

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. de BIOLOGÍA ANIMAL I



**EVOLUCIÓN Y MODELOS DE REPRODUCCIÓN
EN UN ORGANISMO UNISEXUAL DE LA
PENÍNSULA IBÉRICA: EL COMPLEJO
*TROPIDOPHOXINELLUS ALBURNOIDES***

JOSE AMBROSIO GONZÁLEZ CARMONA
Madrid, 1997

21.575

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. de BIOLOGÍA ANIMAL I

MEMORIA que para optar al grado de DOCTOR en CIENCIAS BIOLÓGICAS presenta JOSE AMBROSIO GONZÁLEZ CARMONA, bajo la dirección del Dr. IGNACIO DOADRIO VILLAREJO, Colaborador Científico del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC).

EVOLUCIÓN Y MODELOS DE REPRODUCCIÓN
EN UN ORGANISMO UNISEXUAL DE LA
PENÍNSULA IBÉRICA: EL COMPLEJO
TROPIDOPHOXINELLUS ALBURNOIDES

El Doctorando



Fdo. Jose Ambrosio González Carmona

Vº Bº

El Director de la Tesis



Fdo. Ignacio Doadrio Villarejo

Madrid, 1997

A mis Padres

A Paquitina y Enrique

AGRADECIMIENTOS

Se suele incluir en este apartado a todas aquellas personas que de una forma u otra han colaborado para que este estudio salga adelante, pero si yo las nombrase a todas este manuscrito no sería encuadernable. Nombraré sólo a las que en este momento me vienen a la memoria pero con la certeza de que las que se me olviden estarán bien escritas en mi.

Del mismo modo, se suele comenzar dando las gracias al director, pero yo quiero empezar dándoselas al amigo. En la formación de un científico la formación humana ha de constituir una parte muy importante, y en este sentido, el Dr. Ignacio Doadrio ha sabido educarme dentro de unos valores sólidos de generosidad, esfuerzo y honradez que han sido los pilares para una enseñanza científica, no menos sólida, basada en el altruismo, la perseverancia y el rigor. En compensación, se que se conformaría con que yo supiese transmitir a los demás su pasión por la naturaleza.

Inevitablemente le toca a Anabel, con quien más tiempo he pasado durante los últimos seis años y con quien compito en admiración por Nacho. Su calidad humana ha sido determinante para una perfecta convivencia y su competencia y esfuerzo personal han sido un ejemplo a seguir en los momentos de entropía por los que uno pasa. Espero no tener que echarla nunca de menos.

Tampoco me puedo olvidar de Annie Machordom, quien siempre ha tenido tiempo para escucharme y aconsejarme, y a quien le debo mis primeros pasos en la electroforesis de proteínas. Siempre mantendré que es una profesora de universidad desperdiciada.

Otros compañeros dentro del grupo peces han aportado esfuerzo y amistad por lo que he de mencionar a Juan Cubo, Antonio Corcuera, Peña Casado, Luis de Ambrosio, Jaime Domínguez, Gloria Rosas, Charo Gavilanes y Emilio Martínez.

Por supuesto, agradezco los consejos y el ánimo de muchos de mis compañeros del Museo quienes siempre me acogieron con mucho cariño. De entre ellos agradezco a Begoña Arano y Pilar Herrero sus comentarios sobre el problema de la hibridogénesis, y a David y Pp por estar siempre ahí.

Han colaborado de forma muy activa Emilia, Toñi, Lourdes y M^a Angeles quienes me han aliviado mucho el trabajo durante las electroforesis y Luis Boto me resolvió muchas papeletas.

EL Pr. Borja Sanchiz y el Dr. Benigno Elvira también me han atendido siempre y se han interesado por las distintas fases de mi trabajo animándome finalmente a concluir esta Tesis.

Fuera de España, agradezco el tratamiento y las facilidades ofrecidas por el Pr. Pannos Economidis para la obtención del material griego analizado en este trabajo.

Durante mis estancias en el Centro de Genética Teórica y Aplicada de la Universidad de Rutgers en Nueva Jersey tuve la oportunidad de trabajar con dos científicos de primer orden, el Dr. Robert Vrijenhoek y su becaria Oris Sanjur con quienes también mantengo una estrecha amistad. Su colaboración en esta Tesis ha sido crucial dada su experiencia sobre organismos unisexuales. Su colaboración ha permitido encender algunas luces sobre la problemática del complejo que nos ocupa.

Del mismo modo, los Drs. Rodulio Caudales, Robert Dawley y Kathryn Goddard me pusieron en contacto con la citometría de flujo facilitándome el trabajo con la determinación de las ploidías. Oris Sanjur y Cecilio Puga, además, cuidaron de mi en las lejanas tierras de ultramar.

Debo recordar a mis nuevos compañeros del Dpto. de Biología Animal, Vegetal y Ecología de la Universidad de Jaén con quienes ya estoy cuajando una buena amistad y quienes en todo momento se han brindado para ayudarme a culminar este trabajo. De ellos destaco al Dr. Isidoro Ruiz, mi compañero, y al Dr. Joaquín Muñoz-Cobo, mi mejor profesor, quien fue el primero en ponerme en

contacto con los peces y quien tuvo la brillante idea de mandarme con personas igualmente brillantes.

Agradezco a la Comunidad de Madrid el apoyo institucional en forma de Beca Predoctoral y las sucesivas ayudas para estancias en el extranjero que han permitido desarrollar el trabajo con garantías.

Mis padres y mis hermanos han apostado y se han sacrificado por mi. Sin ellos no hubiese hecho nada y espero que algún día se sientan orgullosos de este esfuerzo.

El último reconocimiento se lo reservo a Paquitina, mi mujer, quien seguramente siente esta Tesis tan suya como la siento yo. No sólo ha padecido las ausencias y las esperas, y ha cargado con el trabajo sucio, sino que ha participado de forma activa en el campo y en el laboratorio, por lo que después de Nacho es la persona que más ha contribuido en este trabajo. Sin ella, tampoco se podría haber realizado esta Tesis.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| El fenómeno de la unisexualidad | 2 |
| La especie | 9 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 14 |
| Material | 14 |
| Métodos | 25 |
| 1. Métodos citogenéticos | 25 |
| 1.1. Cariotipado | 26 |
| 1.1.1. Principios generales y utilidad | 26 |
| 1.1.2. Protocolo | 26 |
| 1.2. Citometría de flujo | 29 |
| 1.2.1. Principios generales y utilidad | 29 |
| 1.2.2. Protocolo | 30 |
| 2. Métodos moleculares | 33 |
| 2.1. Electroforesis de proteínas | 33 |
| 2.1.1. Principios generales y utilidad | 33 |
| 2.1.2. Protocolo | 36 |
| 2.2. Polimorfismo del ADN mitocondrial | 39 |
| 2.2.1. Principios generales y utilidad | 39 |
| 2.2.2. Extracción de ADN total | 43 |
| 2.2.2.1. Protocolo | 44 |
| 2.2.3. Amplificación del citocromo b del ADN mitocondrial | 46 |
| 2.2.3.1. Protocolo | 48 |
| 2.2.4. Digestión del citocromo b con enzimas de restricción | 50 |
| 2.2.4.1. Protocolo | 50 |
| 3. Tratamiento de los datos | 52 |
| 3.1. Cálculo del contenido de ADN celular con citometría de flujo | 52 |
| 3.2. Variabilidad intrapoblacional | 52 |
| 3.2.1. Aloenzimas | 52 |
| 3.2.2. ADN mitocondrial | 55 |
| 3.3. Variabilidad intrapoblacional | 55 |
| 3.3.1. Aloenzimas | 55 |
| 3.3.2. ADN mitocondrial | 57 |
| 3.4. Reconstrucciones filogenéticas | 59 |
| 3.4.1. Distancias genéticas | 59 |
| 3.4.2. Datos cualitativos | 61 |

| | |
|---|-----|
| RESULTADOS | 65 |
| 1. El complejo <i>T. alburnoides</i> | 65 |
| 1.1. Análisis de la ploidía y de la proporción de sexos | 65 |
| 1.2. Análisis poblacional mediante electroforesis de proteínas | 75 |
| 1.2.1. La población del río Águeda | 77 |
| 1.2.2. Patrones de dosis genética | 80 |
| 2. Las especies parentales | 82 |
| 2.1. Las especies del río Águeda | 82 |
| 2.2. Análisis aloenzimático de las poblaciones ibéricas del género <i>Leuciscus</i> | 85 |
| 2.3. Las especies griegas | 89 |
| 2.4. Análisis aloenzimático de distintos ciprínidos ibéricos | 101 |
| 2.5. Análisis aloenzimático en distintas poblaciones del complejo <i>T. alburnoides</i> | 105 |
| 2.5.1. La población del río Estena | 106 |
| 3. Modos de reproducción | 110 |
| 4. Análisis del citocromo b del ADN mitocondrial | 113 |
| 4.1. Análisis de haplotipos | 113 |
| 4.2. Divergencias nucleotídicas | 116 |
| 4.3. Análisis filogenético basado en ADN mitocondrial | 117 |
| DISCUSIÓN | 119 |
| 1. Estructura poblacional | 119 |
| 1.1. Sexos | 119 |
| 1.2. Ploidía | 121 |
| 1.2.1. Contenido de ADN | 124 |
| 2. El origen híbrido de <i>T. alburnoides</i> | 126 |
| 2.1. Dosis genéticas y poliploides | 130 |
| 3. Búsqueda de las especies parentales | 134 |
| 3.1. La especie paterna | 134 |
| 3.1.1. El género <i>Leuciscus</i> de la Península Ibérica | 135 |
| 3.1.2. El género <i>Leuciscus</i> en Europa | 136 |
| 3.1.3. El género <i>Tropidophoxinellus</i> | 138 |
| 3.2 La especie materna | 140 |
| 4. La hibridogénesis | 142 |
| 5. El análisis del ADN mitocondrial | 146 |
| CONCLUSIONES | 149 |
| BIBLIOGRAFÍA | 152 |

INTRODUCCIÓN

El fenómeno de la hibridación es bastante común en la naturaleza y aunque parece que está mucho más extendido en plantas, llegando algunas revisiones a recoger más de veintitrés mil casos de híbridos interespecíficos e intergenéricos (Knobloch, 1972), también es un hecho bastante frecuente en distintos taxones animales (Harrison, 1993).

Dentro de los vertebrados es en los peces donde aparece con más frecuencia el fenómeno de la hibridación, así, Schwartz (1972, 1981) recoge una lista con 3759 referencias en las que se muestran casos de hibridación natural y artificial. Pero, dentro de los peces, el grupo en el que más comúnmente se da la hibridación de forma natural es en la familia Cyprinidae (Collares-Pereira, 1989; Purdom, 1993).

No está claro porqué la hibridación es más frecuente en ciprínidos, ni siquiera en peces dentro de los vertebrados, aunque no hay que olvidar que la reproducción externa, con toda probabilidad, va a suponer un menor obstáculo a la hibridación que la reproducción interna.

De cualquier modo, parece ser que entre especies originadas como consecuencia de un fenómeno de vicarianza la evolución constante y en alopatria, traerá como resultado un proceso de divergencia en muchos caracteres. Sin embargo, los mecanismos de aislamiento reproductivo, normalmente, no van a sufrir una presión de selección considerable en alopatria por lo que pueden retenerse inalterados. Por tanto, se podría mantener la compatibilidad fisiológica y citogenética para la realización de cruces reproductivos entre especies o taxa que poseen un período de divergencia evolutiva considerable (Buth *et al.*, 1993).

Parece claro que, al menos en ciertos grupos, la capacidad de producción de híbridos naturales es alta. Por el contrario, esta hibridación suele estar limitada a la generación F_1 , debido a serias anomalías durante la etapa de desarrollo que producirán la inviabilidad de los híbridos o a la imposibilidad de superar la barrera de la infertilidad.

Sin embargo, en vertebrados inferiores se han detectado ciertas poblaciones de híbridos en los que se encuentran generaciones mucho más allá de F_1 , con individuos perfectamente viables y que además utilizan mecanismos reproductivos que les permiten mantener estas poblaciones considerablemente estables. Se trata de los denominados vertebrados unisexuales o biotipos unisexuales.

La importancia de estos organismos en biología es básica. Mediante el estudio de lo que consideramos anormal en la naturaleza podemos comprender mejor, aunque sea de forma indirecta, lo que es normal o lo que consideramos típico. Los vertebrados unisexuales son indudablemente atípicos (al menos en el contexto de los vertebrados) y por tanto inherentemente interesantes para la ciencia, pero además, son modelos de estudio inmejorables para conocer respuestas básicas en evolución y ecología (Vrijenhoek, 1994).

El fenómeno de la unisexualidad

Los vertebrados unisexuales son relativamente nuevos para la ciencia. El primero en ser descubierto fue un pez, *Poecilia formosa* y en él se detectó un mecanismo modificado de partenogénesis para la reproducción (Hubbs & Hubbs, 1932).

En la actualidad se han reconocido aproximadamente 70 biotipos unisexuales de peces, anfibios y reptiles (Dawley, 1989; Vrijenhoek *et al.* 1989), aunque con toda probabilidad siempre consideraremos a los vertebrados

unisexuales como meras anécdotas comparados con el número total de especies de vertebrados (Moore, 1984; Vrijenhoek *et al.* 1989). Sin embargo, la propia naturaleza de estos organismos nos sugiere que seguramente existen muchos más ejemplos esperando ser descubiertos (Turner, 1982).

