

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA E IDENTIFICACIÓN DE UNIDADES DE CONSERVACIÓN EN PECES ENDÉMICOS DE INTERÉS COMUNITARIO



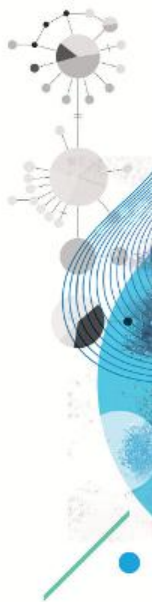
**Familias Cyprinidae
y Cobitidae:**
estudios filogeográfico
y de variabilidad genética
en el marco del
Life+ CIPRIBER

Ignacio Doadrio
Silvia Perea
Andrea Corral-Lou

LIFE 13 NAT/ES/000772
Este proyecto está financiado por el
programa LIFE de la Unión Europea



ACTUACIONES PARA LA
PROTECCIÓN Y CONSERVACIÓN
DE CIBRIDOS IBERICOS
DE INTERÉS COMUNITARIO





CARACTERIZACIÓN GENÉTICA E IDENTIFICACIÓN DE UNIDADES DE CONSERVACIÓN EN PECES ENDÉMICOS DE INTERÉS COMUNITARIO

Familias Cyprinidae y Cobitidae:

estudios filogeográfico y de variabilidad genética en el marco del Life+ CIPRIBER

Ignacio Doadrio / Silvia Perea / Andrea Corral-Lou



Proyecto CIPRIBER: Análisis y estudio filogeográfico y de variabilidad genética de endemismos ibéricos de ciprínidos
Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico
Confederación Hidrográfica del Duero
2020

Lengua/s: Español

Catálogo de publicaciones oficiales: <http://www.O60.es>

NIPO: 668-20-003-9

Depósito legal: DL VA 975-2020

EDITA: © CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL DUERO - 2021

www.chduero.es

1ª EDICIÓN, ENERO 2021

DIRECCIÓN Y COORDINACIÓN: Carlos Marcos Primo, CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL DUERO.

AUTORES: Ignacio Doadrio, Silvia Perea y Andrea Corral-Lou

COLABORADORES: Gustavo González, ICTHIOS GESTIÓN AMBIENTAL S.L.

IMÁGENES: © PROYECTO CIPRIBER, Carlos Rodríguez, PRODUCCIONES BICHO.

DISEÑO Y MAQUETACIÓN: Carolina Gómez, www.estudioplanc.com

IMPRESIÓN:

Gratuita / Unitaria / Papel con gestión forestal certificada



LIFE 13 NAT/ES/000772

Este proyecto está financiado por el programa LIFE de la Unión Europea



Presentación

Uno de los retos más importantes que han tenido que afrontar los organismos de cuenca desde la entrada en vigor de la Directiva Marco del Agua, es la consecución del “buen estado ecológico” de nuestros ríos.

Para poder llevar a cabo medidas de mejora y restauración efectivas, es preciso contar con una diagnosis previa basada en indicadores hidromorfológicos y biológicos que aporten información precisa sobre el estado de las masas de agua. En este contexto, los peces continentales han sido tomados como valiosos indicadores biológicos, y respetando la distribución de competencias entre las Comunidades Autónomas y el Estado, los peces han entrado a formar parte del bagaje de las Confederaciones Hidrográficas.

Es innegable el papel que los organismos de cuenca, como administración competente en la gestión del agua en cuencas intercomunitarias, tienen en la gestión y conservación del hábitat fluvial, y por tanto, en el devenir de las poblaciones de nuestros peces continentales, que son, una de las joyas de biodiversidad que alberga nuestro país, pues buena parte de ellos, son endemismos exclusivos de la península ibérica.

El **proyecto LIFE CIPRIBER** es un buen ejemplo de gestión y responsabilidad compartida en la protección del hábitat fluvial, y de cómo la Confederación Hidrográfica del Duero, como beneficiario coordinador, se ha implicado decididamente en la conservación y protección de este patrimonio natural.

Uno de los hitos alcanzados en este proyecto del que nos sentimos muy orgullosos, es la publicación que ahora tiene en sus manos, “CARACTERIZACIÓN GENÉTICA E IDENTIFICACIÓN DE UNIDADES DE CONSERVACIÓN EN PECES ENDÉMICOS DE INTERÉS COMUNITARIO”, elaborado por el equipo de investigación del Dr. Ignacio Doadrio del Museo Nacional de Ciencias Naturales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), un trabajo inédito sobre la filogenia de nuestros peces que se convertirá sin duda, en una herramienta indispensable en el futuro para la gestión y conservación de las poblaciones de los ciprínidos endémicos de la península ibérica.

Diana Martín Sánchez

Comisaria de Aguas de la Confederación Hidrográfica del Duero



índice general

09 Agradecimientos

11 Introducción

13 Estudio
filogeográfico

18 Estudio de
variabilidad genética

19 Las especies del
proyecto **CIPRIBER**

21 Bermejuela
Achondrostoma arcasii
[Steindachner, 1866]

32 Calandino
Squalius alburnoides
[Steindachner, 1866]

43 Cacho
Squalius pyrenaicus
[Günther, 1868]

54 Boga de río
Pseudochondrostoma polylepis
[Steindachner, 1865]

63 Colmilleja
Cobitis paludica
[De Buen, 1930]

28 Sarda
Achondrostoma salmantinum
Doadrio y Elvira, 2007

39 Bordallo
Squalius carolitertii
[Doadrio, 1987]

49 Boga del Duero
Pseudochondrostoma duriense
[Coelho, 1987]

59 Lamprehuela
Cobitis calderoni
Bacescu, 1962

68 Colmilleja del Alagón
Cobitis vettonica
Doadrio y Perdices, 1997

73 Bibliografía



Agradecimientos

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a la Confederación Hidrográfica del Duero, y en especial a Carlos Marcos Primo, por invitarnos a participar en un proyecto Life de tal magnitud. A la Unión Europea por la concesión del **proyecto CIPRIBER** así como a las instituciones y entidades colaboradoras: Confederación hidrográfica del Tajo, Fundación Patrimonio Natural de Castilla y León y Consejería de Fomento y Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León. Igualmente gracias a Gustavo González y a ICTHIOS por su activa implicación en el proyecto, su ayuda y por habernos proporcionado algunas de las muestras utilizadas en los análisis genéticos mostrados en esta publicación y a Juan Carlos Velasco, del Servicio Territorial de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León en Salamanca, por su inestimable ayuda siempre que la necesitamos. La gran cantidad de muestras que se ha empleado en esta parte del proyecto para identificar las unidades genéticas de los endemismos del Duero y su diversidad genética, y que han permitido obtener resultados más robustos al comparar un gran número de poblaciones ictiológicas para todas las especies estudiadas ha requerido de la colaboración de numerosas personas a las que le estamos enormemente agradecidos. Entre ellas cabe citar a Paloma Garzón, José Luis González y Beatriz Prieto por su ayuda en los muestreos de campo; a Lourdes Alcaraz por su trabajo en el laboratorio del Museo Nacional de Ciencias Naturales para procesar gran parte de las muestras; a Miriam Casal por su ayuda con algunos de los análisis; a Joana Robalo y Carla Sousa-Santos por proporcionar parte del material analizado de Portugal.

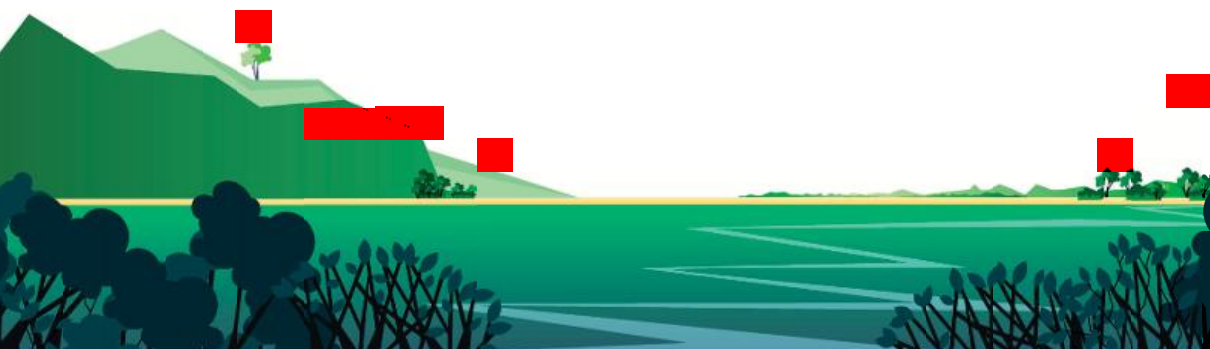




01

Introducción





De todos los vertebrados son los peces de agua dulce de la península ibérica el grupo más amenazado de extinción. Para frenar este riesgo de desaparición, de esas pequeñas joyas que son nuestros pequeños ciprínidos endémicos, algunos esfuerzos se han hecho desde las administraciones, pero todavía queda un largo recorrido por hacer si queremos frenar esa pérdida de biodiversidad. Uno de los problemas existentes es el desajuste que existe entre la información científica disponible y las actuaciones de conservación sobre estas especies. Así por ejemplo las categorías propuestas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), que suelen coincidir con las propuestas realizadas por diferentes expertos, no tienen un reflejo en la legislación Nacional y Autonómica que debiera de amparar la protección de estas especies a través del Catálogo Nacional o de los Catálogos Regionales de Especies Amenazadas.

Sin embargo, son las acciones directas y decididas, llevadas a cabo por las administraciones, sobre el control de especies invasoras, la eliminación de obstáculos en los ríos, el mantenimiento de caudales, la depuración de las aguas, el control sobre fertilizantes y herbicidas y un largo etc., las que deben frenar el declive de nuestros peces. Al fin y al cabo, las cuencas fluviales resumen en sus aguas, y la vida que contienen, la buena o mala gestión de un territorio. Cualquier acción agrícola, ganadera, urbana o industrial tiene repercusión por infiltración o escorrentía en las aguas que discurren en ese territorio y afectan a los peces que viven en sus ríos que no pueden escapar como otras especies de insectos o vertebrados volando, caminado, etc. Pero, la protección de las especies, y la de los peces en particular, no se garantiza sólo a través de obras de restauración, algunas muy loables como la eliminación de presas y obstáculos en la cuenca del Duero o la depuración de las aguas e incluso haciendo una planificación integral de la cuenca.

Estudio filogeográfico: análisis de la variación genética

A largo plazo en especies que han sufrido ya un enorme declive y ante futuros inciertos, debidos al cambio climático, el estudio genético de las especies, es decir el conocimiento de la estructura de sus poblaciones, la variabilidad intrapoblacional o la posibilidad de adaptación a diversos escenarios ambientales tiene un papel clave en la Biología de la Conservación y en la futura supervivencia de estos organismos a largo plazo. Uno de los ejes fundamentales en Biología de la Conservación es conocer la estructura de las poblaciones, es decir, saber cuál es la variación genética de una especie y si se pueden delimitar poblaciones con diferencias genéticas significativas dentro de la misma. El conocimiento de estas poblaciones genética-

mente diferenciadas nos proporciona la posibilidad de tomar decisiones de gestión, cuando los recursos económicos para la conservación de una especie son limitados. De esta forma si no podemos conservar todas las poblaciones de una especie, al menos podremos hacerlo de aquellas poblaciones más diferentes conservando la mayor parte de su patrimonio genético.

Para delimitar estas poblaciones, se han utilizado diferentes marcadores genéticos, entre ellos los microsatélites han sido siempre los más utilizados, junto a la secuenciación de algunos genes. Los microsatélites son repeticiones de un fragmento de ADN y normalmente son marcadores neutros es decir que no codifican para una proteína determinada, aunque pueden tener efectos sobre la expresión de diversos genes. Son muy polimórficos, es decir muy variables, y por ello tienen una ventaja sobre la secuenciación de genes codificantes que suelen estar más conservados y por tanto no permiten descubrir diferencias entre poblaciones cuando estas han divergido hace poco tiempo. Sin embargo, los microsatélites tienen el problema de que normalmente son muy pocos *loci* y alelos (caracteres) los que se pueden estudiar. Las nuevas técnicas genéticas de secuenciación sin embargo permiten estudiar cambios de un solo nucleótido a lo largo de todo el genoma (SNPs por sus siglas en inglés) y obtener cientos o miles de caracteres a través de todos los cromosomas de un organismo. Eso nos da la ventaja de poder estudiar tanto cambios en zonas no codificantes para proteínas, como en zonas codificantes sometidas a selección y obtener dos tipos de información complementaria. Además, si tenemos un organismo próximo con todo su genoma secuenciado, es posible mapear donde se encuentran esas diferencias entre poblaciones e incluso encontrar zonas del genoma y genes candidatos a su adaptación a diferentes cambios ambientales. Son estos SNPs los que junto a la secuenciación de genes mitocondriales y nucleares se han estudiado para los ciprínidos endémicos del oeste español.

Los genes mitocondriales y nucleares nos dan otra información de interés y que tiene que ver con el tiempo de divergencia entre poblaciones, especialmente el ADN mitocondrial, ya que este se transmite de forma clónica por vía materna en la mayor parte de los vertebrados y tiene una tasa de mutación muy superior a la de los genes nucleares, haciéndola idónea para los estudios poblacionales. Y es gracias al estudio de este ADN mitocondrial donde nace una disciplina con una metodología adecuada para el estudio de la divergencia entre poblaciones en un contexto espacio-temporal: la Filogeografía.

La Filogeografía es, por tanto, la disciplina científica que estudia los principios y los procesos que rigen y explican la distribución geográfica de los diferentes linajes evolutivos dentro de una especie, o en especies cercanas, y a una escala espacio-temporal determinada.

La Filogeografía es una disciplina científica relativamente moderna que surge como una subdisciplina de la biogeografía, que incorpora los datos genéticos sobre la estructura de las poblaciones. De esta forma puede desentrañar la evolución de la distribución de una especie a una escala temporal reciente. Por ello, es muy útil en Biología de la Conservación al contribuir a la

delimitación de Unidades de conservación, dependiendo del grado de aislamiento y singularidad de las poblaciones de una especie, y tomar decisiones de gestión cuando los recursos son insuficientes para conservar todas las poblaciones de una especie. La Filogeografía pretende ser un puente de unión entre la Filogenia, la Sistemática y la Genética de poblaciones de manera que pueda ser evaluada la congruencia entre la distribución geográfica de las poblaciones de una especie y la frecuencia en la que sus genotipos (haplotipos mitocondriales o alelos nucleares) están presentes en cada población dentro de un marco evolutivo. La Filogeografía es especialmente útil cuando las especies son filogenéticamente próximas, ya que los métodos filogeográficos pueden representar de una manera más fidedigna las relaciones entre poblaciones en este contexto, procurando un mejor entendimiento de los procesos evolutivos más recientes. De hecho, la Filogeografía ha sido crucial en la historia evolutiva de los organismos para explicar por ejemplo la influencia de las glaciaciones pleistocénicas sobre la formación de linajes genéticos y la distribución de los mismos o la identificación de refugios glaciares, de los que en el caso de los peces de agua dulce de la península ibérica se cuentan algunos ejemplos. La Filogeografía también permite inferir procesos demográficos históricos como tamaño efectivo poblacional, flujo génico, migración, expansión o regresión poblacional que deben ser considerados a la hora de interpretar los resultados obtenidos del análisis filogeográfico.

El ADN mitocondrial de células eucariotas y el ADN cloroplásmico de plantas son los marcadores genéticos principales que se han utilizado en Filogeografía, y numerosos son los estudios que se han realizado utilizando estos dos marcadores desde los albores de la Filogeografía como disciplina; no obstante, también ha sido demostrada la utilidad del ADN nuclear en los estudios filogeográficos. En animales, el uso del ADN mitocondrial en Filogeografía conlleva una serie de ventajas respecto al uso del ADN nuclear. Tal es el caso de su carácter haploide y herencia materna, la carencia de estructuras complejas presentes en el ADN nuclear y la ausencia de recombinación. Además, el ADN mitocondrial presenta una tasa de evolución relativamente rápida respecto al ADN nuclear, por lo que va a ser capaz de mostrar polimorfismo a nivel intraespecífico. Sin embargo, no hay que dejar de señalar algunas desventajas potenciales del ADN mitocondrial que hacen que no descartemos la valiosa información que provee el ADN nuclear para investigar las relaciones filogenéticas de las especies y de sus poblaciones. Así, si se analizase exclusivamente el ADN mitocondrial, algunos procesos evolutivos como la introgresión genética o la hibridación, común en peces de agua dulce, podrían quedar enmascarados. Además, otros factores como un flujo génico diferencial entre sexos o el diferente tamaño poblacional del ADN mitocondrial respecto al nuclear podrían estar mostrando historias evolutivas sesgadas. Por último, aunque el genoma mitocondrial ha sido tradicionalmente considerado una molécula neutral no sometida a procesos de selección, se ha demostrado que este modelo no es real y numerosos son los ejemplos que sostienen este patrón, de forma que los patrones espaciales de estructura y diversidad genética observados en los organismos no tienen por qué reflejar procesos neutrales, es decir, aquellos derivados únicamente de su historia evolutiva.

Por tanto, un estudio filogeográfico completo debe llevar información de ambos tipos marcadores genéticos. En el estudio filogeográfico de las especies del CIPRIBER se ha utilizado un gen mitocondrial, el citocromo b (*MT-CYB*), y un gen nuclear, el gen activador de la recombinación (*RAG1*). Clásicos son los trabajos de filogeografía que analizaban un único gen o un fragmento del mismo, normalmente mitocondrial, sin embargo, con el advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva en los últimos 15 años, la filogeografía basada en el análisis de un mayor número de genes ha tomado una gran importancia. No obstante, aunque el coste de estas técnicas se está abaratando, debido a la gran cantidad de individuos analizados en el proyecto CIPRIBER solamente se seleccionaron los dos genes mencionados para el estudio filogeográfico, priorizando el uso de una batería mayor de marcadores nucleares (SNPs) para el análisis de variabilidad genética.

El estudio filogeográfico nos permite conocer por tanto los patrones evolutivos de los organismos vivos actuales, es decir su variación genética, en un contexto geográfico y temporal. Por otro lado, el análisis de varias especies o poblaciones co-distribuidas de forma conjunta nos ayuda a entender la presencia de patrones generales biogeográficos (vicarianza, dispersión, extinción, etc.) e históricos (eventos geológicos o climáticos) que han dado lugar a la diversidad biológica actual. En el caso de los peces de agua dulce de la península ibérica, existen patrones filogeográficos comunes a varias especies. Así, la presencia de grandes barreras biogeográficas como la formación de los Pirineos o la apertura del Estrecho de Gibraltar apoyan el aislamiento de la ictiofauna continental ibérica. Sin embargo, el Estrecho de Gibraltar no solamente ha dado lugar a la separación de la fauna ibérica de la norteafricana, ya que patrones vicariantes explicando la divergencia entre linajes atlánticos y mediterráneos hace aproximadamente cinco millones de años cuando se abrió el Estrecho, se han descrito para los géneros *Aphanius*, *Cobitis* y *Squalius*. Así mismo, conexiones antiguas entre el sur de la península y el norte de África hace aproximadamente seis millones de años durante el período de desecación del Mediterráneo han puesto de manifiesto relaciones evolutivas próximas entre especies de barbos de ambas regiones.

