alternatiu per genotipar les mostres directament sense necessitat de seqüenciar tant extensament: la tècnica coneguda com PCR-SnapShot. La PCR-SnapShot funciona amplificant regions específiques del DNA seguides d'una extensió de cadena amb nucleòtids fluorescents, que permet detectar polimorfismes puntuals en el DNA.

6 CONCLUSIONS

Based on all the information and results obtained from the conducted study, we can draw the following conclusions:

- a) The ***bmp4*** and ***actb*** genes are strong candidates for molecular markers. The ***bmp4*** gene has two specific polymorphisms unique for *S. laietanus*. The ***actb*** gene shows a single polymorphism. These markers can differentiate species, but further studies with more samples are recommended.
- b) The analysis of restriction sites revealed that the exclusive polymorphisms of *S. laietanus* do not coincide with restriction enzyme sites in any species. This indicates that detecting hybridization between species using these genes will be more complex and cannot rely on simple restriction enzyme digestion.

AGRAÏMENTS

Vull expressar el meu més profund agraïment a totes les persones que han donat suport i han contribuït a la realització d'aquest estudi. En primer lloc, a la tutora del treball, la Núria Pérez Bielsa per la seva guia al llarg d'aquest procés, els seus consells de millora i l'encoratjament constant durant tot el procés de recerca. També a tota la meua família i amics pel seu suport constant i comprensió durant les fases més exigents d'aquest treball.

7 BIBLIOGRAFIA

- Almada, V., Sousa-Santos, C., 2010. Comparisons of the genetic structure of *Squalius* populations (Pisces, Cyprinidae) from rivers with contrasting histories, drainage areas and climatic conditions. *Mol. Phylog. Evol.* 57, 924–931. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.08.015>.
- Aparicio, E., C. Alcaraz, G. Carmona-Catot, E. García-Berthou, Q. Pou-Rovira, R. Rocaspana, M.J. Vargas & D. Vinyoles. 2016. Peixos continentals de Catalunya. Ecologia, conservació i guia d'identificació. Lynx Edicions, Barcelona. 251 p.
- Behrens-Chapuis S, Herder F, Esmaeili HR et al (2015) Adding nuclear rhodopsin data where mitochondrial COI indicates discrepancies—Can this marker help to explain conflicts in cyprinids? *DNA Barcodes* 3:187–199. <https://doi.org/10.1515/dna-2015-0020>
- Benovics, M., Vukić, J., Šanda, R., Nejat, F., Charmpila, E. A., Buj, I., Shumka, S., Porcelloti, S., Tarkan, S. A., Aksu, S., Emiroğlu, O., & Šimková, A. (2023). Monogeneans and chubs: Ancient host-parasite system under the looking glass. *Molecular phylogenetics and evolution*, 179, 107667. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107667>
- Chatterjee, P., & Werner, R. M. (2021). Gender Disparity in Citations in High-Impact Journal Articles. *JAMA network open*, 4(7), e2114509. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.14509>
- Chen, D., Zhao, M., & Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 22(4), 233–241. <https://doi.org/10.1080/08977190412331279890>
- Denys, G. P. J., Dettai, A., Persat, H., Doadrio, I., Cruaud, C., & Keith, P. (2013). Status of the Catalan chub *Squalius laietanus* (Actinopterygii, Cyprinidae) in France: Input from morphological and molecular data. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 408, 04. <https://doi.org/10.1051/kmae/2013039>
- Doadrio I, Carmona JA (2003) Testing freshwater Lago Mare dispersal theory on the phylogeny relationships of Iberian cyprinid genera *Chondrostoma* and *Squalius* (Cypriniformes, Cyprinidae). *Graellsia* 59:457–473. <https://doi.org/10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.260>
- Doadrio I, Kottelat M, de Sostoa A (2007) *Squalius laietanus*, a new species of cyprinid fish from North-Eastern Spain and southern France (Teleostei : Cyprinidae). *Ichthyol Explor Fres* 18:247–256.
- Freyhof, J. & Kottelat, M. 2008. *Squalius laietanus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2008: e.T135676A4177674. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T135676A4177674.en>.
- Goren, M., Morizumi, T., Menon, I. et al. Constitutive phospholipid scramblase activity of a G protein-coupled receptor. *Nat Commun* 5, 5115 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms6115>
- Guo, C., Liu, S., Wang, J., Sun, M. Z., & Greenaway, F. T. (2013). ACTB in cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 417, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.12.012>