La mayoría de estos biotipos (64%) son poliploides ($3n$ ó $4n$), y en esencia todos parecen haber surgido como híbridos interraciales o interespecíficos. A estas dos características básicas se les unen otras dos igualmente definitorias: estos biotipos están constituidos por poblaciones en las que prácticamente todos los individuos son hembras (de ahí el nombre de vertebrados unisexuales) y se reproducen mediante un mecanismo gametogénico aberrante (bien premeiótico o meiótico) que inhibe la recombinación genética y produce una herencia genética clonal. Estas cuatro características están muy relacionadas entre sí, encontrándose como factor de unión entre ellas el fenómeno de la hibridación (Dawley, 1989).

La esterilidad normalmente asociada a la hibridación supone una gran presión de selección para cualquier organismo que retenga la producción de huevos y retenga o restaure la diploidía (Schultz, 1969; White, 1978). En aquellos casos en los que se mantiene tanto la viabilidad de los individuos híbridos como su fertilidad, aparece una reproducción basada sólo en hembras ya que parece que se incrementan las ventajas demográficas y por ello se verá favorecido este mecanismo de “rescate” de la ovogénesis, que además, parece fijarse a corto plazo (Moritz *et al.*, 1989; Vrijenhoek, 1989). Por tanto no sorprende que hayan aparecido a modo de convergencia distintos modos de reproducción entre los vertebrados unisexuales (partenogénesis, ginogénesis e hibridogénesis) y que los mecanismos citogénéticos en que se basan cada uno de estos modos de reproducción puedan no tener mucha relación entre sí (revisiones de Cuellar, 1974; Dawley, 1989).

La “hipótesis de la balanza” (Moritz *et al.*, 1989) supone que los organismos bisexuales pueden acumular mutaciones de poco efecto en genes que regulan la ovogénesis y que estos genes no se expresan a un nivel significativo en ellos. Sin embargo, cuando se combina el genoma de dos especies en un híbrido, estas mutaciones pueden expresarse y suponer una modificación importante en la ovogénesis, como consecuencia de la alteración de la meiosis, que supondría la aparición de una cierta proporción de ovocitos de ploidía no reducida.

La proporción de estos ovocitos de ploidía no reducida va a depender de la divergencia que se haya acumulado entre las especies parentales, en los genes responsables del control de la meiosis. Paralelamente, la divergencia también podría acumularse en genes reguladores de otros aspectos de la gametogénesis o del desarrollo por lo que el exceso de divergencia incidiría negativamente sobre la fecundidad, sobre la viabilidad de los híbridos o sobre ambas. Los dos efectos combinados delimitan un margen estrecho en el que dos especies bisexuales divergentes pueden cruzarse produciendo híbridos unisexuales viables. Las especies que hibridan deben ser lo suficientemente diferentes como para que se altere la meiosis pero no demasiado a fin de que el desarrollo embrionario y la fertilidad no se alteren. Es, por tanto, “muy difícil llegar a ser un vertebrado unisexual” (Vrijenhoek, 1989).

Modos de reproducción unisexuales

De los tres modos de reproducción mencionados la **partenogénesis** es la más simple (Figura 1). Las hembras híbridas partenogénéticas producen huevos sin recombinación genética ni reducción en la ploidía. De esta forma los huevos diploides pasan a la fase de desarrollo larvario sin que además haya habido intervención de esperma alguno. La descendencia estará compuesta de individuos genéticamente idénticos a su progenitor (clones).

En la **ginogénesis** ocurre un fenómeno similar al visto, sin embargo los huevos no reducidos que producen las hembras híbridas necesitan de la estimulación de espermatozoides de una especie próxima para que se inicie la embriogénesis. No existe singamia o fusión de los núcleos del espermatozoide y ovocito, y normalmente el contacto del espermatozoide con la corteza del ovocito es suficiente para desencadenar el desarrollo larvario. De nuevo, la descendencia será genéticamente idéntica a la madre progenitora.

En la **hibridogénesis** aparecen algunas características típicas de la reproducción sexual ya que en este caso las hembras híbridas sí producen ovocitos haploides que serán fecundados por esperma. Sin embargo, pero estos ovocitos haploides están constituidos por el genoma procedente de una sola de las especies parentales, y siempre la misma, que originaron al híbrido y que es transmitido al ovocito sin recombinación. El genoma procedente del otro parental es desechado durante la ovogénesis (previo o durante la meiosis). El ovocito es posteriormente fertilizado por esperma de la especie cuyo genoma fue desechado, restaurándose de nuevo la condición híbrida de la descendencia. Por tanto un genoma es heredado clonalmente y el otro sexualmente, por lo que también se conoce a los organismos hibridogénéticos como hemiclones (Vrijenhoek *et al.*, 1977) (Fig. 1).

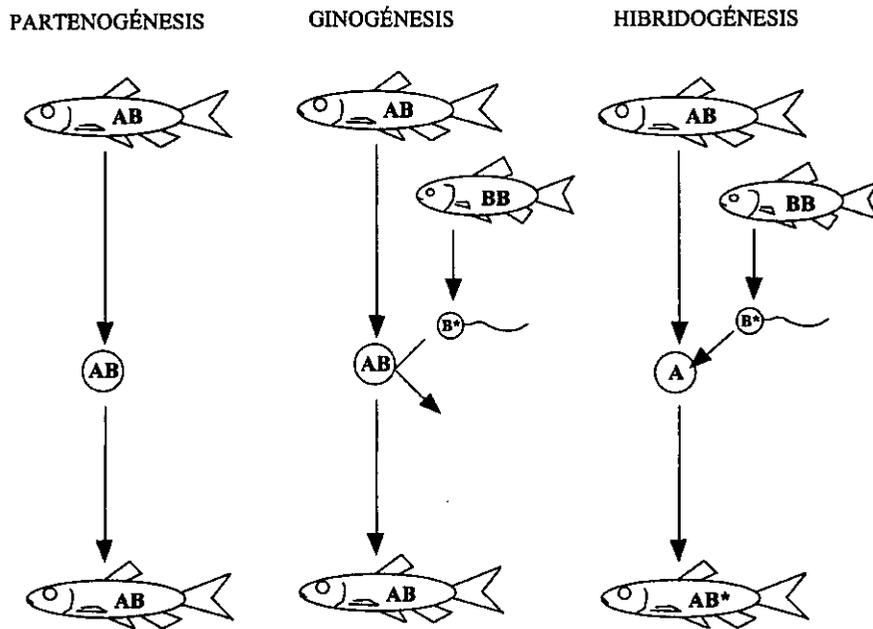


Fig. 1. Modos de reproducción en organismos unisexuales.

Base citogenética y molecular

En cuanto a los mecanismos citogenéticos referidos anteriormente y que se encuentran en la base de los modos de reproducción descritos (partenogénesis, ginogénesis e hibridogénesis) los mejor conocidos son los de apomixis, endomitosis premeiótica y exclusión genómica (Dawley, 1989). Básicamente consisten en mecanismos gametogénéticos aberrantes en los que se evita la recombinación genética (función principal de la reproducción sexual). Este fenómeno se produce a través de la eliminación de la singamia o fusión de los pronúcleos del espermatozoide y del ovocito, el sobrecruzamiento entre fragmentos de los cromosomas homólogos durante la profase de meiosis I y la

segregación al azar de éstos hacia los dos polos de la célula en división durante la metafase de meiosis I.

El mecanismo de **apomixis** consiste básicamente en la sustitución de la meiosis por una mitosis simple como mecanismo para la formación de ovocitos. De esta forma no queda lugar para el sobrecruzamiento entre cromosomas y su posterior segregación al azar. Los ovocitos producidos de esta forma tendrán la misma ploidía y el mismo genotipo que las células somáticas y podrán desarrollarse hacia un individuo adulto sin el concurso de un espermatozoide (partenogénesis) o únicamente con la estimulación de éste (ginogénesis).

El mecanismo de **endomitosis premeiótica** provoca una mitosis, antes de la meiosis, en la que no se produce la fase de carioquinesis o de citoquinesis. Esto supone una duplicación en el número de cromosomas del ovocito antes del comienzo de la fase de meiosis I, agrupándose los cromosomas idénticos por parejas (bivalentes). El resto de las fases de la meiosis se completan normalmente pero dado que el sobrecruzamiento entre cromosomas idénticos (en caso de darse) y la segregación entre cromosomas idénticos no tiene ninguna repercusión en cuanto a aumento de variación genética el resultado es similar al del mecanismo de apomixis: producción de ovocitos idénticos entre sí y con respecto a cualquier célula somática de la madre y que darán lugar a individuos adultos sin una fusión previa con el pronúcleo de un espermatozoide.

La **exclusión genómica** sí produce, por el contrario, ovocitos con una reducción cromosómica como en la reproducción sexual, y al igual que en ésta se efectúa una auténtica fusión de los pronúcleos del ovocito y espermatozoide. Sin embargo, mediante este mecanismo se produce la eliminación del genoma completo proveniente de una de las dos especies que hibridaron originando al biotipo unisexual. El genoma que permanece es el que pasará a los ovocitos y estos necesitarán de su fusión con un espermatozoide para comenzar su desarrollo

embrionario. Es, pues, el mecanismo base de la hibridogénesis (Cimino, 1972; Graf & Müller, 1979; Tunner & Heppich, 1981; Graf & Polls-Pelaz, 1989).

Diversidad genética

Aunque, como hemos visto, en una herencia hemiclonal hay una puerta abierta a la diversidad genética no debemos pensar que en la herencia clonal esta puerta está cerrada ya que, de hecho, se encuentran múltiples clones, genéticamente distintos, dentro de un biotipo unisexual (revisiones en: Parker, 1979; Moore, 1984; Cuellar, 1977).

La diversidad clonal se origina fundamentalmente durante el proceso o procesos de hibridación iniciales entre las dos especies bisexuales que van a originar a los individuos híbridos y posteriormente se puede ampliar gracias a fenómenos de mutación y a recombinaciones puntuales entre los dos genomas híbridos (Parker *et al.*, 1989). Teniendo en cuenta que las hembras híbridas F_1 proceden de cruces entre dos especies de reproducción sexual, cada una de estas hembras híbridas será genéticamente diferente y estas diferencias pasarán a su descendencia clonal. Los clones procedentes del mismo fenómeno de hibridación serán genéticamente idénticos mientras que los que proceden de distintas hibridaciones son distintos ya que el fenómeno de la hibridación “congela” en cada hembra híbrida una muestra de la diversidad genética encontrada en las especies parentales, que será desde entonces perpetuada sin cambios (a excepción de las mutaciones) por la reproducción clonal o hemiclonal (Schultz, 1977; Vrijenhoek, 1979, 1984a, 1984b).

Poliploidía

Al combinarse dos genomas procedentes de dos especies distintas se inclina el *sex-ratio* de los individuos híbridos hacia las hembras y se altera la gametogénesis hasta el punto de que las hembras híbridas producen huevos en los que no se ha producido una recombinación genética y, a menudo, tampoco una reducción en la ploidía. La producción de estos huevos no haploides va a significar un aumento en la ploidía si se produce la incorporación en el ovocito de espermatozoides procedente de un macho de una especie relacionada.

En algunos casos bien estudiados referentes a peces y reptiles (*Lacertidae*), la poliploidización se originó como consecuencia de la adición de un tercer genoma en el híbrido diploide asexual (Desmore *et al.*, 1989; Quattro *et al.*, 1992b). Además, se conocen muchos trihíbridos asexuales triploides (tres razas o especies están involucradas) (Dessauer & Cole, 1989; Lowcock *et al.*, 1987; Schultz, 1977; Turner *et al.*, 1983). Sin embargo, esto no ocurre en el origen de muchos insectos unisexuales en los que se ha demostrado la existencia de una partenogénesis espontánea sin la existencia de hibridación (Soumalainen *et al.*, 1987).

La especie

Pocas especies, al menos dentro de la familia Cyprinidae, han tenido tantos problemas para su situación taxonómica como *Tropidophoxinellus alburnoides* (Steindachner, 1866), y es que los estudios basados en su morfología y osteología empleados hasta ahora han discrepado en el género al que debía adscribirse la especie.

Originalmente fue descrita por Steindachner (1866) como *Leuciscus (Leucos) alburnoides* a partir de poblaciones colectadas en las cuencas del Guadalquivir (Sevilla, Écija, Córdoba y Alcalá de Guadaíra) y del Guadiana

(Mértola, Mérida). Esta posición dentro del género *Leuciscus* Cuvier, 1817 fue seguida ampliamente por distintos autores (Günther, 1868; Capello, 1880; Seeley, 1886; Osório, 1888; Vieira, 1898; Seabra, 1911; Lozano-Rey, 1919; De Buen, 1930; Nobre, 1932 y 1935) hasta que Berg (1932) la reconsideró, pasando a situar esta especie en el género *Rutilus* Rafinesque, 1820. A pesar de que Berg no aporta en su trabajo los motivos que le inducen a esta reclasificación, el cambio es adoptado por la generalidad de los autores (Lozano-Rey, 1935; De Buen, 1935/1936; Helling, 1943; Medrano-Sanz, 1944; Albuquerque, 1954/1956; Banarescu, 1964; Daget, 1968; Banarescu *et al.*, 1971). Sin embargo, ya Lozano-Rey (1947) se cuestiona la oportunidad de la inclusión de la especie en el género *Rutilus* tras compararlo con otras especies ibéricas del género, pero no va a ser modificada esta posición taxonómica hasta que Stephanidis (1974) revisa la especie y propone su inclusión en un nuevo género, al que llamará *Tropidophoxinellus*, en el que también situará a otros dos taxones griegos hasta entonces nominados como *Rutilus spartiaticus* Stephanidis, 1971 y *R. alburnoides hellenicus* Stephanidis, 1939.

