



**MEMORIA DE ACTIVIDADES. 2008.
ANÁLISIS GENÉTICO DE POBLACIONES
DE TRUCHA COMÚN (*Salmo trutta*) EN LA
COMUNIDAD VALENCIANA.**

**DEPARTAMENTO DE XENÉTICA
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTADE DE VETERINARIA, CAMPUS DE LUGO**

Investigadora responsable:

Carmen Bouza Fernández

Investigadores colaboradores:

Manuel Vera Rodríguez
Almudena López Martínez
Román Vilas Peteiro
Jaime Castro Alberto
Paulino Martínez Portela

Técnicos de laboratorio:

María López Villar

AGRADECIMIENTOS: A todo el personal de la Consellería de Medioambiente, Agua, U. y V. de la Generalitat Valenciana implicado en la coordinación, el muestreo, toma de datos e informaciones muestrales utilizadas en el presente análisis genético. A la Delegación de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León por suministrar al grupo Acuigen de la Universidad de Santiago el stock HBU que se ha utilizado en este estudio como referencia de origen centroeuropeo puro. A todo el personal de Acuigen de la Universidad de Santiago por el apoyo y soporte técnico al trabajo realizado.

ÍNDICE:

I. Introducción.....	pág. 4
II. Justificación y objetivos.....	pág. 9
III. Material y métodos.....	pág. 10
IV. Resultados y discusión	pág. 16
V. Gestión y conservación de recursos genéticos de trucha común en la Comunidad Valenciana.....	pág. 26
VI. Bibliografía.....	pág. 30
VII. Figuras.....	pág. 35
VII. Tablas.....	pág. 44
VII. Apéndices	pág. 51

I. INTRODUCCIÓN: ESTRUCTURA GENÉTICA Y CONSERVACIÓN DE TRUCHA COMÚN

I.1. Estructura genética de la trucha común (*Salmo trutta* L.)

La trucha común se distribuye a lo largo de todo el continente Europeo, desde el Mar Blanco hasta las costas de Islandia en el Norte, y desde la Península Ibérica y costa del Norte de África, a lo largo del Mediterráneo, hasta los mares Negro, Aral y Caspio, en el Sur. La excelente adaptabilidad de esta especie ha determinado que desde finales del siglo pasado hasta mediados del siglo XX, la trucha común haya sido introducida en más de 24 países distintos, estando presente en la actualidad en todos los continentes exceptuando la Antártida (McCrimmon, 1968; Elliot, 1989).

Junto con *Oncorhynchus clarkii*, la trucha común es la especie que presenta mayor estructuración poblacional entre los salmónidos, e incluso entre los vertebrados (Krieg y Guyomard, 1985). La diferenciación genética entre poblaciones a nivel microgeográfico es considerable, detectándose un componente de diferenciación entre poblaciones en torno al 30%. Es decir de la diversidad genética total observada, el 30% se debe a divergencia genética entre poblaciones (Ryman, 1983; Crozier y Ferguson, 1986; Hansen *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 1993; Bouza *et al.*, 1999; 2001). Las causas fundamentales de esta microdiferenciación tienen que ver con la fidelidad en el retorno a los lugares de freza (*homing behaviour*), con la notable fragmentación del hábitat en que vive esta especie y con los efectos del avance y retroceso de los hielos a lo largo del Pleistoceno (Hewitt, 1996; Willis y Whittaker, 2000).

A escala macrogeográfica la divergencia genética es también considerable, con un nivel global de estructuración superior al 70% (Ferguson, 1989; Bernatchez *et al.*, 1992; Giuffra *et al.*, 1994; Bernatchez y Osinov, 1995; García-Marín y Plá, 1996; Laikre *et al.*, 1999; Bernatchez, 2001; Presa *et al.*, 2002). Se reconoce la existencia de al menos cinco linajes matriarcales genéticamente diferenciados a partir de estudios genético-moleculares a lo largo del continente Europeo: Linajes Atlántico (AT), Mediterráneo (ME), Danubiano (DA), Marmoratus (MA) y Adriático (AD) (Bernatchez *et al.*, 1992; Bernatchez 2001). Los trabajos iniciales en la región Atlántica sugerían una gran homogeneidad genética proponiéndose la existencia de un único linaje principal AT (Bernatchez *et al.*, 1992). Estudios más recientes han demostrado, sin embargo, la existencia de una mayor complejidad en esta zona, especialmente en relación con la Península Ibérica donde se han localizado los principales refugios glaciares durante el

Cuaternario (Hewitt, 1996; Willis y Whittaker, 2000). Según éstos, existirían al menos tres grandes regiones en el Atlántico definidas por el límite de la forma anádroma por debajo del paralelo 42°N y por la Bretaña Francesa (Atlántico Norte, Cantábrico y Atlántico Sur; Bernatchez, 2001; Presa *et al.*, 2002). Sin embargo, la región SurAtlántica ha evidenciado una enorme heterogeneidad existiendo diferentes linajes coexistiendo en alo y parapatría (Bouza *et al.*, 1999, 2001, 2008; Machordom *et al.*, 2000; Sanz *et al.* 2000; Weiss *et al.*, 2000; Presa *et al.* 2002; Martínez *et al.*, 2007). Estudios recientes basados en ADN mitocondrial y microsatélites han revelado la existencia de un nuevo linaje atlántico de trucha común en la Península Ibérica, confinado esencialmente al curso alto de la cuenca del Duero y del Miño, siendo una de las aportaciones más novedosas de los últimos años en filogeografía de esta especie (Machordom *et al.*, 2000; Bouza *et al.*, 2001; 2008; Suárez *et al.*, 2001; Cortey y García-Marín, 2002; Martínez *et al.*, 2007).

Una parte importante de esta diferenciación genética de la especie se localiza en el área de distribución Mediterránea, donde la ausencia de la forma anádroma determina el aislamiento de las cuencas, y consecuentemente su divergencia debido a procesos de deriva y adaptación a las condiciones peculiares medioambientales de cada cuenca. Los cambios climáticos y modificaciones del hábitat consecuencia de las glaciaciones durante el Pleistoceno, han resultado en procesos de migración y recolonización, que han contribuido a dibujar la compleja estructuración genética de esta especie en la actualidad (García-Marín y Plá, 1996; Apostolidis *et al.*, 1997; García-Marín *et al.*, 1999; Machordom *et al.*, 2000; Bernatchez, 2001; Aurelle *et al.*, 2002; Cortey y García-Marín, 2002). Los datos en la vertiente Mediterránea apuntan a una subdivisión genética regional con presencia de linajes MED y AD, a modo de mosaico en las distintas cuencas analizadas (Sanz *et al.*, 2002; Cortey *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2006).

La aplicación de diferentes tipos de marcadores genéticos, incluyendo los de linajes mitocondriales matriarcales a los resolutivos microsatélites para análisis microgeográfico, debería permitir una definición mucho más precisa de las diferentes subregiones genéticas de la trucha común a nivel micro y macrogeográfico, información indispensable para identificar las unidades operativas de conservación (OCUs, “Operational Conservation Units”, Dodson *et al.*, 1998; Palsboll *et al.*, 2006).

1.2. Gestión y conservación de recursos en la trucha común

El conocimiento de la estructura genética de la trucha común es un elemento esencial a tener en cuenta en la aplicación de programas de gestión y conservación de recursos teniendo en cuenta la elevada subdivisión genética existente. En consecuencia, los estudios dirigidos a conocer la ubicación en términos filogeográficos de las poblaciones de un área determinada dentro del contexto europeo, así como a estimar los niveles de estructuración existentes a nivel microgeográfico, constituyen un punto de partida indispensable en el desarrollo de cualquier programa de gestión (Ryman, 1981; Allendorf *et al.*, 1987; García-Marín *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1993).

Desde el punto de vista de la gestión, las tres principales actividades humanas que afectan a la conservación de recursos biológicos son la alteración del hábitat, la sobreexplotación pesquera, y la repoblación, que también afectan a las poblaciones de trucha. La degradación ambiental implica tanto destrucción física directa del medio en que se desenvuelve la trucha, por ejemplo por la construcción de centrales hidroeléctricas que impiden el ascenso de los reproductores a los lugares de freza o las modificaciones del curso para la regulación del régimen hídrico, como modificaciones indirectas del mismo a través de diversas formas de contaminación.

La explotación de las poblaciones naturales de trucha mediante la pesca, tiene esencialmente un componente recreativo, aunque en algunas regiones y países de Europa se mantiene la comercialización de la misma, lo cual agrava el problema. El desconocimiento de la estructura genética y diferenciación de las poblaciones de trucha puede determinar la erosión de recursos a través de la pesca, ya que las poblaciones proporcionalmente menos representadas pueden llegar a desaparecer si no existe una regulación específica de los recursos genéticos (Utter y Ryman, 1993; Ryman *et al.*, 1995; Polikansky y Magnuson, 1998; Laikre *et al.*, 1999). Igualmente, se ha demostrado que la actividad pesquera lleva aparejada componentes selectivos diferenciales que devienen en cambios genéticos importantes de las poblaciones explotadas. En este sentido se ha observado frecuentemente en las pesquerías sobreexplotadas una tendencia a la disminución de tamaño de los individuos, así como una mayor precocidad en la maduración sexual (Larkin, 1977; Nelson y Soulé, 1987). En relación con la gestión de recursos, existe cada vez un consenso más amplio respecto de la necesidad de mantener reservorios genéticos específicos dentro de cada región. Esta práctica supondría además de un seguro para el futuro de la especie, el necesario análisis para la evaluación y

priorización de los recursos a conservar, lo que tendría un aconsejable componente de concienciación social (Moritz *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 1998; Laikre *et al.*, 1999).

La pérdida de recursos genéticos dentro de la especie puede producirse de manera drástica por la eliminación de poblaciones diferenciadas, pero también la propia disminución del tamaño efectivo poblacional puede tener efectos negativos sobre la viabilidad y futuro de las poblaciones (Frankel y Soulé, 1981; Lande y Barrowclough, 1987). Esta disminución conlleva inevitablemente la pérdida de diversidad genética por deriva, y el apareamiento entre parientes que puede determinar la aparición de fenómenos de depresión consanguínea. En ambos casos la viabilidad de las poblaciones se ve seriamente comprometida, ya que la variabilidad genética representa el seguro adaptativo frente a la impredecibilidad ambiental, y la depresión consanguínea es responsable de una disminución de la eficacia biológica como consecuencia de una mayor susceptibilidad a enfermedades, menor viabilidad, etc., de las poblaciones afectadas (Lande, 1994; Frankham, 1995).

La introducción de especies o stocks foráneos puede también afectar seriamente a los recursos genéticos de una especie por extinción de las poblaciones nativas, hibridación que rompa los complejos genéticos que permiten la adaptación a las peculiaridades del medio, o introducción de parásitos y enfermedades con los que no han tenido contacto previo las poblaciones nativas (Hindar *et al.*, 1991; Ryman y Laikre, 1991; Ryman *et al.*, 1995). En relación con esta cuestión, es importante que los programas de repoblación se apliquen en aquellas áreas realmente deterioradas, dentro de un modelo de gestión autosostenible. Igualmente, es necesario evaluar la cantidad de individuos a liberar en relación con el tamaño efectivo y el grado de diferenciación de las poblaciones repobladas para evitar cambios genéticos en dichas poblaciones (Ryman, 1991). Por esta misma razón, la reproducción asistida (“supportive breeding”), considerado un medio de gestión inocuo, puede alterar la composición genética de las poblaciones en función del número de reproductores utilizados (Hansen, 2002). Por otro lado, los stocks usados para repoblar un área deberían ser genéticamente representativos de las poblaciones nativas. En este sentido, cobra gran importancia la caracterización de las unidades operacionales de conservación (OCUs), pues con ello se intenta delimitar la existencia de recursos genéticamente diferenciados que serán tratados como una unidad desde el punto de vista de la gestión y conservación (Moritz, 1994). Finalmente, es necesario hacer hincapié también en el mantenimiento en el tiempo de las

características genéticas de los stocks utilizados para la repoblación, tratando de evitar los cambios producidos por deriva (efectos fundadores, tamaño efectivo poblacional), consanguinidad (depresión por apareamiento entre parientes), y selección en las nuevas condiciones de cautividad (Ryman y Ståhl, 1980; Leary *et al.*, 1985; Meffe, 1990; Skaala *et al.*, 1990), introduciendo de forma regular reproductores desde las poblaciones naturales.

Cuando se decide repoblar, además de utilizar un stock apropiado, tal como se comentó anteriormente, es necesario monitorizar el impacto y el éxito de la repoblación. La existencia de marcadores genéticos diagnóstico en la trucha común entre el stock centroeuropeo utilizado durante años para la repoblación en la Península Ibérica y las poblaciones nativas, facilita la evaluación y seguimiento de esta práctica de gestión. Así, el locus *LDH-C** se ha utilizado para evaluar el impacto de las repoblaciones en la península Ibérica (García-Marín *et al.*, 1991; Morán *et al.*, 1991; Arias *et al.*, 1995), ya que se encuentra fijado para el alelo *100 en las poblaciones nativas, mientras que lo está para el alelo *90 en los stocks, constituyendo un excelente marcador diagnóstico. Este marcador se ha utilizado para evaluar el impacto de las repoblaciones en la península Ibérica (García-Marín *et al.*, 1991; Morán *et al.*, 1991; Arias *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos demuestran que tras años de repoblación las poblaciones de cuencas cantábricas y gallegas apenas muestran presencia de repobladores, incrementándose su incidencia conforme nos aproximamos a la zona mediterránea donde se encuentran valores de impacto promedios entre el 10-20% (Bouza *et al.*, 1999, 2001; Sanz *et al.*, 2000, 2002). La utilización de stocks híbridos, y más recientemente procedentes de poblaciones nativas, hace necesario la utilización de marcadores más resolutivos como los loci microsatélite para hacer un seguimiento de las repoblaciones. Estos marcadores muestran tal variación genética que es posible asignar los individuos muestreados a sus poblaciones de origen o incluso identificar progenitores, caso de que exista información de los mismos (Hansen *et al.*, 2000; Hansen, 2002).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los antecedentes respecto a las poblaciones de trucha común (*Salmo trutta*) en la Comunidad Valenciana evidencian un declive importante en los últimos años, quedando actualmente circunscritas a reductos en determinados ríos de las provincias de Castellón y Valencia. Las razones de esta disminución de los efectivos poblacionales son múltiples pasando desde la reducción de caudales y calidad de aguas. Adicionalmente, en poblaciones muy reducidas es previsible que se puedan producirse problemas de consanguinidad, con repercusión negativa en la viabilidad de las poblaciones.

En el presente análisis genético se pretende abordar la definición de las unidades de gestión de trucha común en la Comunidad Valenciana. Así se plantea aplicar distintos marcadores genéticos sobre cinco muestras de las poblaciones naturales detectadas en los últimos años como reductos en cuencas de Castellón y Valencia. Este estudio persigue constituir un punto de partida de asesoramiento técnico en la gestión y conservación de esta especie en la Comunidad. Para la consecución de estos objetivos se han incluido dos niveles esenciales en el análisis genético poblacional: i) la evaluación de la incidencia de la repoblación de origen centroeuropeo, y ii) la caracterización del linaje genético y diversidad genética en las poblaciones con componente genético autóctono, que permitan plantear recomendaciones prácticas de cara a la gestión y la conservación de recursos genéticos de trucha común.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 Material biológico

Se han analizado las muestras recibidas desde Julio a Octubre de 2008 correspondientes a cinco poblaciones de la Comunidad de Valencia, 3 en la provincia de Valencia (Turia, Ebrón y Vallanca) y 2 de Castellón (Villahermosa y Palancia), tal como se indica en el siguiente recuadro.

Muestras poblacionales de trucha común.