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Jesus, T., Fernandes, C., Waap, S., & Coelho, M. (2013). Biogeography of the Western Iberian Peninsula unveiled from phylogenetic relationships of Leuciscinae sub-family. Unpublished manuscript, Center for Environmental Biology, Edificio C2, 3 Piso, Sala 2.3.12 Campo Grande, Lisbon 1749-016, Portugal. (UNPUBLISHED)
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Li, Y. Y., Chen, X., Yang, J. X., Chen, Q., Song, T. Y., & Ge, J. Q. (2023). Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real-time PCR analysis of European eel, *Anguilla anguilla*. *Journal of fish biology*, 102(1), 141–154. <https://doi.org/10.1111/jfb.15247>
- Morgane Rose, Agnès Dettai, Stéphane Lefèbvre, Laurence Blanc, Nicolas Poulet, Olivier Baudier, Mélyne Hautecoeur, & Gaël P. J. Denys. (2020). Upstream as a sanctuary for the French populations of Catalan chub *Squalius laietanus* (Teleostei, Leuciscidae) threatened by the allochthonous European chub *S. cephalus* <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33803.87842>
- New England Biolabs. (2024). NEBcutter V3.0. Retrieved from <https://nc3.neb.com/NEBcutter/>
- Palandačić, A., Zupančič, P., & Snoj, A. (2010). Revised classification of former genus *Phoxinellus* using nuclear DNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(5), 1069–1073. <https://doi.org/10.1016/J.BSE.2010.09.021>
- Perea, S., Böhme, M., Zupancic, P., Freyhof, J., Sanda, R., Ozuluğ, M., Abdoli, A., & Doadrio, I. (2010). Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC evolutionary biology*, 10, 265. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-265>
- Perea, S., Sousa-Santos, C., Robalo, J., & Doadrio, I. (2020). Multilocus phylogeny and systematics of Iberian endemic *Squalius* (Actinopterygii, Leuciscidae). *Zoologica Scripta*, 49(4), 440-457. <https://doi.org/10.1111/zsc.12420>
- Perea S, Sousa-Santos C, Robalo J, Doadrio I. (2021) Historical biogeography of the Iberian Peninsula: multilocus phylogeny and ancestral area reconstruction for the freshwater fish genus *Squalius* (Actinopterygii, Leuciscidae). *J Zool Syst Evol Res*. 2021;59:858–886. <https://doi.org/10.1111/jzs.12464>
- QGIS Development Team, 2024. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>
- Rhymer, J. M., & Simberloff, D. (1996). EXTINCTION BY HYBRIDIZATION AND INTROGRESSION. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1), 83–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>
- Robalo, J. I., Sousa Santos, C., Levy, A., & Almada, V. C. (2006). Molecular insights on the taxonomic position of the paternal ancestor of the *Squalius alburnoides* hybridogenetic

complex. *Molecular phylogenetics and evolution*, 39(1), 276–281.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.08.009>

SANJUR, O., CARMONA, J. A. & DOADRIO, I., (2003). Molecular phylogeny of Iberian Chub (genus *Squalius*, Cyprinidae), inferred from molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(1): 20–30. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00088-5)

Schönhuth, S., Vukić, J., Šanda, R., Yang, L., & Mayden, R. L. (2018). Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei). *Molecular phylogenetics and evolution*, 127, 781–799. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.026>

Serrote, C. M. L., Reiniger, L. R. S., Silva, K. B., Rabaiolli, S. M. D. S., & Stefanel, C. M. (2020). Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. *Gene*, 726, 144175. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175>

Sousa-Santos C, Collares-Pereira MJ, Almada VC (2006) Evidence of extensive mitochondrial introgression with nearly complete substitution of the typical *Squalius pyrenaicus*-like mtDNA of the *Squalius alburnoides* complex (Cyprinidae) in an independent Iberian drainage. *J Fish Biol* 68(Suppl B):292–30. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01081.x>

Sun, T., Zhu, W., Ru, Q., & Zheng, Y. (2023). Silencing RPL8 inhibits the progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating the mTORC1 signalling pathway. *Human cell*, 36(2), 725–737. <https://doi.org/10.1007/s13577-022-00852-9>

Technelysium Pty Ltd. (2024). Chromas (Versió 2.01) [Windows]. Recuperat de <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

Wang, X., Gan, X., Li, J., Mayden, R. L., & He, S. (2012). Cyprinid phylogeny based on Bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data: implications for Cyprinidae systematics. *Science China. Life sciences*, 55(9), 761–773. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4366-z>

Waap, S., Amaral, A. R., Gomes, B., & Manuela Coelho, M. (2011). Multi-locus species tree of the chub genus *Squalius* (Leuciscinae: Cyprinidae) from western Iberia: new insights into its evolutionary history. *Genetica*, 139(8), 1009–1018. <https://doi.org/10.1007/s10709-011-9602-0>

Zeng, S., Zhang, T., Madigan, M. C., Fernando, N., Aggio-Bruce, R., Zhou, F., Pierce, M., Chen, Y., Huang, L., Natoli, R., Gillies, M. C., & Zhu, L. (2020). Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein (IRBP) in Retinal Health and Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 577935. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.577935>