Inicialmente Almaça (1976, 1978) y con posterioridad la gran mayoría de los ictiólogos españoles (Elvira, 1987, 1990 y 1995; Doadrio, 1988; Doadrio *et al.*, 1991; Herrera, 1991; Fernández-Delgado & Herrera, 1994; Peris *et al.*, 1994; Velasco, 1995) aceptan en sus trabajos la nominación de la especie como *Tropidophoxinellus alburnoides*. Otros autores, sin embargo, no consideran la adscripción al nuevo género (Ladiges, 1978), aunque sólo Collares-Pereira (1984) argumenta que en la especie ibérica no está presente uno de los caracteres definitorios del género *Tropidophoxinellus* como es la presencia de una quilla sin escamas entre la aleta ventral y la papila urogenital. Finalmente Lelek (1980) considera a la especie dentro del género *Pararutilus* Bonaparte, 1845.

En la actualidad la polémica sigue abierta, pero nuevos datos citogenéticos y de su estructura poblacional (Collares-Pereira, 1983, 1984, 1985) nos llevan a

abordar la problemática desde otro punto de vista mucho más interesante ya que tras la controversia sobre su ubicuidad taxonómica puede encontrarse un origen híbrido interespecífico o intergenérico para algunas formas dentro de la especie. En base a esta posibilidad, Collares-Pereira (1984, 1985, 1987, 1989) utiliza la denominación de “complejo de *Rutilus alburnoides*”. En el presente estudio, y a la espera de los resultados moleculares, hemos preferido mantener inicialmente la denominación de *T. alburnoides* por ser la consensuada por la mayoría de los autores españoles (ICONA, 1986)

Tropidophoxinellus alburnoides contiene formas diploides ($2n=50$) y triploides ($3n=75$) dentro de una misma población (Collares-Pereira, 1984; Lobillo *et al.*, 1989; Fernández-Delgado & Herrera, 1994; Peris *et al.*, 1994), e incluso se ha llegado a hipotetizar la presencia de formas tetraploides (Collares-Pereira, 1985). La proporción de diploides y triploides cambia entre poblaciones de distintos ríos, pero la presencia de un mayor número de individuos triploides (entre el 70% y el 80%) suele ser más frecuente (Collares-Pereira, 1983, 1985, 1987; Lobillo *et al.*, 1989).

A esto hay que añadir que el *sex-ratio* encontrado por diferentes autores en poblaciones naturales está muy desequilibrado a favor de las hembras (entre 16:1 y 30:1) frente a los machos (Collares-Pereira, 1983; Fernández-Delgado & Herrera, 1994; Peris *et al.*, 1994).

Dado que los individuos triploides son prácticamente todas hembras, se ha hipotetizado un modo de reproducción asexual (Collares-Pereira, 1989) para parte de la población de *T. alburnoides*. Aunque se desconoce cuál es el mecanismo usado para esta reproducción, se ha apuntado la posibilidad de que se trate de un fenómeno de ginogénesis. El resto de los individuos tendrían una reproducción sexual normal. Ambas subpoblaciones podrían ser discriminadas en base a ligeras diferencias a nivel morfológico (Collares-Pereira, 1983, 1984), si bien éstas no son demasiado acusadas.

Miembros del complejo *T. alburnoides* hibridan con especies del género *Leuciscus* (Collares-Pereira, 1989) y de forma mucho más esporádica con especies del género *Chondrostoma* y *Anaocypris* habiéndose detectado algún ejemplar con morfología intermedia entre *T. alburnoides* y *Ch. polylepis duriensis* en el río Águeda (Velasco, 1994) y *T. alburnoides* x *Ch. polylepis polylepis* en el río Almonte (datos sin publicar).

Sin embargo, entre los distintos modelos hipotetizados para explicar el origen de algunos triploides no aparece claro el papel de la hibridación, por lo que si se confirmase un origen no híbrido para algunas de estas formas poliploides, el complejo *T. alburnoides* sería un caso extremadamente raro, por definición, dentro de los vertebrados unisexuales (Dawley, 1989).

Objetivos

Nuestro propósito es el de determinar el origen, las relaciones evolutivas, y los modos de reproducción, de las formas diploides y triploides de *T. alburnoides*. Usaremos para ello técnicas citogenéticas con el fin de delimitar qué individuos presentan poliploidía y comprobar el alcance de ésta en las poblaciones naturales. Además, se han utilizado diferentes técnicas moleculares como electroforesis de proteínas y análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen del Citocromo *b* del ADN mitocondrial para estudiar el fenómeno de la hibridación.

Partiendo de esta intención, los objetivos del presente estudio consistieron en conocer:

1.- Si nos encontramos ante un nuevo caso dentro de los vertebrados unisexuales

a) analizando la proporción de sexos

- b) analizando la proporción de individuos poliploides
- c) analizando los patrones genotípicos de los individuos en busca de loci fijados en heterocigosis

2.- Las especies parentales implicadas en el fenómeno, caracterizando genéticamente a las poblaciones potencialmente implicadas

- a) comparando los loci marcadores encontrados entre las especies parentales potenciales con los que aparecen fijados en heterocigosis en los individuos híbridos
- b) identificando el parental materno mediante genes de herencia materna

3.- El origen de las formas poliploides determinando el mecanismo molecular que facilitó el establecimiento de poliploidías

4.- El modo de reproducción empleado por los organismos híbridos

- a) analizando la variabilidad genética de los individuos híbridos
- b) determinando el genotipo de los ovocitos maduros en hembras híbridas

5.- El alcance del fenómeno de la hibridación

- a) estudiando la proporción de sexos y de individuos poliploides en poblaciones de distintas cuencas hidrográficas
- b) estudiando el genotipo de poblaciones localizadas en otras cuencas hidrográficas

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

La captura de los ejemplares necesarios para el presente estudio se realizó mediante un motor de pesca eléctrica. Además, se evitan sesgos hacia las tallas mayores que podrían falsear las proporciones de sexos y ploidías, como suele ocurrir con otras artes de pesca más selectivas. Siempre se trabajó con intensidades de corriente suficientemente pequeña como para evitar mortandades innecesarias en las poblaciones.

La nomenclatura que se utilizó para designar los distintos taxones es la empleada por Doadrio *et al.* (1991). Como ya se ha argumentado en el capítulo anterior se mantuvo la denominación genérica de *Tropidophoxinellus* para la especie que estamos estudiando. Debido a que no distinguimos a priori los supuestos individuos híbridos de los bisexuales introducimos el término “*complejo*” siguiendo a otros autores como Collares-Pereira (1985).

El material se ha dividido según los objetivos para los que se ha empleado. Debido a la gran cantidad de material empleado y a su diversa procedencia, y dado que todos los ejemplares no se han estudiado con las mismas técnicas y para resolver las mismas cuestiones, hemos creído más lógico enumerar dicho.

1.- Material para el análisis de la poliploidía y de la proporción de sexos

Se recolectaron ejemplares del complejo *T. alburnoides* en varias cuencas hidrográficas en la Península Ibérica, transportándose vivos al Museo Nacional de Ciencias Naturales donde fueron sexados tras su anestesiado y disección.

Las localidades y el número de ejemplares utilizados aparecen en la Tabla 1 y su distribución viene recogida en la Figura 2.

Tabla 1.- Poblaciones de complejo *T. alburnoides* empleados para el estudio de la ploidía y de la proporción de sexos. (n) representa el número de individuos analizados.

| Río | Cuenca | Localidad | n | Fecha |
|----------|--------------|---------------------------------|----|------------|
| Águeda | Duero | La Fregeneda (Salamanca) | 33 | 17-11-1992 |
| Árrago | Tajo | Cadalso de Gata (Cáceres) | 65 | 17-11-1992 |
| Almonte | Tajo | Jaraicejo (Cáceres) | 39 | 2-12-1992 |
| Tiétar | Tajo | Iglesuela (Toledo) | 23 | 13-12-1992 |
| Alburrel | Tajo | Valencia de Alcántara (Cáceres) | 16 | 1-12-1992 |
| Estena | Guadiana | Navas de Estena (Ciudad Real) | 41 | 22-5-1995 |
| Gévora | Guadiana | Alburquerque (Badajoz) | 23 | 1-12-1992 |
| Rumblar | Guadalquivir | El Centenillo (Jaén) | 16 | 13-11-1993 |

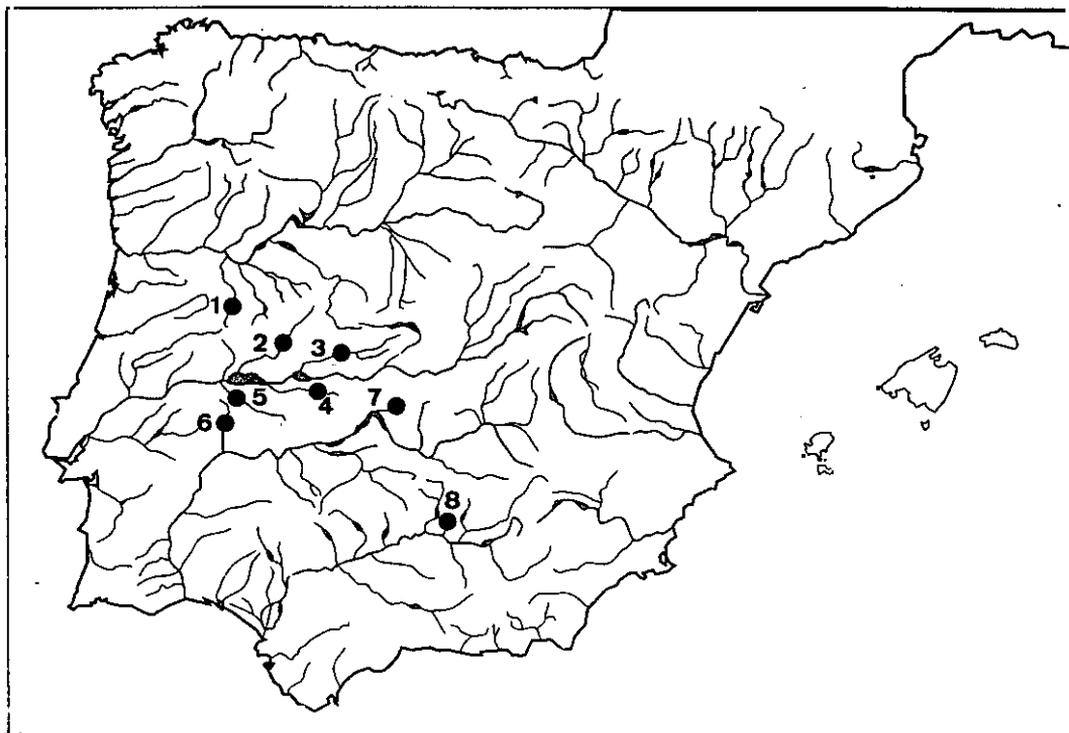


Fig. 2. Mapa con las poblaciones analizadas de *T. alburnoides*. 1. Río Águeda. 2. Río Árrago. 3. Río Tiétar. 4. Río Almonte. 5. Río Alburrel. 6. Río Gévora. 7. Río Estena. 8. Río Rumblar.

2.- Material para el análisis de la hibridación

Una vez comprobada la extensión del fenómeno de la poliploidía por las distintas cuencas hidrográficas que comprenden el rango de distribución del complejo, se decidió elegir una de las poblaciones ya muestreadas para, con un número más elevado de individuos, profundizar en el análisis de la hibridación mediante electroforesis de proteínas.

Enfocamos nuestro mayor esfuerzo en capturar ejemplares del río Águeda, un afluente de la cuenca del Duero, situado en el límite norte del rango de distribución del complejo *T. alburnoides*. Así, a los 33 individuos previamente capturados en el Águeda y ya analizados se le añadieron 200 ejemplares más que se capturaron con pesca eléctrica en campañas sucesivas en el mismo punto de muestreo (La Fregeneda, Salamanca). Las fechas de las capturas fueron:

4-3-1994, 28 ejemplares (22 de ellos utilizados en los estudios cariológicos).

8-4-1994, 49 ejemplares (40 de ellos utilizados en los estudios cariológicos).

14-5-1994, 43 ejemplares (37 de ellos utilizados en los estudios cariológicos).

18-6-1994, 52 ejemplares.

29-6-1994, 28 ejemplares.

La totalidad de los 233 individuos fueron sexados en el laboratorio, pero debido a su gran número se seleccionaron 132 de ellos (casi todos los machos y un número amplio de hembras que fueron elegidas al azar) a los que se les estudió la ploidía y se analizaron mediante electroforesis de proteínas. La selección de los machos se debió a que ellos potencialmente pertenecerían a la especie bisexual que teníamos que caracterizar.