PROCEDENCIA		CÓDIGO (N)
	Palancia	CSPA (35)
	Villahermosa	CSVH (22)
	Ebrón	VAEB (31)
	Vallanca	VAVA (32)
	Turia	VATU (31)

III.2 Marcadores moleculares y extracción de ADN

En el presente proyecto se ha planteado un análisis genético individual y poblacional mediante marcadores moleculares de ADN con probada eficacia en estudios genéticos previos análogos de trucha común en la Península Ibérica: LDH-C*, haplotipos de ADNmt y microsatélites (Martínez *et al.*, 1993; Arias *et al.*, 1995; Machordom *et al.*, 2000; Suarez *et al.*, 2001; Cortey *et al.*, 2004; Bouza *et al.*, 2007, 2008; Martínez *et al.*, 2007).

Análisis del locus LDH-C*: Para analizar el impacto de la repoblación en las 5 poblaciones naturales muestreadas, se utilizó inicialmente el marcador diagnóstico LDH-C*, que se encuentra fijado para el alelo *100 en las poblaciones nativas del Sur de Europa, y para el alelo *90 en el stock Centroeuropeo. Este análisis se realizó mediante RFLPs de la región diferencial de este locus siguiendo el protocolo descrito por McMeel *et al.* (2001). En las Figuras 1 y 2 se muestran los distintos genotipos para LDH-C* detectados usando esta técnica en las distintas poblaciones analizadas.

Marcadores mitocondriales: Los marcadores de linaje mitocondrial considerados en este estudio se basan esencialmente en el análisis de RFLPs descrito por Marchordom *et al.* (2000), utilizando 5 enzimas de restricción (*AluI*, *HincII*, *MspI*, *RsaI* y *Sau3A1*) para digerir una región entre NADH-5 y citocromo *b* amplificado utilizando los primers descritos por Machordom *et al.* (2000). Complementariamente,

en este estudio se ha puesto a punto un marcador mitocondrial más informativo basado en la secuenciación de la región de control, con objeto de comparar directamente con estudios previos de trucha común en el área de estudio (Cortey *et al.*, 2004). Para ello se han utilizado los primers y procedimientos técnicos descritos por estos autores, Cortey y García-Marín (2002).

Marcadores microsatélite: En el presente estudio se han seleccionado 10 loci microsatélite (Str58, Str60, Str73, Str85, Str543, Str591, Ssa85, Ssa171, Ssa197, y Sssl.438; Tabla 2) recomendados en estudios previos en la trucha común (Laikre *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2007; TROUTCONCERT; EU FAIRCT97-3882; <http://www.qub.ac.Uk/bb/prodohl/TroutConcert/TroutConcert.htm>).

Extracción de ADN y amplificación de marcadores: Se realizó según el procedimiento descrito por Walsh *et al.* (1991) a partir de aleta adiposa de las muestras individuales recibidas. La amplificación por PCR de cada marcador analizado (*LDH-C**, mitocondriales y microsatélites) se realizó siguiendo los protocolos específicos señalados en los apartados anteriores y se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez estimada la cantidad de ADN obtenida por PCR, se procedió al análisis de los fragmentos de ADN mediante RFLPs en gel de agarosa para el locus *LDH-C** según McMeel *et al.* (2001) y para el marcador mitocondrial de Machordom *et al.* (2000). Para el genotipado de los loci microsatélite se realizó el análisis de fragmentos de DNA en un secuenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems). El análisis de marcador mitocondrial de la región control se realizó mediante secuenciación utilizando un secuenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) para la comparación con datos de muestras mediterráneas del área de estudio disponibles en la literatura (Cortey *et al.*, 2004).

III.3 Análisis de datos

Impacto de la repoblación de origen centroeuropeo

Habitualmente, se ha utilizado el locus diagnóstico *LDH-C** para evaluar el impacto de las repoblaciones, al estar fijado para el alelo *100 en las poblaciones nativas del sur de Europa y para el * 90 en los stocks de repoblación (Martínez *et al.*, 1993).

Teniendo en cuenta que la mayor parte de la repoblación en España se ha realizado históricamente con stocks de origen Centroeuropeo se consideró importante el análisis de una muestra Centroeuropea pura. Este stock se ha podido analizar gracias a la muestra cedida por el Gobierno de Castilla-León procedente de una piscifactoría de Burgos (HBU; Martínez *et al.*, 2007), que ha sido una referencia esencial para evaluar el impacto de las repoblaciones. Esta opción parece una de las más apropiadas, tanto por carecer de un stock de estas características en Valencia, como por la escasa diferenciación genética existente entre los stocks de origen Centroeuropeo en la Península Ibérica (García-Marín *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1993). Mediante comparación de cada población con el stock Centroeuropeo disponible de referencia se pudieron identificar una serie de alelos exclusivos o privados de los stocks de repoblación que se usaron para monitorizar el impacto de la repoblación en cada población considerada. Al no poder identificar de forma inequívoca los alelos diagnóstico en muestras nativas no puras, se utilizó preferentemente el locus diagnóstico *LDH-C** para estimar el grado de introgresión. En cualquier caso, teniendo en cuenta la posible utilización de stocks mixtos (centroeuropeo x autóctono) en la Península Ibérica en los últimos años, los valores obtenidos representarían una infraestima del impacto real de las repoblaciones. El conocimiento detallado de las repoblaciones realizadas en el pasado reciente con los stocks centroeuropeos puros y/o mixtos sería esencial para obtener una imagen más precisa del impacto de las repoblaciones en Valencia.

En paralelo, se ha utilizado la información del marcador de linaje mitocondrial para identificar haplotipos de origen atlántico (AT) característicos de los stocks de repoblación centroeuropeos (“AT-hatchery”; Machordom *et al.*, 2000; Cortey *et al.*, 2004). El análisis de este marcador permite trazar la introgresión de origen centroeuropeo vía materna, es decir, reflejo de cruzamientos entre hembras de linaje

AT-hatchery con machos de linaje autóctono. Sin embargo, no resulta informativo para detectar introgresión de origen centroeuropeo vía paterna.

Complementariamente se han realizado análisis estadísticos específicos para detección de hibridación en base a marcadores microsatélites, que permite indagar en el grado de introgresión de origen centroeuropeo, así como la detección de híbridos de 2ª y posteriores generaciones (programa NEWHYBRIDS; Anderson y Thompson, 2002; Anderson, 2003; Martínez *et al.*, 2007).

Cuantificación de la diversidad genética

Los alelos detectados en este estudio son codominantes, de manera que a partir de los datos genotípicos individuales observados (Apéndice I) se obtuvieron las frecuencias alélicas o génicas (Apéndice II) mediante el programa FSTAT (Goudet, 1995, 2001). Para la cuantificación de la diversidad genética se estimaron el número medio de alelos por locus (A) y la heterozigosis media esperada por locus o índice de diversidad genética (He; Nei, 1987).

Para el ajuste a las frecuencias de equilibrio Hardy-Weinberg (H-W), que supone la unión al azar de los gametos en la población analizada y en consecuencia el apareamiento aleatorio entre los individuos de dicha población, se utilizaron tests exactos de probabilidad usando el método de la cadena de Markov (Guo y Thompson, 1992) del programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995). Se rechaza la hipótesis nula de equilibrio H-W cuando la probabilidad obtenida es menor que el valor crítico del 5% ($\alpha=0,05$). La corrección secuencial de Bonferroni se aplicó para obtener el valor crítico para múltiples test sobre los 10 loci por población ($P<0.005$; Rice, 1989). Para conocer el sentido y la magnitud de la desviación respecto a las condiciones de equilibrio H-W en cada locus (exceso o defecto de heterozigotos) se utilizó el índice de fijación F que se corresponde con el Fis de Wright (1969), y obtenido en este estudio mediante el método descrito por Weir y Cockerham (1984) en el programa GENEPOP, versión 3.1 (Raymond y Rousset, 1995).

Utilizando el programa GENEPOP se ha estimado también la existencia de desequilibrios genotípicos entre todos los pares de marcadores nucleares analizados (microsatélites y LDH-C*). La corrección secuencial de Bonferroni se aplicó para obtener el valor crítico para múltiples test sobre todos los pares de comparaciones

realizados globalmente por población (Rice, 1989). El desequilibrio de ligamiento puede tener varias causas, como la colonización o efecto fundador, mezcla de poblaciones, proximidad de los loci en el mismo cromosoma o selección (Fontdevila y Moya, 1999). Es el contexto de estudio, con Este análisis permitiría detectar asociaciones no aleatorias de alelos diagnósticos de origen centroeuropeo en poblaciones introgresadas (detección de híbridos de 2ª y posteriores generaciones).

Mediante el programa MICRO-CHECKER v2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004) se determinó si existen evidencias de errores de genotipado de microsatélites debidos a presencia de alelos nulos, *allele dropout* (amplificación diferencial en heterocigosis de fragmentos de ADN de muy diferente tamaño alélico) y tartamudeo (para un mismo alelo se detectarían amplificaciones seriadas que difieren en una unidad del motivo de repetición debido a deslizamiento de la polimerasa). Estos errores de genotipado se detectan a partir del análisis por clases alélicas de las desviaciones del equilibrio HW para cada locus.

La detección de reducciones del tamaño efectivo en la historia de las poblaciones analizadas se ha testado mediante la aplicación de distintas aproximaciones estadísticas basadas en marcadores microsatélites: Programa BOTTLENECK (Cornuet y Luikart, 1996) y estimas de M-Value (Garza y Williamson, 2001) utilizando el programa AGARst software (Harley, 2001).

Análisis de estructura y diferenciación entre poblaciones

Para el análisis de estructuración poblacional se utilizaron los índices de fijación o estadísticos F (Wright, 1969), que descomponen la diversidad genética total en sus componentes intra (H_S/H_T) e interpoblacional (G_{ST} ; Nei, 1973; 1977). Este último estadístico, G_{ST} , denominado coeficiente relativo de diferenciación interpoblacional proporciona una estima de la diferenciación entre las poblaciones analizadas (oscilando entre un mínimo de 0 y un máximo de 1). El estimador de divergencia interpoblacional de Weir y Cockerham (1984) se ha calculado utilizando el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet *et al.*, 2001), tanto del valor de F_{ST} global para el conjunto de poblaciones analizadas, como de los valores F_{ST} por pares de poblaciones consideradas.

Para visualizar las relaciones genéticas entre las poblaciones analizadas se realizó un análisis de agrupamiento de poblaciones utilizando genotipos individuales que se ordenaron en un espacio multidimensional mediante una análisis factorial de

correspondencias (FCA; programa GENETIX; Belkhir *et al.*, 2004) con el objetivo de encontrar alguna evidencia de estructura con respecto al origen poblacional. También se ha determinado la existencia de grupos poblacionales de individuos genéticamente similares que minimizan las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg y el desequilibrio de ligamiento dentro de grupo utilizando un sistema de agrupamiento Bayesiano implementado en el programa BAPS 4.13 (Corander *et al.*, 2004).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha realizado un análisis genético en cinco muestras de poblaciones naturales detectadas en la Comunidad Valenciana, como punto de partida técnico en la gestión y conservación de esta especie en esta Comunidad. Por un lado, se ha evaluado la incidencia de la repoblación de origen centroeuropeo realizada en el pasado reciente. Por otro se ha realizado una caracterización de linajes genéticos matriarcales de la especie, así como un análisis de diversidad genética en las poblaciones con componente genético autóctono.

A continuación, se presentan los principales resultados obtenidos hasta el momento, que analizados de forma preliminar permiten extraer una serie de evidencias respecto al origen genético de las muestras analizadas, particularmente enfocado a determinar la existencia de indicios de hibridación alóctono debido a suplementaciones pasadas con líneas domesticadas de origen centroeuropeo.

IV.1 *Análisis del marcador LDH-C*: Incidencia de la repoblación*

Para analizar el impacto de la repoblación en las 5 poblaciones naturales muestreadas, se utilizó inicialmente el marcador diagnóstico *LDH-C**, que se encuentra fijado para el alelo *100 en las poblaciones nativas del Sur de Europa y para el alelo *90 en los centros piscícolas de origen centroeuropeo. En la Figuras 1 y 2 se presentan las fotos de gel de agarosa donde se muestran los distintos genotipos para *LDH-C** detectados usando esta técnica en una fracción muestral representativa de las cinco poblaciones analizadas.

Los datos obtenidos evidencian la presencia del alelo *90 marcador de repoblación de origen centroeuropeo en las 5 poblaciones analizadas hasta el momento en frecuencia variable (Apéndice I). Por población, la incidencia de repoblación estimada a través de la frecuencia de este alelo *90 evidenció en primer lugar su fijación en la población de Turia (VA-TU; Fig. 1; Tabla 1). Este resultado sugiere la existencia de un proceso fundacional directo a partir de un stock de repoblación centroeuropeo en su origen. En las cuatro muestras restantes, la incidencia de repoblación osciló entre un mínimo de 0,09 en Vallanca y un máximo de 0,41 en Villahermosa (Figs. 1 y 2; Tabla 1). En promedio, la presencia de componente genético centroeuropeo resultó superior en las muestras de Castellón que en las de Valencia, tras excluir la muestra VATU del Turia directamente derivada de un stock centroeuropeo. La ausencia de desviaciones

significativas de las condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg para este locus en todas las muestras estudiadas sugiere además apareamiento aleatorio entre repobladores y poblaciones autóctonas. Estos resultados a escala microgeográfica podrían encajar con la mayor incidencia promedio de introgresión centroeuropea observada en estudios previos en el área mediterránea respecto al área cantábrica (Arias *et al.*, 1995; Bouza *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000). Muy posiblemente, este hecho puede explicarse en parte debido al perfil físico de la zona, con importante inestabilidad hidrológica estacional, que favorecen procesos de extinción y recolonización poblacional. Es necesario destacar que los riesgos de introgresión por repoblación de origen centroeuropeo pueden afectar incluso a poblaciones no repobladas directamente, si no existen barreras que eviten la migración natural entre las zonas repobladas y sin repoblar. Esta idea es particularmente relevante en el caso de la cuenca del Turia, y de la población VATU que posiblemente refleja un proceso fundacional a partir de suplementaciones pasadas con líneas domesticadas de origen centroeuropeo. Esta población podría suponer una amenaza de introgresión sobre poblaciones autóctonas de la misma cuenca.

IV.2 Definición de linajes genéticos mediante marcadores de ADN mitocondrial

El estudio genético en poblaciones valencianas de trucha común mediante marcadores de ADN mitocondrial ha permitido obtener una imagen precisa de la distribución de linajes genéticos en las cuencas analizadas (Tabla 1; Apéndice I). Los dos tipos de marcadores mitocondriales analizados mostraron resultados congruentes (Fig. 3A y 3B), que permiten la discusión respecto a los datos previos en el área de estudio publicados en base a RFLPs por Machordom *et al.* (2000) y secuenciación de la región control por Cortey *et al.* (2004).

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos mediante el marcador de linaje genético mitocondrial. En primer lugar, cabe destacar la fijación de linaje atlántico AT en la población VATU del Turia. En congruencia con los datos del marcador *LDH-C**, todos los individuos analizados de esta población VATU mostraron un haplotipo atlántico característico de los stocks domesticados de origen centroeuropeo utilizados tradicionalmente para la repoblación (AT-hatchery) tal como ha sido descrito el área de estudio por Cortey *et al.* (2004).

En las restantes cuatro poblaciones analizadas los resultados obtenidos revelan en general un elevado porcentaje de individuos con haplotipos de los linajes

Mediterráneo (ME) o Adriático (AD), previamente descritos como autóctonos en el área mediterránea de la Península Ibérica (Machordom *et al.*, 2000; Cortey *et al.*, 2004). Además, en tres de las poblaciones estudiadas, incluyendo las dos muestreadas en Castellón, Palancia y Villahermosa (CS-PA y CS-VH), así como Vallanca en la provincia de Valencia (VAVA), se han detectado también individuos con haplotipos atlánticos de origen centroeuropeo (AT-hatchery) en congruencia con la detección del marcador de origen centroeuropeo LDH-C*90 a frecuencia baja/moderada (Tabla 1; Apéndice I).