Otro patrón filogeográfico característico que explica la distribución actual de algunas especies de peces continentales ibéricos es la presencia de capturas fluviales, en las que una porción de una cuenca hidrográfica es capturada por otra cuenca diferente a consecuencia de eventos geológicos particulares como movimientos tectónicos a lo largo de fallas, migración de cauces o erosión remontante de un río en otro. Estas capturas pueden ser antiguas o recientes y en la península ibérica se han descrito varias a lo largo del tiempo geológico, entre las que cabe citar la de los ríos Alagón y Alberche, dos tributarios de la cuenca del Tajo cuya fauna de peces está estrechamente relacionada con la cuenca del Duero. Así, capturas puntuales de pequeños torrentes de cabecera del río Tormes por erosión remontante del Alberche permiten explicar la presencia de bordallo (*Squalius carolitertii*) en este afluente del Tajo. El bordallo está distribuido principalmente por las cuencas de los ríos Duero, Miño, Mondego y otras pequeñas cuencas

del cuadrante noroccidental de la península ibérica, mientras que la cuenca del Tajo está habitada por otras dos especies del género *Squalius*, el cacho (*S. pyrenaicus*) y el bordallo del Gallo (*S. castellanus*), excepto por la población de bordallo del Alberche. A su vez, existe un patrón filogeográfico común a varias especies de peces de agua dulce ibéricos, de manera que las poblaciones del río Alagón, una subcuenca del río Tajo, están evolutivamente emparentadas con las de algunos de los afluentes del río Duero, como demuestran los resultados obtenidos del análisis genético de las poblaciones de peces consideradas por el proyecto CIPRIBER. Así, las poblaciones de calandino (*Squalius alburnoides*) del Alagón pertenecen al mismo linaje que las poblaciones de esta especie del Duero. Lo mismo ocurre con la colmilleja del Alagón (*Cobitis vettonica*), que se distribuye por esta subcuenca del río Tajo, y por los ríos Mayas y Águeda en el Duero. La presencia de patrones filogeográficos compartidos entre el calandino y la colmilleja del Alagón y la existencia de un alelo mitocondrial que está presente en ambas cuencas hidrográficas apoyan la idea de que estos linajes estuvieron unidos en el pasado, en un período previo a la captura del Alagón por la cuenca del Tajo.

La forma de visualización de los patrones filogeográficos se basa principalmente en la reconstrucción de una red de haplotipos mitocondriales o alelos nucleares, dependiendo del tipo de marcador molecular analizado, en la que se refleja la existencia o no de estructura genética de las poblaciones analizadas, así como la frecuencia de cada uno de los haplotipos o alelos representados en la red. Existen metodologías y algoritmos variados para llevar a cabo la inferencia de redes, cuyo desarrollo excede los límites del presente libro, sin embargo, la literatura que los recoge es extensa.

El análisis conjunto de aspectos filogenéticos, biogeográficos y de genética de poblaciones que engloba la Filogeografía tiene importantes implicaciones en el área de la Biología de la Conservación. Dentro de un contexto de programas de conservación, la Filogeografía nos permite identificar Unidades de conservación estancas que van a estar sometidas a diferentes presiones evolutivas y a verse afectadas por distintos factores de amenaza. El conocimiento de estas Unidades de conservación, como se propone en el **proyecto Life CIPRIBER**, es fundamental para poder llevar a cabo programas de conservación y medidas de gestión adecuadas.

Vista aérea del río Alberche



Estudio de variabilidad genética

En la cuenca del Duero se ha planteado un programa de cría en cautividad con objeto de no solo desarrollar un método de cría natural sino también de permitir la posibilidad de llevar a cabo refuerzos de poblaciones naturales de las especies de peces incluidas en el marco del proyecto **Life CIPRIBER** (aquellas que están incluidas en el Anexo II de la Directiva Hábitats), en caso de ser necesario en un futuro si se observa una tendencia regresiva de las mismas, o de recuperarlas en puntos donde históricamente estaban presentes estas especies de peces. Sin embargo, para llevar a cabo este programa de cría en cautividad y posibles futuras reintroducciones es imprescindible tener un fuerte conocimiento científico acerca de la variación y variabilidad genética de estas poblaciones de peces, ya que probablemente presenten adaptaciones locales que se han originado hace miles o millones de años siguiendo la dinámica ambiental y climática de los de los sistemas acuáticos que habitan. La variación genética viene determinada por el estudio filogeográfico, que ha sido explicado en el apartado anterior. La variabilidad genética requiere de una metodología de análisis específica que va a describir la diversidad genética de las poblaciones de una especie.

Esta diversidad genética es importante porque hace posible la respuesta de las poblaciones a cambios ambientales, enfermedades emergentes, cuellos de botella, etc. Además, el análisis de la diversidad genética ayuda a comprender los efectos que tienen los cambios del tamaño en las poblaciones, los modos de apareamiento, la distribución espacial de los individuos, la mutación, la migración y la selección natural en las poblaciones individuales y en una especie en su conjunto. Por lo tanto, el conocimiento de la cantidad de diversidad genética se considera crítico para analizar el estado, las amenazas y la viabilidad genética de especies enteras y poblaciones individuales. La diversidad genética se estudia a través de diversos parámetros como son el número de *loci* polimórficos (un locus y su plural loci es el sitio, o sitios, donde se encuentra un gen o una secuencia de ADN), es decir que tienen más de una variante genética (alelos), en términos de probabilidad. También otros parámetros como el número de alelos por locus, la heterocigosidad, la diversidad nucleotídica (π) o la diversidad haplotípica son medidas básicas de la diversidad genética.

02

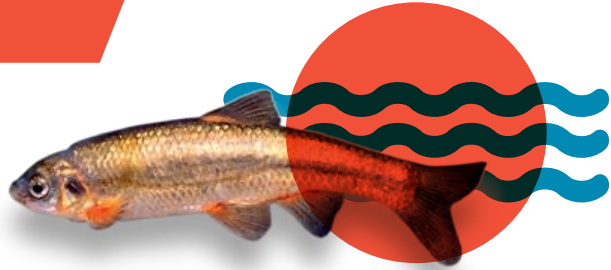
Las especies
CIPRIBER





Bermejuela

Achondrostoma arcasii
(Steindachner, 1866)



La bermejuela es una especie incluida en la categoría de Vulnerable en la lista roja de la IUCN ya que sus poblaciones se encuentran en regresión. Sin embargo, aunque esta es la tendencia general de la especie, el estado de los distintos linajes, o Unidades de conservación, que la constituyen, y las amenazas particulares de cada una de estas unidades, no tiene por qué ser el mismo. De hecho, no es el mismo, y mientras que para algunas de las Unidades de conservación que se definirán posteriormente, las poblaciones siguen siendo abundantes, como ocurre por ejemplo en Galicia, Duero occidental y Duero oriental, en otras, como las de la margen izquierda del Ebro o las poblaciones de los ríos Cuerpo de Hombre y Tormes (Río Corneja), el declive poblacional ha sido muy acusado, y por tanto, estas Unidades de conservación deberían tener una categoría de protección más elevada. La bermejuela además está incluida en el anexo II de la Directiva Hábitats, con la denominación taxonómica antigua de *Rutilus arcasii* y, de acuerdo a la normativa española, en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial (LESPE, RD 139/2011, de 4 de febrero) como *Chondrostoma arcasii*, aunque su taxonomía ha sido actualizada y actualmente la especie se denomina *Achondrostoma arcasii*.

La bermejuela es un ciprínido que originalmente fue descrito como *Leuciscus (Leucos) arcasii* Steindachner, 1866. Posteriormente, la especie fue transferida a los géneros *Rutilus* y *Chondrostoma* en base al estudio comparativo de diferentes ciprínidos y diversos caracteres taxonómicos, hasta que definitivamente este último género fue dividido en seis géneros nuevos de acuerdo a sus características morfológicas y a los diferentes linajes evolutivos que lo constituían. Cuatro de estos géneros son endémicos de la península ibérica (*Achondrostoma*, *Iberochondrostoma*, *Parachondrostoma* y *Pseudochondrostoma*); un quinto género, *Protochondrostoma*, es endémico de Italia, y finalmente, las especies que han permanecido adscritas al género *Chondrostoma* se distribuyen por el este de Europa y la parte occidental de Asia. Después de la escisión del género *Chondrostoma s.l.* en los seis géneros diferentes,

la bermejuela se ha mantenido en el género *Achondrostoma*, siendo *A. arcasii* la especie tipo del mismo, debido a la principal característica morfológica que define al género, la ausencia de una placa córnea en la región bucal, y a otras características óseas que lo diferencian del resto de géneros.

La bermejuela está filogenéticamente emparentada con dos especies portuguesas del mismo género: el ruivaco (*Achondrostoma oligolepis*), distribuida por la mitad septentrional de Portugal y el ruivaco del oeste (*Achondrostoma occidentale*), cuya área de distribución está restringida a unos pocos ríos pequeños y costeros en las proximidades de Lisboa, el Alcabri-chel, el Sizandro y el Safarujo. La cuarta especie que constituye el género *Achondrostoma* es la sarda (*A. salmantinum*), que tiene su propia sección en este libro. La sarda es endémica de algunos pequeños ríos de la cuenca del Duero en la región de Salamanca. Por su parte, la bermejuela se distribuye por la mitad norte de la península ibérica (Figura 1), incluyendo poblaciones principalmente atlánticas en las cuencas del Miño, Limia y otras cuencas gallegas más pequeñas, en las cuencas del Duero y Tajo y en la vertiente mediterránea en las cuencas del Ebro, Mijares, Palancia, Turia y Júcar. En algunas cuencas de la parte portuguesa del Duero, el límite entre la bermejuela y el ruivaco es difuso debido a posibles fenómenos de introgresión y necesita ser estudiado con las técnicas de investigación moleculares y morfológicas adecuadas.

Dentro del proyecto CIPRIBER se han analizado algunos marcadores genéticos mitocondriales (gen citocromo *b*) y nucleares (gen de activación de la recombinación [*RAG1*] y SNPs) para todas las poblaciones conocidas de la bermejuela con el fin de identificar las Unidades de conservación que componen esta especie. Para ello se estudiaron 61 poblaciones a lo largo de su área de distribución (Figura 1) y que se detallan a continuación: Cuenca del Miño: Ca-boalles, Miño, Sil, Tamuxe y Tea. Cuenca del Mandeo: Mandeo. Cuenca del Umia: Umia. Cuenca del Ulla: Ulla. Cuenca del Tajo: Alagón, Alberche, Bullones, Cañamares, Cuerpo de Hombre, Dulce, Gallo, Gévalo y Salado. Cuenca del Duero: Adaja, Almar, Aranzuelo, Arlanza, Arevalillo, Bernesga, Camesa, Carrión, Cea, Cega, Corneja, Cubillo, Curueño, Duratón, Ebrillos, Eresma, Eria, Manzanas, Merdancho, Odra, Ólvega, Omaña, Pirón, Pisuerga, Riaza, Sabor, Tera, Trabanco, Valdavia, Valderaduey y Voltoya. Cuenca del Mijares: Mijares. Cuenca del Palancia: Palancia. Cuenca del Turia: Alfambra. Cuenca del Ebro: Araquil, Cidacos, Isuela, Jalón, Jiloca, Matarra-ña, Mesa, Najerilla, Piedra, Queiles y Zirauntza. Cuenca del Júcar: Laguna de Arcas, Laguna Cedazos, Laguna de Fuentes, Laguna del Marquesado y el propio río Júcar. Además, se analizaron varias poblaciones de dos especies filogenéticamente próximas a la bermejuela para obtener un ajuste más fino en la identificación de sus Unidades de conservación: el ruivaco (*Achondrostoma oligolepis*; 9 poblaciones: ríos Alcoa, Cávado, Limia, Lis, Mondego, Real San Pedro, Tornada y Vouga) y el ruivaco del oeste (*Achondrostoma occidentale*; 2 poblaciones: ríos Safarujo y Sizandro).



Fig. 1. Área de distribución de la bermejuela (*Achondrostoma arcasii*), el ruivaco (*Achondrostoma oligolepis*) y el ruivaco del oeste (*Achondrostoma occidentale*) y localidades de muestreo para la bermejuela.

Del análisis del gen mitocondrial citocromo b se desprende que las poblaciones de bermejuela no constituyen un grupo evolutivo monofilético y que la especie está constituida por dos grandes linajes mitocondriales independientes, uno de ellos compuesto por las poblaciones del noroeste de España, que incluye las poblaciones gallegas y de la parte occidental de la cuenca del Duero y que está filogenéticamente emparentado con el ruivaco del oeste (*Achondrostoma occidentale*). El segundo gran linaje mitocondrial de bermejuela lo forman el resto de poblaciones españolas, y constituye el grupo hermano del ruivaco (*Achondrostoma oligolepis*) (Figura 2).

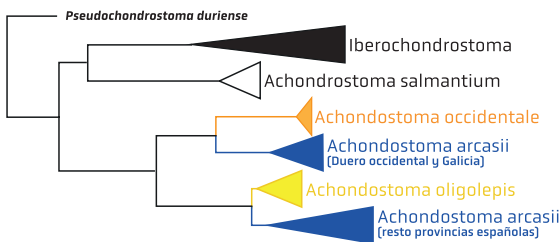


Fig. 2. Árbol filogenético representando un esquema de las relaciones evolutivas de la bermejuela respecto al resto de especies del género *Achondrostoma*.

A efectos de conservación nos interesa una escala de análisis más profunda, en la que se puedan identificar diferentes grupos mitocondriales, o clados, en función de sus genotipos para cada uno de los dos grandes linajes mitocondriales de bermejuela, y por ello se han analizado más de 900 individuos (Figura. 3). Dentro del gran linaje mitocondrial de las poblaciones gallegas y del Duero occidental se han identificado tres clados: uno constituido por las poblaciones gallegas y que incluye los individuos pertenecientes a la cuenca del Miño, y sus afluentes Caboalles, Sil, Tamuxe y Tea, y a las cuencas hidrográficas del Mandeo, Umia y Ulla. En la cuenca del Miño se mezclan individuos de bermejuela con individuos de ruivaco; lo mismo ocurre en algunos de los afluentes portugueses de la cuenca del Duero (Río Sabor) donde comparten haplotipos estas dos especies probablemente como consecuencia de contactos cuaternarios durante las glaciaciones pleistocénicas. Un segundo clado perteneciente a este linaje estaría formado por las poblaciones de los tributarios del Noroeste del Duero (Duero occidental): Cea, Bernesga, Curueño, Eria, Omaña, Sabor, Esla, Porma y algunos individuos del río Manzanas. Contactos cuaternarios que explican la captura fluvial bien conocida entre la cabecera del río Sil (Río Caboalles) sobre el río Luna también apoyan la presencia de haplotipos mitocondriales compartidos entre los clados de las cuencas gallegas y del Duero occidental. Finalmente, en el linaje del Noroeste se observa un tercer clado en el que se incluyen el resto de individuos del Río Manzanas.

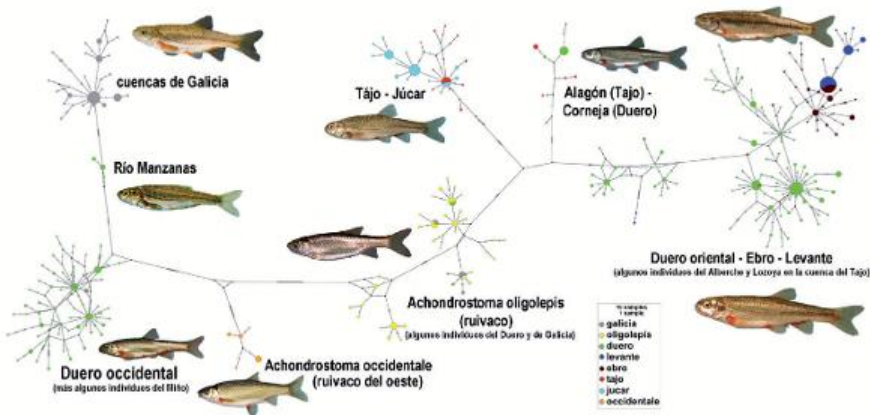


Fig. 3. Red de haplotipos mitocondriales representando las relaciones evolutivas de la bermejuela (*Achondrostoma arcasii*), el ruivaco (*Achondrostoma oligolepis*) y el ruivaco del oeste (*Achondrostoma occidentale*). Para el caso de la bermejuela pueden distinguirse grupos genéticos diferentes, que se corresponden a las siete unidades de conservación representadas en la Figura 4.

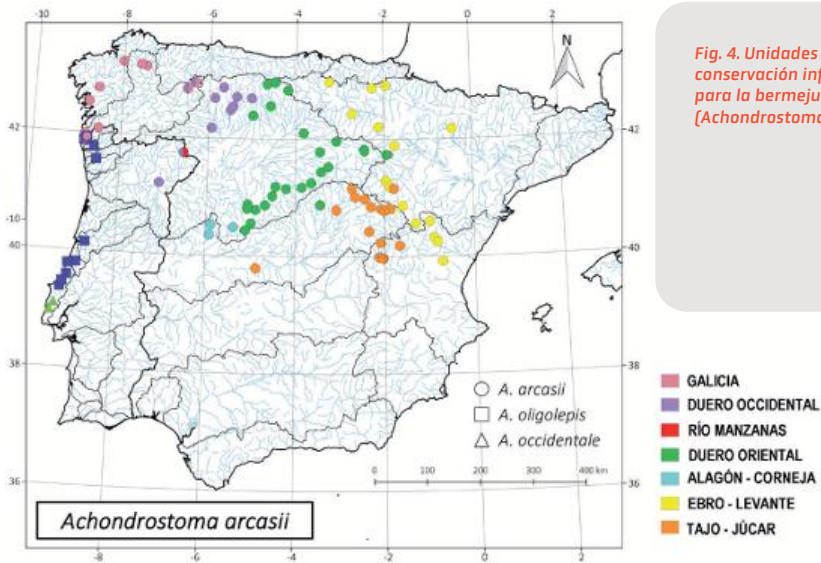
Bermejuelas



En el gran linaje mitocondrial que engloba a las poblaciones de bermejuela del Duero oriental, Tajo, Ebro y Levante Español también se identifican tres clados. Uno formado por las poblaciones de la subcuenca del Río Alagón en el Tajo, y que se encuentran distribuidas en el Alto Alagón y en el Cuerpo de Hombre, y las poblaciones del Río Corneja de la cuenca del Duero. Un segundo clado constituido por los tributarios del Duero oriental y las cuencas que drenan al Mar Mediterráneo [Ebro, Mijares, Palancia y Turia]. Este segundo clado presenta poblaciones de bermejuela en los siguientes ríos: Cuenca del Duero: Aranzuelo, Arlanza, Almar, Arevalillo, Camesa, Cea, Cega, Cubillo, Curueño, Duratón, Eresma, Merdancho, Odra, Ólvega, Pirón, Pisuerga, Rianza, Tera, Trabanco, Valde- raduey, Valdavia, Voltoya; Cuenca del Ebro: Araquil, Cidacos, Isuela, Jalón, Jiloca, Matarraña, Mesa, Najerilla, Piedra, Queiles, Zirauntza; Cuencas del Levante: Palancia, Mijares, Alfambra (cuenca del Turia); Cuenca del Tajo: Alberche y Lozoya. Un tercer clado dentro de este linaje estaría compuesto por las poblaciones de las cuencas del Tajo y del Júcar, incluyendo los siguientes ríos: Cuenca del Tajo: Dulce, Gallo, Gévalo y Salado; Cuenca del Júcar: Laguna de Arcas, Laguna Cedazos, Laguna de Fuentes, Laguna del Marquesado y el propio Júcar. Dentro de este clado también está presente la población del río Piedra de la cuenca del Ebro, cuya presencia en este río probablemente se explica por conexiones pleistocénicas con afluentes de la cuenca alta del Tajo.



En la red de haplotipos mitocondrial de la bermejuela se observan dos grupos diferenciados en las poblaciones del Duero oriental. Sin embargo, estos comparten haplotipos, por lo que se consideran pertenecientes al mismo clado junto con las poblaciones de la cuenca del Ebro y del Levante español (excepto la cuenca del río Júcar que pertenece a un clado diferente). No obstante, dentro de este clado, las poblaciones del Duero oriental no comparten ni haplotipos mitocondriales ni alelos nucleares con las poblaciones del Ebro y del Levante, por lo que a efectos prácticos se han considerado dos Unidades de conservación diferentes, una incluyendo todas las poblaciones del Duero oriental, y la otra las poblaciones del Ebro y Levante [Mijares, Palancia y Alfambra]. De esta forma, la bermejuela debería ser dividida en siete Unidades de conservación diferentes en base a los marcadores mitocondriales y nucleares analizados (Figura. 4).