3.- Material para el análisis de las especies parentales

Para determinar la especie/especies que pudiesen estar implicadas en la hibridación se procedió a recoger material de distintas localidades que después fue analizado mediante electroforesis de proteínas. Esta búsqueda se realizó a tres niveles diferentes. En primer lugar, se centró en las especies del río Águeda. Posteriormente, se hizo un análisis exhaustivo de distintas poblaciones de especies del género *Leuciscus* ya que su implicación en la hibridación parecía más evidente. Finalmente, se realizó un estudio para otras especies situadas en distintos ríos españoles y griegos.

a) El principal motivo en la elección del río Águeda para un estudio más intensivo se debió a que este río se caracteriza por una relativa baja diversidad de especies de ciprínidos, pudiendo encontrarse cuatro además del complejo *T. alburnoides*, siendo éstas: *Leuciscus carolitertii* Doadrio 1987, *Chondrostoma polylepis duriensis*, Coelho, 1985, *Barbus bocagei* Steindachner, 1865 y *Rutilus lemmingii* (Steindachner, 1866). También se encuentra un cobítido (*Cobitis vettonica* Doadrio & Perdices, 1997) y un salmónido (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) (Doadrio *et al.*, 1991; Velasco, 1994).

Por tanto, el río Águeda será adecuado para analizar el fenómeno de la hibridación ya que ésta sólo sería factible entre miembros del complejo *T. alburnoides* y miembros de los otros tres géneros de la familia Cyprinidae (*Leuciscus*, *Chondrostoma* y *Rutilus*), como ya había sido indicado previamente (Collares-Pereira, 1989).

b) Debido a que los resultados del complejo *T. alburnoides* del río Águeda sugirieron que los parentales debían pertenecer al género *Leuciscus* se realizó un estudio exhaustivo de sus especies en la Península Ibérica y en el resto de Europa. Dentro de esta revisión se hizo especial hincapié en las especies griegas ya que también se ha considerado la presencia de *T. alburnoides* en este área

(Stephanidis, 1971). También se estudiaron las otras dos especies incluidas en el género *Tropidophoxinellus*: *Tropidophoxinellus hellenicus* (Stephanidis, 1939) y *Tropidophoxinellus spartiaticus* (Stephanidis, 1971). Todos ellos fueron analizados con electroforesis de proteínas.

En la Tabla 2 se recogen las poblaciones españolas de especies del género *Leuciscus* que se han analizado y la Figura 3 muestra la distribución de sus puntos de muestreo.

Tabla 2. Poblaciones de las especies del género *Leuciscus* analizadas como posibles parentales en la hibridación. (n) indica los ejemplares estudiados y los números junto a los ríos designa a las poblaciones. Las abreviaturas en la localidad se corresponden con las provincias.

| Río | Cuenca | Taxa | n | Localidad | Fecha |
|-------------------|----------------------|------------------------|----|------------------------------|----------|
| 1 Arnoia | Miño | <i>L. carolitertii</i> | 19 | Santa Eufenia (OR) | 3-8-95 |
| 2 Boedo | Duero | <i>L. carolitertii</i> | 20 | Bascones de Ojeda (P) | 17-8-95 |
| 3 Eresma | Duero | <i>L. carolitertii</i> | 10 | Olmedo (V) | 15-6-95 |
| 4 Águeda | Duero | <i>L. carolitertii</i> | 31 | La Fregeneda (SA) | 18-6-94 |
| 5 Pesquero | Tajo | <i>L. pyrenaicus</i> | 15 | Valverde del Fresno (CC) | 27-11-94 |
| 6 Almonte | Tajo | <i>L. pyrenaicus</i> | 24 | Jaraicejo (CC) | 26-11-94 |
| 7 Tiétar | Tajo | <i>L. pyrenaicus</i> | 14 | Iglesuela (TO) | 22-3-93 |
| 8 Cedená | Tajo | <i>L. pyrenaicus</i> | 10 | Los Navalmorales (TO) | 23-5-95 |
| 9 Estena | Guadiana | <i>L. pyrenaicus</i> | 20 | Navas de Estena (CR) | 22-5-95 |
| 10 Valparaíso | Guadiana | <i>L. pyrenaicus</i> | 13 | Casas de Villares-Pérez (CU) | 17-5-95 |
| 11 Valdehornos | Guadiana | <i>L. pyrenaicus</i> | 15 | Navalpino (CR) | 5-10-95 |
| 12 Fresneda | Guadalquivir | <i>L. pyrenaicus</i> | 10 | Calzada de Calatrava (CR) | 21-11-95 |
| 13 Guadalmena | Guadalquivir | <i>L. pyrenaicus</i> | 21 | Alcaraz (AB) | 23-10-96 |
| 14 Bogarda | Segura | <i>L. pyrenaicus</i> | 7 | Las Mohedas (AB) | 31-10-96 |
| 15 Algar | Algar | <i>L. pyrenaicus</i> | 17 | Callosa de Ensarria (A) | 3-11-96 |
| 16 Bullent | Bullent | <i>L. pyrenaicus</i> | 6 | Pego (A) | 28-4-92 |
| 17 Serpis | Serpis | <i>L. pyrenaicus</i> | 9 | Beniarrés (A) | 1996 |
| 18 Font de Barret | Albufera de Valencia | <i>L. pyrenaicus</i> | 9 | Sollana (VA) | 28-4-92 |
| 19 Matarraña | Ebro | <i>L. cephalus</i> | 14 | Nonaspe (Z) | 29-5-84 |

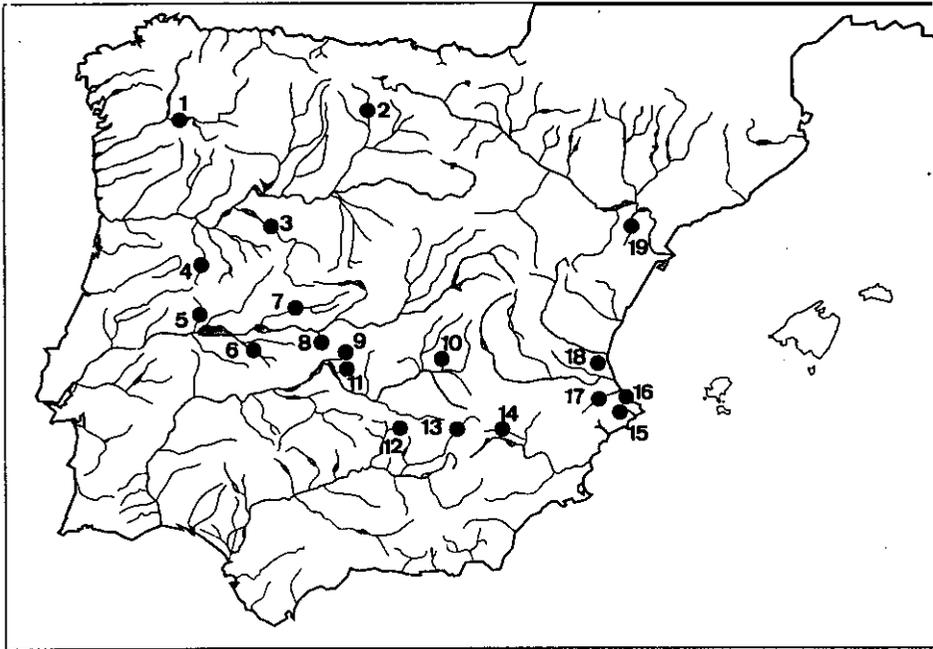


Fig. 3. Mapa con las poblaciones analizadas de los posibles parentales en la hibridación. 1. Miño. 2. Boedo. 3. Eresma. 4. Águeda. 5. Pesquero. 6. Almonte. 7. Tiétar. 8. Cedená. 9. Estena. 10. Valparaíso. 11. Valdehornos. 12. Fresneda. 13. Guadalmena. 14. Bogarda. 15. Algar. 16. Bullent. 17. Serpis. 18. Font de Barret. 19. Matarraña.

En la Tabla 3 se indican las poblaciones de las especies del género *Leuciscus* colectadas fuera de la Península Ibérica y en la Figura 4 la posición geográfica de éstas. La mayoría de éstas son poblaciones griegas pero se han añadido otras dos poblaciones de *L. cephalus* de Italia y Bulgaria.

Tabla 3. Relación de las distintas especies y localidades recolectadas fuera de la Península Ibérica y analizadas como posibles parentales en la hibridación. (n) representa el número de individuos analizados.

| Taxa | Localidad | n | Fecha |
|--|---|----|-----------|
| 1 <i>Leuciscus keadicus</i> | Río Evrotas (Skala y Sparta), Grecia | 21 | 17-6-92 |
| 1 <i>Tropidophoxinellus spartiaticus</i> | Río Evrotas (Sparta), Grecia | 20 | 17-6-92 |
| 2 <i>L. cephalus peloponnensis</i> | Río Miras (Kopanaktion), Grecia | 9 | 18-9-92 |
| 3 <i>L. c. peloponnensis</i> | Río Alfios (Karitana), Grecia | 21 | 17-6-92 |
| 4 <i>L. c. peloponnensis</i> | Lago Stymphalia, Grecia | 24 | 17-9-92 |
| 5 <i>L. c. albus</i> | Río Evinos (Mesologki), Grecia | 10 | 19-6-92 |
| 6 <i>L. cf. svallize</i> | Lago Trichonis (Panetolio), Grecia | 26 | 20-6-92 |
| 6 <i>Tropidophoxinellus hellenicus</i> | Lago Trichonis (Panetolio), Grecia | 20 | 20-6-92 |
| 7 <i>L. c. albus</i> | Río Louros (Kerasona), Grecia | 13 | 6-6-92 |
| 8 <i>L. c. albus</i> | Río Arachthos (Arta), Grecia | 12 | 7-6-92 |
| 9 <i>L. cf. svallize</i> | Río Thiamis (Parapotamus), Grecia | 25 | 5-6-92 |
| 10 <i>L. c. vardarensis</i> | R. Maniklotico (Oxilotos), Euboiia-Grecia | 14 | 12-6-92 |
| 11 <i>L. c. vardarensis</i> | (Kirintos), Isla de Euboiia, Grecia | 15 | 13-6-92 |
| 12 <i>L. c. vardarensis</i> | Río Sperchios (Lamia), Grecia | 6 | 15-6-92 |
| 13 <i>L. c. vardarensis</i> | Río Pinios (Omolio), Grecia | 3 | 11-6-92 |
| 14 <i>L. c. vardarensis</i> | Río Aliakmon (Kaloneri), Grecia | 9 | 8-6-92 |
| 15 <i>L. c. vardarensis</i> | Río Aaos (Konitsa), Grecia | 14 | 7-6-92 |
| 16 <i>L. c. vardarensis</i> | Lago Prespa (Pсарades), Grecia | 12 | 21-6-92 |
| 17 <i>L. c. vardarensis</i> | Río Gallikos (Gallikos), Grecia | 11 | 9-6-92 |
| 18 <i>L. c. macedonicus</i> | Río Strymon (Strimoniko), Grecia | 15 | 23-6-92 |
| 19 <i>L. c. macedonicus</i> | Río Nestos (Paranesti), Grecia | 8 | 24-6-92 |
| 20 <i>L. borysthenicus</i> | Río Filiouris (Fotolivos), Grecia | 10 | 24-6-92 |
| 21 <i>L. c. cephalus</i> | Río Dîmboviza (L. Dragomiresti) Rumanía | 5 | 9-10-91 |
| 22 <i>L. c. cabeda</i> | Río Reno (Vergato), Italia | 6 | 30-9-91 |
| 23 <i>Telestes souffia muticellus</i> | Río Bevera (Sospel), Francia | 30 | abril -95 |
| 24 <i>L. carolitertii</i> | Río Águeda (La Fregeneda), España | 33 | 17-11-92 |

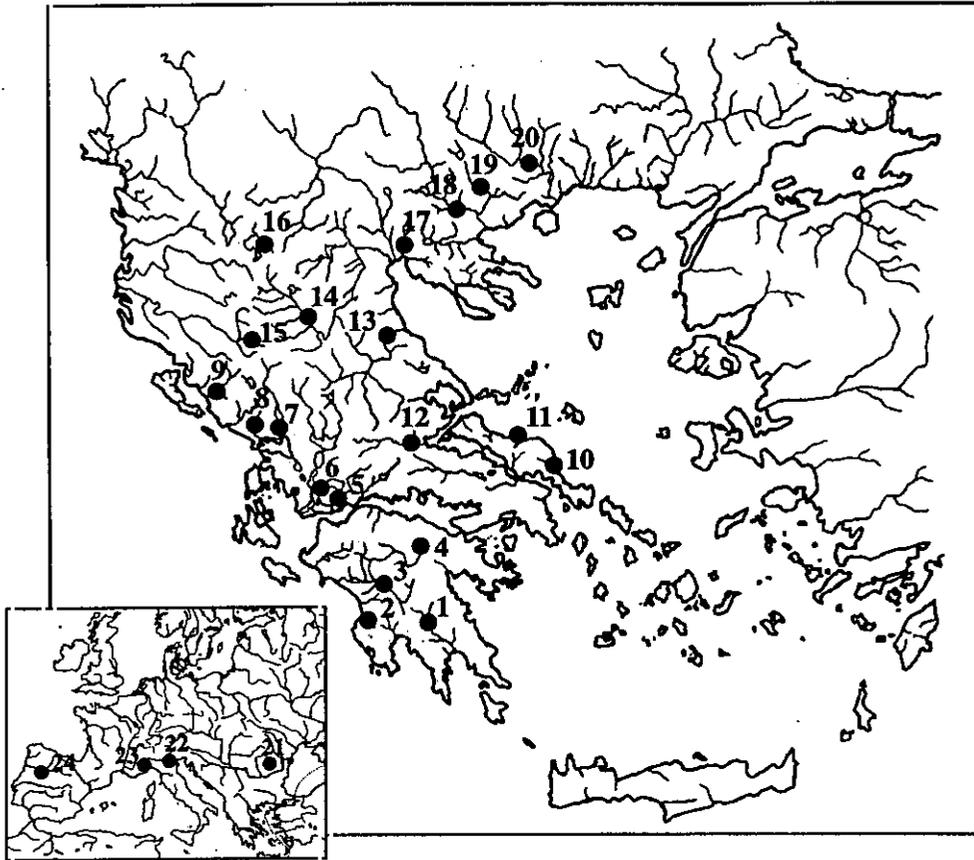


Fig. 4. Poblaciones analizadas fuera de la Península Ibérica de las especies del género *Leuciscus* consideradas como posibles parentales. Las localidades se corresponden con las relacionadas en la Tabla 3.

c) Debido a que no fueron encontrados los dos parentales en el estudio del género *Leuciscus* se inició un estudio en otras especies de ciprínidos ibéricos y diferentes poblaciones de *T. alburnoides*. Especialmente, se analizaron las especies de los ríos Estena y Jándula ya que en ellos aparecen un número considerable de especies potencialmente interesantes para este estudio. Las colectadas en el río Estena fueron *Anaocypris hispanica* (Steindachner, 1866), *Rutilus lemmingii* (Steindachner, 1866), *Leuciscus pyrenaicus* Günther, 1868, *Leuciscus* sp. *Chondrostoma polylepis willkommii* Steindachner, 1865, además de

una población muy abundante del complejo *T. alburnoides*. Así mismo, en el río Jándula, se recolectaron algunos ejemplares de *Iberocypris palaciosi* Doadrio, 1980 y de *Chondrostoma polylepis willkommii* y en un afluente suyo, el río Robledillo, se muestreó *R. lemmingii*.