La distribución de linajes autóctonos en el área de estudio reveló la presencia preferente de linaje ME en las poblaciones de Castellón (CS). Así, aparece fijado en Villahermosa (CSVH) y coexistiendo con residuos de repoblación centroeuropeo de linaje AT en Palancia (CSPA). En los ríos analizados de Valencia (VA), los resultados obtenidos muestran la fijación de linaje ME en Ebrón (VAEB). En Vallanca (VAVA) el linaje ME coexiste con el linaje autóctono AD, pero también con el linaje AT-hatchery. Nuestros datos son esencialmente concordantes con los datos de linaje mitocondrial publicados previamente en el área de estudio (Cortey y García-Marín, 2004). Así, se evidencia una estabilidad genética temporal del componente genético autóctono en las poblaciones analizadas, aunque también alerta sobre el incremento de la introgresión centroeuropea en las poblaciones de Vallanca y Palancia (Fig. 4). Estos resultados son imprescindibles para definir adecuadamente las unidades operativas de gestión truchera en la Comunidad Valenciana, priorizando la conservación de poblaciones estables del linaje autóctono.

En la Tabla 1 puede observarse, sin embargo, un aparente desajuste entre marcadores en la población de Ebrón, que presentó únicamente haplotipos autóctonos a pesar de mostrar una frecuencia moderada del marcador de repoblación centroeuropea LDH-C*90 (23%). Si los repobladores en origen hubiesen sido de origen centroeuropeo (fijados para el linaje AT-hatchery), se esperaría que al menos una fracción de individuos híbridos de la población Ebrón presentase el haplotipo AT-hatchery heredado de repobladores-hembras, teniendo en cuenta la herencia vía materna del marcador mitocondrial y asumiendo igual contribución reproductiva de machos y hembras del stocks de repoblación. En este caso, por tanto, la explicación más verosímil de la situación detectada en Ebrón estaría asociada a la pérdida por deriva genética del linaje mitocondrial AT-hatchery. Una hipótesis interesante aunque menos verosímil y no testada hasta el momento podría tener relación con la existencia de éxito

reproductivo diferencial entre sexos de los repobladores de origen centroeuropeo, con apareamiento preferente de los repobladores-machos (genotipo *LDH-C*9090*) con hembras autóctonas (linaje ME ó AD; genotipo *LDH-C*100100*). Otra posible explicación de estos datos podría tener que ver con la utilización de stocks de repoblación modificados ya en la domesticación. Si los stocks de repoblación de partida estuviesen ya introgresados en mayor o menor medida por poblaciones autóctonas de diferente origen, ni el locus *LDH-C** ni el linaje nativo mitocondrial serían marcadores suficientes por sí solos para la evaluación de las repoblaciones. En definitiva, los datos del presente estudio refuerzan la necesidad de análisis combinado de distintos marcadores genéticos representando distintas fracciones del genoma con distintas y particulares dinámicas evolutivas que ayudan a comprender mejor y de una forma global la evolución histórica de las poblaciones estudiadas. En este sentido, el análisis de marcadores microsatélites realizado en este estudio ha permitido profundizar en la evaluación de introgresión de origen centroeuropeo en las poblaciones trucheras objeto de estudio (ver apartado IV.3).

IV.3. Análisis genético mediante marcadores microsatélites: diversidad genética e introgresión de origen centroeuropeo.

La ausencia de desviaciones significativas de las condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg para el marcador *LDH-C** (Tabla 1) y para los 10 loci microsatélites (Tablas 2 y 3) en todas las poblaciones estudiadas sugiere apareamiento aleatorio en las poblaciones autóctonas analizadas, con integración de una fracción residual de componente genético de origen centroeuropeo. Paralelamente, el análisis realizado mediante el programa MICROCHECKER confirma la fiabilidad del genotipado para los marcadores microsatélites analizados, descartando esencialmente la existencia de errores debidos a alelos nulos, drop-out o tartamudeo en todas las poblaciones estudiadas.

El análisis de diversidad genética con marcadores microsatélites confirmó de forma genérica los datos obtenidos con los marcadores *LDH-C** y mitocondriales respecto a la población VATU del Turia, con respecto a las restantes poblaciones analizadas en Castellón y Valencia. Así, en la muestra VATU se detectó una cierta similitud con características alélicas de los stocks domesticados de origen centroeuropeo (Apéndices II y III), tras comparación con la muestra de referencia considerada representativa de este tipo de líneas de repoblación utilizadas en España (HBU;

Martínez *et al.*, 2007). A pesar de esta similitud genética, los estimadores de diferenciación interpoblacional revelan una acusada divergencia genética entre la muestra actual del Turia (VATU) y el stock domesticado de referencia disponible (HBU) (Figs. 4A y 4B; Tabla 5). En esta población VATU, además se han detectado síntomas de erosión genética reciente (baja diversidad genética y evidencias de cuellos de botella; Tabla 4). Todo ello sugiere pérdidas de diversidad genética y fluctuación de frecuencias alélicas al azar por deriva genética desde el proceso fundacional a partir del sueltas de stocks de repoblación en el pasado reciente y mantenimiento de bajos tamaños efectivos hasta la actualidad, que habrían determinado una importante diferenciación genética respecto al stock de origen.

En contraste, el análisis de las restantes 4 muestras analizadas, Vallanca, Ebrón, Villahermosa y Palancia (VAVA, VAEB, CSVH, CSPA), reveló una composición genética preferente de carácter autóctono y niveles de variabilidad genética moderados, en general por encima del valor promedio para el conjunto de poblaciones estudiadas (A: 5,1; He: 0.55; Tabla 4). Las estimas poblacionales obtenidas con microsatélites son en general comparables a las descritas en otras poblaciones trucheras viables sin síntomas de erosión genética relevante, incluso del área atlántica (Martínez *et al.*, 2007; Vilas *et al.*, datos no publicados). En poblaciones atlánticas con conexión intercuenca se esperan valores más elevados de diversidad genética que en el área mediterránea, con poblaciones de menor tamaño efectivo y mayor grado de aislamiento interpoblacional (Bouza *et al.*, 1999; Poteaux *et al.*, 1999; Aurelle *et al.*, 2002). De hecho, los niveles de variabilidad genética detectados por encima de la media, por ejemplo en Villahermosa, podrían deberse en parte a la existencia de eventos de hibridación, tal como se evidencia en otras zonas híbridas de la Península Ibérica (Martínez *et al.*, 2007). En este estudio, la introgresión de origen centroeuropeo habría tenido lugar a partir de suplementaciones pasadas con stocks domesticados, en congruencia con la presencia de marcadores diagnóstico *LDH-C*90* y linaje mitocondrial AT-hatchery.

Para analizar la existencia de cuellos de botella poblacionales en la historia de las poblaciones estudiadas se han aplicado los métodos descritos por Cournet y Luikart (1996) y por Garza y Williamson (2001). Todas las muestras poblacionales mostraron valores justo por debajo del umbral crítico $M < 0,68$ considerado por Garza y Williamson (2001) como indicador de reducción del tamaño efectivo poblacional (Tabla 4). Estos datos son compatibles con el contexto poblacional de una especie como la trucha común, altamente estructurada y con tamaños efectivos reducidos (Jensen *et al.*,

2003; Vilas *et al.*, datos no publicados). Esto se podría ver acentuado en el área de estudio constituida por unos pocos reductos poblacionales trucheros en el área mediterránea con aislamiento intercuenca e inestabilidad hidrológica estacional, que pueden suponer una situación potencial de amenaza para su viabilidad y estabilidad en el futuro. No obstante, resulta destacable que en las muestras valencianas de Ebrón y Vallanca existen algunos indicios de expansión poblacional reciente atendiendo al método BOTTLENECK de Cornuet y Luikart (1996).

Análisis de hibridación de origen centroeuropeo

Se han realizado una serie de análisis específicos para detección de hibridación de origen centroeuropeo en base a marcadores microsatélites, de forma independiente pero también en combinación con los restantes marcadores de linaje mitocondrial y el diagnóstico *LDH-C**. Para el análisis de hibridación se ha considerado como referencia un stock piscícola centroeuropeo puro, al carecer de información precisa del origen de los stocks utilizados en las repoblaciones pasadas y dado que, en gran medida, éstas procedieron históricamente de centros piscícolas con líneas domesticadas de origen centroeuropeo genéticamente homogéneas (García-Marín *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos mediante el método NEWHYBRIDS (Anderson y Thompson, 2002; Anderson, 2003; Martínez *et al.*, 2007) apenas revelan signos de introgresión centroeuropea reciente, sino que evidencian un componente genético autóctono preferente para la mayoría de individuos de las 4 poblaciones analizadas (exceptuando VATU que está completamente introgresada). De hecho, sólo se han identificado unos pocos individuos híbridos de 2ª o posteriores generaciones en la población de Vallanca. En la misma dirección apunta la ausencia de desequilibrios genotípicos significativos entre pares de marcadores microsatélites en todas las poblaciones estudiadas que revela ausencia de asociación de alelos de origen centroeuropeo, característica de poblaciones recientemente introgresadas. Así, el desequilibrio genotípico entre pares de loci que se genera por hibridación entre poblaciones genéticamente divergentes va disminuyendo de generación en generación por recombinación, pudiendo llegar a perderse la asociación genotípica si se da el tiempo suficiente.

Respecto al genoma nuclear, destaca en cierto modo el mantenimiento del alelo *LDH-C*90* frente a la pérdida de rastro nuclear para algunos alelos microsatélites diagnósticos parciales del stock centroeuropeo. Aunque por deriva todos ellos podrían

experimentar fluctuaciones aleatorias de frecuencia, tanto a la baja hasta su eliminación, como al alza con potencial fijación, hay que matizar que existen diferencias en la frecuencia inicial de los distintos alelos considerados en los stocks domesticados, con fijación de partida del alelo diagnóstico total del alelo *90 frente a frecuencias $\ll 1$ para los distintos alelos microsatélites parcial diagnóstico. Cuando se amplió el análisis de desequilibrios genotípicos a todos los loci nucleares estudiados, incluyendo el locus diagnóstico *LDH-C** en combinación con los microsatélites, se detectaron indicios de retención de desequilibrio genotípico en todas las poblaciones analizadas ($P < 0,05$) respecto al marcador microsatélite *Str58**, que muestra varios alelos diagnóstico parcial de origen centroeuropeo (Apéndice III). El desequilibrio para este par de loci resultó no significativo en el análisis para cada población tras la corrección de Bonferroni para múltiples tests, pero sí fue significativo para el global de las cinco poblaciones estudiadas. La existencia de tamaños efectivos poblacionales históricos reducidos en las poblaciones estudiadas, en el pasado receptoras de los repobladores centroeuropeos, podría explicar variaciones y/o fijaciones de variantes alélicas por deriva genética, particularmente acusado en el caso del genoma mitocondrial haploide, debido a su menor tamaño efectivo respecto al genoma nuclear. Esto podría explicar en parte la presencia del alelo *LDH-C*90* a frecuencia moderada por ejemplo de Villahermosa, o la pérdida de linaje mitocondrial AT en Ebrón. Alternativamente, sería muy interesante analizar molecular y funcionalmente la variante enzimática *LDH-C*90* presente actualmente en estas poblaciones valencianas, para comprobar su identidad respecto a la variante presente en stocks domesticados y testar la posible existencia de selección favorable que pudiese explicar su mantenimiento en las poblaciones analizadas, un aspecto novedoso en la bibliografía al respecto.

Desde un punto de vista aplicado, el análisis genético combinando diferentes tipos de marcadores ha permitido identificar individuos híbridos de origen centroeuropeo en distinto grado (2ª generación, retrocruzamientos) que presenta genotipos aparentemente autóctonos (*LDH-C*100100*; linaje mitocondrial ME ó AD), como por ejemplo en la población de Vallanca (Apéndice I). Este tipo de análisis individualizado podría resultar de interés para establecer planes de reproducción asistida a partir de reproductores autóctonos en la fundación de líneas nativas, si fuese necesario. Tal como se ha planteado anteriormente, en escenarios complejos con niveles de introgresión variables y poblaciones autóctonas de diferente origen, ni el marcador

*LDH-C*100* ni el linaje nativo mitocondrial (ME, AD) serían suficientes por sí solos para la evaluación de las repoblaciones, ni para identificar individuos autóctonos puros.

IV.4. Diferenciación genética interpoblacional

El análisis de estructuración genética realizado en base a los marcadores microsatélites evidenció diferencias genéticas importantes entre las cuencas analizadas de la Comunidad Valenciana. Así, se ha detectado una gran diferenciación intra e interpoblacional, más acusada en el caso de las cuencas de Castellón, que sugiere una consideración específica de cara a la conservación y gestión de recursos trucheros en el área. El índice de diferenciación global en todo el área de estudio fue elevado y significativo (G_{st} global: 25,7%), es decir, que casi un 26% de la diversidad total observada se debe a diferencias genéticas entre poblaciones (Tabla 5). Cuando se excluyó la muestra VATU del Turia de origen centroeuropeo, la estima de diferenciación interpoblacional se redujo a un 20,4% (Tabla 5), tal como era de esperar debido a la divergencia genética entre las líneas domesticadas respecto a las poblaciones autóctonas del área mediterránea.

El análisis por pares de poblaciones mostró la existencia de diferencias genéticas significativas en todos los casos estudiados (Tabla 6). Los valores mínimos de diferenciación correspondieron a las comparaciones entre las dos poblaciones valencianas de la misma cuenca (Vallanca respecto a Ebrón; F_{st} : 0,05; VAVA-VAEB), seguido por el detectado entre las dos muestras de 2 cuencas distintas en Castellón (Villahermosa respecto a Palencia; F_{st} : 0,16; CSVH-CSPA). Los valores de mayor divergencia genética se correspondieron a todas las comparaciones por pares respecto a la muestra VATU de origen centroeuropeo del Turia ($F_{st} > 0,23$; F_{st} máximo: 0,40 entre VAVA y VATU). Se confirma, en definitiva que la muestra VATU del Turia está muy diferenciada genéticamente del resto, comparable en frecuencia relativa a la diferenciación observada respecto a la línea domesticada centroeuropea pura utilizada como referencia (HBU). Sin embargo, también se confirma una importante divergencia de VATU respecto a HBU (F_{st} : 0,17), en coherencia con los datos de variabilidad alélica y diversidad genética debido posiblemente a la deriva genética en el proceso fundacional a partir de sueltas de repoblación.

Estos mismos resultados se refuerzan en los análisis de relaciones genéticas interindividuales e interpoblacionales en el área de estudio, mediante métodos de

inferencia bayesiana y multivariantes (BAPs y FCA; Figs. 5A y 5B). En primer lugar, se observa una alta divergencia de la población VATU del Turia respecto al resto de poblaciones de la Comunidad Valenciana. En esta misma cuenca, sin embargo, se observa una importante similitud genética de las otras dos poblaciones valencianas analizadas (Ebrón y Vallanca), compatible con una única unidad panmíctica con el método bayesiano (Fig. 5A). Las dos muestras de Castellón están más relacionadas entre sí que respecto a las del Turia en Valencia (Fig. 5B), pero con un nivel de divergencia genética importante tal como revelan las estimas de F_{st} y el análisis de agrupamiento bayesiano (Tabla 6; Fig. 5A), en coherencia con la alta estructuración genética de esta especie, en todo el rango de distribución y particularmente en el área mediterránea.

El análisis integrado con los distintos marcadores genéticos evidencia una importante heterogeneidad genética de todo el área analizada, concordante con la ausencia de forma anádroma en el área mediterránea y una importante inestabilidad hidrográfica estacional. Todo ello contribuye a determinar un escenario evolutivo con ausencia de migración truchera entre cuencas, aislamiento interpoblacional y disminución de tamaño efectivo poblacional con papel predominante de la deriva genética y un alto grado de diferenciación genética interpoblacional e intercuenca. En este contexto estaría totalmente desaconsejado considerar a todas las poblaciones trucheras analizadas como una única unidad operativa de gestión. De un modo estricto, un primer nivel operativo de gestión de trucha común en el área de estudio sería considerar cada cuenca de forma independiente. Esta subdivisión mejoraría el conocimiento y consideración de las poblaciones locales singulares y deterioradas en cada área. Sin embargo, no se puede obviar el hecho de que dichas unidades de gestión estén restringidas a escasos reductos poblacionales por cuenca que sugiere riesgos de amenaza a su viabilidad por aislamiento y bajo tamaño efectivo, sumado a inestabilidad hidrográfica estacional. En este sentido, podría resultar de interés valorar la introducción de una fracción de migración entre poblaciones genéticamente similares, por ejemplo, entre las muestras de Vallanca y Ebrón en el Turia, aplicando para ello marcadores moleculares y aproximaciones estadísticas que permitan la trazabilidad individual/familiar para maximizar la diversidad genética, minimizando la introducción de consanguinidad (Fernández *et al.*, 2004, 2008).