Particularmente para la cuenca del Duero se reconocen cuatro unidades de conservación diferentes. Estas son: a) La región noroccidental de la cuenca del Duero, representada principalmente por las grandes subcuencas del Esla/Tera. b) El centro y Este de la cuenca del Duero. c) El río Manzanas. d) El río Corneja. Esta última, aunque desde el punto de vista genético es similar a las poblaciones del alto Alagón [Alagón y Cuerpo de Hombre] con las que constituyen un clado, deben ser consideradas como diferentes a las poblaciones del Alagón, ya que no comparten haplotipos mitocondriales entre sí.

Respecto a la variabilidad genética de las poblaciones de bermejuela (*Figura 5*), la cuenca del Miño y algunos tributarios de la parte noroccidental del Duero, como son los ríos Arlanza, Cea, Cega y Omaña, presentan valores altos de este parámetro genético. En el río Caboalles, uno de los afluentes de la cabecera de la cuenca del Miño, junto con el río Sabor, afluente de la parte occidental del Duero, se hallan valores especialmente altos de diversidad genética. Sin embargo, estos valores son artificiales ya que en ambos ríos se mezclan dos linajes mitocondriales diferentes. Esto contrasta con lo que ocurre en el río Manzanas, donde la diversidad genética es menor de lo esperado, ya que en este afluente del Duero también se citan dos linajes mitocondriales diferentes. Si nos movemos al extremo opuesto, la diversidad genética es baja en las cuencas de los ríos Mandeo, Ulla, Umia y en las cuencas del Levante, siendo especialmente baja en el río Corneja [cuenca del Duero]. En la cuenca del Tajo la diversidad genética es relativamente alta y en las lagunas ubicadas en la parte alta la cuenca del Júcar [Arcas, Cedazos, Fuentes y Marquesado]. Sin embargo, dentro de la cuenca del Tajo la diversidad genética es muy baja en la cuenca del Alagón.

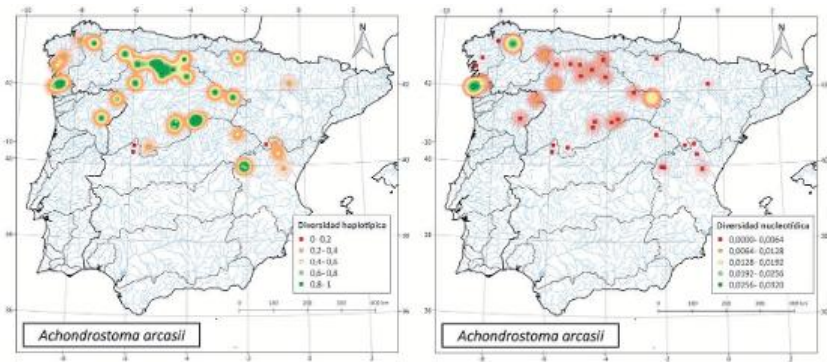


Fig. 5. Diversidad genética de las poblaciones de bermejuela (Achondrostoma arcasii).

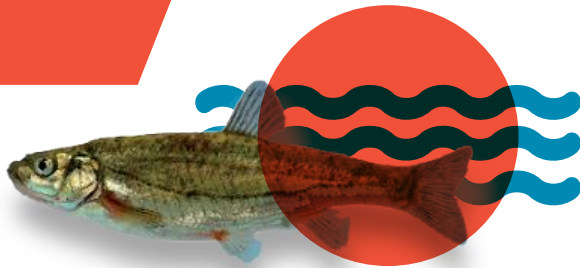
Si fuese necesario llevar a cabo programas de cría en cautividad de bermejuela, para las poblaciones bajo el marco del proyecto Life CIPRIBER se recomendaría mantener en cautividad de forma independiente, ya que no comparten genotipos, una población del Corneja [cuenca del Duero] y una población del Alto Alagón [Alagón o Cuerpo de Hombre] por su área de distribución restringida y alto grado de vulnerabilidad. Sin embargo, al obtener los ejemplares para mantener en cautividad habría que analizarlos genéticamente porque en estas cuencas la introgresión con especies del género *Pseudochondrostoma* es frecuente. De esta forma se

mantendrían dos poblaciones de seguridad frente a catástrofes. Las otras poblaciones de bermejuela es mejor no manipularlas. Especialmente aquellas que se encuentran en zonas de contacto entre distintos linajes genéticos. Este es el caso del río Manzanas, en este río habría que tomar medidas para su conservación y sus poblaciones no deben ser reforzadas, ni servir de fuente para reforzar otras poblaciones. En cualquier caso, si alguna población desapareciera de la cuenca del Duero y se quisiera llevar a cabo su reintroducción habría que respetar la Unidad de conservación en la que se enmarca dicha población.

Sarda

Achondrostoma salmantinum

Doadrio y Elvira, 2007



La sarda es un endemismo ibérico incluido en la categoría de En Peligro de Extinción en la lista roja de la IUCN debido a su marcada regresión poblacional. La distribución de esta especie se encuentra, actualmente, restringida a tres subcuencas de la parte suroeste de la cuenca del Duero pertenecientes a la provincia de Salamanca: Águeda, Huebra-Yeltes y Uces, [Figura 6]. De manera genérica las poblaciones se encuentran en regresión debido a la disminución del caudal de sus ríos. Dentro de la subcuenca del Águeda, en el río Turones (Ribera de Portugal) esta especie se considera extinta desde el año 2009, cuando este río sufrió una enorme disminución de su caudal. Además, la sarda está incluida en el anexo II de la Directiva Hábitats con la antigua denominación taxonómica de *Rutilus lemmingii*. Pero estudios posteriores han demostrado que la población de *R. lemmingii* del Duero debía considerarse una especie diferente y la población del suroeste de la cuenca del Duero actualmente se denomina *Achondrostoma salmantinum*.

Dentro del proyecto CIPRIBER se han utilizado varios tipos de marcadores moleculares para establecer las diferentes Unidades de conservación para esta especie a lo largo de toda su área de distribución [Figura 6]. Para llevar a cabo este objetivo se hizo uso de un marcador



mitocondrial [citocromo *b*], un marcador nuclear (*RAG1*) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que se han analizado para 11 poblaciones de las tres cuencas hidrográficas de la cuenca del Duero en las que se distribuye la especie y sus tributarios. Concretamente se incluyeron los ríos Arganza, Cabeza de Iruelos, Camaces, Dos Casas, Gavilanes, Huebra, Tenebrillas, Turones, Uces y Yeltes.



Fig. 6. Área de distribución de la sarda (*Achondrostoma salmantinum*) y localidades de muestreo.

Las Unidades de conservación para la sarda se han establecido en base a la estructura encontrada con el marcador mitocondrial (*Figura 7*), ya que el gen nuclear analizado no ofreció ninguna estructura clara y los resultados de los SNPs han reforzado lo encontrado a través del marcador mitocondrial. Por lo tanto, para la sarda se han identificado cuatro Unidades de conservación (*Figura 8*) y, al contrario de lo esperado, estos grupos genéticos no se corresponden con las regiones geográficas de las tres subcuencas mencionadas anteriormente. Al primer grupo corresponderían las poblaciones de la subcuenca del Águeda (río Turones y rivera de Dos Casas). El segundo grupo estaría comprendido por la población del Camaces (subcuenca Huebra-Yeltes), la cual se encuentra separada del resto de poblaciones de la misma cuenca por el salto de agua del Cachón del Camaces. Las poblaciones del Huebra y sus afluentes (el río Arganza) y la subcuenca del Uces (el río Uces y la rivera de Cabeza de Iruelos) formarían el tercer grupo. Mientras que las poblaciones del Yeltes y sus afluentes (ríos Gavilanes, Tenebrillas y Morasverdes) formarían el cuarto grupo genético. Por lo tanto,

las poblaciones de la subcuenca del río Águeda pertenecen al grupo 1, dentro de la subcuenca del Huebra–Yeltes encontramos los grupos 2, 3 y 4, y finalmente dentro de la subcuenca del río Uces encontramos tanto individuos que pertenecen al grupo 1 como al grupo 3 genéticamente. A pesar del área de distribución tan restringida de la especie, es sorprendente que estas poblaciones estén tan estructuradas. Asimismo, los resultados de los SNPs fueron congruentes con los resultados obtenidos para el marcador mitocondrial.

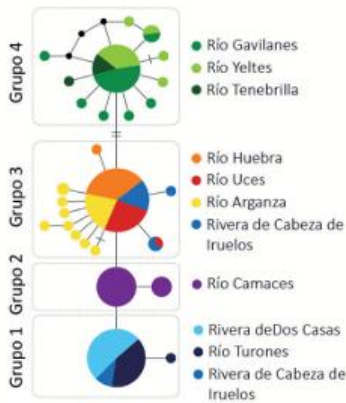


Fig. 7. Red de haplotipos representando las relaciones mitocondriales de la sarda (*Achondrostoma salmantinum*).

Fig. 8. Unidades de conservación de la sarda (*Achondrostoma salmantinum*)





También gracias al uso de las herramientas moleculares se ha visto que estas poblaciones presentan valores muy bajos de diversidad genética (**Figura 9**) lo cual las hace más sensibles a los cambios que se puedan producir en el ambiente. Las poblaciones con una diversidad genética mayor son el río Arganza (afluente del Huebra) y el río Yeltes y su afluente el río Gavilanes. El resto de poblaciones presentan valores más bajos de diversidad genética y sólo se han identificado entre uno y tres haplotipos mitocondriales en estas poblaciones. La gran diversidad encontrada en la rivera de Dos Casas se debe a la presencia de individuos pertenecientes a dos grupos genéticos distintos. Por otro lado, la población del río Turones (subcuenca del Águeda) es considerada extinta y gracias al uso de las herramientas moleculares y al material genético conservado en el Museo Nacional de Ciencias Naturales - CSIC se ha visto que esta población poseía características propias, pero muy similar genéticamente a los arroyos de Dos Casas y Cabeza de Iruelos. En caso que se quisiera reintroducir en este río la sarda, se debería hacer con individuos procedentes de la población de rivera de Dos Casas.

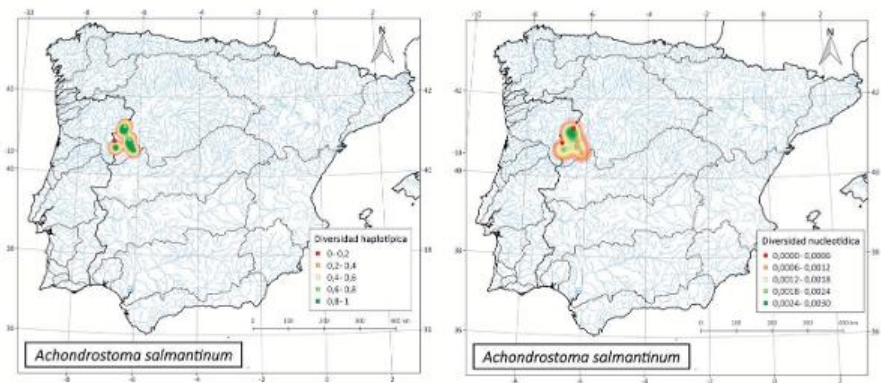
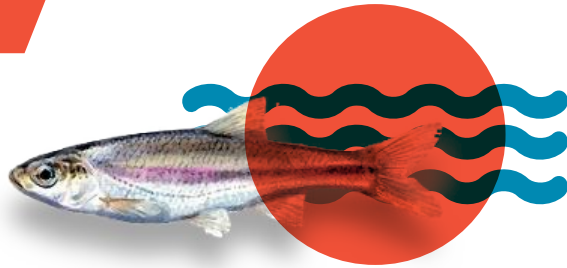


Fig. 9. Diversidad genética de las poblaciones de la sarda (*Achondrostoma salmantinum*).

Calandino

Squalius alburnoides
[Steindachner, 1866]



El calandino es una especie que en general ha mostrado un buen estado de conservación, con una amplia distribución en la mitad suroccidental de la península ibérica y unas densidades poblacionales relativamente altas y con una tendencia estable. Sin embargo, debido a la presión sostenida que han sufrido sus poblaciones por la expansión creciente de las especies exóticas y por la degradación de sus hábitats, la especie se encuentra incluida en la categoría de Vulnerable en la lista roja de la IUCN. A nivel nacional, el calandino se halla protegido por diversas normativas regionales, de manera que está catalogada como En Peligro de Extinción en el Catálogo regional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres de la Comunidad de Madrid y como De Interés Especial en el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Castilla-La Mancha, apareciendo en ambos como *Tropidophoxinellus alburnoides*, taxonomía desactualizada. La especie además está incluida en el Anexo II de la Directiva Hábitats como *Rutilus alburnoides*, nombre también desactualizado, hecho que ha derivado a su consideración dentro de los objetivos del Life CIPRIBER.

El calandino es una especie con un origen híbrido antiguo a partir de dos genomas diferentes, uno procedente de hembras de cacho [*Squalius pyrenaicus*; genoma P] y el otro de machos de una especie actualmente extinta emparentada filogenéticamente con los Alburninae [genoma A] y cuya especie actual más próxima es el jarabugo [*Anaocypris hispanica*]. Esta hibridación probablemente ocurrió, entre el Plioceno y el Pleistoceno, cuando las cuencas fluviales se reestructuraron poniendo en contacto especies antes aisladas. El calandino presenta una complejidad no vista en muchos otros organismos, con distintos morfotipos y distintas dotaciones cromosómicas, [diploides: $2n=50$, triploides: $3n=75$ y tetraploides: $4n=100$] y una desviación muy acusada en la proporción de sexos hacia las hembras. Todo esto origina una gran plasticidad fenotípica y una capacidad evolutiva extraordinaria, y para algunos autores estos raros y escasos complejos híbridos asexuales

constituyen un fondo de saco evolutivo, debido a una pérdida de variabilidad genética y a su incapacidad para compensar mutaciones deletéreas a través de la heterocigosidad. Sin embargo, el calandino permanece desde hace al menos 1,5 millones de años en la península ibérica, y parece que esta plasticidad les confiere una mayor capacidad de respuesta ante condiciones ambientales desfavorables.

Se ha cuestionado si el origen híbrido del calandino ocurrió una única vez, hecho más parsimonioso, o si se ha producido múltiples veces a lo largo de la evolución, ya que la estructura filogenética del calandino es un reflejo de la estructura mitocondrial del cacho (*Squalius pyrenaicus*), especie con la que cohabita y de cuyo ancestro obtuvo su genoma mitocondrial. Si se hubiera producido un único evento de hibridación la diferenciación del calandino hubiera sido paralela a la del cacho a medida que se fueron configurando las cuencas hidrográficas ibéricas actuales. Por el contrario, si el evento de hibridación hubiera sido múltiple, este habría tenido lugar de forma independiente en cada una de las cuencas en las que cohabitan ambas especies y la presencia de calandino fuera del área de distribución de la especie, por ejemplo en la cuenca del Duero donde el cacho (*Squalius pyrenaicus*) es reemplazado por el bordallo (*Squalius carolitertii*), podría explicarse o bien por dispersiones posteriores al evento de hibridación o por extinción del cacho en la cuenca del Duero una vez se hubiera producido el evento de hibridación en esta cuenca. En el río Quarteira, una pequeña cuenca de la punta suroeste de Portugal, se han descrito fenómenos de introgresión genética de la especie coexistente, el cacho del Arade (*Squalius aradensis*), sobre el calandino, de forma que en esta cuenca el mitocondrial que aparece en los calandinos con mayor frecuencia es el de la especie *S. aradensis* y no el típico de *S. pyrenaicus*, que aparece en otras poblaciones de la península ibérica, aunque calandinos con mitocondrial de cacho también se citan en el río Arade.

Debido a la complejidad de ploidías que presenta el calandino los modos de reproducción de la especie son variados y complejos, y además son diferentes dependiendo de la cuenca hidrográfica que habitan. La forma más frecuente es la reproducción asexual, de manera que en cada una de estas cuencas otras especies del género *Squalius* actúan como donadoras de esperma contribuyendo con nuevo material genético, reproduciéndose con las hembras de calandino a través de hibridogénesis, es decir, descartando algunos de los genotipos, de manera que los genotipos no excluidos pueden recombinarse aleatoriamente produciendo generalmente gametos haploides; sin embargo, aunque el sex-ratio está sesgado hacia las hembras también aparecen machos que son fértiles y que juegan un papel importante en la dinámica reproductiva del calandino. Algunos de estos machos diploides han regenerado y mantenido el genoma de la especie parental extinta [AA]. Otros modos de reproducción como la ginogénesis en el que las hembras híbridas transmiten su genoma intacto al óvulo, aunque en menor medida, también son factibles. Las formas

tetraploides pueden incluso retomar la bisexualidad originando nuevamente formas diploides [machos y hembras] fértiles que siguen los procesos típicos de la reproducción sexual de recombinación, meiosis y singamia.

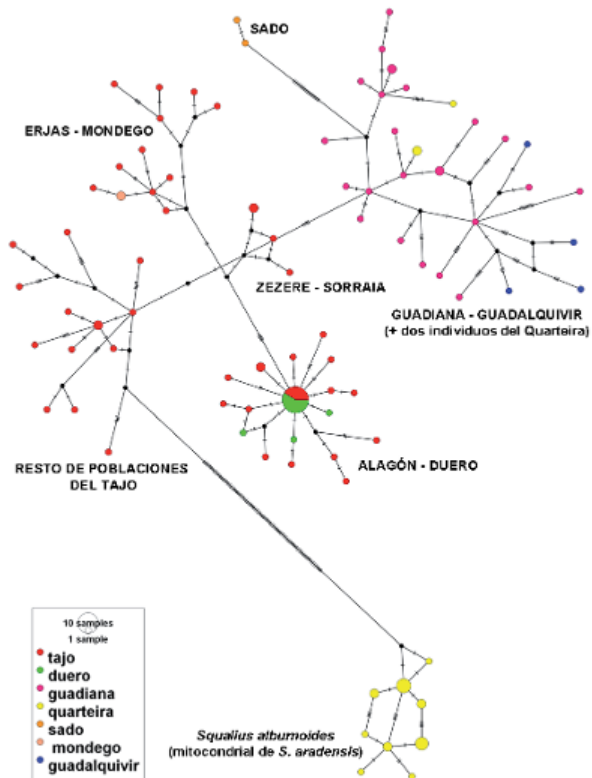
El calandino se distribuye por la mitad suroeste de la península ibérica, habitando en las cuencas del Duero, Mondego, Tajo, Sado, Odiel, Guadiana, Guadalquivir y otras pequeñas cuencas del sur de Portugal [Figura 10]. La especie también se distribuye por las cuencas del Júcar y Guadalhorce, pero estas poblaciones probablemente sean introducidas. Para estimar las áreas de conservación de la especie se ha analizado el gen mitocondrial citocromo b para diversas poblaciones cubriendo la mayor parte de su área de distribución, considerando los ríos que se detallan a continuación. Cuenca del Duero: Adaja, Águeda, Manzanas, Mayas, Pava, Sousa, Turones, Támega y Yeltes. Cuenca del Mondego: Alva y Ceira. Cuenca del Tajo: Acebo, Alburrel, Almonte, Árrago, Aurela, Caparro, Cedena, Cofio, Erjas, Gévalo, Guadarrama, Huso, Jarama, Jerte, Ladrillar, Sever, Sorraia, Tiétar, Trevejana, Serta, Vid y Zêzere. Cuenca del Sado: Odivelas. Cuenca del Guadiana: Albuera, Arronches, Estena, Gévora, Lagunas de Ruidera, Matachel, Quejigares, Sillo, Záncara, Zújar y el propio Guadiana. Cuenca del Guadalquivir: Guadiel, Jándula, Manzano y Montemayor. Cuenca del Quarteira: Quarteira.