En la Tabla 4 se detallan especies, localidades, fechas y número de ejemplares capturados en los ríos Águeda, Estena y Jándula y en la Figura 5 se muestra la distribución geográfica de los puntos de muestreo.

Tabla 4. Relación de las distintas especies y localidades analizadas como posibles parentales en la hibridación. (n) representa el número de individuos analizados.

| Río | Cuenca | Taxa | n | Localidad | Fecha |
|------------|--------------|---------------------------------|-----|----------------------|----------|
| Águeda | Duero | complejo <i>T. alburnoides</i> | 132 | La Fregeneda (SA) | varias* |
| Águeda | Duero | <i>Leuciscus carolitertii</i> | 31 | La Fregeneda (SA) | 18-6-94 |
| Águeda | Duero | <i>Ch. polylepis duriensis</i> | 31 | La Fregeneda (SA) | 29-6-94 |
| Turones | Duero | <i>Rutilus cf. lemmingii</i> | 20 | Bouza (SA) | 26-11-94 |
| Estena | Guadiana | complejo <i>T. alburnoides</i> | 31 | Navas de Estena (CR) | 22-5-95 |
| Estena | Guadiana | <i>Leuciscus pyrenaicus</i> | 20 | Navas de Estena (CR) | 22-5-95 |
| Estena | Guadiana | <i>Leuciscus sp.</i> | 17 | Navas de Estena (CR) | 22-5-95 |
| Estena | Guadiana | <i>Anaocypris hispanica</i> | 6 | Navas de Estena (CR) | 22-5-95 |
| Estena | Guadiana | <i>Rutilus lemmingii</i> | 18 | Navas de Estena (CR) | 22-5-95 |
| Jándula | Guadalquivir | <i>Iberocypris palaciosi</i> | 11 | Lugar Nuevo (J) | 5-3-92 |
| Jándula | Guadalquivir | <i>Ch. polylepis willkommii</i> | 2 | Lugar Nuevo (J) | 5-3-92 |
| Robledillo | Guadalquivir | <i>Rutilus lemmingii</i> | 12 | Solana del Pino (CR) | 19-11-94 |

* las fechas de captura son las relatadas en el texto en el apartado anterior.

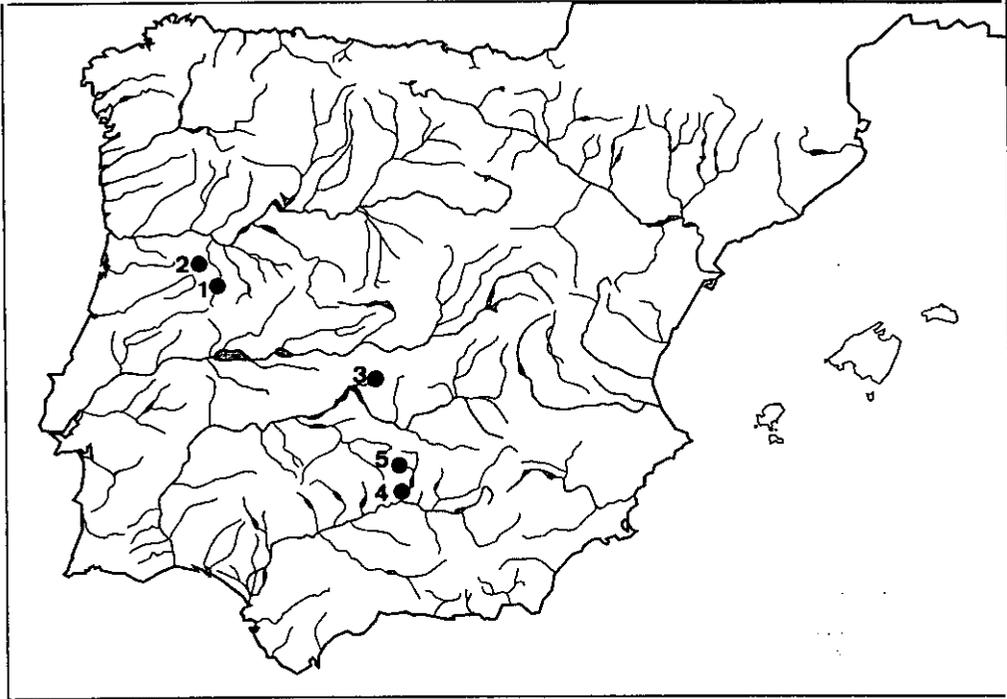


Fig. 5. Mapa con las poblaciones de las especies utilizadas en el análisis de las especies parentales. 1. Río Águeda. 2. Río Turones. 3. Río Estena. 4. Río Jándula. 5. Río Robledillo.

Los estudios de electroforesis de proteínas encaminados a determinar las especies implicadas en la hibridación se vieron complementados con los del polimorfismo de los fragmentos de restricción del Citocromo *b* del ADN mitocondrial. Parte del material analizado mediante proteínas fue estudiado con esta segunda herramienta molecular que sirvió para hayar la especie que actuó como materna en la hibridación.

Aunque este material ya viene incluido en la Tabla 4, sin embargo, mostramos de manera más explícita el número de ejemplares y la procedencia de éstos en la Tabla 5.

Tabla 5. Localidades y especies colectadas, así como el número de muestras usadas para los estudios de aloenzimas y enzimas de restricción en el ADN mitocondrial.

| Río, Cuenca (Localidad) | Especie | n° de muestras | | |
|--|---|----------------|-----------|----------|
| | | Colectadas | Proteínas | ADN mit. |
| Río Águeda (Duero) (La Fregeneda, Salamanca) | | | | |
| | <i>Tropidophoxinellus alburnoides</i> * | 233 | 132 | 15 |
| | <i>Leuciscus carolitertii</i> | 31 | 31 | 5 |
| | <i>Chondrostoma polylepis duriensis</i> | 31 | 31 | 5 |
| Río Turones (Duero) (Bouza, Salamanca) | | | | |
| | <i>Rutilus lemmingii</i> | 20 | 20 | 5 |
| Río Estena (Guadiana) (Navas de Estena, Toledo) | | | | |
| | <i>Tropidophoxinellus alburnoides</i> * | 41 | 31 | 15 |
| | <i>Leuciscus pyrenaicus</i> | 20 | 20 | 5 |
| | <i>Rutilus lemmingii</i> | 18 | 18 | 5 |
| | <i>Anaocypris hispanica</i> | 6 | 6 | 5 |

(*) complejo *T. alburnoides*, incluidos los híbridos putativos y poliploides.

Métodos

La combinación de los estudios de electroforesis de aloenzimas y ADN mitocondrial suponen una herramienta poderosa para aclarar el origen y los modos de reproducción de los organismos unisexuales (Avise *et al.*, 1992; Buth *et al.*, 1993; Avise, 1994). Hemos creído, por tanto, que estos métodos moleculares son los más adecuados para la consecución de los objetivos propuestos en este estudio.

Como paso previo a los estudios moleculares hemos abordado los estudios citogenéticos que nos van a aportar una información básica de partida. Por una parte conoceremos qué individuos presentan poliploidía y por tanto son sospechosos de presentar un origen híbrido. En segundo lugar, hemos de tener en cuenta la ploidía de los individuos para los cálculos de las frecuencias alélicas, ya que la frecuencia con que aparece un determinado alelo está en relación con el número de cromosomas homólogos existentes. En el caso de individuos heterocigotos triploides el cuantificar la dosis génica es determinante para el cálculo posterior de las frecuencias alélicas.

1.- Métodos citogenéticos

Con el fin de determinar la ploidía de los individuos se usaron métodos cariológicos y fotométricos. Las hipótesis previas (Collares-Pereira, 1987, 1989) sugerían la existencia dentro de la población de una fracción con reproducción sexual en la que aparecen individuos diploides y triploides y otra fracción, de origen híbrido, también con los dos tipos de ploidía. Parece claro, por tanto, que antes de abordar el análisis del origen de estas formas sea necesario determinar la

ploidía para cada individuo. En el presente estudio se han empleado para tal fin dos técnicas, la del cariotipado y la citometría de flujo.

1.1.- Cariotipado

1.1.1.- Principios generales y utilidad

Esta técnica consiste en el estudio mediante microscopía óptica de los cromosomas aprovechando el hecho de que durante la metafase mitótica éstos son visibles al hallarse el material genético superenrollado y compactado a la espera de que los husos acromáticos separen la cromátidas hermanas hacia los polos de la célula en división.

El cariotipado se ha venido usando tradicionalmente con fines taxonómicos al utilizarse para describir el número haploide de una especie y la proporción de los distintos tipos de cromosomas atendiendo a su morfología y posición del centrómero (fórmula haploide). Para el caso de *T. alburnoides* ya fueron descritos ambos valores (Collares-Pereira, 1983) observándose un número de $2n=50$. En nuestro caso esta técnica se va a emplear exclusivamente para contar el número de cromosomas y determinar así, la ploidía del individuo.

1.1.2.- Protocolo

El protocolo empleado está basado en otros descritos anteriormente (Kligerman & Blomm, 1977; Gold *et al.*, 1990; Arai *et al.*, 1991) aunque con modificaciones y se compone de cinco pasos básicos:

- (a) Elección de un tejido con tasa de actividad mitótica alta (normalmente un órgano hematopoyético).
- (b) En vivo, tratamiento con un agente inhibidor mitótico.

- (c) Tratamiento hipotónico de las células.
- (d) Fijación de los núcleos celulares.
- (e) Tinción y montaje de preparaciones permanentes.

Como ya se ha indicado, los ejemplares de *T. alburnoides* fueron capturados mediante pesca eléctrica y fueron transportados vivos al laboratorio en contenedores suficientemente oxigenados. Una vez en el laboratorio se procedió a su estudio en el plazo máximo de 24 horas, ya que experiencias previas durante la puesta a punto de la técnica nos indicaron que el tiempo que permanecían en cautividad los ejemplares influía negativamente sobre los resultados obtenidos, no encontrándose prácticamente placas mitóticas en las preparaciones, posiblemente como consecuencia de una ralentización del metabolismo al estar sometidos a estrés.

Cuatro horas antes de su sacrificio, y dependiendo de su tamaño, se inyectó a cada individuo entre 0,1 y 0,3 cc de una solución de colchicina al 0,1 % en el peritoneo y se les mantuvo en un acuario bien aireado. La colchicina es un agente cuya propiedad es la de inhibir la mitosis al impedir la formación de los husos acromáticos. Por tanto, su efecto va a propiciar que las células que espontáneamente entren en división se detengan en la metafase de mitosis y de este modo al cabo de las cuatro horas hemos multiplicado la proporción de células en metafase al detenerlas artificialmente en esta etapa de la mitosis.

Una vez anestesiado y sacrificado el individuo, éste fue disecado, aprovechando este momento para su sexado puesto que en esta especie no presenta dimorfismo sexual secundario y es necesario la observación directa de las gónadas. Posteriormente se extrajo el riñón y las agallas ya que estos tejidos presentan una actividad mitótica alta (Sessions, 1990), depositándolas en un pocillo alemán con 1 ml de solución hipotónica de KCl 0,075 M donde se cortaron finamente hasta conseguir disgregar el mayor número posible de células

manteniéndose en esta solución durante 30 minutos. En esta solución hipotónica las membranas celulares se rompen por ósmosis con lo que se consigue liberar el núcleo celular.