V. GESTIÓN Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS DE TRUCHA COMÚN EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

V.1 Consideraciones generales sobre gestión autosostenible y repoblación.

La conservación de recursos genéticos requiere una serie de actuaciones y orientaciones de aplicación práctica para los gestores. Tras la evaluación de los recursos genéticos existentes en el área gestionada es posible la identificación de las Unidades de Significación Evolutiva (ESUs), que representan unidades genéticamente diferenciadas de la especie con potencial adaptativo o evolutivo en el área de gestión. Estas constituyen una propuesta de máximos a conservar y gestionar. A partir de las ESUs es posible definir las Unidades Operativas de Conservación (OCUs), atendiendo a limitaciones socioeconómicas, y que constituyen una propuesta de gestión y conservación más realista. Una vez establecidas, resulta importante analizar su viabilidad para, en función del resultado, diseñar planes de gestión, recuperación y repoblación según sea necesario (Fig. 6).

V.2. Evaluación general cualitativa de las poblaciones trucheras analizadas en la Comunidad Valenciana: diversidad genética, linaje mitocondrial e implicaciones para la gestión.

Variabilidad genética

Del análisis genético realizado, la población de VATU reveló niveles de diversidad génica y riqueza alélica inferiores al resto. Otra población que mostró escasa variabilidad fue VAVA, que también parece haber sufrido una erosión en su variabilidad genética. En todos los casos, los datos de M-value apuntan a la existencia de disminuciones en el tamaño efectivo poblacional a lo largo de la historia de las poblaciones. Parece probable que la principal causa de este déficit de diversidad se encuentre en fuertes efectos de deriva genética, congruente con el contexto filogeográfico de las cuencas fluviales mediterráneas, aisladas entre sí en ausencia de forma anádroma y sujetas a alteraciones hídricas estacionales muy importantes. Aparentemente, el resto de poblaciones estudiadas presentan un nivel de diversidad moderado-alto, superiores al máximo del rango descrito en otras poblaciones aisladas

por debajo del límite de la forma anádroma, por ejemplo dentro del linaje Duero en la cuenca del Duero (Martínez *et al.* 2007). El análisis de hibridación mediante marcadores microsatélites sugiere un componente genético autóctono preferente, por tanto un estado relativamente saludable de diversidad genética. Sin embargo, es verosímil que parte de la diversidad genética observada refleje la introgresión en el pasado con líneas domesticadas de origen centroeuropeo.

En resumen, y de modo cualitativo, ninguna de las poblaciones analizadas mostró niveles extremadamente reducidos de variabilidad genética. Dos de las poblaciones (VAVA, VATU) mostraron niveles relativamente bajos de variabilidad genética ($A < 4$ y/o $He < 0.5$). Mientras, las restantes poblaciones mostraron niveles de variabilidad genética moderada-alta en el contexto filogeográfico de esta especie ($A > 5$; $He > 0.5$): VAEB, CSPA, CSVH.

Complejidad de definición de unidades de gestión

La heterogeneidad genética subyacente en el área de estudio introduce una importante complejidad a nivel operativo. Una aproximación conservativa desaconsejaría la gestión única del área y, por extensión la reproducción asistida cruzada entre poblaciones o la fundación de una única línea nativa de suplementación para toda la región, que debería estar subdividida por cuencas diferentes. En la cuenca del Turia se han identificado poblaciones del linaje ME/AD aparentemente estables a largo plazo que deberían constituir un objetivo prioritario de conservación. En este punto es importante restringir la amenaza de introgresión desde la población VATU analizada en la misma cuenca con componente genético centroeuropeo y pérdida de diversidad genética por efecto fundacional a partir de stocks domesticados de repoblaciones pasadas.

Las peculiaridades genéticas de las distintas poblaciones autóctonas analizadas han de ser tenidas en consideración a la hora de utilizar estos reproductores para fines de trasplantes y/o suplementación, si fuese el caso, desaconsejando idealmente su uso fuera de los cursos de las propias cuencas. El seguimiento genético de los planes de gestión y conservación integrando distintos tipos de marcadores, incluyendo análisis de linajes mitocondriales y diversidad genética mediante microsatélites permitiría trazar la representatividad genética de las poblaciones salvajes muestreadas, a nivel familiar e individual.

V.3 Conclusiones. Implicaciones para la conservación

1) Los datos genéticos confirman en general la información disponible por parte de la Generalitat Valenciana. Así, en cuatro de las poblaciones analizadas (VAVA, VAEB, CSPA, CSVH) se evidencia: i) la existencia de residuos genéticos que reflejan suplementaciones en el pasado con líneas domesticadas de origen centroeuropeo (anteriores a los años 90) y ii) la ausencia de síntomas genéticos característicos de introgresión reciente, congruente con el cese de dichas repoblaciones (> los años 90). Solo en el caso de una de las poblaciones analizadas en la cuenca del Turia (VATU) se observan datos genéticos compatibles con un alto grado de introgresión de origen centroeuropeo.

2) Excluyendo la muestra VATU del Turia, la detección a nivel individual y poblacional de un componente genético autóctono preferente en las restantes muestras analizadas (linaje mitocondrial y loci microsátélites) evidencia que la hibridación genética de origen centroeuropeo que tuvo lugar en el pasado se ha ido diluyendo de forma importante a lo largo de las generaciones, con reforzamiento progresivo del componente genético nativo, con variantes genéticas mitocondriales y nucleares características de la region filogeográfica del área mediterránea.

3) Las poblaciones analizadas, aunque con restos de introgresión centroeuropeo, se han mantenido aparentemente viables y mantienen una fracción importante de diversidad genética del área filogeográfica mediterránea, por lo que constituyen recursos genéticos trucheros valiosos de cara a su conservación y gestión.

4) Un criterio de concordancia entre marcadores genéticos revela que al menos podrían distinguirse dos unidades de conservación operativas de trucha común en Valencia: i) la cuenca del Turia en su tramos altos, que parece mantenerse estable hasta el momento, y que debería preservarse de introgresión deliberada a partir de la muestra de origen centroeuropeo presente en el curso bajo del Turia; ii) las muestras presentes en las dos cuencas de Castellón muestran ciertas similitudes genéticas entre sí e importante diferenciación respecto a las muestras del Turia; pero también presentan un importante grado de diferenciación interpoblacional. Los resultados obtenidos sugieren realizar una gestión que priorice su conservación diferencial en lo posible, ya que mantienen fracciones importantes de diversidad genética específicas de población, que pueden resultar relevantes para garantizar su futuro adaptativo a medio-largo plazo.

5) Las cuatro poblaciones con componente genético autóctono preferente deberían constituir objeto prioritario de conservación, monitorizando su viabilidad en estudios de seguimiento temporal de parámetros poblacionales y genéticos. En particular, tres de ellas con niveles relativamente elevados de diversidad genética, que sugieren su condición genéticamente saludable (VAEB, CSPA, CSVH), merecen un cuidado especial, evitando cualquier otra actuación que no sea la de preservar el hábitat, así como controlar estrictamente la presión de pesca.

6) Alternativamente, si se viesen indicios de amenaza en los últimos reductos de la especie en el área de estudio, se podrían valorar distintas propuestas de gestión para su conservación (Fernández *et al.*, 2004, 2008). Idealmente, se deberían ejecutar: 1) bajo asesoramiento genético, maximizando la diversidad genética, minimizando los cruces consanguíneos y preservando la integridad evolutiva definida por el linaje mitocondrial característico de la región filogeográfica de estudio, tanto AD como ME; y 2) bajo estricto control sanitario, para evitar la introducción de patógenos que pudieran poner en riesgo la viabilidad de las poblaciones. Algunas de las propuestas podrían evaluar la necesidad de introducir niveles de migración residual entre poblaciones de la misma unidad de gestión para incrementar la diversidad genética manteniendo a la vez las características poblacionales específicas y potencial adaptación a condiciones locales propias. Alternativamente, de diseñar supervisadamente prácticas de reproducción asistida a partir de reproductores autóctonos de cada unidad de gestión y/o prácticas de suplementación a partir de familias de juveniles obtenidas en programas de reproducción asistida.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Allendorf F.W., Ryman N. y Utter F. 1987. Genetic and fishery management: past, present and future. En: Population Genetics and Fishery Management. Ryman N. y Utter F. (eds). Washington Sea Grant Program, Washington University Press. Seattle. pp: 1-19.
- Anderson E.C. 2003. NEWHYBRIDS version 1.1 beta. Disponible en: <http://ib.berkeley.edu/labs/slatkin/eriq/software/software.htm>.
- Anderson E.C. y Thompson E.A. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, 160: 1217-1229.
- Apostolidis A., Triantaphyllidis C., Kouvatsi A. y Economidis P.S. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Mol. Ecol.*, 6: 531-542.
- Arias J., Sánchez L. y Martínez P. 1995. Low stocking incidence in brown trout populations from Northwestern Spain monitored by LDH-5* diagnostic marker. *J. Fish Biol.*, 47: 170-176.
- Aurelle D., Cattaneo-Berberi G. y Berberi P. 2002. Natural and artificial secondary contact in brown trout (*Salmo trutta*, L.) in the French western Pyrenees assessed by allozymes and microsatellites. *Heredity*, 89: 171-183.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. y Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bernatchez L. 2001. The evolutionary history of brown trout *Salmo trutta* L. inferred from phylogeographic, nested clade and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55: 351-379.
- Bernatchez L., Guyomard R. y Bonhomme F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Mol. Ecol.*, 1: 161-173.
- Bernatchez L. y Osinov A.G. 1995. Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Mol. Ecol.*, 4: 285-297.
- Bouza C., Arias J., Castro J., Sánchez L. y Martínez P. 1999. Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L., at the southern limit of the distribution range of the anadromous form. *Mol. Ecol.*, 8: 1991-2001.
- Bouza C., Castro J., Sánchez L. y Martínez P. 2001. Allozymic evidence of parapatric differentiation of brown trout (*Salmo trutta* L.) within an Atlantic river basin of the Iberian Peninsula. *Mol. Ecol.*, 10: 1455-1469.
- Bouza C., Vilas R., Castro J. y Martínez P. 2008. Mitochondrial haplotype variability of brown trout populations from Northwestern Iberian Peninsula, a secondary contact area between lineages. *Conserv. Genet.*, 9: 917-920.
- Corander J., Marttinen P., Sirén J. y Tang J. 2007. BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure (version 4.14). Disponible en: <http://web.abo.fi/fak/mnf//mate/jc/software/baps.html>.
- Cornuet J.M. y Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
- Cortey M. y García-Marín J.L. 2002. Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout. *J. Fish Biol.*, 60: 1058-1063.

- Cortey M., Pla C. y García-Marín J-L. 2004. Historical biogeography of Mediterranean trout. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 33: 831-844.
- Crozier W. y Ferguson A. 1986. Electrophoretic examination of the population structure of brown trout, *Salmo trutta* L., from the Lough Neagh catchment, Northern Ireland. *J. Fish Biol.*, 28: 459-477.
- Dodson J.J., Gibson R.J., Cunjak R.A., Friedland K.D., García De Leaniz C., Gross M.R., Newbury R., Nielsen J.L., Power M.E. y Roy S. 1998. Elements in the development of conservation plans for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Aquat. Sci.*, 55: 312-323.
- Elliot J.M. 1989. Wild brown trout *Salmo trutta*: an important national and international resource. *Freshwater Biol.*, 21: 1-5.
- Ferguson A. 1989. Genetic differences among brown trout (*Salmo trutta*) stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater Biol.*, 21: 35-64.
- Fernández J., M.A. Toro y A. Caballero. 2004. Managing individuals' contributions to maximize the allelic diversity maintained in small, conserved populations. *Conserv. Biol.*, 18: 1358-1367
- Fernández J., Toro M. A. y Caballero A. 2008. Management of subdivided populations in conservation programs: development of a novel dynamic system . *Genetics*, 179: 683-692.
- Fontdevila A. y Moya A. 1999. Introducción a la Genética de Poblaciones. Ed. Síntesis. Madrid. 349 pp.
- Frankel O.H. y Soulé M.E. 1981. Conservation and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R. 1995. Conservation genetics. *Ann. Rev. Genet.*, 29: 305-327.
- García-Marín J.L. y C. Pla. 1996. Origins and relationships of native populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Heredity*, 76: 313-323.
- García-Marín J.L., Jorde P.E., Ryman N., Utter F. y Pla C. 1991. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture*, 95: 235-249.
- García-Marín J.L., Utter F.M. y C. Pla. 1999. Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity*, 82: 46-56.
- Garza J.C. y Williamson E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol. Ecol.*, 10: 305-318.
- Giuffra E., Bernatchez L. y Guyomard R. 1994. Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout, *Salmo trutta* from Northern Italy. *Mol. Ecol.*, 3: 161-171.
- Goudet J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.*, 86: 485-486
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponible en: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Guo S.W. y Thompson E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Hansen, M.M. 2002. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: An approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Mol. Ecol.*, 11: 1003-1015.
- Hansen M.M., Loeschcke V., Rasmussen G. y Simonssen V. 1993. Genetic differentiation among Danish brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Hereditas*, 118: 177-185.

- Hansen M.M., Ruzzante D.E., Nielsen E.E. y Mensberg K.L.D. 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Mol. Ecol.*, 9: 583-594.
- Harley E.H. 2001. AGARst. A program for calculating allele frequencies, G_{ST} and R_{ST} from microsatellite data, version 2.0. University of Cape Town, Cape Town.
- Hewitt G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.*, 58: 247-276.
- Hindar K., Ryman N. y Utter F. 1991. Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 945-957.
- Jensen L.F., Hansen M.M., Carlsson J., Loeschcke V. y Mensberg K.L.D. 2005. Spatial and temporal genetic differentiation and effective population size of brown trout (*Salmo trutta*, L.) in small Danish rivers. *Conservation Genetics* 6:615–621.
- Krieg C.B. y Guyomard R. 1985. Population genetics of French brown trout (*Salmo trutta* L.): large geographical differentiation of wild populations and high similarity of domesticated stocks. *Génét. Sél. Evol.* 17: 225-242.
- Laikre L., Antunes A., Alexandrino P., *et al.* 1999. Conservation Genetic Management of Brown Trout (*Salmo trutta*) in Europe. ("TROUTCONCERT": EU FAIR CT97-3882).
- Lande R. 1994. Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. *Evolution*, 48: 1460-1469.
- Lande R. y Barrowclough G.F. 1987. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. En: *Viable Populations for Conservation*, Soulé M.E. ed. Cambridge University Press, Cambridge. pp: 87-123.
- Larkin P.A. 1977. An epitaph for the concept of maximum sustainable yield. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106: 3-11
- Leary R.F., Allendorf F.W. y Knudsen K.L. 1985. Developmental instability as an indicator of reduced genetic variation in hatchery trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 114: 230-235.
- MacCrimmon H.R. 1968. World distribution of brown trout, *Salmo trutta*. *J. Fish. Res. Board*, 25: 2527-2548.
- Machordom A., Suárez J., Almodóvar A., y Bautista J.M. 2000. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations. *Mol. Ecol.* 9: 1325-1339.
- Martínez P., Arias J., Castro J. y Sánchez L. 1993. Differential stocking incidence in brown trout (*Salmo trutta*) populations from northwestern Spain. *Aquaculture*, 114: 203-216.
- Martínez P., Bouza C., Castro J., Hermida M., Pardo B.G. y Sánchez L. 2007. Analysis of a secondary contact between divergent of brown trout (*Salmo trutta*) from Duero basin using microsatellites and mtDNA RFLPs. *J. Fish Biol.*, 71: 195-213.
- McMeel O.M., Hoey E.M. y Ferguson A. 2001. Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1*90 and *100 alleles. *Mol. Ecol.*, 10: 29-34.
- Meffe G.K. 1990. Genetic approaches to conservation of rare fishes: examples from North American desert species. *J. Fish Biol.*, 37: 105-112.
- Morán P., Pendás A.M., García-Vázquez E. e Izquierdo J.I. 1991. Failure of stocking policy of hatchery reared brown trout, *S. trutta* L., in Asturias, Spain, detected using LDH-5* as a genetic marker. *J. Fish Biol.*, 39: 117-122.
- Moritz C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Mol. Ecol.*, 3: 401-411.