Fig. 10. Distribución del calandino (*Squalius alburnoides*) en la península ibérica y localidades de muestreo.

La herencia del ADN mitocondrial en el calandino es clonal e idéntica a la especie materna que hibridó hace más de un millón de años. Por este motivo en los análisis filogeográficos se observan dos grandes linajes evolutivos. Uno de ellos presenta ADN mitocondrial del cacho del Arade [*Squalius aradensis*] y se distribuye por la Rivera de Quarteira en Portugal; el otro gran linaje se corresponde con el que tiene ADN mitocondrial de cacho [*Squalius pyrenaicus*] y cubre el área de distribución entera del calandino en la península ibérica, incluso el río Quarteira. Es decir, en este río portugués se hallan individuos que portan el ADN mitocondrial tanto de *Squalius aradensis* como de *Squalius pyrenaicus*. Dentro de este segundo gran linaje aparecen algunos grupos, o clados, como consecuencia de que *Squalius pyrenaicus* ya tenía una estructura poblacional antes de surgir la hibridación o a mutaciones puntuales acumuladas desde entonces [Figura 11]. Estos clados se corresponderían con las diferentes Unidades de conservación que pueden inferirse para el calandino, ya que no comparten haplotipos mitocondriales entre ellos y por tanto han seguido historias evolutivas diferentes.

Fig. 11. Red de haplotipos mostrando las relaciones evolutivas del calandino [*Squalius alburnoides*] en base al ADN mitocondrial.



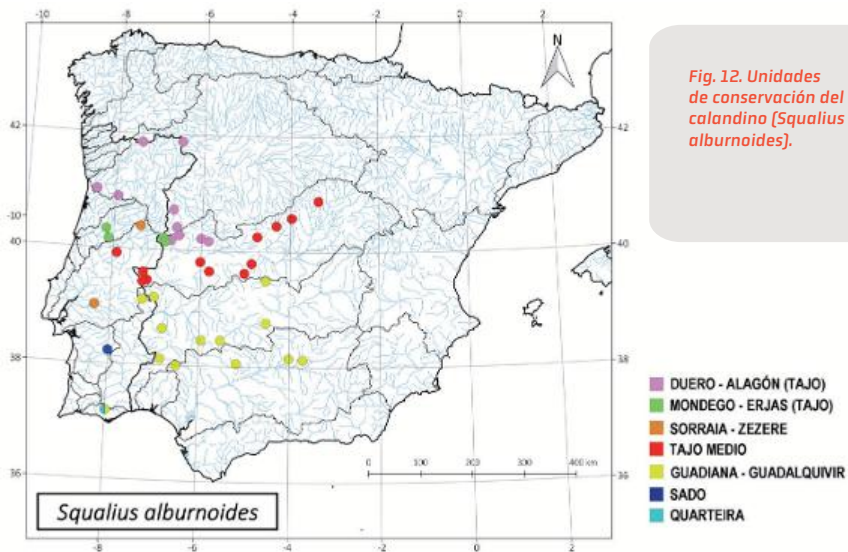
Calandinas



Uno de estos clados mitocondriales es el representado por las poblaciones de la cuenca del Duero y subcuenca del Alagón. En este clado se encuentran todas las poblaciones estudiadas del Duero (Águeda, Manzanas, Mayas, Paiva, Sousa y Támega) y todas las del Alagón (Acebo, Árrago, Caparro y Jerte). Este patrón de relaciones evolutivas entre la subcuenca del Alagón y algunos afluentes de la margen izquierda del Duero se repite para varias especies ibéricas, como es el caso por ejemplo de la bermejuela (*Achondrostoma arcasii*) o la colmilleja del Alagón (*Cobitis vettonica*), y tiene su origen en eventos paleogeográficos muy antiguos que conectaron ambas cuencas hidrográficas. Un segundo clado es el compuesto por todas las poblaciones del Tajo excluyendo a la subcuenca del Alagón y el río Mondego; dentro de este clado se aprecia una estructuración interna concordante con una estructuración geográfica, de forma que las poblaciones del Río Erjas y Trevejana, próximas a la frontera entre España y Portugal, están filogenéticamente emparentadas con las del Río Mondego, los afluentes portugueses del Tajo Zêzere y Sorraia constituyen otro subgrupo genético diferenciado y el resto de pobla-

ciones que se localizan en la cuenca media del Tajo se agrupan en un subgrupo genético diferenciado. Por tanto, este segundo clado incluye las poblaciones de los ríos Alburrel, Almonte, Aurela, Cedena, Cofio, Gévalo, Guadarrama, Huso, Jarama, Serta, Sever, Sorraia, Tiétar, Trevejana, Vid y Zêzere en la cuenca del Tajo y de la cuenca del Mondego incluye sus afluentes Alva y Ceira. Un tercer clado estaría compuesto por las poblaciones de calandino de las cuencas del Guadiana y Guadalquivir y por individuos del río Quarteira con mitocondrial de cacho. Finalmente, la cuenca del Sado representa un clado muy diferenciado, distinguido por un alto número de pasos mutacionales del clado del Guadiana y Guadalquivir.

Estos clados mitocondriales se corresponden con las siete Unidades de conservación que han sido definidas para el calandino (Figura 12). Las poblaciones de la cuenca del Duero pertenecen a la Unidad de conservación del Duero – Alagón. No obstante, hay que entender que la aplicación de programas de conservación que impliquen al calandino, especialmente aquellos relacionados con programas de cría en cautividad, debe llevarse a cabo con sumo cuidado ya que lo importante sería conservar el complejo evolutivo al completo y sus modos de reproducción no son sencillos de entender. Sin embargo, por su facilidad para la reproducción en cautividad es una especie que suele ser un objetivo dentro de los programas de cría *ex situ*. En realidad, es un error su mantenimiento en cautividad para hacer repoblaciones, a pesar de su éxito en cautividad, porque se puede variar el equilibrio de sexos, ploidías y fenotipos.



Calandinas y barbo



En referencia a la diversidad genética del calandino, cabe destacar que la diversidad es mucho menor en la cuenca del Duero que en el resto de poblaciones de la península ibérica, donde se observa una tendencia estable para los dos parámetros de diversidad genética analizados [Figura 13]. Los valores de diversidad genética de la cuenca Quarteira en Portugal son especialmente altos, no obstante, hay que tener en cuenta que estos valores tan elevados están sesgados por la presencia de dos linajes mitocondriales diferentes en esta cuenca, encontrándose individuos con mitocondrial de cacho (*Squalius pyrenaicus*), como ocurre en el resto de cuencas hidrográficas ibéricas, e individuos con mitocondrial de cacho del Arade (*Squalius aradensis*).

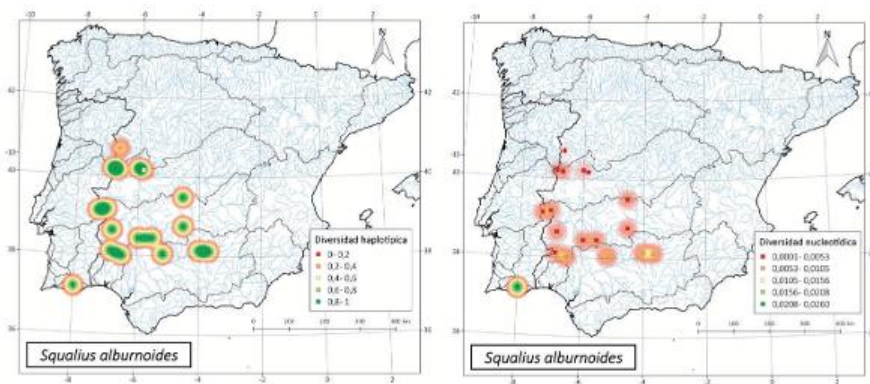
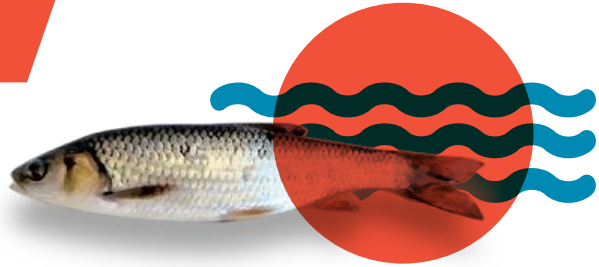


Fig. 13. Diversidad genética del calandino (*Squalius alburnoides*).

Bordallo
Squalius carolitertii
(Doadrio, 1987)



El bordallo es una especie que ha sido ampliamente denominada como *Leuciscus cephalus* cabeda Risso, 1827 hasta que a finales de la década de los ochenta fue descrita como *Leuciscus carolitertii* Doadrio, 1987. Posteriormente pasó a denominarse *Squalius carolitertii* cuando los cuatro subgéneros que constituían el género *Leuciscus* fueron elevados al rango de género. El bordallo es una especie considerada como “Preocupación menor” en la lista roja de la IUCN, sin embargo su estado de conservación en la actualidad se ha deteriorado observándose una tendencia regresiva de sus poblaciones en los últimos años debido principalmente al deterioro de su hábitat a consecuencia de una intensificación de la agricultura y urbanización, a la construcción de infraestructuras y a la introducción de especies exóticas. El bordallo se distribuye principalmente por la cuenca del Duero y algunas cuencas hidrográficas más pequeñas de Galicia (Miño, Limia, Oitavén y Lézé) y de Portugal (Ave, Cávado, Neiva, Pego, Vouga, Mondego y Alcoa). En la cuenca del Tajo la especie está presente en la cabecera del río Alberche probablemente como consecuencia de una captura fluvial (Figura 14).

Bordallo y bermejuelas



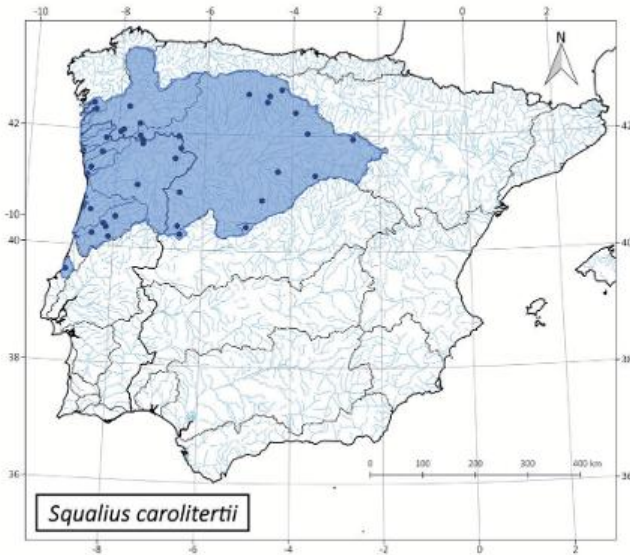


Fig. 14. Área de distribución del bordallo (*Squalius carolitertii*) y localidades de muestreo.

Las relaciones evolutivas del bordallo han sido estudiadas dentro del contexto del género *Squalius*, siendo el bordallo del Gallo (*S. castellanus*) su especie hermana, de manera que estas dos especies constituyen un clado que a su vez está filogenéticamente emparentado con el cacho (*S. pyrenaicus*), el cacho del levante (*S. valentinus*) y el cacho malagueño (*S. malacitanus*). Las distancias genéticas mitocondriales del bordallo respecto a sus especies ibéricas más próximas, el bordallo del Gallo (*S. castellanus*) y el cacho (*S. pyrenaicus*) son de 3,7-4,2 % y 5,7-6,6 % respectivamente, mientras que las distancias más lejanas son las que se dan entre esta especie y las dos especies portuguesas *S. aradensis* y *S. torgalensis*, que se circunscriben en un rango aproximado de 9-11%. Sin embargo, recientes análisis de marcadores nucleares han demostrado que las relaciones evolutivas de las especies ibéricas del género *Squalius* son más complejas de lo que muestra el genoma mitocondrial y que aún son necesarios nuevos estudios a una escala genómica más amplia para responder esta cuestión evolutiva.

Aunque el bordallo no es una especie incluida en el Anexo II de la Directiva Hábitats, se tuvo en consideración en los objetivos del proyecto CIPRIBER, ya que parte de su distribución coincide con el área de interés del proyecto. Por este motivo se analizaron 53 poblaciones pertenecientes a 11 cuencas hidrográficas: Cuenca del Tajo: Alberche y Árrago (uno de los individuos analizados presentó mitocondrial de *S. carolitertii*). Cuenca del Duero: Adaja Águeda, Arlanza, Boedo,

Cea, Cega, Coa, Curueño, Ebrillos, Eresma, Hormazuela, Huebra, Manzanas, Mayas, Onor, Paiva, Riaza, Pirón, Pisuerga, Razón, Sabor, Sousa, Tâmega, Távora, Tera, Torio, Valdavia, Valderaduey y Yeltes. Cuenca del Limia: Limia y Salas. Cuenca del Miño: Arnoia, Bibey, Bubal y Tea. Cuenca del Lézere: Lézere. Cuenca del Verdugo: Oitavén. Cuenca del Cávado: Cávado, Cuenca del Vouga: Águeda, Caima, Sul y Vouga. Cuenca del Mondego: Alva, Ceira, Corvo, Dao, Mondego y Mortagua. Cuenca del Alcoa: Alcoa. Cuenca del Ave: Ave. Cuenca del Minas: Minas. Cuenca del Neiva: Neiva.

El análisis mitocondrial de estas poblaciones reveló la existencia de dos clados bien definidos, uno constituido por las poblaciones de las cuencas del Alcoa y el Mondego y el otro por el resto de poblaciones de Portugal junto con las poblaciones de la cuenca del Duero y las cuencas gallegas (Figura 15). Estos dos clados de *S. carolitertii* están a su vez mitocondrialmente emparentados con la especie *S. castellanus* (endémica de la cuenca del Gallo, afluente de la parte alta del Tajo), cuyo genoma mitocondrial también se ha hallado en el río Ompóveda, en la parte alta de la cuenca del Tajo, y en el río Piedra, un afluente de la margen derecha del río Ebro; y con la población del río Zêzere (afluente de la parte baja de la cuenca del Tajo). En estas tres poblaciones de los ríos Ompóveda, Piedra y Zêzere, además del genoma mitocondrial del bordallo del Gallo y del genoma mitocondrial del río Zêzere, también se hallan de forma simpátrica individuos con el genoma mitocondrial del cacho (*S. pyrenaicus*), probablemente a consecuencia de eventos de hibridación históricos. Considerando cada uno de los clados de *S. carolitertii* de forma independiente no se aprecia una estructura genética significativa, especialmente remarcable en el clado constituido por las poblaciones de la cuenca del Duero, cuencas gallegas y algunas de las cuencas del norte de Portugal.

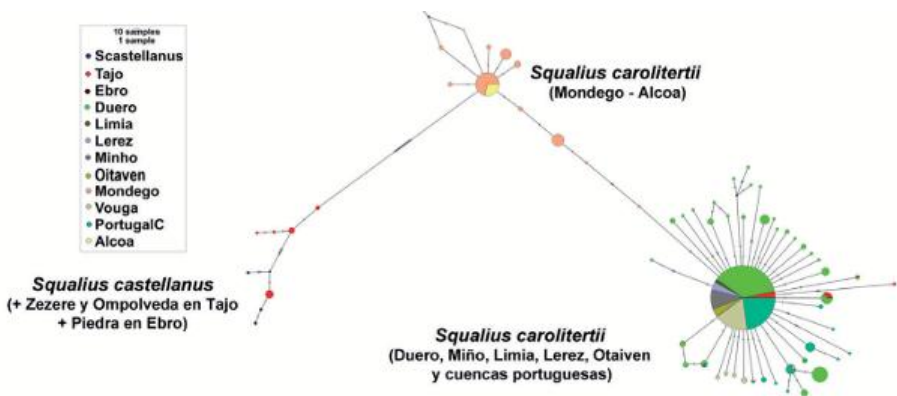


Fig. 15. Red de haplotipos mitocondriales mostrando las relaciones evolutivas del bordallo [*Squalius carolitertii*]. PortugalC hace referencia a las cuencas hidrográficas portuguesas donde se distribuye la especie al norte de la cuenca del Mondego.

Por tanto, para el bordallo se han definido dos Unidades de conservación diferentes, de acuerdo a los dos clados mitocondriales identificados y ante la falta de una clara estructura genética dentro de cada uno de estos clados. Una de estas unidades incluye todas las poblaciones de la cuenca del Duero, las poblaciones de las cuencas gallegas y las poblaciones portuguesas al norte de la cuenca del Mondego. La segunda Unidad de conservación está representada por las poblaciones de las cuencas del Mondego y del Alcoa en Portugal [Figura 16].

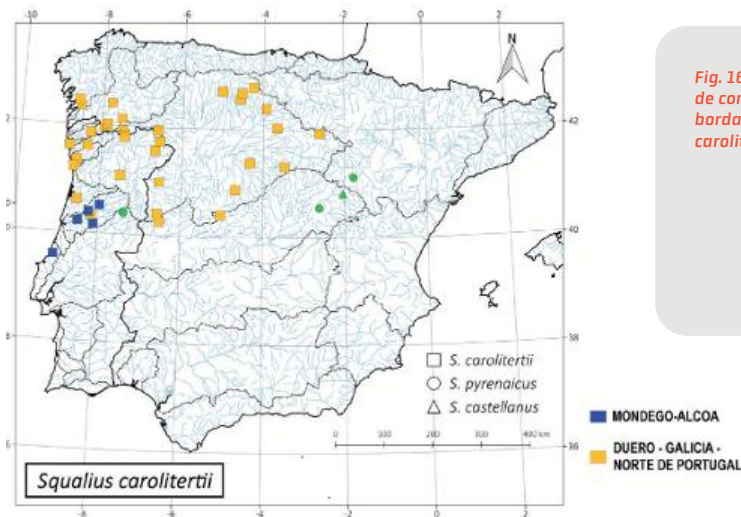


Fig. 16. Unidades de conservación del bordallo (*Squalius carolitertii*).

La diversidad genética inferida fue más alta para la Unidad de conservación del Mondego-Alcoa respecto a la del Duero, Galicia y norte de Portugal. Dentro de la cuenca del Duero, la diversidad genética es generalmente baja, siendo los valores más altos estimados para el río Adaja, mientras que este valor es muy bajo en el río Tera (Figura 17).

Las poblaciones del bordallo no se encuentran tan amenazadas como las del cacho [*S. pyrenaicus*], por lo tanto en este momento no es aconsejable su manejo. Si hubiera que manejarlas se debería respetar las cuencas hidrográficas de procedencia. Dentro del Duero todas las poblaciones tienen un valor de diversidad genética similar, por lo que cualquiera podría actuar como fuente para un programa de cría, teniendo en cuenta además la poca estructura genética que presenta la especie en el Duero.