Para aislar los núcleos celulares, se pipetea cuidadosamente a un tubo de ensayo la solución de KCl en la que irán en suspensión un gran número de núcleos. A continuación, el tubo se centrifuga durante 20 minutos a 1400 revoluciones por minuto. En el líquido sobrenadante quedaran los restos de la membrana celular y los demás componentes citoplasmáticos se retiran cuidadosamente permaneciendo los núcleos celulares precipitados en el fondo del tubo.

En el tubo se depositan 1,5 cc de etanol-acético (1:1) recién preparado para fijar los núcleos celulares. Es fundamental que ambos componentes del fijador estén libres de impurezas para que nada enmascare los cromosomas cuando sean analizados al microscopio.

A continuación, para asegurarnos de que todos los núcleos entran en contacto con el fijador se resuspende cuidadosamente los núcleos con el fijador durante unos segundos usando una pipeta Pasteur. En esta operación se tendrá un especial cuidado de no provocar burbujas de aire ya que éstas disgregarían los cromosomas.

Los núcleos ya fijados se centrifugan de nuevo otras dos veces con las mismas condiciones (a 1400 r.p.m. durante 20 minutos) y siempre cambiando el fijador usado por nuevo y resuspendiendo cuidadosamente. Ya en estas condiciones los núcleos se pueden conservar durante largo tiempo.

Para visualizar metafases en las que poder contar el número cromosómico se dejó caer una gota de la suspensión de núcleos purificada y fijada, mediante una pipeta Pasteur, desde una altura de 1 metro (técnica de "splash"), sobre un portaobjetos previamente limpiado con alcohol absoluto y enfriado a -20 °C. A

continuación se dejó secar durante unos segundos al aire y se tiñó el portaobjetos con una solución de Giemsa al 3 % durante 15 minutos.

Las preparaciones fueron analizadas con microscopía óptica usando el objetivo de 40 aumentos a fin de encontrar placas mitóticas en las que la disposición y compactación de los cromosomas permitiese contar su número. Una vez localizadas buenas placas mitóticas en una preparación se montó el cubre objetos con Bálsamo de Canadá y se fotografiaron con el objetivo de inmersión. Para evitar errores en el conteo de cromosomas se analizaron entre 3 y 10 metafases por individuo.

1.2.- Citometría de flujo

1.2.1.- Principios generales y utilidad

La técnica del cariotipado requiere que los ejemplares se mantengan vivos para su posterior tratamiento con colchicina antes de la disección. Sin embargo, no siempre fue posible mantener vivos los ejemplares capturados por lo que se procedió a su congelación en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron, bien enteros o sus tejidos, en congeladores a -70 °C.

Mediante un citómetro de flujo conseguimos una medida indirecta pero muy fiable de la ploidía del individuo mediante la cuantificación de ADN existente en el núcleo de una célula.

La cantidad de ADN existente en una célula es característico de cada especie y vendrá dado por la cantidad de cromatina que posea. De este modo, la cantidad de ADN existente en una célula de un individuo triploide será aproximadamente 1/3 mayor que la existente en la célula de un individuo diploide de la misma especie y así, sucesivamente para niveles de ploidía mayores (Dawley & Goddard, 1988a).

Utilizando la propiedad de la molécula del ADN de ser teñida mediante colorantes específicos y puesto que la intensidad de esta tinción puede ser medida con un citómetro, se puede obtener un valor relativo que será proporcional a la cantidad de ADN de una célula.

Como se ha indicado, esta medida de la ploidía es muy fiable porque en realidad el citómetro mide el contenido de ADN en más de veinte mil células de un mismo organismo. Sin embargo, dada la poca disponibilidad de este instrumental y lo costoso del análisis de cada muestra no se utilizó este procedimiento rutinariamente para el total de los ejemplares analizados,. Solo se empleó en los casos en que los ejemplares no sobrevivieron en su transporte al laboratorio, en los que se dudó en el conteo de cromosomas por cariólogía y en aquellos en los que se quiso confirmar un dato importante para el presente estudio.

Normalmente, se emplean los eritrocitos del individuo (Dawley & Goddard, 1988a) para lo cual se le hace una punción en la aleta caudal obteniéndose aproximadamente 100 μ l de sangre, pero en nuestro caso partimos de ejemplares congelados a -70 °C y a ello hay que unir que el pequeño tamaño de muchos de los individuos analizados no permitió la obtención de tal cantidad de sangre. Tras probar con distintos tejidos (hígado, músculo, cerebro, branquias, corazón) obtuvimos los mejores resultados usando cerebro y corazón, por lo que optamos por este último tejido al ser más fácil su obtención.

1.2.2.- Protocolo

Básicamente, se ha seguido el protocolo de Vindeløv *et al.* (1982) aunque con pequeñas modificaciones (Dawley & Goddard, 1988b). Las fases más importantes son:

- (a) Elección de un tejido apropiado y su disgregación en células en una solución tamponada.
- (b) Purificación de la solución celular mediante filtrado o centrifugación.
- (c) Tratamiento hipotónico de las células.
- (d) Tinción con un colorante o fluorante específico del ADN e incorporación de células estándar para el calibrado del contenido de ADN.
- (e) Medición de la fluorescencia en un citómetro y cálculo del contenido de ADN.

Una vez extraído el corazón, éste se sitó en un pocillo o placa de Petri con 1 ml de solución tamponada (pH 7.6) compuesta por sacarosa 250 mM, citrato trisódico dihidratado 40 mM y dimetilsulfóxido al 5% (DMSO). En esta solución el tejido se cotó finamente con tijeras y pinzas a fin de liberar el mayor número posible de células.

La suspensión de células obtenida se hizo pasar por un filtro de nilón de 30 μm de luz de malla o bien se centrifugó durante unos segundos a 500 r. p. m. para aislar restos de tejido de las células individuales.

Una vez obtenida la suspensión de células en la solución de sacarosa/citrato/DMSO, se añadió 50 μl de una solución estándar de células de sangre periférica humana, cuyo contenido de ADN ya se conoce, y que va a servirnos como cantidad de ADN de referencia para nuestro análisis.

A continuación, se añadió 1 ml de una solución hipotónica de cloruro sódico 146 mM, cloruro cálcico 1 mM y cloruro de magnesio 21 mM que como en el caso del cariotipado va a tener la función de romper las células liberando los núcleos. Además, en la solución hipotónica se añade un colorante específico para la molécula de ADN. En nuestro caso se usó 100 μl de yoduro de propidio que se

caracteriza por emitir fluorescencia. Por tanto, el citómetro lo que va a medir será la cantidad de fluorescencia emitida por el yoduro de propidio fijado a la molécula de ADN del núcleo.

La solución ya preparada es introducida en el citómetro de flujo (FACS SORT Becton Dickinson). Los núcleos en suspensión son inyectados en una corriente de flujo laminar y se hacen pasar en fila por un rayo de luz ultravioleta o por un láser procedente de una fuente de luz de alta intensidad. La intersección del haz de luz concentrada con los núcleos produce la emisión de fluorescencia por parte del yoduro de propidio que será recogida por fotodetectores orientados convenientemente. La fracción de luz emitida por los núcleos y recogida por los fotorreceptores generará una señal eléctrica que será proporcional a dicha fracción de luz. La señal eléctrica será posteriormente amplificada, acumulada y analizada apareciendo representada como una distribución de frecuencias de contenido de ADN formando picos más o menos discretos dependiendo del estado de la muestra.

En nuestro caso aparecerán dos picos discretos en la distribución de frecuencias correspondientes uno a las células sanguíneas humanas y el otro a los núcleos de *T. alburnoides* diploides o a los núcleos de los individuos triploides.

La fluorescencia emitida por el yoduro de propidio va a dar por tanto una medida indirecta del ADN (Lee *et al.*, 1984) ya que cuanto más ADN posea el núcleo más cantidad de yoduro de propidio se fijará a éste y más cantidad de fluorescencia se recogerá en el citómetro.

2.- Métodos moleculares

2.1.- Electroforesis de proteínas

2.1.1.- Principios generales y utilidad

Esta técnica consiste básicamente en comparar las proteínas de distintos individuos tras hacerlas migrar en un campo eléctrico aprovechando que las proteínas están cargadas eléctricamente.

Las proteínas están compuestas por aminoácidos que se unen entre sí mediante enlaces covalentes formando cadenas denominadas polipéptidos. Existen 20 aminoácidos en la naturaleza, y de ellos tres presentan un grupo NH_3^+ libre y por tanto tienen carga positiva (lisina, arginina e histidina). Otros dos son ácidos, presentando un grupo COO^- libre por lo que presentan carga negativa. La presencia en mayor o menor medida de estos aminoácidos en la cadena polipeptídica va a determinar la carga neta final de la molécula proteica y provocará su migración al ser sometida a un campo eléctrico.

Los aminoácidos pueden, además, unirse unos a otros aunque no estén próximos mediante puentes de hidrógeno con lo que conseguirían una estructura secundaria. Dependiendo de los grupos con carga, la disposición de éstos y la estructura secundaria se obtendrá una estructura terciaria con la que la molécula proteica va a adquirir una forma determinada y un volumen concreto. Finalmente, algunas proteínas están compuestas por varias subunidades o cadenas polipeptídicas, entre las que se dan distintos enlaces iónicos, de hidrógeno y puentes disulfuro, configurando la estructura cuaternaria de la molécula (Lehninger, 1982).

La importancia del volumen de la molécula va a ser fundamental ya que su migración se verá afectada por el tamaño de poro del soporte físico (en nuestro caso un gel de almidón) sobre el que se hará migrar la proteína. Por tanto, en

condiciones normales, la movilidad de una proteína va a aumentar con la carga neta que posea y con la diferencia de potencial del campo eléctrico al que se vea sometida, y por el contrario, disminuirá cuanto mayor sea su volumen y más concentrado esté el medio (Murphy *et al.*, 1990).

Para hacer migrar las proteínas situamos éstas en un gel de almidón que se pone en contacto con la fuente de alimentación mediante un tampón de electrodos con un pH y una concentración determinados. Una vez acabada la electroforesis se revelará específicamente una determinada proteína, de entre el total existente en el tejido en bruto, mediante una tinción histoquímica concreta que indicará la posición exacta a la que ha migrado en el gel apareciendo una banda visible (zimograma). La tinción histoquímica más frecuente consiste en aprovechar la función enzimática de la proteína para obtener un producto final coloreado o coloreable, aunque, a veces, la sustancia coloreada es un producto intermedio de la reacción. Otras tinciones colorean específicamente cuerpos químicos asociados (glúcidos, lípidos, grupos aminados...) presentes en las proteínas y que son susceptibles de tinción (Machordom, 1992).

Cada aminoácido viene codificado por una secuencia de tres nucleótidos (triplete) situados en la cadena de ADN. Una mutación que afecte al conjunto de la secuencia de tripletes que van a codificar la cadena polipeptídica puede traer como consecuencia la sustitución de algún aminoácido, por lo que la carga neta de la proteína y su estructura espacial pueden variar. Esta variación, fundamentalmente de carga, va a suponer una variación en la migración de la nueva proteína al someterla a electroforesis.

Partiendo de la asunción de que cambios en la movilidad de las proteínas en un campo eléctrico reflejan cambios en el ADN que las codifica, hemos de asumir también que si hay diferencias en los patrones de migración de las bandas de dos individuos, estas diferencias tienen una base genética y son heredables (Avisé, 1974; Matson, 1984). También partiremos de la base de que la expresión

de un locus que codifica para una proteína es codominante, por lo que si sus alelos codifican polipéptidos diferentes (aloenzimas), éstos se expresan igualmente.

Las aloenzimas permiten identificar el genotipo de cada especie tipificándolo como un patrón de bandas en cada locus. Si dos taxa distintos se cruzan formando una descendencia híbrida los loci marcadores o identificadores de cada especie van a aparecer típicamente expresados en codominancia en los híbridos, o lo que es lo mismo, las aloenzimas nos van a permitir la detección de heterocigosis fijada en estos loci en los individuos híbridos.

Las ventajas que presenta la técnica de la electroforesis para estudios de sistemática, filogenia y evolución ya han sido ampliamente comentadas (Avise, 1974, 1994; Buth, 1984; Murphy *et al.*, 1990; Machordom, 1992), e igualmente se ha destacado su utilidad para abordar estudios de hibridación y constatar casos de biotipos unisexuales (Schultz, 1969, 1977; Vrijenhoek & Schultz, 1974; Uzzell & Darevsky, 1975; Graf *et al.*, 1977; Echelle & Mosier, 1982; Turner *et al.*, 1983; Bogart *et al.*, 1985; Dawley *et al.*, 1987; Dessauer & Cole, 1989; Graf & Polls-Pelaz, 1989; Moritz *et al.*, 1989) aunque comentarios generales sobre la aplicabilidad de la electroforesis de proteínas a los biotipos unisexuales pueden verse en Murphy *et al.* (1990), Avise (1994) y Vrijenhoek (1994). Las ventajas que se obtienen de esta técnica son varias: (1) por una parte, nos va a permitir caracterizar genéticamente a las especies supuestamente implicadas en el fenómeno de la hibridación, determinando cuáles son los loci marcadores entre ellas, (2) va a facilitar la detección de los individuos híbridos por su heterocigosis fijada en los loci detectados como marcadores entre las especies parentales y se podrá descartar a las que no participaron en dicha hibridación, (3) además, los biotipos diploides y triploides pueden ser distinguidos entre sí ya que en los individuos triploides aparecen distintas intensidades en las bandas de los loci heterocigotos debido a la diferencia de dosis genética aportada por cada parental,

dando información complementaria sobre el origen de la poliploidía (Balsano *et al.*, 1972; Uzzell *et al.*, 1975; Vrijenhoek, 1975).