- Moritz C., Lavery S. y Slade R. 1995. Using allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 17: 249-262
- Nei M. 1973 Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 3321-3323.
- Nei M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.*, 41: 225-233.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolution Genetics*. Columbia University Press, New York
- Nelson K. y Soulé M. 1987. Genetical conservation of exploited fishes. En: *Population Genetics and Fishery Management*, Ryman N. y Utter F.M. eds. University Press, Seattle, Washington. pp: 345-368.
- Palsbøll P.J., Bérubé M. y Allendorf F.W. 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecol. Evol.*, 22: 11-16.
- Petit R.J., El Mousadik A. y Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv. Biol.*, 12: 844-855.
- Policansky D. y Magnuson J.J. 1998. Genetics, metapopulations, and ecosystem management of fisheries. *Ecol. Appl.* 8 (Supl.): S119-S123.
- Poteaux, C, Bonhomme, F, Berrebi, P. 1999. Microsatellite polymorphism and genetic impact of restocking in Mediterranean brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity*, 82: 645-653.
- Presa P., Pardo., Martínez P. y Bernatchez L. 2002. Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 2161-2175.
- Raymond M. y Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249
- Rice W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Ryman N. 1981. Conservation of genetic resources: Experiences from the brown trout (*Salmo trutta*). *Ecol. Bull.*, 34: 61-74.
- Ryman N. 1983. Patterns of distribution of biochemical genetic variation in Salmonids: differences between species. *Aquaculture*, 33: 1-21.
- Ryman N. 1991. Conservation genetic considerations in fishery management. *J. Fish Biol.* 39: 211-224.
- Ryman N. y Ståhl G. 1980. Genetic changes in hatchery stocks of brown trout (*Salmo trutta*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 82-87.
- Ryman N. y Laikre L. 1991. Effects of supportive breeding on the genetically effective population size. *Conserv. Biol.*, 5: 325-329.
- Ryman N., Utter F. y Laikre L. 1995. Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 5: 417-446.
- Sanz N., García-Marín J.L. y Pla C. 2000. Divergence of brown trout (*Salmo trutta*) within glacial refugia
- Sanz N., García-Marín J.L. y Pla C. 2002. Managing fish populations under mosaic relationships. The case of brown trout (*Salmo trutta*) in peripheral Mediterranean populations. *Conserv. Genet.*, 3: 385-400.. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57: 2201-2210.
- Sanz, N., Cortey M., Pla C. y García-Marín J.L. 2006. Hatchery introgression blurs ancient hybridization between brown trout (*Salmo trutta*) lineages as indicated by complementary allozymes and mtDNA markers. *Biol. Conserv.*, 130: 278-289.
- Skaala O., Dahle G., Jorstad K.E. y Naevdal G. 1990. Interactions between natural and farmed fish populations: information from genetic markers. *J. Fish Biol.*, 36: 449-460.

- Suárez J., Bautista J.M., Almodóvar A. y Machordom A. 2001. Evolution of the mitochondrial control region in Palaeartic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity*, 87: 198-206.
- Utter F. y Ryman N. 1993. Genetic markers and mixed stock fisheries. *Fisheries* (Bethesda) 18: 11-21.
- van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M. y Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*, 4: 535-538.
- Walsh P.S., Metzger D.A. e Higuchi R. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10: 506-513.
- Weir B.S. y Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Weiss S., Antunes A., Schlötterer C. y Alexandrino P. 2000. Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmo trutta* L. populations: relevance to the post-Pleistocene recolonization of northern Europe. *Mol. Ecol.*, 9: 691-698.
- Willis K.J. y Whittaker R. J. 2000. The refugial debate. *Science*, 287: 1406-1407.
- Wright S. 1969. *Evolution and the Genetics of Population*. Vol. II. Chicago University

VII. FIGURAS

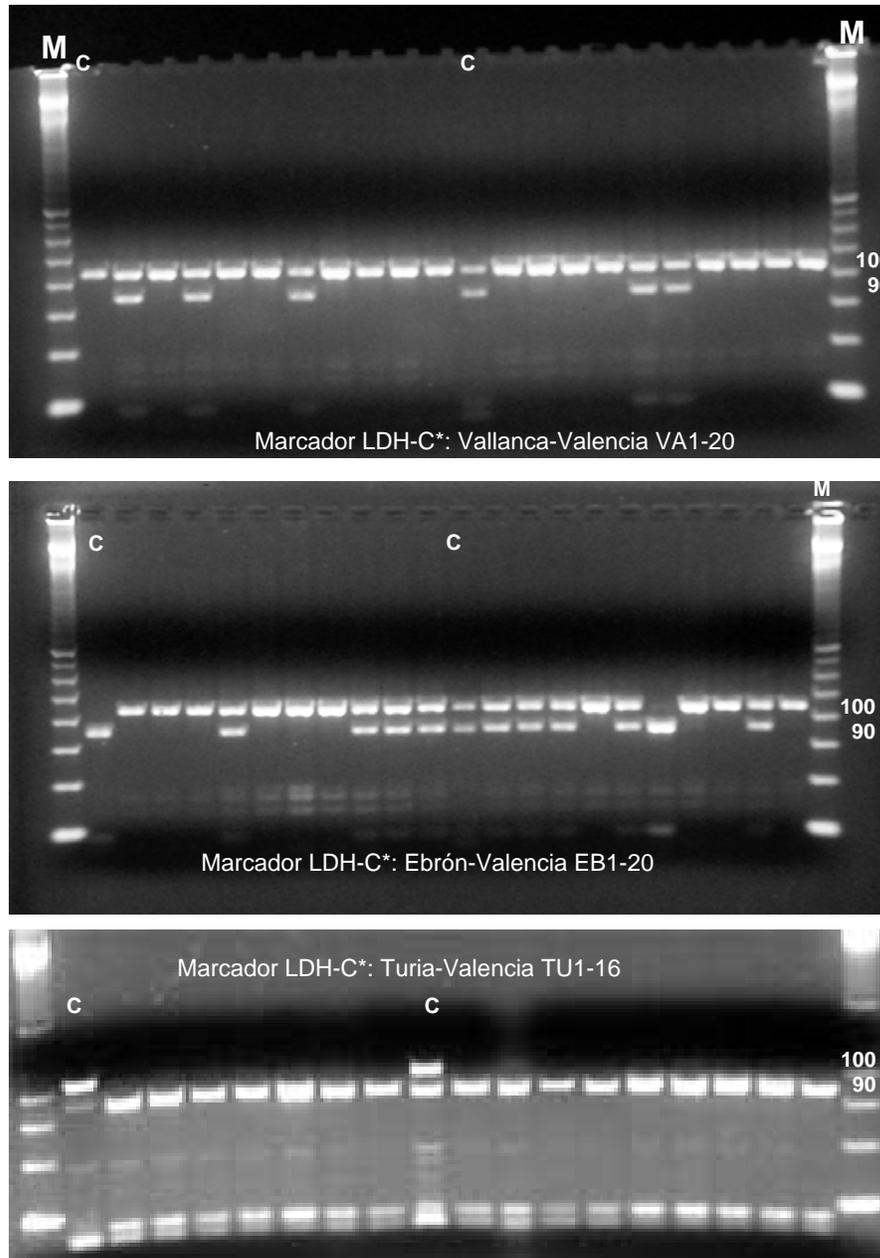


FIGURA 1. Análisis del marcador LDH-C*90, diagnóstico de origen centroeuropeo en poblaciones trucheras procedentes de ríos de Valencia. M: marcador molecular 100 pb ladder. Se han incluido muestras control (C) con genotipos de referencia para el análisis, con una única banda en los homocigotos con 2 alelos iguales (100100; 9090) y dos bandas en los híbridos heterocigóticos correspondientes a los dos alelos *90 y *100.

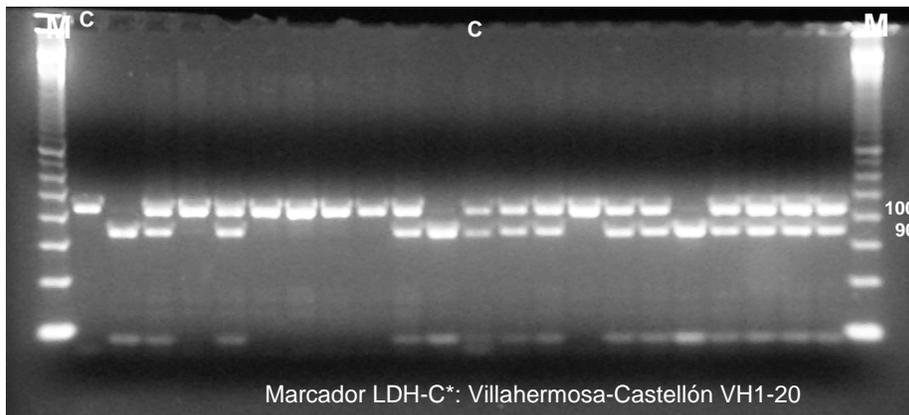
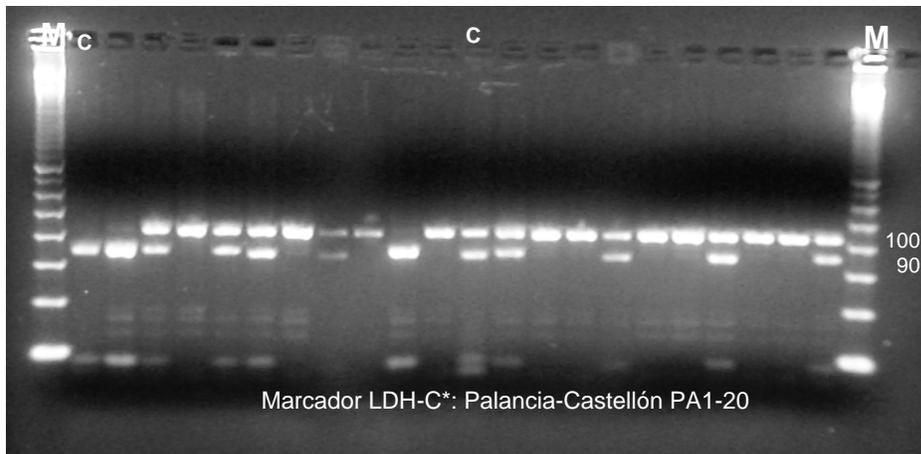


FIGURA 2. Análisis del marcador LDH-C*90, diagnóstico de origen centroeuropeo en muestras de poblaciones trucheras analizadas procedentes de ríos de Castellón. M: marcador molecular 100 pb ladder. Se han incluido muestras control (C) con genotipos de referencia para el análisis, con una única banda en los homocigotos con 2 alelos iguales (9090; 100100) y dos bandas en los híbridos heterocigóticos correspondientes a los dos alelos *90 y *100 (90100).

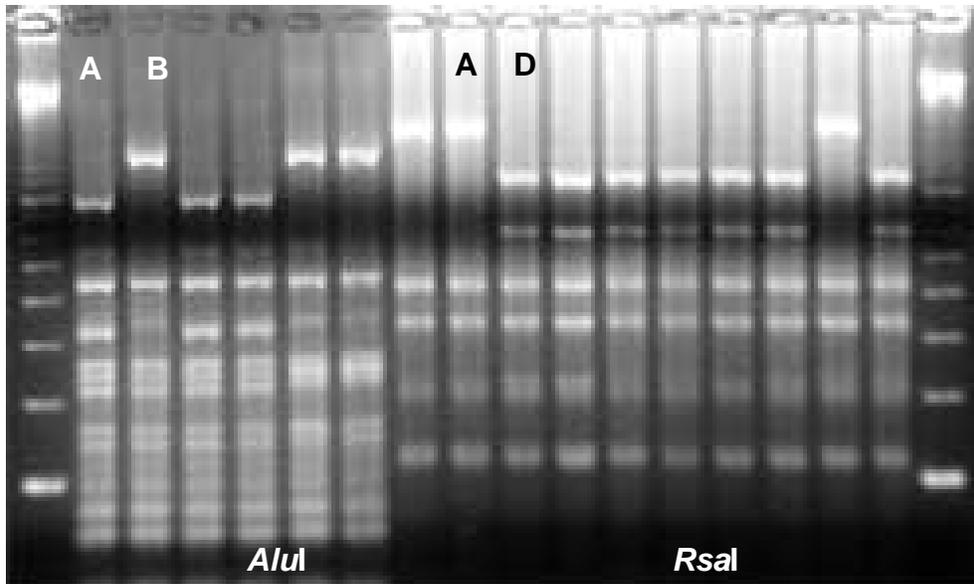


Figura 3A

Haplotipo	1	1	2	3	3	4	5	8	9	9	9	9	9	9	9	9	RFLPs (Fig. 3A)	Número Acceso GeneBank
Linaje																		
AT-hatchery																	AAAAA	
ATcs1	T	G	A	G	C	T	T	C	T	A	C	C	-	T	C	T		AF273086
ATcs2	T	.	.	.	A	-	.	.	.		AF273087
ATcs4	T	.	.	A	A	-	.	.	.		AF274575
ATCS1del	-		Este estudio
Linaje																		
Autóctonos																		
ADcs1	C	.	.	C	T	C	C	T		G	.	.	T	.	.	.	BBCDA	AY836330
MEcs1	C	A	C	.	T	C	C	T	C	G	.	.	-	C	.	.	BBBDA	AY836350

Figura 3 B

FIGURA 3. Análisis del marcador de linaje genético mitocondrial.

A) Análisis del marcador mitocondrial basado en RFLPs según Machordom *et al.* (2000). Se presentan patrones de restricción con 2 de las enzimas analizadas (*AluI* y *RsaI*) diagnóstico de origen Atlántico (AT; *AluI*-A; *RsaI*-A) y Mediterráneo (ME y AD *AluI*-B; *RsaI*-D) en muestras de poblaciones trucheras analizadas procedentes de ríos de Castellón. M: marcador molecular 100 pb ladder.

B) Análisis del marcador mitocondrial basado en secuenciación de la región control. Se presentan los haplotipos detectados en el presente estudio, utilizando la denominación haplotípica descrita en Cortey *et al.* (2004). Se presentan las posiciones variables en la región de control del ADN mitocondrial detectadas en las muestras analizadas. “.” indica posición idéntica respecto a ATcs1. “-” indica delección o *indel* de una base. Se indica también la correspondencia de haplotipos obtenidos mediante RFLPs siguiendo la nomenclatura de Machordom *et al.* (2000)

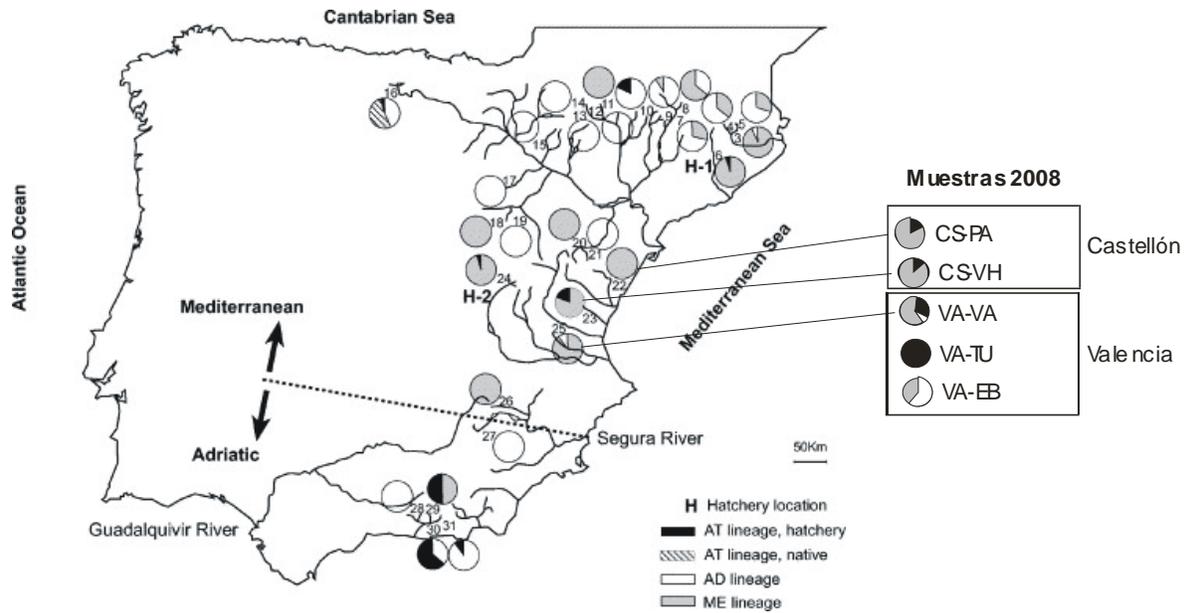


FIGURA 4. Integración de los datos de linaje mitocondrial obtenidos en este estudio (2008) en el contexto filogeográfico del área Mediterránea según el mapa publicado por Cortey *et al.* (2004). Mediante líneas se señalan las correspondencias respecto a 3 muestras comunes con el trabajo previo de 2004 (22-VH, 23-PA, 25-VA).