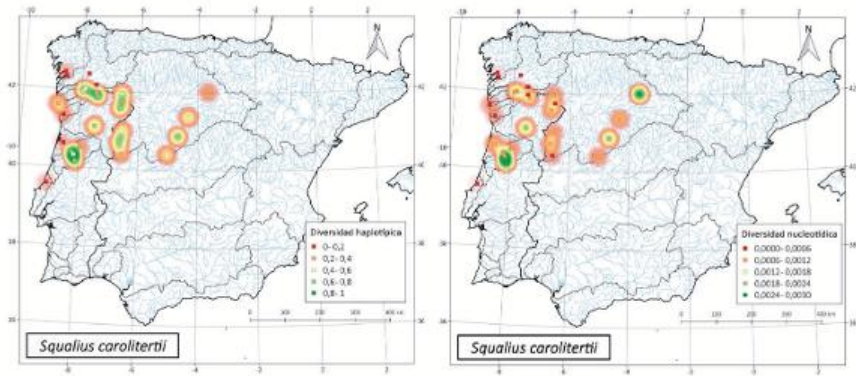
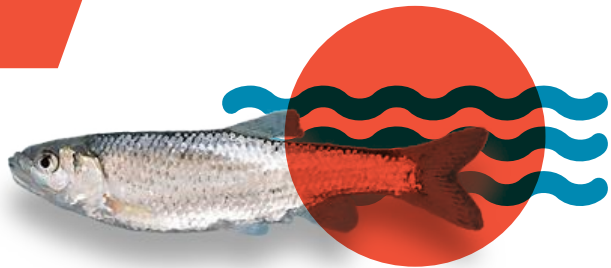


Fig. 17. Diversidad genética del bordallo (*Squalius caroliterti*)

Cacho
Squalius pyrenaicus
[Günther, 1868]



El cacho es una especie que se distribuye por la mitad sur de la península ibérica, habitando en la cuenca del Tajo y pequeñas cuencas portuguesas alrededor de su desembocadura, Sado, Guadiana, Guadalquivir, Guadalete, Odiel, Guadalhorce, Velez, Guadalfeo, Segura y algunos afluentes de la cuenca del Ebro (ríos Piedra, Baias y Jérea) [Figura 18]. El estado de conservación del cacho ha empeorado en los últimos años, con una tendencia regresiva de sus poblaciones a consecuencia del deterioro de su hábitat por el aumento de la agricultura

intensiva, las urbanizaciones, la construcción de presas y la introducción de especies exóticas, de manera que algunas poblaciones en las que la especie era abundante actualmente incluso ha llegado a desaparecer, y en la actualidad solo las poblaciones de las cabeceras de los ríos y de zonas profundas parecen ser estables. El declive es muy acentuado en algunas cuencas hidrográficas, especialmente en la del Guadiana.

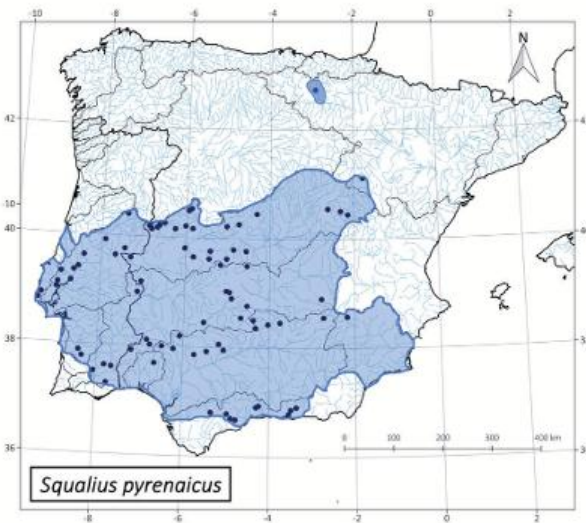


Fig. 18. Área de distribución del cacho (*Squalius pyrenaicus*) y localidades de muestreo.

El área de distribución del cacho no se encuentra en el área de influencia del proyecto CI-PRIBER ni la especie está incluida en el Anexo II de la Directiva Hábitats, pero el cacho se ha tenido en consideración en el proyecto por su relación evolutiva con el bordallo del Duero (*Squalius carolitertii*), de manera que también se han estimado las Unidades de conservación del cacho. De esta forma se han analizado 112 poblaciones de 19 cuencas hidrográficas diferentes abarcando el área de distribución completa de la especie (Figura 18). Las poblaciones estudiadas fueron: Cuenca del Tajo: Acebo, Alagón, Alburrel, Almonda, Almonte, Alviela, Árrago, Aurela, Batuecas, Broncó, Caia, Caparro, Cedena, Cofio, Cuervo, Erjas, Escabas, Grande da pipa, Guadiela, Gualija, Gévalo, Hurdano, Huso, Ibor, Jerte, Maior, Muge, Nabao, Ocreza, Om-pólveda, Ota, Pesquero, Ponxul, Ramacastañas, Rivera de Gata, San Blas, San Martin, Serta, Sever, Tajuña, Tiétar, Trevejana, Vid, Valparaiso y Zézere. Cuenca del Lage: Lage. Cuenca del Jamor: Jamor. Cuenca del Guadiana: Ardila, Azuer, Calaboza, Cigüela, Cobres, Estena, Esteras, Fresneda, Fresnedoso, Gévora, Guadalemar, Guadalmez, Guadarranque, Múrtigas, Odeleite,

Oeiras, Quejigares, Ruecas, Ruidera, Sillo, Siruela, Valdeazogues, Vasco y Zújar. Cuenca del Gilao: Gilao. Cuenca del Almagén: Almagén. Cuenca del Colares: Colares. Cuenca del Guadalquivir: Cabrera, Cabrillas, Cala, Guadalmena, Huéznar, Manzano, Molinos, Montemayor, Montoro, Retortillo, Rivera de Ciudadreja, Rivera de Huelva, Robledillo y Yeguas. Cuenca del Odiel: Corumbel, Odiel y Villar. Cuenca del Guadalhorce: Grande, Pereilas y Turón. Cuenca del Guadalete: Guadalete. Cuenca del Vélez: Cuevas y Sabar. Cuenca del Guadalfeo: Guadalfeo y Trévez. Cuenca del Ebro: Baias, Jerea y Piedra. Cuenca del Segura: Segura. Cuenca del Lizandro: Lizandro. Cuenca del Sado: Campilhas, Odivelas, Sado y San Martinho. Cuenca del Samarra: Samarra, Cuenca del Lis: Lis.

Las relaciones evolutivas del cacho son complejas. Numerosos son los trabajos que han analizado las relaciones mitocondriales de la especie en los últimos quince años, sin embargo, trabajos recientes incluyendo marcadores nucleares han demostrado que las relaciones filogenéticas basadas en el genoma nuclear no coinciden con los resultados obtenidos del análisis del genoma mitocondrial. Así, el cacho está constituido por tres linajes mitocondriales divergentes, pero que constituyen un grupo monofilético (**Figura 19**): un linaje más norteño, incluyendo las poblaciones de la cuenca del Ebro, Tajo y de los pequeños ríos portugueses próximos a su desembocadura (Colares, Jamor, Lage, Lis, Lizandro y Samarra); un linaje que engloba las poblaciones de las cuencas del Guadiana, Gilao, Almagén, Guadalquivir, Guada-

Cachos



lete, Odiel, Guadalhorce, Guadalfeo y Segura; y por último, el tercer linaje mitocondrial está restringido a la cuenca del Sado. Desde el punto de vista nuclear estos tres linajes presentan una relación polifilética a consecuencia de una mayor relación del linaje del norte con el bordallo (*S. carolitertii*), mientras que las poblaciones del sur están filogenéticamente emparentadas con el cacho del levante (*S. valentinus*) y el cacho malagueño (*S. malacitanus*). Por lo tanto, futuros estudios son necesarios para esclarecer la evolución del grupo. Por otro lado, evolutivamente hablando, el cacho forma parte del complejo híbrido del calandino (*Squalius alburnoides*), teniendo en cuenta que el genoma mitocondrial de esta especie procede de una hibridación antigua entre hembras de cacho con una especie de Alburninae extinta. Además, los machos de cacho actúan como donadores de esperma, participando en los complejos modos de reproducción del calandino.

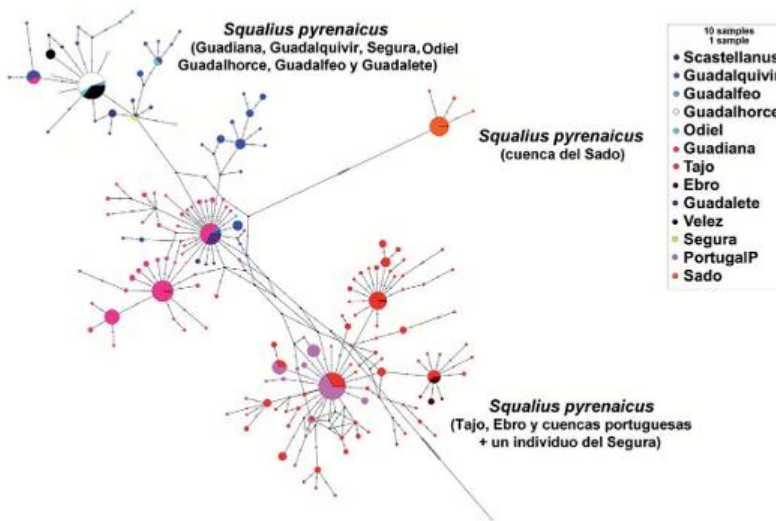


Fig. 19. Rede de haplotipos mitocondriales del cacho (*Squalius pyrenaicus*) y localidades de muestreo. PortugalP hace referencia a las pequeñas cuencas portuguesas próximas a la desembocadura del Tajo [Colares, Jamor, Lage, Lis, Lizandra y Samarra].

Para el establecimiento de las diferentes Unidades de conservación del cacho solamente se ha tenido en cuenta las relaciones evolutivas mitocondriales basadas en el gen citocromo *b*, ya que la filogenia nuclear todavía no está claramente resuelta. Por tanto, los tres linajes mi-

tocondriales divergentes identificados se han considerado como Unidades de conservación distintas, una cuarta Unidad de conservación viene definida por la población del río Zêzere en la cuenca del Tajo, ya que en esta población aparecen dos genomas mitocondriales simpátricos diferentes, el del cacho y otro filogenéticamente emparentado con el del bordallo del Gallo y por tanto, por su particularidad debe considerarse de forma independiente (*Figura 20*). La población del Segura presenta haplotipos mitocondriales en dos de los linajes evolutivos, el del norte y el del sur de la península, probablemente asociado al trasvase Tajo-Segura, sin embargo, nuclearmente se engloba dentro del linaje del sur, y por tanto, esta población se considera como perteneciente a esta Unidad de conservación.

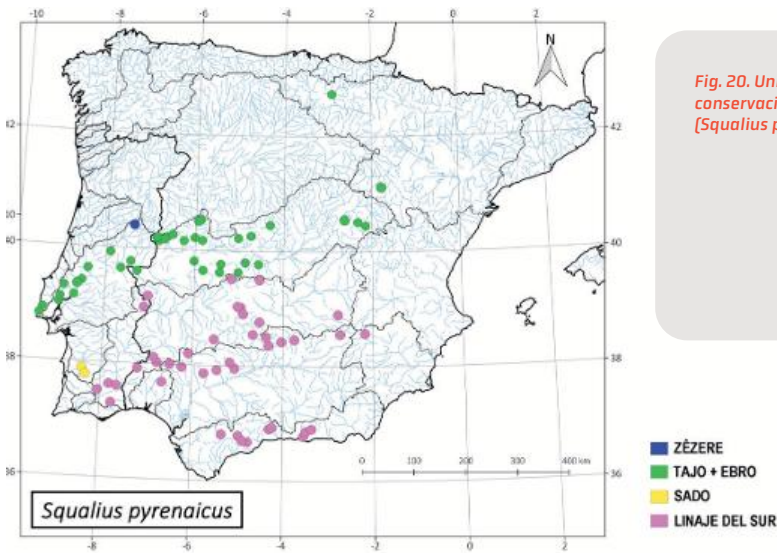


Fig. 20. Unidades de conservación del cacho (Squalius pyrenaicus).

El análisis de la diversidad genética estimada para cada una de estas Unidades de conservación mostró altos valores de diversidad para las poblaciones del Alagón y de la parte baja de la cuenca del Tajo, principalmente en los ríos pequeños próximos a su desembocadura. Igualmente, la región media de la cuenca del Guadiana y el tramo bajo de la cuenca del Guadalquivir, especialmente su afluente el río Cala, también presentaron altos valores de diversidad genética (*Figura 21*). Los valores más bajos de diversidad genética aparecieron en la parte alta de la cuenca del Segura y en las poblaciones del sur de la península.

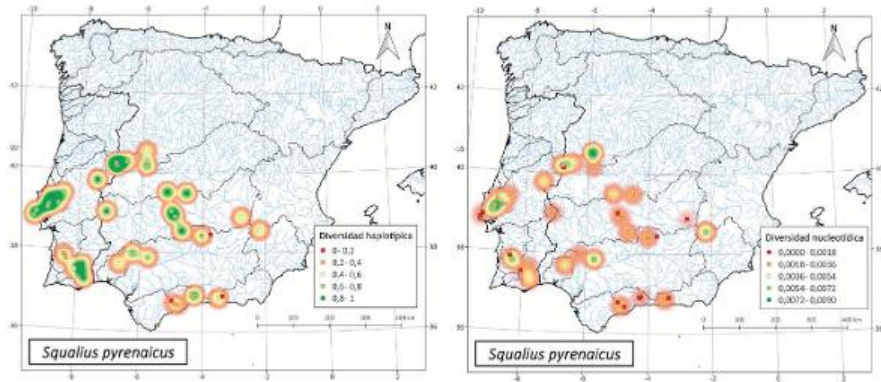


Fig. 21. Diversidad genética del cacho (*Squalius pyrenaicus*).

La cuenca del Alagón, donde la diversidad genética es alta, es una localidad idónea para mantener alguna población destinada a programas de cría en cautividad *ex situ* en caso de ser necesario, sin embargo, la población del Árrago debería descartarse por la presencia de introgresión del Bordallo (*S. carolitertii*) en uno de los ejemplares analizados. El río Jerte o el río Acebo por su alta diversidad y hábitat similares a otras poblaciones de la Sierra de Gata que es donde ha habido una mayor regresión pueden considerarse buenas poblaciones fuente. La subcuenca del Erjas [Erjas, Pesquero y Trevejana] mantienen todavía alta diversidad y buenas poblaciones de *S. pyrenaicus* por lo que no es recomendable su manejo en la actualidad. Este stock debería mantenerse en piscifactorías o charcas próximas a la cuenca del Tajo. Esto impediría que por catástrofes los ejemplares escapasen a cuencas hidrográficas diferentes.

Boga del Duero

Pseudochondrostoma duriense
(Coelho, 1987)



La boga del Duero es un endemismo ibérico que está catalogado en la lista roja de la IUCN como Vulnerable. Sus principales problemas de conservación son la introducción de especies exóticas invasoras y la cantidad de obstáculos que impiden sus migraciones reproductoras. Otros problemas son las canalizaciones, la contaminación por vertidos, la extracción tanto de agua para fines agrícolas como de áridos, lo que provoca la eliminación de los frezaderos. Naturalmente la especie se distribuye a lo largo de las cuencas atlánticas del noroeste de la península ibérica en las cuencas del Vouga, Duero y ríos de Galicia hasta la cuenca del Navia (Figura 22). Es probable que en algunos ríos de Galicia esta especie haya sido introducida por lo que su área de distribución puede que sea más reducida. Asimismo, la boga del Duero está incluida en el anexo II de la Directiva Hábitats con la denominación taxonómica de *Chondrostoma polylepis ssp.* En el año 2006, se publicó un estudio taxonómico en el que el género *Chondrostoma* era dividido en seis géneros diferentes en base a diversos caracteres morfológicos y moleculares; cuatro de estos nuevos géneros son endémicos de la península ibérica (*Achondrostoma*, *Iberochondrostoma*, *Parachondrostoma* y *Pseudochondrostoma*). Las poblaciones de la boga del Duero pertenecen al género *Pseudochondrostoma*, el cual se caracteriza por la presencia de una boca recta con una lámina córnea en el labio inferior entre otros caracteres diagnósticos, de forma que la especie actualmente se denomina *Pseudochondrostoma duriense*. Las especies ibéricas del género *Pseudochondrostoma* evolucionaron de forma independiente en un periodo corto de tiempo durante el Mioceno. Esta especie forma un grupo monofilético con la boga meridional (*Pseudochondrostoma wilkoeffii*) y la boga de río (*Pseudochondrostoma polylepis*).

Dentro del proyecto CIPRIBER se han analizado a través de herramientas moleculares diversas localidades donde se encuentra distribuida la boga del Duero para determinar las diferentes Unidades de conservación en las que puede ser dividida la especie. Para ello se

usó un marcador mitocondrial, un marcador nuclear y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). El estudio se ha basado en analizar 260 individuos pertenecientes a 30 poblaciones diferentes distribuidas a lo largo de nueve cuencas hidrográficas diferentes. Concretamente las poblaciones analizadas fueron: Cuenca del Miño: Azumara, Bubal, Deva, Miño, Sil y Támoga. Cuenca del Ulla: Deza e Iso. Cuenca del Jallas: Jallas. Cuenca del Grande: Grande del Puerto. Cuenca del Tambre: Lengüelle. Cuenca del Umia: Umia. Cuenca del Limia: Limia y Salas. Cuenca del Eo: Eo. Cuenca del Duero: Águeda, Arlanza, Camesa, Curueño, Eresma, Huebra, Manzanas, Odra, Pisuerga, Revinuesa, Tera, Torio, Valdavia y Yeltes, Cuenca del Ouro: Ouro. Además, también se introdujeron en los análisis ejemplares de boga de río [*Pseudochondrostoma polylepis*] para observar las relaciones evolutivas entre estas dos especies.

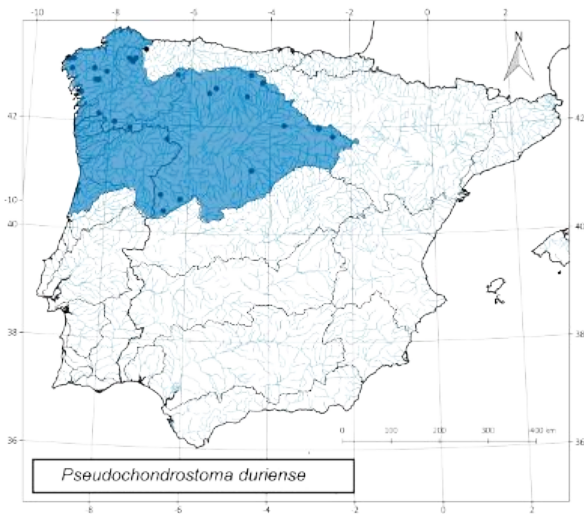


Fig. 22. Distribución de la boga de Duero [*Pseudochondrostoma duriense*] y localidades de muestreo.

Las Unidades de conservación han sido inferidas en base al marcador mitocondrial citocromo *b* (Figura 23) y a los resultados de los SNPs que nos ofrecen una estructuración más detallada, debido a la falta de información estructural en el gen nuclear *RAG1*. Por lo tanto, teniendo en cuenta los marcadores moleculares informativos se han establecido tres Unidades de conservación diferentes (Figura 24). Al primer grupo pertenecen todas las poblaciones analizadas a excepción de dos ríos de la cuenca del Duero, ríos Águeda y Yeltes, los cuales constituyen las otras dos Unidades de conservación establecidas. La poca estructuración de estas poblaciones de la boga del Duero se debe en parte a la gran capacidad de dispersión

Boga del Duero



que posee esta especie dentro de la cuenca. Sólo la población del Yeltes para todos los marcadores analizados y la del Águeda para los SNPs mostraron una diferenciación genética y por ello se consideran como dos Unidades de conservación diferentes.