2.1.2.- Protocolo

El protocolo básico seguido en el presente estudio sigue los pasos comentados por Pasteur *et al.* (1987) y que pueden resumirse en:

- (a) Obtención de los tejidos necesarios y su homogeneización en tampón adecuado.
- (b) Purificación del extracto de proteínas mediante centrifugación.
- (c) Migración de las proteínas en gel de almidón sometiéndolas a un campo eléctrico.
- (d) Tinción histoquímica para el revelado de sistemas enzimáticos específicos.
- (e) Fijación y lectura de los zimogramas.

De los individuos estudiados cariológicamente se procedió a extraer los tejidos sobre los que se obtienen las proteínas. A cada uno de ellos se le extrajo entre 1-2 cc de músculo esquelético dorsal del individuo, el hígado o una porción de éste y las gónadas, almacenando cada tejido individualmente en tubos eppendorf y congelándolos a -70°C hasta su procesado.

Previo a la electroforesis, los tejidos (músculo e hígado) se homogeneizaron por separado en un volumen similar de tampón de homogeneizado (Tris 0,01 M y EDTA 0,0025 M, a pH 7,0) con un homogeneizador mecánico. El tejido homogeneizado fue centrifugado durante 20 minutos a 17000 g, y a una temperatura media de 4°C , guardándose el sobrenadante con el total de proteínas hidrosolubles de ese tejido en un tubo nuevo.

En el extracto de proteínas de cada individuo se sumergieron papelillos de 1x 0,5 cm de papel Watman nº 3 y se insertaron verticalmente en geles de almidón hidrolizado al 12% (Sigma Chemical co.) previamente preparados. Los geles se realizaron sobre moldes de metacrilato de 480 cc siguiendo el protocolo y usando los tampones obtenidos de Pasteur *et al.* (1987). Para la elaboración de los geles los tampones usados fueron: Tris-citrato, pH 7,0; Tris-citrato, pH 8,0; Tris-maleato-EDTA, pH 6,9 y Poulik, pH 8,7. En realidad estos tampones se obtuvieron mediante diluciones de los tampones de electrodos conservándose el pH, a excepción de Poulik cuyo tampón de electrodos fue Borato, pH 8,2.

Una vez cargadas las muestras en el gel (28 individuos por gel) se añadió azul de bromotimol como marcador de la migración y se conectaron dichos geles al campo eléctrico usando esponjillas absorbentes para conectar físicamente el gel con el tampón de electrodos. Dependiendo del tipo de gel, la migración duró entre 6 y 10 horas, aplicando una intensidad media de 60 mA y una diferencia de potencial de 240 V.

Tras la migración, se retiraron de los geles los papelillos con los que se cargaron las muestra y se procedió a cortarlos obteniéndose 4 ó 5 láminas delgadas de aproximadamente 2 mm de grosor que se colocaron independientemente en cubetas de plástico para su posterior tinción.

Cada lámina obtenida de un gel fue coloreada específicamente para revelar una determinada enzima mediante una tinción histoquímica concreta, aunque habría que aclarar que estudios preliminares tendentes a poner a punto la técnica nos permitieron conocer cual era la coloración más apropiada para cada gel de acuerdo con el tipo de tampón usado, el pH del mismo y tejido empleado. Una vez delimitados los sistemas enzimáticos que ofrecían mejores resultados, se procedió a su análisis en rutina para todos los individuos considerados en este estudio.

Las recetas de las tinciones histoquímicas se obtuvieron de Pasteur *et al.* (1987) y sólo algunas sufrieron pequeños ajustes para incrementar la resolución de los zimogramas.

Cuando las bandas de los zimogramas se apreciaron con nitidez se procedió a la detención del revelado histoquímico mediante un fijador consistente en etanol, ácido acético y agua (4:1:5) o ácido acético al 5% dependiendo si la tinción empleada llevase agar o no.

Una vez fijados los geles se procedió a la lectura de los zimogramas siguiendo las recomendaciones de Shaklee *et al.* (1990). Se tomó el alelo más frecuente como referencia asignándole el valor "100". Los demás alelos se codificaron con un valor relativo dependiendo de su migración respecto al alelo "100" de referencia. Loci múltiples que codifican para una misma enzima son designados con -1, -2, etc. en sentido anódico.

Para identificar los marcadores diagnósticos de las especies consideradas examinamos en rutina 19 sistemas enzimáticos para los que obtuvimos resultados óptimos en cuanto a resolución de los zimogramas. Los 19 sistemas enzimáticos comprendieron un total de 26 loci putativos.

Una vez caracterizados los loci fijados en heterocigosis en los individuos híbridos, y con el fin de conocer el alcance de la hibridación, se analizó un número mayor de individuos de la población del río Águeda empleando exclusivamente los geles necesarios para revelar estos loci.

Finalmente, para contrastar si el modo de reproducción empleado en la hibridación fue la ginogénesis o la hibridogénesis, analizamos ovocitos primarios de sesenta y tres hembras grávidas, tres de ellas diploides y 60 triploides. Para cada hembra se estudiaron tanto ovocitos individuales como grupos de ellos aplastándolos directamente sobre el mismo tipo de papelillos Watman y cargándolos sobre el gel de almidón. En ellos se analizaron los mismos loci que

aparecieron fijados en heterocigosis en el tejido somático, por lo que la ausencia de alguno de los alelos en los ovocitos sería indicativo de una exclusión genómica y por tanto nos hallaríamos en un caso de hibridogénesis.

2.2.- Polimorfismo del ADN mitocondrial

2.2.1.- Principios generales y utilidad

Mediante esta técnica se analiza el polimorfismo del ADN mitocondrial comparando entre distintos individuos el número y tamaño de los fragmentos resultantes tras ser digerida esta molécula con enzimas de restricción.

El ADN mitocondrial está constituido por una cadena circular de doble hélice que presenta entre 16.000 y 20.000 pares de bases (pb) dependiendo del tipo de organismo. En vertebrados está muy conservado y consta habitualmente de cerca de 16.000 pb. A nivel celular se localiza en las mitocondrias del citoplasma y al igual que el ADN nuclear posee propiedades autorreplicativas. Tanto la talla como el contenido génico es considerablemente estable en comparación con el ADN nuclear y parece haber poco espacio para ADN no funcional. La molécula consta de 37 genes los cuales codifican para 22 ARN transferentes, 2 subunidades del ARN ribosomal y 13 proteínas implicadas en el transporte de electrones que se efectúa durante la respiración (Avisé & Lansman, 1983; Brown, 1983; Avisé, 1986, 1994).

A pesar de esta estabilidad genética es, sin embargo, una molécula que evoluciona rápidamente a nivel de su secuencia nucleotídica, probablemente como consecuencia de la carencia de mecanismos de reparación de las mutaciones tras la replicación (Wilson *et al.*, 1985). Se ha comprobado que el ADN mitocondrial evoluciona en vertebrados de cinco a diez veces más rápido que el ADN nuclear (Brown *et al.*, 1979; Moritz *et al.*, 1987), estimándose una

tasa del 2% de sustituciones en la secuencia por millón de años (Gyllensten & Wilson, 1986).

Durante la reproducción, la hembra es la que aporta el citoplasma al cigoto ya que, en el caso de que se produzca singamia, el espermatozoide normalmente sólo aporta su material genético. Por tanto, la transmisión del ADN mitocondrial se efectúa por vía materna y este hecho parece bastante generalizado, al menos en vertebrados (Awise & Lansman, 1983; Awise & Vrijenhoek, 1987; Goddard *et al.*, 1989). Sin embargo, existen excepciones y en algunas especies como el mejillón (*Mytilus*) se da un aporte de ADN mitocondrial procedente del padre (Zouros *et al.*, 1992).

En definitiva, los genotipos obtenidos a partir del ADN mitocondrial representan caracteres no recombinantes que se transmiten asexualmente vía materna, por lo que podemos considerarlos como clones o haplotipos y van a ser muy útiles para inferir relaciones evolutivas interpretadas a partir de filogenias matriarcales (Awise *et al.*, 1979).

El estudio del polimorfismo del ADN mitocondrial es relativamente reciente y se viene efectuado con tres técnicas diferentes: mediante hibridación ADN-ADN, por comparación directa de las secuencias de nucleótidos (secuenciación) y mediante el análisis de los fragmentos de restricción. De las tres técnicas, la última resulta sencilla y relativamente económica, permitiendo tanto estimar la cantidad de divergencia en la secuencia de dos genomas como obtener datos en forma de caracteres discretos (Dowling *et al.*, 1990).

Esta técnica se basa en la utilización de enzimas endonucleasas, también conocidas como enzimas de restricción, cuyo trabajo consiste en cortar el ADN en una posición constante dentro de una determinada secuencia de bases que son capaces de reconocer. Estas enzimas fueron aisladas en bacterias donde realizan una importante función de eliminación de ADN extraño, conociéndose alrededor

de 400 enzimas de restricción. Cada una de ellas reconoce una secuencia concreta que varía normalmente entre 4 y 6 pares de bases, aunque enzimas de restricción aisladas de diferentes bacterias son capaces de reconocer una misma secuencia de pares de bases (Dowling *et al.*, 1990).

La especificidad del corte producido por las enzimas de restricción implica que la digestión de una determinada secuencia de ADN es un experimento repetible, obteniéndose siempre el mismo número y tamaño de fragmentos, por lo que cambios en este número o tamaño van a reflejar cambios en la secuencia de ADN, fundamentalmente debidas a reorganización de la secuencia, adición o pérdida de fragmentos de ADN o a la sustitución de alguna base en la zona de reconocimiento.

Los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión se someten a electroforesis aprovechando que la desoxirribosa que constituye la cadena de ADN está cargada negativamente en un medio de pH neutro. Cuanto mayor sea el fragmento mayor será la carga relativa de la molécula y, por tanto, migrará más en un campo eléctrico. Sin embargo, el tamaño de poro del gel de electroforesis en el que se someten a migración (agarosa o poliacrilamida) dificultará más ésta a aquellos fragmentos de mayor tamaño que a los pequeños. La conjugación de ambos factores, carga y tamaño, va a contribuir a discriminar con bastante precisión fragmentos desiguales en un gel. Se puede establecer el tamaño en número de pares de bases de cada fragmento utilizando como referencia fragmentos de tamaño conocido y comparando su migración.

La utilidad de esta técnica resulta evidente tras lo comentado en párrafos anteriores. En primer lugar, su mayor tasa de evolución va a permitir descubrir diferencias genotípicas que pueden haber pasado desapercibidas en un estudio con aloenzimas, permitiendo abordar filogenias tanto de las especies sexuales como de los biotipos unisexuales debido a su herencia estrictamente clonal (Avisé, 1989; Avisé, *et al.*, 1992).

En segundo lugar, y debido a su herencia materna, esta técnica será decisiva para conocer cuál fue la especie parental que ejerció de hembra en el cruce interespecífico ya que los haplotipos del ADN mitocondrial presentes en la especie materna serán iguales a los presentes en los biotipos híbridos (Awise et al, 1992). Por otro lado, resultará muy útil para probar si la dirección del cruce en la hibridación ha sido siempre la misma comprobando, si de las dos especies que hibridan sólo una de ellas actuó siempre como hembra en los sucesos de hibridación (cruce unidireccional) o si individuos de las dos especies pudieron desempeñar el papel de hembra (Spolsky & Uzzell, 1986; Quattro *et al.*, 1992b)

El ADN mitocondrial revela, por tanto, el ancestro maternal de un linaje híbrido y complementa al genoma nuclear con otro de herencia clonal. Juntos, aloenzimas y ADN mitocondrial son útiles para estimar la diversidad clonal en poblaciones unisexuales actuales. Ello es debido a que pueden determinar si éstas surgieron a través de múltiples fenómenos de hibridación o por el contrario como consecuencia de un cruce puntual, de gran éxito, a partir del cual se originaron las poblaciones actuales. En este último supuesto, las pequeñas variaciones genotípicas se deberían a mutaciones posteriores al fenómeno de la hibridación (Brown & Wright, 1979; Quattro *et al.*, 1991; Quattro *et al.*, 1992a).

La forma más común de abordar los estudios de ADN mitocondrial mediante enzimas de restricción suele contar con cinco fases principales (Dowling *et al.*, 1990; Machordom, 1992; Awise, 1994):

- (1) Extracción de ADN total a partir de un fragmento de tejido del individuo.
- (2) Aislamiento y purificación del ADN mitocondrial a partir del ADN total en un gradiente de cloruro de cesio.
- (3) Digestión del ADN mitocondrial con una batería de enzimas de restricción.
- (4) Electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida de los fragmentos de restricción resultantes de la digestión.

(5) Fotografiado de los geles y elaboración de los patrones de restricción (haplotipos) para cada individuo.

En el presente estudio se ha introducido una modificación importante a nivel del segundo paso consistente en introducir la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Mediante PCR podemos amplificar una región determinada de la molécula de ADN mitocondrial a partir del ADN total obtenido, consiguiéndose millones de copias de una zona deseada para su estudio (amplificación), y es sobre esta zona sobre la que se procederá a la digestión con enzimas de restricción.