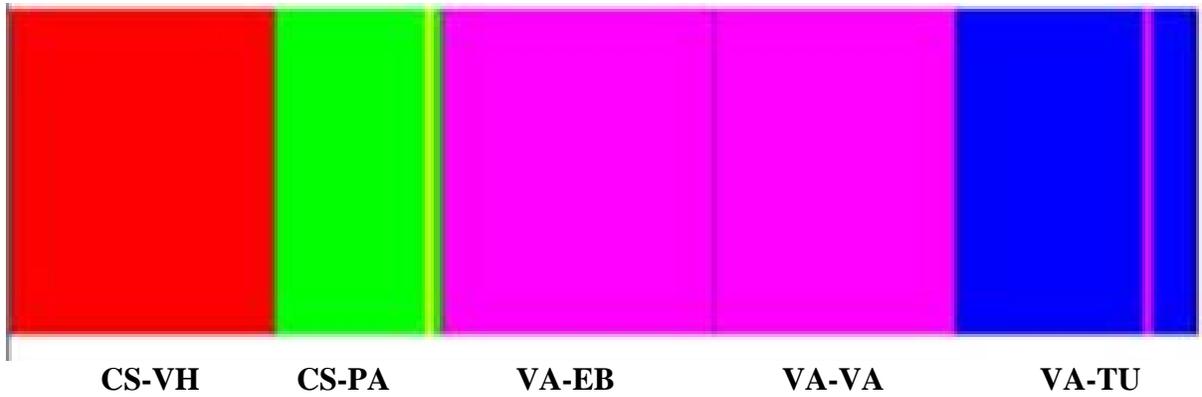


Figura 5A

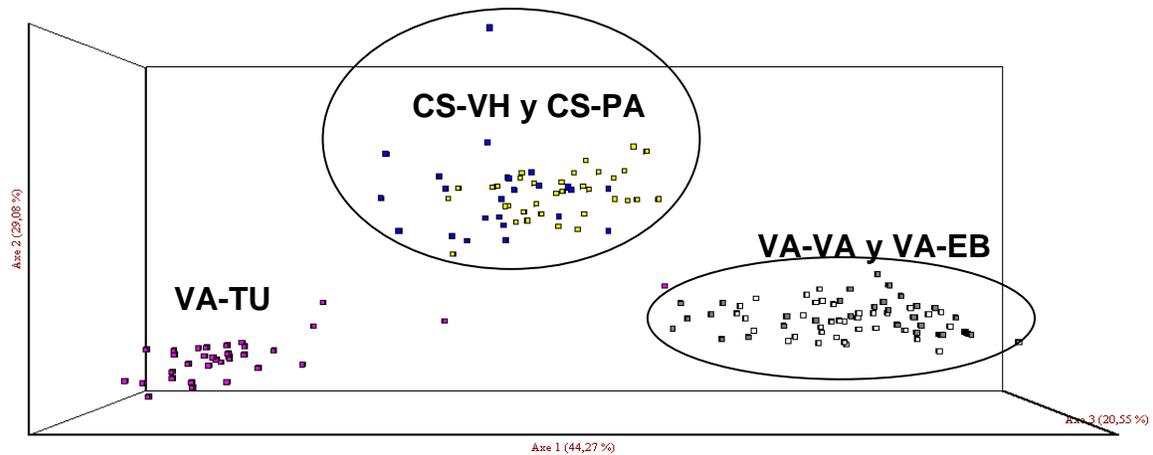


Figura 5B

FIGURA 5. Análisis gráfico de relaciones genéticas interindividuales y poblacionales para el total de cinco muestras trucheras analizadas en la Comunidad de Valencia.

A) Análisis bayesiano mediante el programa BAPs para que marca en colores diferentes grupos de individuos genéticamente compatibles con unidades de apareamiento aleatorio.

B) Análisis factorial discriminante implementado en el programa GENETIX en el que se muestran las relaciones genéticas entre todos los individuos analizados con claves de colores atendiendo al origen muestral. Cada punto representa a cada individuo muestreado en Valencia (rojo: VA-TU; gris: VA-VA; blanco: VA-EB) o en Castellón (azul: CS-VH; amarillo: CS-PA).

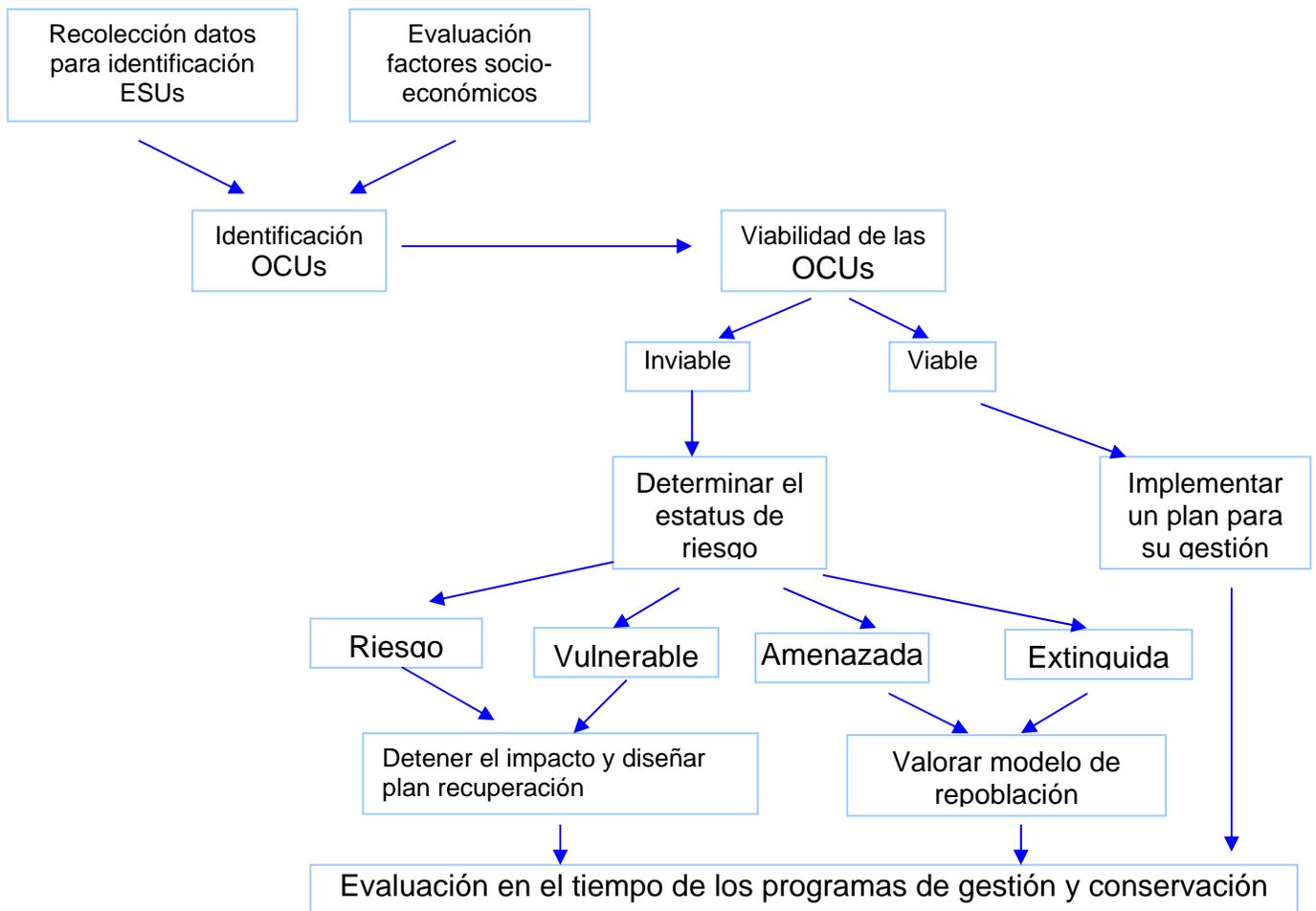


FIGURA 6. Esquema ideal de actuaciones y orientaciones prácticas para la gestión y conservación de recursos genéticos (ESUs: Unidades de significación evolutiva vs. OCUs : Unidades operativas de conservación). Modificado de Laikre et al. (1999).

VIII. TABLAS

TABLA 1. Frecuencias de incidencia de repoblación centroeuropeo y linaje genético mitocondrial (autóctonos del área mediterránea: ME, Mediterráneo y AD, Adriático; AT: haplotipos atlánticos de hatchery de origen centroeuropeo) en cuatro poblaciones de trucha común de la Comunidad de Valencia (VA: Valencia; CS: Castellón) N: Individuos analizados.

Población (N)	LDHC*90 HW	Linaje ADNmt		
		AT “Hatchery”	AD	ME
VA-Ebrón (36)	0,236 NS	-	0,583	0,417
VA-Vallanca (32)	0,094 NS	0,323 ¹	0,098	0,581
VA-Turia (31)	1,0	1,000 ²	-	-
CS-Villahermosa (22)	0,405 NS	0,136 ³	-	0,864
CS-Palancia (35)	0,286 NS	0,200 ⁴	-	0,800

¹ Haplotipo ATcs2 (ver Figura 3B)

² Haplotipo ATcs4 (ver Figura 3B)

³ Haplotipo ATcs1 (ver Figura 3B)

⁴ ATcs1-del, variante haplotípica de ATcs1 (ver Figura 3B)

TABLA 2. Análisis genético en base mediante marcadores microsatélites en las cinco poblaciones de trucha común analizadas de la Comunidad de Valencia (VA: Valencia; CS: Castellón), (N) Individuos analizados.

	Diversidad Genética ¹	HW ₂ global	Desequilibrio ligamiento ³	Hibridación origen Centroeuropeo ⁴
Población (N)	A (error) He (error)		Tests significativos (loci nucleares)	Híbridos 2G (%) H2G ₁₀₀₁₀₀ (%)
VA-Ebrón (36)	5,2 (0,7) 0,52 (0,07)	0,888 ^{NS}	-	-
VA-Vallanca (32)	4,2 (0,4) 0,46 (0,07)	0,620 ^{NS}	1/45 Str15*-Ssa85*	4/32 (12,5%) 3/4 (75%)
VA-Turia (31)	3,6 (0,5) 0,54 (0,06)	0,884 ^{NS}	-	-
CS-Villahermosa (22)	6,0 (0,8) 0,66 (0,05)	0,163 ^{NS}	-	-
CS-Palancia (35)	5,1 (0,7) 0,55 (0,04)	0,481 ^{NS}	-	-
Media / Global	4,8 (0,4) 0,55 (0,03)	-	<i>LDH-C*-Str58*</i>	-

1 Diversidad genética (A: nº medio de alelos y He: heterocigosis esperada).

2 HW-global: Ajuste al equilibrio Hardy-Weinberg (significación y probabilidad global sobre loci).

3 Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci nucleares (microsatélites y *LDH-C**).

4 Hibridación de origen centroeuropeo respecto a un stock de referencia puro (híbridos 2G: de segunda generación o retrocruzamientos, H2G₁₀₀₁₀₀: homocigóticos para *LDHC*100*).

TABLA 3. Estimaciones de diversidad genética y ajuste a las condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) para 10 microsatélites en cinco poblaciones de trucha común de la Comunidad Valenciana. A: n° alelos por locus; He: heterocigosis esperada; HW: Probabilidad del test exacto de ajuste a las condiciones de equilibrio HW; Fis: Índice de fijación (medida y sentido de la desviación respecto a HW). En negrilla: valores significativos respecto a la Hipótesis nula Fis=0.

		CS.PA	CS.VH	VA.EB	VA.VA	VATU
<i>STR15</i>	A	3	5	2	3	3
	He	0,511	0,529	0,297	0,153	0,296
	HW	0,533	0,499	0,553	1,000	1,000
	Fis	+0,049	-0,053	-0,200	-0,056	-0,169
<i>STR58</i>	A	9	11	9	6	7
	He	0,459	0,835	0,589	0,688	0,786
	HW	0,540	0,453	0,637	0,684	0,277
	Fis	+0,004	-0,019	+0,031	+0,046	-0,054
<i>STR60</i>	A	2	3	2	2	2
	He	0,342	0,296	0,056	0,119	0,419
	HW	1,000	0,008	1,000	1,000	0,680
	Fis	-0,089	+0,524	-0,015	-0,051	+0,077
<i>STR73</i>	A	3	4	4	3	3
	He	0,556	0,606	0,459	0,228	0,652
	HW	0,581	0,413	0,348	0,209	0,504
	Fis	+0,075	+0,259	+0,005	+0,042	-0,006
<i>STR85</i>	A	5	7	7	6	4
	He	0,615	0,841	0,754	0,737	0,715
	HW	0,993	0,845	0,675	0,033	0,622
	Fis	-0,102	+0,038	+0,054	+0,208	-0,037
<i>STR543</i>	A	7	10	7	6	4
	He	0,700	0,710	0,502	0,621	0,587
	HW	0,620	0,058	0,231	0,725	0,948
	Fis	+0,033	+0,130	+0,228	+0,045	+0,002
<i>STR591</i>	A	6	6	5	4	2
	He	0,620	0,704	0,608	0,503	0,178
	HW	0,112	0,723	0,434	0,675	1,000
	Fis	-0,201	-0,085	-0,082	+0,132	-0,091
<i>SSA85</i>	A	6	5	5	4	4
	He	0,376	0,646	0,604	0,534	0,593
	HW	0,386	0,179	0,842	0,224	0,077
	Fis	+0,012	+0,152	-0,089	-0,233	+0,186
<i>SSA197</i>	A	5	5	5	4	4
	He	0,666	0,772	0,696	0,577	0,649
	HW	0,895	0,493	0,248	0,732	0,581
	Fis	+0,029	+0,161	+0,194	+0,080	+0,168

Tabla 3. Cont.

		CS.PA	CS.VH	VA.EB	VA.VA	VATU
<i>SSOL438</i>	A	5	4	6	4	3
	He	0,681	0,653	0,618	0,393	0,486
	HW	0,014	1,000	0,989	0,418	0,653
	Fis	+0,090	-0,075	-0,080	+0,092	-0,029

TABLA 4. Valores medios de diversidad por población y probabilidad global de ajuste a HW sobre 10 microsatélites en cinco poblaciones de trucha común de la Comunidad Valenciana.