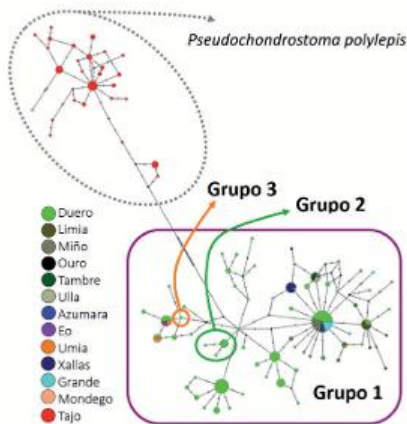
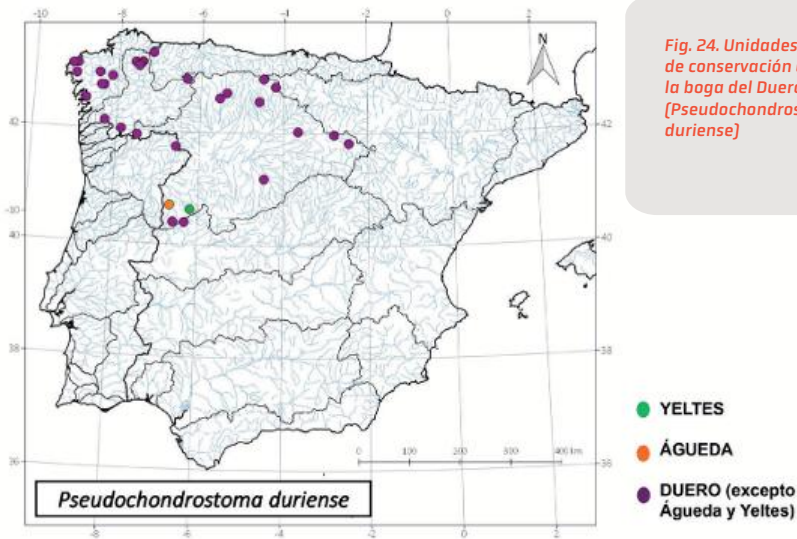


Fig. 23. Red de haplotipos representado las relaciones mitocondriales de la boga del Duero (*Pseudochondrostoma duriense*).



La diversidad genética de esta especie en la cuenca del Duero es en general muy alta (Figura 25). Lo mismo ocurre con sus afluentes, especialmente en las cabeceras de los ríos de la margen derecha, excepto en los ríos Yeltes y Valdavia, con una diversidad genética menor. Estos ríos de la margen izquierda del Duero presentan una menor diversidad debido probablemente a los impactos que estos ríos han sufrido con la introducción de especies invasoras y la alteración de su hábitat, además del gran impacto que ha tenido el efecto de la sequía en algunos de estos ríos. Dentro de las cuencas gallegas, la diversidad genética es muy baja en la cuenca del Tambre, aunque genéticamente los individuos del Tambre son idénticos a los individuos de la cuenca del Miño y del Ulla, y en la del Jallas, cuyos individuos a excepción de uno son genéticamente iguales a los del río Grande del Puerto. En el resto de cuencas gallegas la diversidad genética tiene valores medios o altos de diversidad genética.



Río Duero

Las poblaciones tanto del río Yeltes como las del río Águeda, tienen poblaciones abundantes y de momento no parece que deban manejarse. En el resto de la cuenca del Duero y debido a su descenso poblacional se debería intentar su reproducción *in situ* igual que con la boga de río. Si esto no fuera posible y se quisiera mantener una población en cautividad, a pesar de los problemas que plantea su mantenimiento se podría utilizar como poblaciones fuente los ríos de la margen derecha del Duero reforzando poblaciones situadas en la margen izquierda.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que fuera de la época de reproducción las bogas presentan un comportamiento agonístico por lo que necesitan abundantes refugios y mayor espacio que otros endemismos aquí estudiados, factores que deberían contemplarse en los programas de cría. El control de la variabilidad genética es necesario tal y como se ha indicado para otras especies. Todo ello debe ser seguido de controles sobre la abundancia de la especie en los ríos seleccionados para hacer reforzamiento de las poblaciones y adecuación del hábitat. Para ello en esta especie al igual que en la boga del río los obstáculos como presas, azudes, etc. son una de las causas de su brusco declive. Eliminar estos obstáculos es imprescindible si se quiere recuperar estos endemismos ibéricos, endemismos que durante años y por su abundancia fueron objeto de pesca profesional. Sin embargo, este recurso económico prácticamente ha desaparecido por la disminución de estas especies.

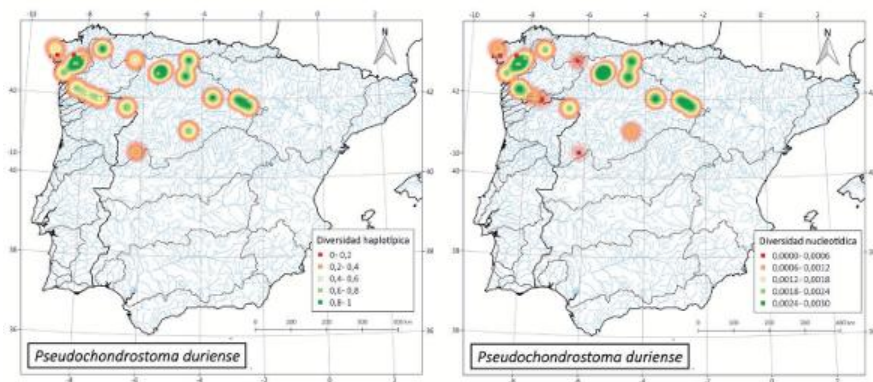


Fig. 25. Diversidad genética de las poblaciones de la boga del Duero.

Boga de río

Pseudochondrostoma polylepis
[Steindachner, 1865]



La boga de río está catalogada en la lista roja de la IUCN como Preocupación Menor. Sin embargo, es recomendable que esta categoría sea actualizada en la próxima revisión de la IUCN. Parece que la categoría más adecuada debiera de ser la de Vulnerable ya que la boga de río está siendo sometida a diversos factores que alteran la viabilidad de la especie. Los dos principales problemas, al igual que con la boga del Duero, son la introducción de especies exóticas invasoras, y la cantidad de obstáculos que impiden las migraciones que esta especie necesita realizar para su reproducción. Además, también le afectan los mismos factores que a la boga del Duero, pero la peor calidad de las aguas de la cuenca del Tajo acentúa la problemática sobre esta especie. Naturalmente la boga de río se distribuye a través de las cuencas el Tajo, Mondego, Alcoa y Sado (**Figura 26**) y se ha observado una tendencia regresiva acentuada en España habiendo desaparecido de muchas de las zonas donde antes sí que estaba presente. Además, esta especie siempre se ha considerado como una de las especies más abundantes del Tajo en el pasado, lo cual acentúa la preocupación por su declive. Asimismo, la boga de río está incluida en el anexo II de la Directiva Hábitats con la denominación antigua taxonómica de *Chondrostoma polylepis* ssp. Tras un estudio taxonómico llevado a cabo en el año 2006 y que dividió al género *Chondrostoma* en seis géneros diferentes, como se ha explicado en la sección dedicada en este libro a la boga del Duero, la boga de río pasó a denominarse *Pseudochondrostoma polylepis*, siendo ésta la especie tipo del género.

Para determinar las Unidades de conservación en las que se puede dividir la boga de río se han analizado 75 individuos pertenecientes a 15 poblaciones diferentes distribuidas a lo largo de la cuenca del Tajo. Analizando como en otras especies un gen mitocondrial (citocromo b), otro nuclear (*RAG1*) y SNPs. Concretamente las poblaciones analizadas fueron: Acebo, Alagón, Almonte, de los Ángeles, Árrago, Caparro, Cuerpo de Hombre, Erjas, Francia, Guadiela, Ibor, Jerte, Salor y Tiétar (**Figura 26**). Además, también se han incluido en los análisis

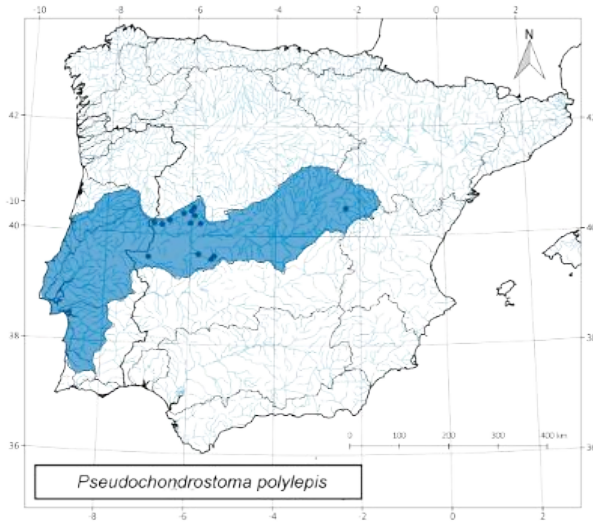


Fig. 26. Distribución de la boga de río (*Pseudochondrostoma polylepis*) y localidades de muestreo.



Boga de río

sis las poblaciones de boga del Duero (*Pseudochondrostoma duriense*), su especie hermana evolutivamente. El gen nuclear y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) no mostraron divergencias significativas entre las poblaciones por lo que las Unidades de conservación fueron basadas en el gen mitocondrial citocromo *b* (Figura 27). Así, se han establecido dos Unidades de conservación diferentes en base a los dos grupos genéticos observados en la red de haplotipos (Figura 28). Al primer grupo pertenecen los ríos Árrago y Francia, ambos tributarios de la subcuenca del Alagón, mientras que el segundo grupo engloba el resto de poblaciones estudiadas (los ríos Acebo, Alagón, Almonte, de los Ángeles, Caparro, Cuerpo de Hombre, Erjas, Guadiela, Hurdano, Ibor, Jerte, Salor y Tiétar).

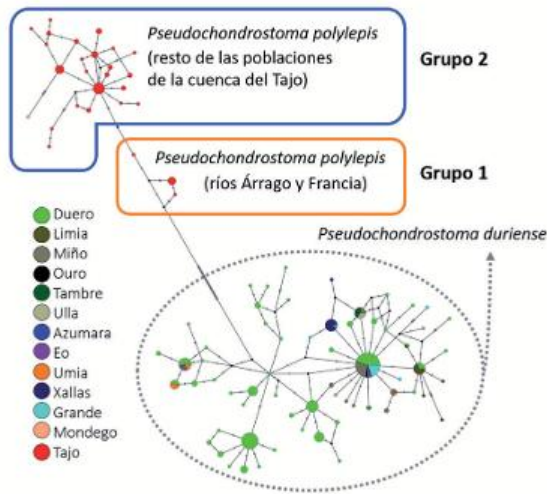


Fig. 27. Red de haplotipos representada las relaciones mitocondriales de la boga de río (*Pseudochondrostoma polylepis*).

La diversidad genética de la boga de río cuando se tuvo en cuenta toda la cuenca del Tajo fue alta (Figura 29), habiendo tres haplotipos más frecuentes y muchos haplotipos poco frecuentes. Por un lado, los mayores valores de diversidad genética se encuentran en los ríos Cuerpo de Hombre y Hurdano, siendo cada uno de los individuos analizados en estos ríos diferentes al resto de individuos de la misma población. Por otro lado, los valores más bajos de diversidad genética se hallan en los ríos Salor y Árrago, teniendo valores bajos de diversidad haplotípica aunque los valores de diversidad nucleotídica para el río Árrago son altos.



Fig. 28. Unidades de conservación de la boga de río (*Pseudochondrostoma polylepis*).

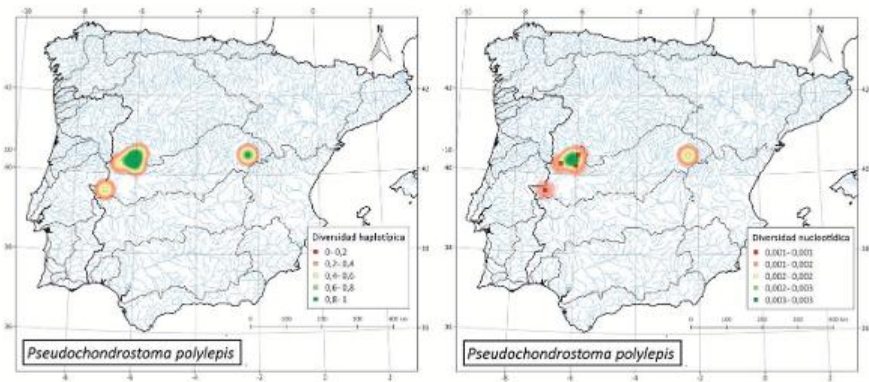
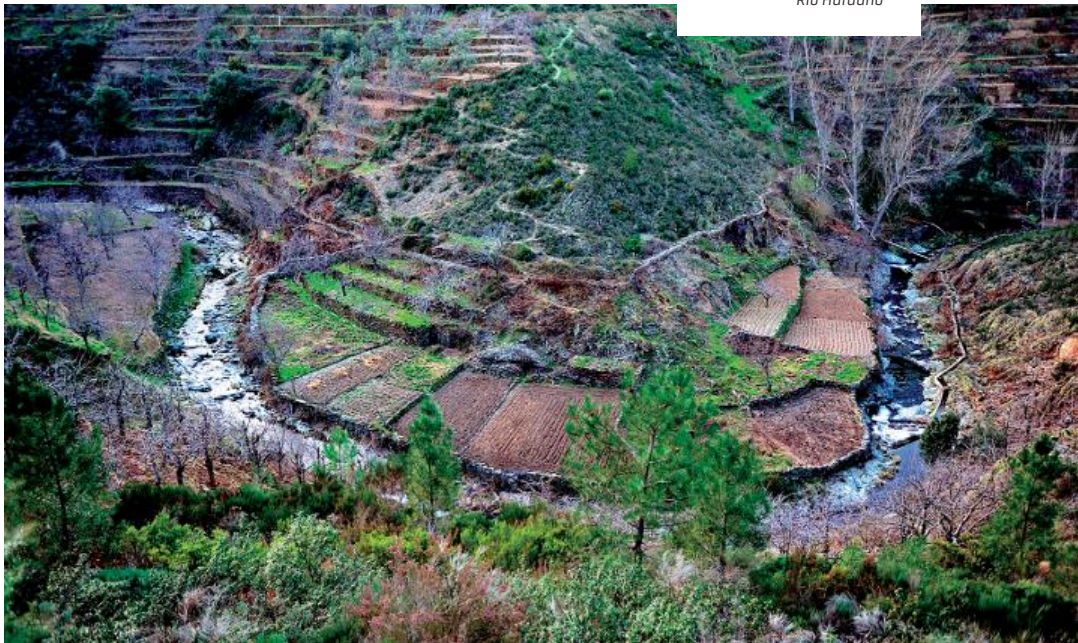


Fig. 29. Diversidad genética de las poblaciones de la boga de río (*Pseudochondrostoma polylepis*).

Como en otras bogas de la península ibérica, su alta capacidad de dispersión dentro de la cuenca del Tago hace que tengan una débil estructura geográfica. Aunque la enorme cantidad de obstáculos en esta cuenca hidrográfica podría cambiar esta tendencia. Las poblaciones de boga han sufrido un enorme declive en los últimos años al ser una especie herbívora especializada y por tanto más susceptible a los cambios de hábitat. Sin embargo, se considera que se conservan poblaciones buenas en las cabeceras de algunos ríos de la cuenca del

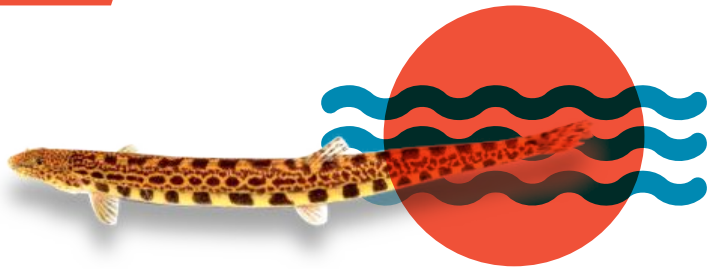
Tajo. Esto queda reflejado en los bajos valores de diversidad tanto haplotípica como nucleotídica (*Figura 29*), que son menores en los afluentes de los tramos medio y bajo de la cuenca, mientras que los valores más altos se encuentran en las poblaciones de ríos de la Sierra de Gata donde se hallan poblaciones bien conservadas y sin excesiva presión de especies invasoras. Asimismo, tanto el Árrago como el Cuerpo de Hombre a pesar de tener un alto número de alelos, tuvieron índices de endogamia muy altos, siendo la del Hurdano la que presenta mayor variabilidad para los SNPs.

Probablemente la población del Hurdano podría ser una buena población fuente para llevar a cabo programas de cría en caso de que sea necesario el mantenimiento en cautividad de alguna población. Sin embargo, se podría como ya se ha explicado para la boga del Duero, hacer reproducción *in situ*. De esta forma se evitaría los problemas que tiene la especie para criar en cautividad. Por tanto, la reproducción *in situ* y el control de su pesca en los ríos de la Sierra de Gata, deben ser medidas más adecuadas para asegurar un buen estado de conservación para la boga de río que mantener una población cautiva para programas de cría y reintroducción.



Río Hurdano

Lamprehuela
Cobitis calderoni
Bacescu, 1962



La lamprehuela es un endemismo de las cuencas del Duero, Ebro y de las cabeceras de dos afluentes de la cuenca del Tajo (ríos Jarama y Lozoya), así como en la cabecera del río Ca-boalles en la cuenca del Miño (Figura 30). Sus poblaciones se encuentran siempre muy localizadas seleccionando un hábitat muy específico, con sustratos de gravas y arenas. En las poblaciones de la cuenca del Tajo la lamprehuela se encuentra en simpatria con la colmilleja (*Cobitis paludica*). Respecto a su estado de conservación, se engloba bajo la categoría de En Peligro de acuerdo a la lista roja de la IUCN debido a la fuerte regresión de sus poblaciones, aunque en algunos ríos como el Tirón (cuenca del Ebro) y Curueño (cuenca del Duero) la especie es localmente abundante. Su hábitat se ha visto enormemente reducido por la disminución del nivel del agua a consecuencia de la intensificación de la agricultura, la construcción de presas y trasvases de unas cuencas a otras y la introducción de especies exóticas depredadoras.

Las relaciones evolutivas de la lamprehuela respecto del resto de especies iberoafricanas han sido analizadas desde el punto de vista mitocondrial y nuclear, a través del uso de alozimas. Tradicionalmente, debido a la ausencia de un dimorfismo sexual marcado, la lamprehuela se ha considerado alejada filogenéticamente del resto de las especies ibéricas (*C. paludica* y *C. vettonica*) y africanas (*C. maroccana*), las cuales constituyen el subgénero *Iberocobitis*. Sin embargo, los estudios moleculares han demostrado que la lamprehuela constituye un grupo monofilético con estas especies, siendo la especie más divergente. La diversificación de las especies iberoafricanas probablemente ocurrió en el Mioceno, coincidiendo con el período de endorreísmo de la península ibérica.

Fig. 30. Área de distribución de la lamprehuela (*Cobitis calderoni*) y localidades de muestreo.



Lamprehuela

Dentro del proyecto CIPRIBER se han estudiado 41 ejemplares de 10 poblaciones pertenecientes a las tres cuencas donde está presente la especie [Tajo, Ebro y Duero] (Figura 30). En el río Revinuesa no ha sido posible localizar ejemplares, siendo la única población de las previstas en el proyecto que no se incluyeron en el estudio a pesar de los esfuerzos de muestreo realizados. Las poblaciones estudiadas han sido: Cuenca del Duero: Arlanzón, Bernesga, Cega, Duratón, Esla, Tera y Voltoya. Cuenca del Miño: Caboalles. Cuenca del Ebro: Tirón. Cuenca del Tajo: Lozoya.

Las relaciones filogenéticas intraespecíficas de la lamprehuela basadas en el gen mitocondrial citocromo *b* no están bien resueltas y solamente se aprecia una pequeña diferenciación que separa por un lado las poblaciones de los afluentes del Duero Bernesga y Esla junto con la población del Caboalles en la cuenca del Sil, y por otro lado se agrupan el resto de poblaciones de la cuenca del Duero con las poblaciones de la cuencas del Ebro y del Tajo (Figura 31), pero con un número bajo de pasos mutacionales entre ellos. Dentro de este segundo grupo genético el haplotipo mitocondrial más frecuente está compartido por las tres cuencas hidrográficas. Estos dos grupos genéticos se han considerado como dos Unidades de conservación diferentes, teniendo en cuenta además que las poblaciones del Bernesga y el Esla no comparten alelos nucleares con el resto de poblaciones del Duero en base al gen nuclear *RAG1* (Figura 32).