	CS.PA	CS.VH	VA.EB	VA.VA	VATU
Diversidad genética					
Media A \pm error	5,1 \pm 0,7	6,0 \pm 0,8	5,2 \pm 0,7	4,2 \pm 0,4	3,6 \pm 0,5
Media He \pm error	0,553 \pm 0,040	0,659 \pm 0,051	0,518 \pm 0,065	0,455 \pm 0,070	0,536 \pm 0,060
Equilibrio HW					
P Global HW	0,481	0,163	0,888	0,620	0,884
Media Fis \pm error	-0,010 \pm 0,029	+0,103 \pm 0,059	+0,005 \pm 0,041	+0,031 \pm 0,038	+0,005 \pm 0,035
Reducción de tamaño efectivo (Ne)					
Bottleneck test	-	-	Expansión Reciente	Expansión Reciente	Cuello botella Reciente
M-Value	0,571	0,625	0,593	0,506	0,631

A: nº alelos por locus; He: heterocigosis esperada.

HW: Probabilidad del test exacto de ajuste a las condiciones de equilibrio HW; Fis: Índice de fijación (medida y sentido de la desviación respecto a HW). En negrilla aparecen los valores significativos respecto a la Hipótesis nula Fis=0.

Tests de reducción de tamaño efectivo poblacional: Bottleneck tests (Defecto o exceso de He significativo evidenciaría signos de cuellos de botella o expansión reciente, respectivamente, en la historia poblacional) M-values (valor crítico <0,68: signos de cuellos de botella poblacional).

TABLA 5. Análisis de diversidad genética de poblaciones trucheras analizadas en la Comunidad de Valencia. Para cada locus se presentan las estimas de diversidad genética total (Ht), diversidad genética intrapoblacional (Hs) y componente relativo de diferenciación interpoblacional (Gst).

Locus	Todas poblaciones			Excluyendo VA-TU		
	Hs	Ht	Gst	Hs	Ht	Gst
STR15	0,356	0,561	0,365	0,371	0,418	0,111
STR58	0,671	0,897	0,253	0,642	0,851	0,245
STR60	0,247	0,266	0,072	0,204	0,214	0,050
STR73	0,500	0,585	0,144	0,463	0,493	0,062
STR85	0,733	0,831	0,119	0,737	0,812	0,092
STR543	0,625	0,888	0,296	0,634	0,833	0,239
STR591	0,522	0,818	0,362	0,608	0,850	0,285
SSA85	0,551	0,878	0,373	0,540	0,856	0,370
SSA197	0,673	0,872	0,228	0,679	0,834	0,186
SSOL438	0,566	0,731	0,226	0,586	0,704	0,167
Global	0,544	0,733	0,257	0,546	0,687	0,204

TABLA 6. Valores del componente de diferenciación interpoblacional por pares de poblaciones analizadas en la Comunidad de Valencia y respecto a un stock centroeuropeo puro utilizado como referencia (HBU; datos tomados de Martínez et al, 2008)

	CS.PA	CS.VH	VA.EB	VA.VA	VATU
CS.VH	0,155*				
VA.EB	0,264*	0,209*			
VA.VA	0,271*	0,252*	0,049*		
VATU	0,299*	0,232*	0,364*	0,402*	
HBU	0,265*	0,211*	0,336*	0,373*	0,174*

*P<0,05

IX. APÉNDICES

APÉNDICE I. Marcador *LDH-C**, linaje genético mitocondrial y análisis de componente genético autóctono para las cinco poblaciones de trucha común analizadas en la Comunidad de Valencia. (n.d.): muestras no determinadas por problemas muestrales y/o de resolución técnica.

*LDH-C**: Alelo *90 marcador diagnóstico de repoblación centroeuropea en el Sur de Europa.

Mitocondrial: Análisis de linajes genéticos, (ME y AD): linajes mitocondriales autóctonos del área mediterránea (Mediterráneo y Adriático, respectivamente), (AT-hatchery): linaje mitocondrial característico de stocks domesticados de origen centroeuropeo utilizados para repoblación en España.

Newhybrids: Análisis de hibridación respecto a un stock centroeuropeo puro de referencia, (Nativo>90): Probabilidad de asignación a población parental autóctona superior al 90%, (BC-nativo): máxima probabilidad de asignación a un retrocruzamiento híbrido x nativo; (CE<10%): probabilidad de asignación al stock centroeuropeo de referencia menor al 10%.

RÍOS DE VALENCIA-VALLANCA			
Individuo	Mitocondrial	LDH-C*	Newhybrids
VAVA1	AT hatchery	90100	BC-nativo
VAVA2	ME	100100	nativo >90
VAVA3	ME	90100	nativo >90
VAVA4	AT hatchery	100100	BC-nativo
VAVA5	ME	100100	nativo >90
VAVA6	AT hatchery	90100	nativo >90
VAVA7	ME	100100	nativo >90
VAVA8	ME	100100	nativo >90
VAVA9	AD	100100	nativo >90
VAVA10	AT hatchery	100100	nativo >90
VAVA11	ME	100100	nativo >90
VAVA12	ME	100100	nativo >90
VAVA13	ME	100100	nativo >90
VAVA14	ME	100100	nativo >90
VAVA15	AT hatchery	90100	nativo >90
VAVA16	AT hatchery	90100	nativo >90
VAVA17	ME	100100	nativo >90
VAVA18	AT hatchery	100100	nativo >90
VAVA19	ME	100100	BC-nativo
VAVA20	ME	100100	nativo >90
VAVA21	AT hatchery	100100	nativo >90
VAVA22	ME	100100	nativo >90
VAVA23	AD	100100	nativo >90
VAVA24	ME	100100	BC-nativo
VAVA25	ME	100100	nativo >90
VAVA26	ME	100100	nativo >90
VAVA27	AT hatchery	100100	nativo >90
VAVA28	AT hatchery	90100	nativo >90
VAVA29	ME	100100	nativo >90
VAVA30	ME	100100	nativo >90
VAVA31	AD	100100	nativo >90
VAVA32	nd	100100	nativo >90

Apéndice I.Cont.

RÍOS DE VALENCIA: EBRÓN			
Individuo	Mitocondrial	LDH-C*	Newhybrids
VAEB1	ME	100100	nativo >90
VAEB2	ME	100100	nativo >90
VAEB3	AD	100100	nativo >90
VAEB4	AD	90100	nativo >90
VAEB5	AD	100100	nativo >90
VAEB6	ME	100100	nativo >90
VAEB7	AD	100100	nativo >90
VAEB8	AD	90100	nativo >90
VAEB9	AD	90100	nativo >90
VAEB10	AD	90100	nativo >90
VAEB11	AD	90100	nativo >90
VAEB12	AD	90100	nativo >90
VAEB13	ME	90100	nativo >90
VAEB14	AD	100100	nativo >90
VAEB15	AD	90100	nativo >90
VAEB16	AD	9090	nativo >90
VAEB17	ME	100100	nativo >90
VAEB18	ME	100100	nativo >90
VAEB19	AD	90100	nativo >90
VAEB20	AD	100100	nativo >90
VAEB21	ME	100100	nativo >90
VAEB22	AD	9090	nativo >90
VAEB23	AD	90100	nativo >90
VAEB24	ME	100100	nativo >90
VAEB25	ME	90100	nativo >90
VAEB26	ME	100100	nativo >90
VAEB27	ME	100100	nativo >90
VAEB28	AD	100100	nativo >90
VAEB29	ME	100100	nativo >90
VAEB30	AD	100100	nativo >90
VAEB31	ME	100100	nativo >90
VAEB32	ME	90100	nativo >80
VAEB33	ME	100100	nativo >90
VAEB34	AD	90100	nativo >90
VAEB35	AD	100100	nativo >90
VAEB36	AD	100100	nativo >90

Apéndice I. Cont.

RÍOS DE VALENCIA: TURIA			
Individuo	Mitocondrial	LDH-C*	Newhybrids
VATU 1	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 2	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 3	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 4	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 5	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 6	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 7	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 8	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 9	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 10	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 11	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 12	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 13	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 14	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 15	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 16	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 17	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 18	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 19	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 20	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 21	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 22	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 23	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 24	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 25	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 26	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 27	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 28	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 29	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 30	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 31	AT hatchery	9090	CE <10%
VATU 32	AT hatchery	9090	CE <10%

Apéndice I. Cont.

RÍOS DE CASTELLÓN: VILLAHERMOSA			
Individuo	Mitocondrial	LDH-C*	Newhybrids
CSVH1	AT hatchery	9090	nativo >90
CSVH2	ME	90100	nativo >90
CSVH3	ME	100100	nativo >90
CSVH4	ME	90100	nativo >90
CSVH5	ME	100100	nativo >90
CSVH6	ME	100100	nativo >90
CSVH7	ME	100100	nativo >90
CSVH8	ME	100100	nativo >90
CSVH9	ME	90100	nativo >90
CSVH10	AT hatchery	9090	nativo >90
CSVH11	ME	90100	nativo >90
CSVH12	ME	90100	nativo >90
CSVH13	ME	100100	nativo >90
CSVH14	AT hatchery	90100	nativo >90
CSVH15	ME	90100	nativo >90
CSVH16	ME	9090	nativo >90
CSVH17	ME	90100	nativo >88
CSVH18	ME	90100	nativo >90
CSVH19	ME	90100	nativo >90
CSVH20	ME	90100	nativo >90
CSVH21	ME	nd	nativo >90
CSVH22	ME	100100	nativo >90

Apéndice I. Cont.

RÍOS DE CASTELLÓN: PALANCIA			
Individuo	Mitocondrial	LDH-C*	Newhybrids
CSPA1	ME	9090	nativo >90
CSPA2	AT hatchery	90100	nativo >90
CSPA3	n,d,	100100	nativo >90
CSPA4	ME	90100	nativo >90
CSPA5	ME	90100	nativo >90
CSPA6	ME	100100	nativo >90
CSPA7	ME	90100	nativo >90
CSPA8	AT hatchery	100100	nativo >90
CSPA9	n,d,	9090	nativo >90
CSPA10	n,d,	100100	nativo >90
CSPA11	AT hatchery	90100	nativo >90
CSPA12	n,d,	100100	nativo >90
CSPA13	ME	100100	nativo >90
CSPA14	ME	90100	nativo >90
CSPA15	ME	100100	nativo >90
CSPA16	ME	100100	nativo >90
CSPA17	AT hatchery	90100	nativo >90
CSPA18	NR	100100	nativo >90
CSPA19	AT hatchery	100100	nativo >90
CSPA20	ME	90100	nativo >90
CSPA21	ME	90100	nativo >90
CSPA22	ME	100100	nativo >90
CSPA23	ME	100100	nativo >90
CSPA24	ME	90100	nativo >90
CSPA25	ME	90100	nativo >90
CSPA26	ME	90100	nativo >90
CSPA27	ME	90100	nativo >90
CSPA28	ME	90100	nativo >90
CSPA29	AT hatchery	100100	nativo >90
CSPA30	ME	100100	nativo >90
CSPA31	ME	100100	nativo >90
CSPA32	ME	90100	nativo >90
CSPA33	ME	90100	nativo >90
CSPA34	ME	100100	nativo >90
CSPA35	ME	100100	nativo >90

APÉNDICE II. Genotipos multilocus para 10 microsatélites en poblaciones de trucha común de la Comunidad de Valencia. Los códigos alélicos corresponden al tamaño en pares de bases de los fragmentos de ADN microsatélite analizados. Los genotipos ausentes (000000) se corresponden con muestras que presentaron limitada resolución técnica en uno o varios loci.

	STR15	STR58	STR60	STR73	STR85	STR543	STR591	SSA85	SSA197	SSOL438
RÍOS CASTELLÓN										
POBLACIÓN PALANCIA										
CS.PA01	221225	98132	97101	141141	164176	131169	152182	112112	127139	103103
CS.PA02	221225	160164	97097	141141	000000	127141	152182	112114	127131	99099
CS.PA03	213221	124160	97097	141145	176176	165165	182182	106112	127127	103107
CS.PA04	225225	158160	97097	141145	164176	000000	152152	112112	127139	103103
CS.PA05	221221	160160	97097	141141	170176	123141	152182	110112	127139	000000
CS.PA06	221225	130160	97097	141145	152170	165165	182182	112114	127139	99107
CS.PA07	221225	160160	97097	141145	166176	123165	152182	112112	127131	103107
CS.PA08	225225	124124	97097	141145	176176	141147	152182	112114	139139	103103
CS.PA09	213221	160160	97101	141145	176176	141141	152184	106114	131143	000000
CS.PA10	221225	160160	97101	145147	152176	127141	152182	112112	131139	103107
CS.PA11	225225	160160	97101	147147	152176	127165	152182	112112	131139	103103
CS.PA12	221225	160160	97097	141145	176176	127141	152184	112116	139143	99107
CS.PA13	221221	160160	97097	141141	170176	141165	182182	112112	127139	103105
CS.PA14	225225	160166	97097	141147	170176	000000	152152	112112	139139	103103
CS.PA15	221225	160160	97101	141145	164176	141165	152182	112112	139139	103103
CS.PA16	221221	160160	97097	141141	170170	127127	152182	106120	131139	99101
CS.PA17	221221	126160	97097	145147	170176	141141	152182	112112	139139	99107
CS.PA18	221225	124160	97101	141141	170176	141147	152182	112112	139139	103105
CS.PA19	221221	160160	97097	141147	152176	141141	164182	112114	127131	103103
CS.PA20	221225	160160	97097	141145	164176	141165	152182	112112	127127	103105
CS.PA21	221225	160164	97101	141141	164170	141165	156182	112112	127127	103105
CS.PA22	221221	124160	97101	141147	176176	141141	182184	112116	131139	99099
CS.PA23	225225	160160	97097	141145	176176	000000	152152	112112	127139	103105
CS.PA24	221225	160160	97097	145145	152176	165165	152182	112112	127143	99103
CS.PA25	221221	160164	97097	141145	176176	123141	152182	112112	127139	103107
CS.PA26	221221	160160	97101	145145	176176	141169	152184	112112	127131	99107
CS.PA27	221225	160160	97097	141141	170176	141165	152152	112112	123127	103103
CS.PA28	221221	98160	97101	141141	176176	123165	152182	112114	000000	103105
CS.PA29	221221	124160	97097	000000	152170	141141	168182	112120	139139	107107
CS.PA30	221225	124160	101101	145145	176176	141141	152182	112112	127139	103107
CS.PA31	221225	160160	97101	141141	152176	141165	152182	112120	139143	000000
CS.PA32	221221	160164	97101	141145	170176	141165	152182	112112	139139	103105
CS.PA33	221221	160164	97101	000000	170176	141169	152182	112112	127139	000000
CS.PA34	221221	160160	97097	141141	170176	000000	152152	112112	127127	000000
CS.PA35	213221	160160	97097	141141	166170	141165	184184	112112	139139	000000
POBLACIÓN VILLAHERMOSA										
CS.VH01	000000	98148	000000	149149	164170	165165	172182	114114	131143	99103
CS.VH02	221221	126144	97097	000000	164174	147?	152172	112112	139143	99101
CS.VH03	221223	148158	97097	000000	164174	141165	152182	106114	127139	101107
CS.VH04	221221	130144	97097	141141	152164	147165	168182	112112	139143	99101
CS.VH05	223225	98166	97097	141141	148166	141165	152182	106114	139139	99099
CS.VH06	221225	158158	97097	141147	164166	165165	172172	112112	127139	101103
CS.VH07	221225	158158	97097	141141	166174	141165	172172	106112	127131	99099
CS.VH08	221221	158158	101101	000000	148162	123141	152172	000000	123123	99107
CS.VH09	000000	158160	97097	000000	148164	165165	152172	000000	143143	99101
CS.VH10	221221	000000	97101	000000	152152	165167	172182	106112	123143	99103
CS.VH11	221223	148158	97097	000000	166166	147167	172188	112112	123123	99099

Apéndice II. Genotipos. Cont.

	STR15	STR58	STR60	STR73	STR85	STR543	STR591	SSA85	SSA197	SSOL438
CS.VH12	221221	118158	97097	141147	164166	127151	182184	112112	143143	99103
CS.VH13	225229	158166	97097	141145	148164	165165	152184	106112	131143	99099
CS.VH14	221227	158160	97097	141141	152166	123125	172172	112114	123127	99107
CS.VH15	221221	144146	97097	000000	152170	165165	152172	106114	123127	99101
CS.VH16	221223	148182	97097	147147	166170	147165	172172	112114	143143	000000
CS.VH17	000000	144146	97097	000000	170170	165165	152152	106112	127143	101101
CS.VH18	221223	148158	97101	000000	166170	165165	172182	112116	000000	99107
CS.VH19	221221	144148	97097	000000	148152	149165	152172	112112	123139	99101
CS.VH20	221223	158182	97101	141147	166166	125165	172182	116116	143143	101107
CS.VH21	000000	000000	107107	000000	000000	121121	000000	110112	000000	000000
CS.VH22	221221	148160	97097	141149	148152	123141	152172	112112	127143	99099

RÍOS DE VALENCIA

POBLACIÓN EBRÓN

VA.EB01	000000	158158	97097	141145	152176	141165	188188	110114	000000	000000
VA.EB02	000000	158158	97097	141147	166166	139139	186188	108110	000000	000000
VA.EB03	221221	144158	97097	141141	166176	139139	184188	110116	119127	99103
VA.EB04	221223	98166	97097	141145	152166	125141	174188	108116	119131	103105
VA.EB05	221221	98158	97097	141145	152166	141141	184186	110110	119119	103109
VA.EB06	221223	158158	97101	141141	164166	139139	184188	110110	119119	103105
VA.EB07	221221	158158	97097	141141	166166	139139	184186	110110	127127	103151
VA.EB08	221223	128144	97097	141141	160170	139139	152188	000000	119127	103103
VA.EB09	221223	158164	97097	141141	166176	139139	000000	108108	119119	000000
VA.EB10	221221	158166	97097	141141	164176	139139	188188	108116	119119	103105
VA.EB11	221223	158158	97097	141141	160176	141141	186188	108116	131139	99099
VA.EB12	221223	128158	97097	141141	170176	139141	152188	108110	127127	99103
VA.EB13	221223	116158	97097	141145	166176	125139	184186	108110	119135	99103
VA.EB14	221221	158158	97097	141147	166176	139139	184186	110110	127127	000000
VA.EB15	221221	158158	97097	141141	176176	139139	152188	108110	127127	99103
VA.EB16	221221	164166	97097	141141	176176	141141	152188	110110	119127	99103
VA.EB17	221221	158158	97097	141141	152164	139139	184188	108110	119119	99103
VA.EB18	221221	98158	97097	141141	170174	139139	184188	108110	127139	99103
VA.EB19	221223	128158	97097	141141	160176	139139	152188	108108	127127	103103
VA.EB20	221223	158158	97097	141145	164176	139139	188188	110110	127135	103103
VA.EB21	221223	158158	97097	141145	152152	139141	188188	108110	119127	99105
VA.EB22	221221	158164	97097	141141	176176	139141	152188	110116	119131	000000
VA.EB23	221221	164166	97097	141141	164176	139139	152188	110116	127127	103107
VA.EB24	221221	128158	97097	141147	152176	139139	186188	108110	127135	103103
VA.EB25	221221	98158	97097	145147	164176	139139	186188	110110	119131	99099
VA.EB26	221221	158164	97097	145145	166176	139161	188188	110110	119131	99099
VA.EB27	221221	158158	97097	141147	164166	139139	186186	110110	135139	99103
VA.EB28	221221	158168	97097	141147	166170	139147	188188	106110	119139	99103
VA.EB29	221221	158158	97097	141147	152176	125141	188188	108110	119119	103103
VA.EB30	221221	98158	97097	141141	152176	139165	186188	108116	119127	99103
VA.EB31	221221	158158	97097	143147	152176	139141	188188	108110	119119	103103
VA.EB32	221223	112158	97101	141141	152152	123139	188188	110110	119119	103107
VA.EB33	000000	000000	000000	000000	000000	139139	186188	108110	127131	103103
VA.EB34	221221	144158	97097	141147	176176	139147	188188	106108	127139	99103
VA.EB35	000000	164164	97097	141141	176176	139141	188188	108110	000000	000000
VA.EB36	000000	158158	97097	141147	176176	139139	186188	108110	000000	99107

Apéndice II. Genotipos. Cont.

	STR15	STR58	STR60	STR73	STR85	STR543	STR591	SSA85	SSA197	SSOL438
POBLACIÓN VALLANCA										
VA.VA01	221225	116158	97101	141145	170176	123139	152188	106108	119131	99103
VA.VA02	221221	144144	97097	141141	176176	139141	186188	108108	127139	103103
VA.VA03	221221	98158	97097	141141	164176	141141	152152	106110	119127	99099
VA.VA04	221225	146158	97097	141141	164174	139145	152186	110116	119119	103103
VA.VA05	221221	144158	97097	141141	176176	139141	174188	108110	119139	103103
VA.VA06	221221	98158	97101	141145	152164	123139	152188	108110	127139	103107
VA.VA07	221221	144158	97097	141141	176176	139139	188188	108110	119119	103103
VA.VA08	221221	158160	97097	141145	164166	139141	152188	108108	119127	103103
VA.VA09	221221	158160	97097	141141	164176	141165	188188	108108	119127	103103
VA.VA10	221221	116144	97097	141141	164174	139141	152188	108110	119119	103103
VA.VA11	221221	158158	97097	141141	152176	141141	188188	108108	119139	103103
VA.VA12	221221	144158	97097	141141	176176	139139	188188	108110	127139	99103
VA.VA13	221221	144158	97097	141141	176176	139139	186188	108110	119119	103103
VA.VA14	221221	158158	97097	141141	176176	139141	188188	108108	119119	99103
VA.VA15	221225	98158	97097	141145	152166	139141	152188	106108	119119	000000
VA.VA16	221221	116158	97097	141141	000000	123141	188188	108110	119139	103107
VA.VA17	211221	158158	97097	141141	176176	139139	186186	106108	119127	103103
VA.VA18	221221	98158	97101	141141	152166	123141	188188	106108	119127	103103
VA.VA19	221221	98144	97097	141147	170176	139141	186188	106108	119119	101103
VA.VA20	221221	158158	97097	141141	176176	139139	186188	108108	119119	103103
VA.VA21	221221	116158	97097	141141	152166	123141	152188	108108	127127	103103
VA.VA22	221221	144144	97097	141141	164176	141141	188188	108108	119119	103103
VA.VA23	221221	158160	97097	141141	166176	141141	188188	108110	119127	000000
VA.VA24	221221	98098	97097	141141	170170	139139	152188	108108	127131	99101
VA.VA25	221221	158158	97097	141141	166176	139147	152152	106108	127127	000000
VA.VA26	000000	158158	97097	141141	166176	139139	188188	108110	119127	99103
VA.VA27	221225	98158	97097	141145	152152	139141	152188	106108	119127	103107
VA.VA28	221221	98158	97101	141141	152152	123141	188188	108108	119127	103103
VA.VA29	221221	144158	97097	145147	000000	139139	188188	108110	127127	103103
VA.VA30	221221	144158	97097	141141	164176	139139	188188	108108	119119	99103
VA.VA31	221221	144144	97097	141141	000000	139141	188188	108110	119119	000000
VA.VA32	221221	144144	97097	141141	164164	139141	188188	108110	119119	103103
POBLACIÓN TURIA										
VATU.01	225225	124130	97097	141147	152152	125147	152152	114114	131143	99099
VATU.02	221225	98130	97097	145147	160170	147147	152154	106106	135135	99107
VATU.03	221225	124124	97101	145145	152170	125147	152152	116116	135135	000000
VATU.04	225225	98130	97101	145147	160176	125147	152152	106114	135135	99107
VATU.05	225225	98124	97101	141147	160176	125125	152152	106114	143143	99099
VATU.06	221225	124150	000000	141145	152160	147147	152152	106114	143143	99101
VATU.07	225225	124130	97101	147147	152170	125125	152152	106106	135135	99099
VATU.08	225225	98124	101101	145147	160170	147147	152152	114114	131135	99099
VATU.09	225225	98110	97097	145147	152152	125147	152152	106106	139143	99099
VATU.10	221225	98110	97101	147147	000000	125125	152154	106106	135143	99099
VATU.11	225225	98146	97101	147147	152160	123147	152152	106116	135143	99107
VATU.12	221225	98130	97097	141147	160170	147147	152152	106114	143143	107107
VATU.13	225225	98130	97101	141141	160160	125147	152152	106114	143143	99107
VATU.14	225225	124124	97097	141147	152176	125125	152152	114114	131135	99107
VATU.15	000000	000000	97101	000000	000000	000000	152154	106114	000000	99107
VATU.16	000000	000000	97097	000000	000000	000000	152152	106114	000000	000000

Apéndice II. Genotipos. Cont.

	STR15	STR58	STR60	STR73	STR85	STR543	STR591	SSA85	SSA197	SSOL438
VATU.17	221225	98130	97097	141147	152170	125147	152154	106114	135135	99099
VATU.18	225225	110124	97101	145147	152176	125147	152152	106114	131143	99099
VATU.19	225225	98124	97097	145145	170176	123147	152152	106112	135139	99107
VATU.20	000000	000000	97097	000000	000000	000000	152152	116116	000000	000000
VATU.21	221225	98130	97097	141145	160176	125147	152152	106106	143143	99107
VATU.22	221225	98112	97097	141147	160176	125147	152152	106116	135143	99101
VATU.23	225227	124124	97101	145145	152152	125147	152152	106106	000000	99107
VATU.24	221225	98124	97101	145147	152160	147147	152152	106106	000000	99101
VATU.25	225225	98130	97101	141147	152176	125125	152154	106106	135143	99099
VATU.26	000000	000000	97097	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000
VATU.27	225225	124124	101101	145147	000000	125145	152154	106112	000000	99099
VATU.28	225225	110130	97097	147147	152152	125147	152152	114114	000000	99099
VATU.29	225225	124146	97097	141147	160170	125125	152152	106116	135139	107107
VATU.30	225225	130146	101101	147147	152152	125125	152152	106106	135143	99099
VATU.31	225225	146146	97097	145147	152152	125147	152152	106106	135139	99101
VATU.32	225225	98146	97097	141141	152160	123125	152152	106114	135135	99101

APÉNDICE III. Frecuencias alélicas para 10 loci microsátélites en poblaciones de trucha común de la Comunidad Valenciana. Se incluye como referencia los datos de una línea domesticada de origen centroeuropeo puro (tomados de Martínez *et al.* 2007). En negrita se señalan alelos potencialmente diagnóstico parcial de origen centroeuropeo.

	CS.PA	CS.VH	VA.EB	VA.VA	VATU	HBU		CS.PA	CS.VH	VA.EB	VA.VA	VATU	HBU
<i>STR15</i>	35	18	31	31	29	54	<i>STR543</i>	31	21	36	32	29	55
211	-	-	-	0,016	-	-	121	-	0,048	-	-	-	-
213	0,043	-	-	-	-	-	123	0,065	0,071	0,014	0,094	0,052	0,127
219	-	-	-	-	-	0,130	125	-	0,048	0,042	-	0,483	0,109
221	0,614	0,667	0,823	0,919	0,155	0,083	127	0,097	0,024	-	-	-	0,191
223	-	0,167	0,177	-	-	0,620	131	0,016	-	-	-	-	-
225	0,343	0,111	-	0,065	0,828	0,167	139	-	-	0,681	0,500	-	-
227	-	0,028	-	-	0,017	-	141	0,468	0,119	0,194	0,359	-	0,136
229	-	0,028	-	-	-	-	145	-	-	-	0,016	0,034	-
<i>STR58</i>	35	20	35	32	29	55	147	0,032	0,071	0,028	0,016	0,431	0,173
98	0,029	0,050	0,071	0,141	0,293	0,118	149	-	0,024	-	-	-	0,036
106	-	-	-	-	-	0,045	151	-	0,024	-	-	-	0,073
110	-	-	-	-	0,069	0,036	161	-	-	0,014	-	-	0,109
112	-	-	0,014	-	0,017	0,018	165	0,274	0,524	0,028	0,016	-	-
116	-	-	0,014	0,063	-	0,018	167	-	0,048	-	-	-	0,009
118	-	0,025	-	-	-	-	169	0,048	-	-	-	-	0,036
120	-	-	-	-	-	0,009	<i>STR591</i>	35	21	35	32	31	55
124	0,100	-	-	-	0,293	0,309	152	0,457	0,262	0,100	0,203	0,903	0,909
126	0,014	0,025	-	-	-	0,027	154	-	-	-	-	0,097	0,091
127	-	-	-	-	-	0,009	156	0,014	-	-	-	-	-
128	-	-	0,057	-	-	0,073	164	0,014	-	-	-	-	-
130	0,014	0,025	-	-	0,190	0,009	168	0,014	0,024	-	-	-	-
132	0,014	-	-	-	-	0,100	172	-	0,452	-	-	-	-
144	-	0,125	0,043	0,250	-	-	174	-	-	0,014	0,016	-	-
146	-	0,050	-	0,016	0,121	0,109	182	0,414	0,190	-	-	-	-
148	-	0,175	-	-	-	-	184	0,086	0,048	0,114	-	-	-
150	-	-	-	-	0,017	0,009	186	-	-	0,186	0,109	-	-
158	0,014	0,350	0,629	0,484	-	-	188	-	0,024	0,586	0,672	-	-
160	0,729	0,075	-	0,047	-	-	<i>SSA85</i>	35	20	35	32	31	53
164	0,071	-	0,100	-	-	-	106	0,043	0,175	0,029	0,125	0,565	0,113
166	0,014	0,050	0,057	-	-	-	108	-	-	0,314	0,641	-	-
168	-	-	0,014	-	-	-	110	0,014	0,025	0,543	0,219	-	-
176	-	-	-	-	-	0,109	112	0,786	0,550	-	-	0,032	0,292
182	-	0,050	-	-	-	-	114	0,086	0,175	0,014	-	0,290	0,330
<i>STR60</i>	35	21	35	32	31	55	116	0,029	0,075	0,100	0,016	0,113	0,132
97	0,786	0,833	0,971	0,938	0,710	0,691	118	-	-	-	-	-	0,132
101	0,214	0,119	0,029	0,063	0,290	0,309	120	0,043	-	-	-	-	-
107	-	0,048	-	-	-	-	<i>SSA197</i>	34	20	32	32	24	55
<i>STR73</i>	33	11	35	32	29	55	119	-	-	0,422	0,578	-	-
141	0,591	0,591	0,714	0,875	0,259	0,073	123	0,015	0,200	-	-	-	-
143	-	-	0,014	-	-	-	127	0,338	0,175	0,344	0,297	-	-
145	0,303	0,045	0,129	0,094	0,276	0,309	131	0,132	0,075	0,094	0,031	0,083	0,055
147	0,106	0,227	0,143	0,031	0,466	0,618	135	-	-	0,063	-	0,458	0,473
149	-	0,136	-	-	-	-	139	0,456	0,175	0,078	0,094	0,083	0,136
							143	0,059	0,375	-	-	0,375	0,136
							147	-	-	-	-	-	0,182
							151	-	-	-	-	-	0,018

Apéndice III. Cont. Frecuencias Alélicas.

	CS.PA	CS.VH	VA.EB	VA.VA	VATU	HBU		CS.PA	CS.VH	VA.EB	VA.VA	VATU	HBU
<i>STR85</i>	34	21	35	29	27	55	<i>SSOL438</i>	29	20	30	28	28	55
148	-	0,143	-	-	-	-	99	0,172	0,525	0,317	0,143	0,679	0,164
150	-	-	-	-	-	0,409	101	0,017	0,250	-	0,036	0,089	0,618
152	0,103	0,167	0,171	0,155	0,426	-	103	0,500	0,100	0,533	0,768	-	0,027
160	-	-	0,043	-	0,259	0,045	105	0,121	-	0,067	-	-	-
162	-	0,024	-	-	-	0,055	107	0,190	0,125	0,050	0,054	0,232	0,191
164	0,074	0,190	0,100	0,172	-	-	109	-	-	0,017	-	-	-
166	0,029	0,262	0,200	0,121	-	-	151	-	-	0,017	-	-	-
170	0,221	0,143	0,057	0,069	0,167	0,282							
174	-	0,071	0,014	0,034	-	0,109							
176	0,574	-	0,414	0,448	0,148	0,082							
178	-	-	-	-	-	0,018							