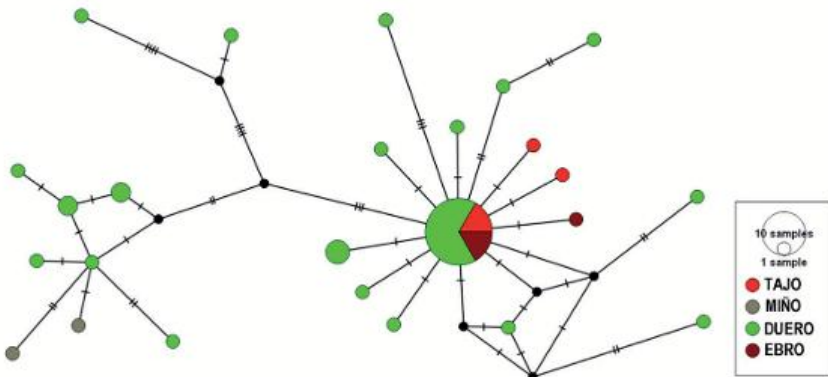


Fig. 31. Red de haplotipos mitocondriales de la lamprehuela (*Cobitis calderoni*).

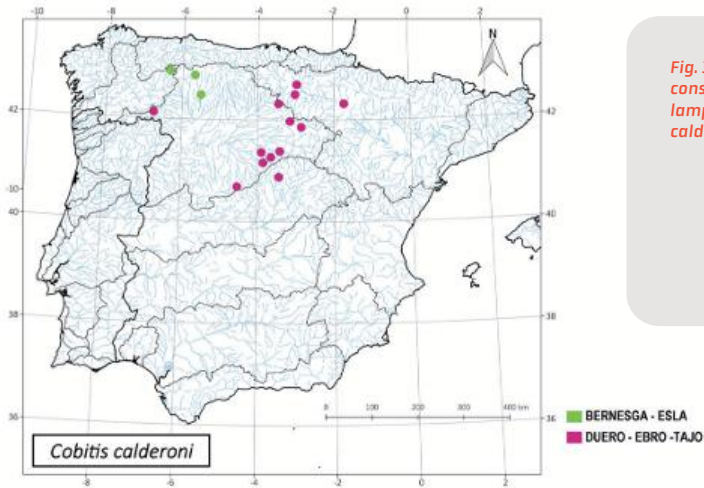


Fig. 32. Unidades de conservación de la lamprehuela (*Cobitis calderoni*)

La mayor diversidad genética para la lamprehuela se ha hallado en la cuenca del Duero, pero hay que tener en cuenta que es donde se ha analizado el mayor número de poblaciones y este resultado puede estar algo sesgado. En los ríos Duratón [Duero] y Tirón [Ebro] la diversidad genética es muy baja, ya que todos los individuos presentan el mismo haplotipo mitocondrial, aunque son dos de las poblaciones localmente más abundantes. Sin embargo en los ríos Bernesga y Esla la diversidad genética es muy alta (Figura 33).

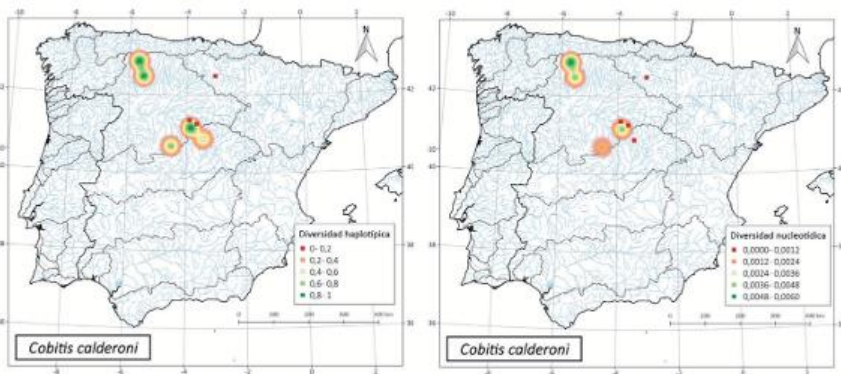
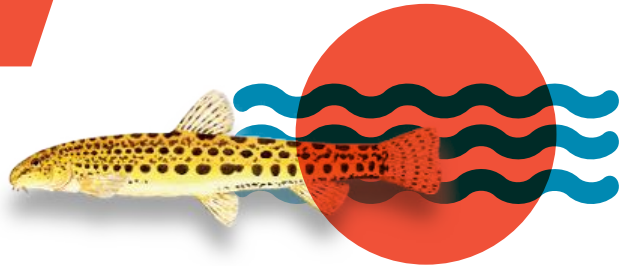


Fig. 33. Diversidad genética de la lamprehuela (*Cobitis calderoni*).

Las poblaciones de lamprehuela son muy difíciles de manejar debido a que no se conocen sus modos de reproducción, además de que generalmente existe una desproporción de sexos a favor de las hembras. Por otro lado, la lamprehuela presenta unas exigencias de hábitat mayores que otras especies de *Cobitis* ibéricas. Por tanto, no se aconseja el manejo de esta especie hasta que no se tenga un mayor conocimiento de su biología.

Colmilleja

Cobitis paludica
[De Buen, 1930]



La colmilleja está catalogada en la lista roja de la IUCN como Vulnerable por su tendencia regresiva. Esta especie ha desaparecido de varias localidades donde antes estaba presente como puede ser en varios ríos de las cuencas del Ebro y del Guadalquivir, siendo la introducción de especies exóticas invasoras una de sus principales amenazas. Por otro lado, otro de los factores que se consideran un factor de amenaza para la colmilleja son la alteración del hábitat y disminución de caudales por las actividades agrícolas. La captura de la especie para su utilización como cebo vivo y las extracciones de áridos que modifican el lecho de los ríos, son también amenazas importantes para la supervivencia de esta especie. La colmilleja además está incluida en el anexo II de la Directiva Hábitats con la antigua denominación taxonómica de *Cobitis taenia*. Las especies ibéricas y norteafricanas pertenecientes al género *Cobitis* [*C. calderoni*, *C. maroccana*, *C. paludica*, y *C. vettonica*] constituyen un grupo monofilético desde el punto de vista evolutivo, diferenciado del resto de poblaciones euroasiáticas del género. Además, las poblaciones de colmilleja exhiben un alto polimorfismo morfológico, al igual que una alta diferenciación genética, por lo que futuros estudios son necesarios para esclarecer la sistemática y la historia evolutiva del grupo.

La colmilleja presenta una amplia distribución en la península ibérica, habitando las cuencas del Ebro, Tajo, Guadiana, Guadalquivir, Guadalete, Odiel, Gualdalhorce, Guadalmedina, Barbate, pequeños ríos próximos al Estrecho de Gibraltar (Jara, Piedras, Valle, Vega), cuencas del levante español (Peñíscola, Júcar, Turia, Mijares, Bullent, Racons, Serpis y Albufera de Valencia), así como en algunos afluentes de la margen izquierda del Duero, y en numerosas cuencas pequeñas portuguesas además de en las grandes compartidas con España. La especie ha sido probablemente introducida en las cuencas del Miño, Ulla, Nalón, lago de Bañolas y cuenca del Segura (Figura 34). Dentro del proyecto CIPRIBER se han analizado a través de herramientas moleculares numerosas localidades de las cuencas del Duero y Tajo, así como de algunas otras cuencas de la península ibérica con el fin de determinar las Unidades de conservación que componen la especie. Para ello se ha hecho uso de un marcador mitocondrial, un marcador nuclear y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). El estudio se ha basado en analizar 265 individuos pertenecientes a 64 poblaciones diferentes distribuidas a lo largo de 22 cuencas hidrográficas. Concretamente las poblaciones analizadas han sido: Cuenca del Duero: Cega, Duratón, Huebra y Yeltes. Cuenca del Guadiana: Aljucén, Azuer, Chanza, Cigüela, Estena, Esteras, Fresnedoso, Gargáligas, Gévora, Guadamez, Guadalmena, Jarero, Lácara, Lanchina, Pedro Moro, Ruecas, Santa María y Usagre. Cuenca del Tajo: Alberche, Almonte, Aurela, Cuervo, Gévalo, Guadarrama, Guajaraz, Jarama, Peralosa, Pusa, Sangreras, Sangusín, Sorbe, Tajuña, Torcón y Valparaíso. Albufera de Valencia: Font del Barret. Cuenca del Júcar: Mariana y Lagunas de Arcas. Cuenca del Guadalquivir: Adamuz, Cabrillas, Cala, Guadiato, Jándula, Majavacas, Robledillo y Laguna del Hondón. Cuenca del Guadalhorce: Grande y Fahala. Cuenca del Valle: Valle. Cuenca del Miño: Caboalles y Tea. Cuenca del Aljibre: Aljibre. Cuenca del Xere: Xere. Cuenca del Boina: Boina. Cuenca del Arade: Arade. Cuenca del Safarujó: Safarujó. Cuenca del Ebro: Ebro. Cuenca del Cávado: Cávado. Cuenca del Mondego: Mondego. Cuenca del Sado: Sado. Cuenca del Sizandro: Sizandro. Cuenca del Quarteira: Quarteira. Cuenca del Lis: Lis. Cuenca del Mira: Mira. Además, se incluyeron en los análisis poblaciones de la colmilleja del Alagón (*Cobitis vettonica*) ya que dentro de *C. paludica* existen grupos más diferenciados entre ellos que con *C. vettonica*.

Las Unidades de conservación para la colmilleja han sido establecidas en base a los haplotipos mitocondriales hallados tras el análisis de un número de poblaciones significativo a lo largo de toda su área de distribución (Figura 35). De esta manera, se pueden observar grupos mitocondriales bien diferenciados. El uso del marcador nuclear y de los SNPs ha permitido profundizar a un mayor detalle de análisis y afinar la resolución en la estructura genética obtenida a partir del análisis mitocondrial. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de todos los marcadores moleculares se han establecido siete Unidades de conservación, estando presente dos de ellas en la cuenca del Duero (Figura 36). El grupo 1 corresponde al río Yeltes el cual fue diferenciado tanto con el marcador mitocondrial como por los SNPs. El grupo 2 constituye la unidad de conservación más ampliamente distribuida a lo largo del área

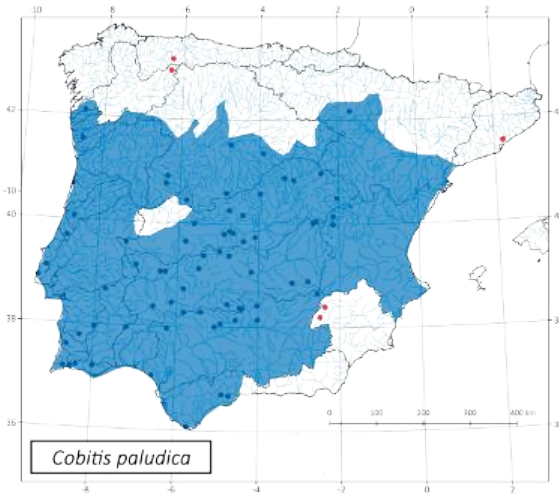


Fig. 34. Distribución de la colmilleja (*Cobitis paludica*) y localidades de muestreo. Los puntos rojos hacen referencia a poblaciones introducidas.

de distribución de la colmilleja y abarca las cuencas del Duero, Tajo, Gadiana, Ebro, Júcar, Guadalquivir, Sado y Arade. Al grupo 3 corresponden las cuencas portuguesas del Odiaxe, Mira, Sado, Lis, Mondego y Cávado y la cuenca gallega del Miño. El grupo cuatro está formado por la cuenca del Valle únicamente. El grupo 5 incluye las cuencas portuguesas del Samarra y Sizandro. El grupo 6 las cuencas del Guadalhorce, Quarteira, la laguna del Acebuche (cuenca del Guadalquivir) y el río Chanza en la cuenca del Gadiana. El grupo 7 agrupa los ríos Guadamez, Esteras y Estena (tres afluentes de la cuenca media del Gadiana), sin embargo, en las poblaciones que definen esta Unidad de conservación también se encuentran individuos pertenecientes al grupo 2. De hecho, los ríos Chanza, así como los ríos Estena, Esteras y Guadamez de la cuenca del Gadiana presentaron individuos de diferentes grupos mitocondriales. El Chanza además de tener individuos con el haplotipo más frecuente de la cuenca del Gadiana también presenta individuos del grupo 6, perteneciente a los ríos del sur de España. En el caso de los ríos Esteras, Estena y Guadamez además de tener el haplotipo más común de la cuenca del Gadiana tuvieron individuos con haplotipos únicos.

El gen nuclear analizado [*RAG1*] aunque no diferenció entre la colmilleja del Alagón (*Cobitis vettanica*) y la colmilleja (*Cobitis paludica*) ha revelado una mayor estructuración de lo esperado dentro de *Cobitis paludica*, con las poblaciones del grupo 4 (cuenca del Valle) y algunas poblaciones del Gadiana medio (ríos Guadamez, Esteras y Estena) diferenciadas del resto de poblaciones, poniendo de manifiesto la posible presencia de diferentes especies dentro de la cuenca del Gadiana y del Valle y que hasta ahora no han sido identificadas morfológi-

camente. Además, con estos análisis también se ha observado la existencia de polimorfismo ancestral compartido entre algunas poblaciones como es el caso del Duratón, afluente de la cuenca del Duero, con la cuenca del Guadalhorce, las cuales a su vez forman un grupo independiente del resto.

Fig. 35. Red de haplotipos representado las relaciones mitocondriales de la colmilleja (*Cobitis paludica*).

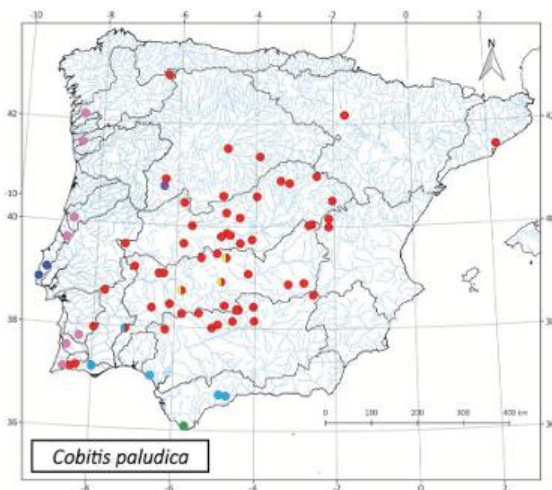
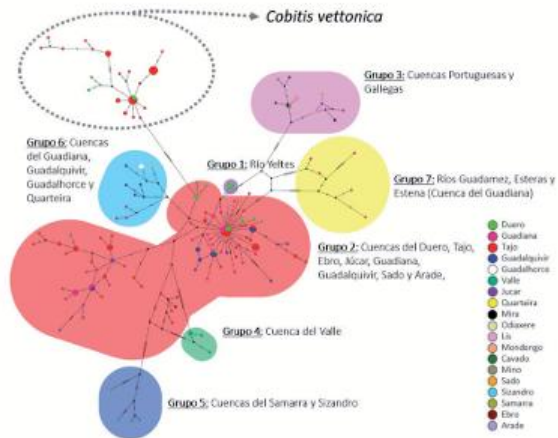


Fig. 36. Unidades de conservación de la colmilleja (*Cobitis paludica*).

Respecto a la diversidad genética de las poblaciones de colmilleja, las poblaciones menos variables fueron el Yeltes (cuenca Duero) y las poblaciones de la cuenca del Guadalhorce [Figura 37]. Esto las podrías hacer más sensibles a los cambios producidos en el ambiente. Por otro lado, las poblaciones más variables desde un punto de vista genético fueron aquellas de los ríos Guadamez (cuenca del Guadiana) y Tajuña (cuenca del Tajo), en los cuales cada uno de los individuos analizados presentó un haplotipo diferente al resto en el marcador mitocondrial.

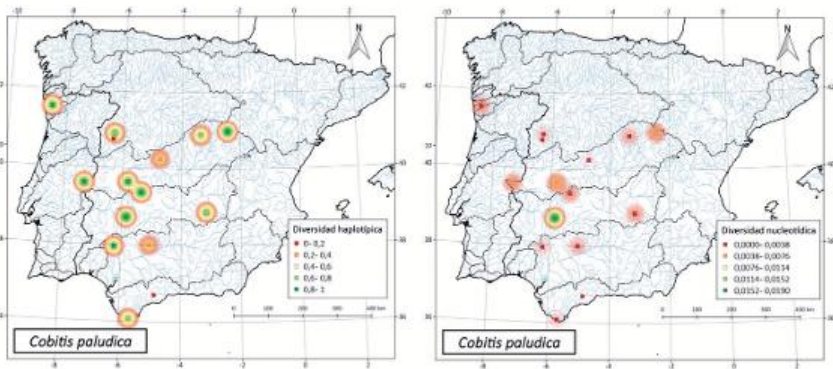
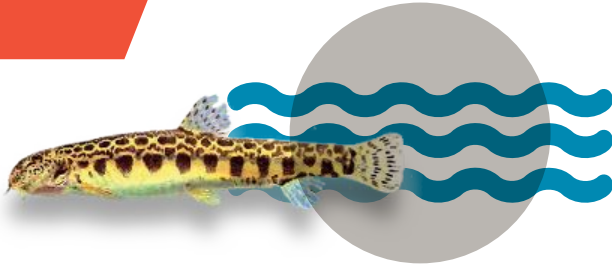


Fig. 37. Diversidad genética de las poblaciones de la colmilleja [*Cobitis paludica*].

Las especies del género *Cobitis* se reproducen con facilidad en cautividad y no necesitan de grandes espacios. En la actualidad sus poblaciones no están muy amenazadas, pero por su singularidad se podría mantener en cautividad una población del Yeltes para posibles futuros programas de cría en caso de ser necesario. De todas formas, de momento no parece necesario reforzar la población natural del río Yeltes, pero se podría mantener en alguna laguna, estanque o balsa de riego cercana al río Yeltes por si se estimara un descenso poblacional y hubiera que reforzar poblaciones.

Colmilleja del Alagón

Cobitis vettonica
Doadrio y Perdices, 1997



La colmilleja del Alagón es un endemismo español incluido en la categoría de En Peligro en la lista roja de la IUCN. Esta especie posee un área de distribución pequeña restringida a las provincias de Salamanca y Cáceres en las subcuencas del Alagón y el Erjas en la cuenca del Tajo y en la subcuenca del Águeda en la cuenca del Duero (**Figura 38**). La colmilleja del Alagón posee una marcada regresión poblacional habiendo desaparecido en algunos ríos, aunque en algunas localidades sea localmente abundante, especialmente en algunos años cuando las condiciones ambientales les son más favorables. Los principales factores que han causado la reducción de las poblaciones han sido la intensificación de la agricultura, con la utilización de pesticidas y fertilizantes, la pérdida de caudal de sus ríos, la presencia de especies exóticas invasoras y su pesca para utilizarla como cebo vivo. Además, esta especie está incluida en el anexo II de la Directiva Hábitats con la antigua denominación taxonómica de *Cobitis taenia*.

La colmilleja del Alagón fue descrita en 1997 después de que estudios morfológicos y genéticos de las poblaciones ibéricas del género *Cobitis* la separaran de la colmilleja (*Cobitis paludica*), ampliamente extendida por el centro y sur de la península. Evolutivamente hablando, la colmilleja del Alagón se encuentra estrechamente relacionada con las especies ibéricas *C. calderoni*, *C. paludica* y con *C. maroccana*, del norte de Marruecos, formando el subgénero *Iberocobitis*. Además, se ha encontrado introgresión genética entre la colmilleja y la colmilleja del Alagón en el río Jerte y probablemente estos fenómenos de introgresión estén más extendidos en la subcuenca del Alagón.

Dentro del proyecto CIPRIBER se han estudiado 64 individuos pertenecientes a 14 poblaciones diferentes, para un gen mitocondrial, un gen nuclear y una batería SNPs con el fin

de inferir las Unidades de conservación que constituyen esta especie. Concretamente las poblaciones analizadas fueron: Cuenca del Tajo: Acebo, Alagón, Árrago, Caparro, Cuerpo de Hombre, Erjas, Francia, Gata, Hurdano, Jerte, Ladrillar y Trevejana. Cuenca del Duero: Águeda y Mayas (Figura 38).



Fig. 38. Distribución de la colmilleja del Alagón (*Cobitis vettonica*) y localidades de muestreo.

Colmilleja de Alagón



La inferencia de las diferentes Unidades de conservación se ha basado en la estructuración encontrada para el marcador mitocondrial citocromo *b* (Figura 39), ya que el marcador nuclear no ha presentado estructura alguna y los resultados de los análisis de los SNPs tampoco. Por lo tanto, se han establecido dos Unidades de conservación, las cuales al contrario de lo que se esperaría no coincidieron con la separación geográfica de la cuenca del Duero y la cuenca del Tajo (Figura 40). Uno de los grupos genéticos está formado por el oriente de la subcuenca del Alagón y sus afluentes [cuenca del Tajo] y por la subcuenca del Águeda [cuenca del Duero] y el segundo grupo está formado por la subcuenca del río Erjas y su afluente Trevejana [cuenca del Tajo].

Fig. 39. Red de haplotipos representado las relaciones mitocondriales de la colmilleja del Alagón [*Cobitis vettonica*].

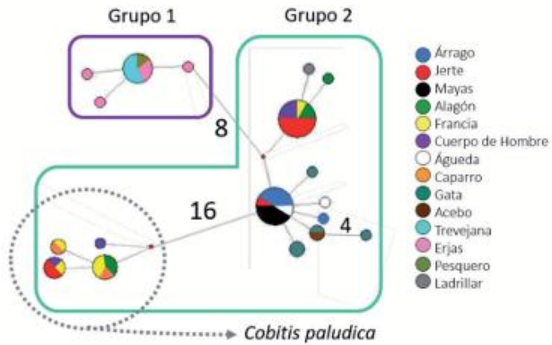


Fig. 40. Unidades de conservación de la colmilleja del Alagón [*Cobitis vettonica*].

La diversidad genética de esta especie es en general muy alta en todas las poblaciones analizadas (Figura 41), sin embargo, estos valores en algunos casos se debieron a la aparición de introgresión genética, es decir el movimiento de genes desde una especie a otra, cuya dirección en este caso es desde la colmilleja [*Cobitis paludica*] a la colmilleja del Alagón [*C. vettonica*]. Así, dentro de la colmilleja del Alagón hay mucha diferencia entre los distintos individuos de una población para un mismo gen. La presencia de esta introgresión fue detectada en los ríos Jerte, Caparro, Francia, Cuerpo de Hombre y el propio Alagón. Esta introgresión genética también ha sido observada en los análisis basados en los SNPs, siendo una población del Árrago [localidad tipo de la especie] y la rivera de Gata las únicas poblaciones no introgresadas. Sin tener en cuenta aquellas localidades donde se había detectado introgresión genética de la colmilleja [*Cobitis paludica*], los valores más altos de diversidad genética se hallan en el río Erjas [cuenca del Tajo], mientras que los valores más bajos fueron para el río Árrago [cuenca del Tajo] y para la subcuenca del Águeda en la cuenca del Duero.

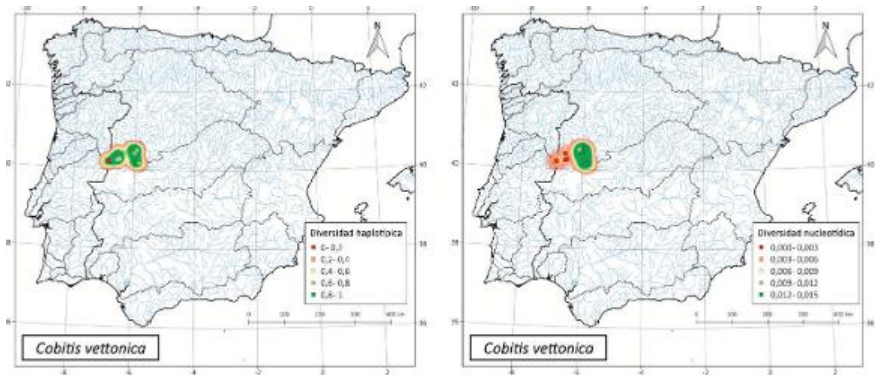
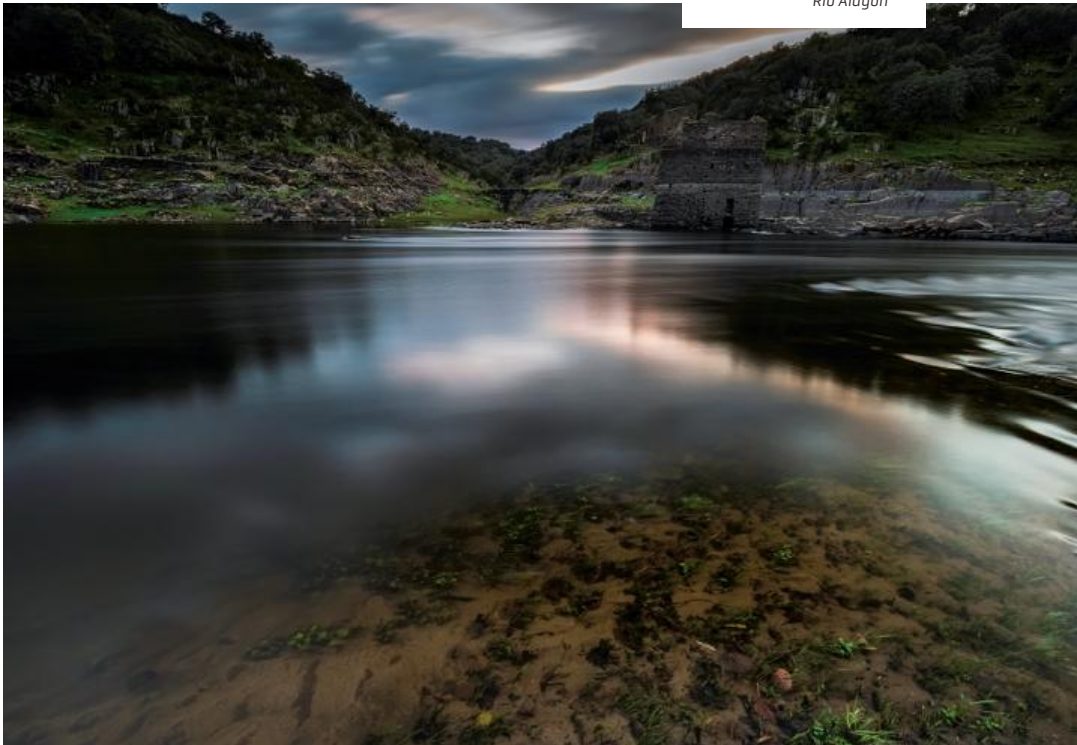


Fig. 41. Diversidad genética de las poblaciones de la colmilleja del Alagón (*Cobitis vettonica*)

Por lo tanto, para el futuro manejo de la especie debe de tenerse en consideración estos dos grupos establecidos y gestionarlos de forma separada. Además, se tiene que tener cuidado a la hora de manejar algunas poblaciones ya que las poblaciones tanto del Águeda [cuenca del Duero] como las del oriente de la Sierra de Gata [cuenca del Tajo] han sufrido un enorme descenso de sus poblaciones y algunas presentan introgresión genética de la colmilleja [*Cobitis paludica*]. Asimismo, se aconseja criar una población de la subcuenca del Alagón para reforzar las poblaciones teniendo extremada precaución en la elección de los individuos

fuente ya que la mayoría de las poblaciones poseen algún grado de introgresión genética de *Cobitis paludica*. Las poblaciones del alto Árrago (Descargamaría) y de la rivera Gata podrían ser las poblaciones fuente ya que gracias a los análisis de los SNPs se ha visto que no poseen introgresión genética. Sin embargo, ambas poblaciones han sufrido un gran descenso poblacional y difícilmente se puede partir de un número elevado de ejemplares. Por tanto, es necesario realizar el control genético de la población fundacional a través de SNPs. Con el stock que se mantenga deben ser reforzadas las poblaciones naturales de los ríos de la Sierra de Gata, excepto aquellos de la subcuenca del Erjas. Estas últimas no deben ser manejadas por pertenecer a otra Unidad de conservación y ser poblaciones todavía abundantes. Lo mismo ocurre con la población del Jerte que mantiene una población muy abundante que no debe ser manejada.

Río Alagón





Bibliografía





- Almada VC, Sousa-Santos C. 2010. Comparisons of the genetic structure of *Squalius* populations [Teleostei, Cyprinidae] from rivers with contrasting histories, drainage areas and climatic conditions based on two molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2): 924–931.
- Alves MJ, Coelho MM, Collares-Pereira MJ. 1997a. The *Rutilus alburnoides* complex [Cyprinidae]: Evidence for hybrid origin. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 35: 1–10.
- Alves MJ, Coelho MM, Collares-Pereira MJ. 1998. Diversity in the reproductive modes of females of the *Rutilus alburnoides* complex [Teleostei, Cyprinidae]: a way to avoid the genetic constraints of uniparentalism. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1233–1242.
- Alves MJ, Coelho MM, Collares-Pereira MJ. 2001. Evolution in action through hybridization and polyploidy in an Iberian fresh water fish: a genetic review. *Genetica*, 111: 375–385.
- Alves MJ, Coelho MM, Collares-Pereira MJ, Dowling TE. 1997b. Maternal ancestry of *Rutilus alburnoides* complex [Teleostei, Cyprinidae] as determined by analysis of cytochrome b sequences. *Evolution*, 51: 1584–1592.
- Alves MJ, Gromicho M, Collares-Pereira MJ, Crespo-López E, Coelho MM. 2004. Simultaneous production of triploid and haploid eggs by triploid *Squalius alburnoides* [Teleostei, Cyprinidae]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301A(7): 552–558.
- Avise JC. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Avise JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36(1): 3–15.
- Avise JC, Arnold J, Martin Ball R, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987. Intraspecific Phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489–522.
- Ballard JWO, Rand DM. 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 36: 621–642.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37–48.
- Brito P, Edwards SV. 2009. Multilocus Phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135: 439–455.
- Carmona JA, Olivero J, Doadrio I, Real R, Marquez AL, Vargas JM. 2000. Testing for inter-drainage connections on the basis of the distribution pattern of endemic freshwater fishes. *Archiv für Hydrobiologie*, 150(1): 101–116.
- Carmona JA, Sanjur OI, Doadrio I, Machordom A, Vrijenhoek RC. 1997b. Hybridogenetic reproduction and maternal ancestry of polyploid Iberian fish: The *Tropidophoxinellus alburnoides* complex. *Genetics*, 146: 983–993.
- Casal-López M, Doadrio I. 2018. The Messinian imprint on the evolution of freshwater fishes of the genus *Luciobarbus* Heckel, 1843 [Teleostei, Cyprinidae] in the western Mediterranean. *Journal of Biogeography*, 1593–1603.
- Carstens BC, Morales AE, Jackson ND, O’Meara. 2017. Objective choice of phylogeographic models. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 116: 136–140.
- Casas-Sainz AM, De Vicente G. 2009. On the tectonic origin of Iberian topography. *Tectonophysics*, 474: 214–235.



- Chen W-J, Miya M, Saitoh K, Mayden RL. 2008. Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing Tree of Life of ray-finned fishes: The order Cypriniformes (Ostariophysi) as a case study. *Gene*, 423(2): 125-134.
- Crespo-López ME, Duarte T, Dowling TE, Coelho MM. 2007. Modes of reproduction of the hybridogenetic fish *Squalius alburnoides* in the Tejo and Guadiana rivers: An approach with micro-satellites. *Zoology*, 109(14): 277-286.
- Cunha C, Bastir M, Coelho MM, Doadrio I. 2008. Body shape evolution among ploidy levels of the *Squalius alburnoides* hybrid complex (Teleostei, Cyprinidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 22(4):718-28
- Cunha C, Coelho MM, Carmona JA, Doadrio I. 2004. Phylogeographical insights into the origin of the *Squalius alburnoides* complex via multiple hybridization events. *Molecular Ecology*, 13: 2807- 2817.
- Cunha C, Doadrio I, Abrante J, Coelho MM. 2011. The evolutionary history of the allopolyploid *Squalius alburnoides* (Cyprinidae) complex in the northern Iberian Peninsula. *Heredity*, 106(1): 100-112.
- Díez-Herrero A, 2001. Geomorfología e hidrología fluvial del río Alberche, modelos y S.I.G. para la gestión de riberas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Doadrio, I. 1987. *Leuciscus carolitertii* n. sp. from the Iberian Peninsula (Ostariophysi Cyprinidae). *Senckenbergiana Biologica*, 68(4/6): 301-309.
- 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(2-3): 457-473.
- Doadrio I, Carmona JA. 2004. Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Chondrostoma* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 802-815.
- Doadrio I, Carmona JA. 2006. Phylogenetic overview of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in the Iberian Peninsula, with description of two new species. *Cybium*, 30(3): 199-214.
- Doadrio I, Elvira B. 2007. A new species of the genus *Achondrostoma* Robalo, Almada, Levy & Doadrio, 2007 (Actinopterygii, Cyprinidae) from western Spain. *Graellsia*, 63(2): 295-304.
- Doadrio I, Perdices A. 1997. Taxonomic study of Iberian *Cobitis* (Osteichthyes, Cobitidae), with description of a new species. *Zoological Journal of Linnean Society*, 119(1): 51-67
- Doadrio I, Perdices A. 2005. Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (*Cobitis*, Cobitidae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(2): 484-493.
- Doadrio I, Perea S, Garzón-Heydt P, González JL. 2011. Ictiofauna Continental Española. Bases para su seguimiento. DG Medio Natural y Política Forestal. MARM. Madrid.
- Edwards SV, Shultz AJ, Campbell-Staton C. 2015. Next-generation sequencing and the expanding domain of Phylogeography. *Folia Zoologica*, 64(3): 187-206.



- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME.** 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113: 351–365
- Gante HF, Micael J, Oliva-Paterna FJ, Doadrio I, Dowling TE, Alves MJ.** 2009. Diversification within glacial refugia: tempo and mode of evolution of the polytypic fish *Barbus sclateri*. *Molecular Ecology*, 3240–3255.
- González EG, Cunha C, Ghanavi HR, Oliva-Paterna FJ, Torralva M, Doadrio I.** 2016. Phylogeography and Population Genetic Analyses in the Iberian Toothcarp (*Aphanius iberus* Valenciennes, 1846) at Different Time Scales. *Journal of Heredity*, 109(3): 253–263.
- Hare MP.** 2001. Prospects for nuclear gene Phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(12): 700–706.
- Hewitt GM.** 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405: 907–913.
- Hewitt GM.** 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 359: 183–195.
- Hughes PD, Woodward JC.** 2017. Quaternary glaciation in the Mediterranean mountains: a new synthesis. *Geological Society of London. Special Publications*, 433: 1–23.
- Leigh JW, Bryant D.** 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110–1116.
- Loget N, Van Den Driessche J.** 2006. On the origin of the Strait of Gibraltar. *Sedimentary Geology*, 188–189: 341–356.
- Machordom A, Doadrio I.** 2001. Evidence of a Cenozoic Betic–Kabilian connection based on freshwater fish Phylogeography [*Luciobarbus*, Cyprinidae]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2): 252–263.
- Mateus CS, Almeida PR, Quintella BR, Alves MJ.** 2011. MtDNA markers reveal the existence of allopatric evolutionary lineages in the threatened lampreys *Lamprolaima fluviatilis* (L.) and *Lamprolaima planeri* (Bloch) in the Iberian glacial refugium. *Conservation Genetics*, 12(4): 1061–1074.
- Matos I, Machado MP, Schartl M, Coelho MM.** 2019. Allele-specific expression variation at different ploidy levels in *Squalius alburnoides*. *Scientific Reports*, 9:3688.
- Perdices A, Doadrio I.** 2000. Diversification patterns in *Cobitis calderoni* (Osteichthyes, Cobitidae) and relationships with some *Cobitis* lineages. *Folia Zoologica*, 49(Suppl.1): 45–54.
- Perdices A, Doadrio I.** 2005. Phylogenetic relationships among the Ibero–African cobitids (Cobitis, Cobitidae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 484–493.
- Perdices A, Machordom A, Doadrio I.** 1995. Allozyme variation of African and Iberian populations of the genus *Cobitis*. *Journal of Fish Biology*, 47(4): 707–718.
- Perea S, Böhme M, Zupancic P, Freyhof J, Sanda R, Özulug M, Abdoli A.** 2010. Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in the circum-mediterranean subfamily *Leuciscinae* (Actinopterygii, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear markers. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 265.
- Perea S, Cobo-Simón M, Doadrio I.** 2016. Cenozoic tectonic and climatic events in southern Iberian Peninsula: implications for the evolutionary history of freshwater fish of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*: 155–169.



- Perea S, Doadrio I. 2015. Phylogeography, historical demography and habitat suitability modelling of freshwater fishes inhabiting seasonally fluctuating Mediterranean river systems: a case study using the Iberian cyprinid *Squalius valentinus*. *Molecular Ecology*, 24[14]: 3706–3722.
- Perea S, Garzón P, González JL, Almada VC, Pereira AM, Doadrio I. 2011. New distribution data on Spanish autochthonous species of freshwater fish. *Graellsia*, 67: 91–102
- Provan J, Bennett KD. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology and Evolution*, 23[10]: 564–571.
- Robalo JI, Almada VC, Levy A, Doadrio I. 2006a. Re-examination and phylogeny of the genus *Chondrostoma* based on mitochondrial and nuclear data and the definition of 5 new genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42[2]: 362–372.
- Robalo JI, Almada VC, Sousa-Santos C, Moreira MI, Doadrio I. 2005a. New species of the genus *Chondrostoma* Agassiz, 1832 (*Actinopterygii*, *Cyprinidae*) from western Portugal. *Graellsia*, 61[1]: 19–29.
- Robalo JI, Doadrio I, Almada VC, Kottelat M. 2005b. *Chondrostoma oligolepis*, new replacement name for *Leuciscus macrolepidotus* Steindachner, 1866 (Teleostei, Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Fresh Waters*, 16[1]: 47–48.
- Robalo JI, Sousa-Santos C, Levy A, Almada VC. 2006b. Molecular insights on the taxonomic position of the paternal ancestor of the *Squalius alburnoides* hybridogenetic complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 276–281.
- Sanz N, García-Marín JL, Pla C. 2000. Divergence of brown trout (*Salmo trutta*) within glacial refugia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57[11]: 2201–2210.
- 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. *Journal of Fish Biology*, 68[SB]: 292–301.
- Teacher AGF, Griffiths DJ. 2011. HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Molecular Ecology Resources*, 11[1]: 151–153
- Templeton AR. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381–397.
- Verdiell-Cubero, D., Oliva-Paterna, F. J. Ruiz-Navarro, A, Torralva, M., [2012]. The first occurrence of *Cobitis paludica* (de Buen, 1930) in the Segura River Basin (SE Iberian Peninsula). *Limnetica*, 31 [2]: 323–326.
- Vrijenhoek RC. 1998. Clonal organisms and the benefits of sex. In: Carvalho GR [ed.]. *Molecular Ecology*, IOS Press. Amsterdam. pp: 151–172.
- Zardoya R, Doadrio I. 1998. Molecular evidence of the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution*, 49[2]: 227–237.