Aunque no partimos de la molécula entera del ADN mitocondrial, si seleccionamos una región de tamaño apropiado y en la que se conserven las características básicas del ADN mitocondrial (tasa de evolución adecuada y ausencia de recombinación), el estudio será igualmente útil para nuestros objetivos. Dentro de la molécula de ADN mitocondrial, la región que comprende el gen que codifica para el Citocromo *b* es idónea para este tipo de análisis (Meyer, 1993).

La ventaja de esta modificación radica principalmente en que sustituimos la rutina tediosa de la obtención del ADN mitocondrial en un gradiente de cloruro de cesio por otra más sencilla y rápida mediante la cual se pueden preparar gran cantidad de individuos para la digestión con enzimas en un breve plazo.

2.2.2.- Extracción de ADN total

Para la obtención de ADN total a partir de un individuo almacenado en congelador a -70 °C o fresco se extrajo un trozo de músculo de entre 1 y 3 cc de la región dorsal. Se tuvo especial cuidado de que las condiciones del habitáculo y material empleado estuviesen en condiciones de la máxima esterilidad posible

para evitar contaminaciones de nuestro material con ADN extraño. Se usó el autoclave para los materiales y etanol absoluto para limpiar el puesto de trabajo. A continuación se usó el protocolo modificado de CTAB (Hecadecyltrimethylammonium Bromide) aportado por Doyle & Dickinson (1987).

2.2.2.1.- Protocolo

El tejido muscular se deposita en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml y se macera junto con 300 μ l del tampón CTAB calentado hasta 60 °C. El tejido ya macerado se mantiene a 60 °C durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, se añaden 300 μ l de una solución de cloroformo-isoamil alcohol (24:1) y se agita el tubo durante dos minutos, tras lo cuales se procede a centrifugar la muestra a 5000 g durante 3 minutos.

Mientras transcurre la centrifugación, en un tubo eppendorf nuevo añadimos 600 μ l de etanol absoluto (enfriado hasta -20 °C) y 25 μ l de acetato sódico (NaOAc, 3M).

Una vez centrifugada la muestra, se recoge la fase acuosa (parte superior) y se deposita en el tubo nuevo con etanol y acetato sódico y se centrifuga de nuevo a 5000 g durante 3 minutos.

A continuación, se retira el sobrenadante del precipitado, en el que ya se encontrará el ADN de nuestra muestra, procurando que no quede nada de etanol-acetato con el precipitado.

Seguidamente, se añaden de nuevo 200 μ l de etanol absoluto (a -20 °C) y se lava el precipitado de ADN agitando suavemente el tubo varias veces hasta conseguir desprender el precipitado del fondo del mismo.

De nuevo, se centrifuga la muestra a 5000 g durante 3 minutos y, a continuación, se retira el etanol eliminándose los restos con una pipeta. Posteriormente se deposita el tubo con la muestra precipitada en una estufa entre 65 y 70 °C durante unos minutos para eliminar totalmente el etanol que pudiese quedar.

Finalmente, se añaden entre 50 y 150 μ l de agua destilada estéril y se sitúa la muestra en la estufa entre 65 y 70 °C durante toda la noche para que el ADN se diluya bien en el agua. Una vez aislado el ADN mediante este protocolo se guarda a 5 °C hasta su uso.

La receta completa de CTAB consiste en:

| | |
|---|--------|
| Tris-HCl, pH 8,0 100 mM | 100ml |
| NaCl | 1,21g |
| EDTA | 8,182g |
| Hecadecyltrimethylammonium Bromide (CTAB) | 2,0g |
| 2-mercaptoetanol | 0,2ml |

El ADN total aislado se suele comprobar en un gel rutinario de agarosa para comprobar si se encuentra en buenas condiciones o si está degradado, observándose en este caso numerosas bandas como consecuencia de la acción de ADNasas.

Los geles de agarosa que se emplearon en el presente estudio, tanto en la comprobación rutinaria de ADN total como del producto de amplificación de la PCR o durante la separación de los fragmentos de restricción, fueron preparados al 2% en 150 ml de tampón 1x TBE (Tris 0.089M, ácido bórico 0.008M y EDTA 0.089M), añadiéndose 15 μ l de bromuro de etidio al final de la cocción. La función bromuro de etidio es la de insertarse entre las dos hebras de ADN y

producir fluorescencia bajo luz ultravioleta y de esta forma poder posicionar y fotografiar las bandas de ADN.

Para la migración, los geles se situaron en la cubeta de electroforesis totalmente sumergidos en tampón 1x TBE, que actuó como tampón de electrodos, cargándose las muestras de ADN (aproximadamente 5 μ l) en los pocillos habilitados en el gel con una micropipeta. A las muestras de ADN se les añadió 1.5 μ l de un marcador de migración. Junto a las muestras de ADN también se cargaron marcadores de talla de ADN de hasta 1000 pb que nos serán muy útiles para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN con los que estamos trabajando.

2.2.3.- Amplificación del citocromo b del ADN mitocondrial

Usando PCR se amplificó un fragmento de 1200 pb en el cual se incluye el gen completo del Citocromo *b* del ADN mitocondrial. Para tal fin se comprobó la utilidad en nuestras muestras de ciprínidos europeos de los cebadores diseñados por Schmidt & Gold (1993) para un ciprínido norteamericano (*Lythrurus roseipinnis*) obteniéndose un buen resultado.

Los citados cebadores consisten en secuencias cortas de nucleótidos (entre 20 y 30) que tienen la función de iniciar la reacción de PCR. Estas moléculas presentan una secuencia de bases con alta complementariedad (sobre todo en el extremo 3') respecto a la secuencia que presentan las regiones que delimitan el fragmento que queremos amplificar (Avisé, 1994).

En esencia, una reacción de PCR consiste en una primera fase de desnaturalización de la doble cadena de ADN mediante el empleo de una temperatura elevada en el medio. Como consecuencia de esta desnaturalización la doble hélice se desenrolla y se estira. De esta forma dejan accesibles los nucleótidos para el acoplamiento de los cebadores que reconocerán y se situarán

en los lugares en los que la secuencia de nucleótidos sea complementaria a la que ellos portan.

Para el acoplamiento de los cebadores se emplea otra temperatura de reacción más baja, pero lo suficientemente elevada como para mantener desnaturalizada la doble hélice. La temperatura de acoplamiento es altamente específica de modo que temperaturas elevadas sólo permitirán la unión de cebadores en los que la similitud de las secuencias de reconocimiento sea muy alta, mientras que temperaturas más bajas van a perder especificidad y van a permitir el acoplamiento del cebador en regiones donde las secuencias no son totalmente complementarias pudiéndose amplificar fragmentos no deseados.

Los cebadores ya situados actúan como iniciadores de una reacción de replicación del fragmento de ADN que se dispone a continuación, también conocida como fase de extensión, en la que se van añadiendo los nucleótidos necesarios para construir una cadena complementaria a la de ADN ya existente. Para la replicación de la cadena se usa la enzima *Taq* polimerasa como moderadora de la agregación de nucleótidos. Ella actúa con otra temperatura distinta, más elevada, que la que se usó para el acoplamiento de los cebadores. La elevada temperatura usada en la fase de extensión facilita y acelera la reacción de replicación. El descubrimiento y aislamiento de las enzimas encargadas de esta función en organismos que habitan ambientes extremos, como son las bacterias de los manantiales termales como *Thermus aquaticus* (*Taq*), fue fundamental ya que a estas temperaturas tan elevadas la polimerasa de cualquier otro organismo se desnaturalizaría y a 37 °C la reacción sería demasiado lenta.

La reacción que acabamos de describir con sus tres fases (desnaturalización, acoplamiento y extensión) se producen sobre las dos hebras de ADN en sentido inverso aunque siempre en el sentido de la replicación. Por ello, al finalizar el ciclo se replican la dos hebras y por tanto se obtiene una copia del fragmento de ADN de nuestro interés. Esto quiere decir que si partiésemos de

una simple copia de ADN al término de un ciclo de PCR obtendríamos dos copias, por tanto, al término de 30 ciclos habremos obtenido 2^{30} copias del fragmento que queremos procesar.

De esta forma, a partir de una pequeña cantidad de ADN total vamos a obtener un producto final de PCR consistente en millones de copias de un fragmento determinado de ADN, que puede servir de base para un estudio con enzimas de restricción (en nuestro caso, el Citocromo *b* del ADN mitocondrial).

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron:

LA 5'-GTGACTTGAAAAACCACCGTTG-3'

HA 5'-CAACGATCTCCGGTTTACAAGAC-3'.

2.2.3.1.- Protocolo

Al igual que durante la extracción de ADN, durante la preparación de la reacción de PCR se debe extremar el cuidado con el material y puesto de trabajo para evitar contaminaciones y amplificar un producto no deseado por lo que todo el material empleado ha de estar perfectamente esterilizado.

Para cada individuo, se preparó en un tubo eppendorf de 1 ml una reacción consistente en 2 μ l de ADN genómico o total, 4 unidades de *Taq* Polimerasa (Promega, Madison, WI), 5 μ l de tampón 10x (suministrado en el paquete comercial junto con la *Taq* polimerasa) y 5 μ l de $MgCl_2$ ($0,025 \text{ mol l}^{-1}$, administrado junto con la polimerasa). También se añaden 5 μ l de una mezcla de los nucleótidos C, T, A, G ($2 \mu\text{mol l}^{-1}$ de cada nucleótido, Boehring Mannheim, Indianápolis, IN), que van a constituir las cadenas que se copien durante la reacción de PCR y 2,5 μ l de cada una de las dos soluciones stock de los

cebadores ($10 \mu\text{mol l}^{-1}$), y por último, $28 \mu\text{l}$ de agua destilada estéril. La solución final lista para la reacción consta de $50 \mu\text{l}$.

Justo antes de introducir la muestra en el termociclador, se depositaron dos gotas de aceite mineral en cada eppendorf para evitar la evaporación de la solución de reacción ya que se verá sometida a elevadas temperaturas.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador en el que se programó un ciclo inicial consistente en tres fases o intervalos de tiempo en los que la temperatura fue diferente. La primera fase consiste en proporcionar una temperatura de $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 segundos para producir la desnaturalización de la molécula de ADN. Durante la segunda fase la temperatura permanece en $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 segundos, produciéndose el alineamiento o acoplamiento de los cebadores sobre la secuencia que reconocen, y la tercera fase consiste en elevar de nuevo la temperatura hasta $72 \text{ }^\circ\text{C}$ permaneciendo así durante 90 segundos para replicar el ADN (extensión). Estas tres fases o ciclos se repiten 25 veces.

El producto final de la reacción de PCR se mantiene a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ en el termociclador y después se almacena en un congelador a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Previo a su utilización en el análisis de restricción, el ADN amplificado con PCR se visualizó en un gel rutinario de agarosa al 2% para comprobar si realmente se produjo amplificación y el grado de pureza de ésta.

En aquellos casos en los que se apreciaron subbandas, como consecuencia de la amplificación de fragmentos no deseados, junto a la banda de 1200 pb que engloba el Citocromo *b* se procedió a repetir la reacción aumentando la temperatura de acoplamiento. Ello se realizó, como ya hemos comentado para elevar la especificidad en el reconocimiento de la secuencia complementaria en los cebadores. En los individuos en los que no se mejoraron los resultados se procedió a la purificación del producto de PCR mediante un paquete comercial de

purificación (en nuestro caso el de la casa Promega) siguiéndose el protocolo especificado en el boletín técnico.

2.2.4.- Digestión del citocromo b con enzimas de restricción

El ADN amplificado y purificado de cada individuo se va a digerir por separado con cada una de las enzimas de restricción que se van a ensayar, por lo que la cantidad de reacciones de digestión será igual al número de individuos a analizar por el número de enzimas disponibles.

2.2.4.1.- Protocolo

Cada una de estas reacciones de digestión se efectuaron en gradillas estériles especiales con pocillos de 0.5 ml, consistiendo cada reacción en 10 μ l del producto de ADN amplificado, 1 μ l de la enzima correspondiente, 2 μ l de tampón (50-100 mM de NaCl, según la enzima) y 7 μ l de agua destilada estéril.

Las reacciones ya preparadas se incubaron durante toda la noche a la temperatura adecuada según la enzima que fuese utilizada (37°, 50° ó 60 °C en cámara de incubación, al baño maría o en estufa, respectivamente).

Tras la digestión, los fragmentos de digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Una vez finalizada ésta, se visualizaron con luz ultravioleta y se fotografiaron.

En el presente estudio, las enzimas empleadas en las reacciones fueron las siguientes: *Ava*I, *Ava*II, *Bam*HI, *Bcl*II, *Bgl*III, *Bst*EII, *Bst*NI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Mlu*I, *Mse*I, *Nco*I, *Nde*I, *Nhe*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sac*II y *Taq*I. En la Tabla 6 se muestran las secuencias de pares de base que reconoce cada una y la temperatura óptima para realizar su función.

Tabla 6. Enzimas de restricción utilizadas en el análisis del polimorfismo del ADN mitocondrial.

| Enzima de restricción | Secuencia de reconocimiento | Temperatura de incubación |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| <i>Ava</i> I | C'(T/C)CGUG | 37° |
| <i>Ava</i> II | G'G(A/T)CC | 37° |
| <i>Bam</i> HI | G'GATCC | 37° |
| <i>Bcl</i> I | T'GATCA | 50° |
| <i>Bgl</i> II | A'GATCT | 37° |
| <i>Bst</i> EII | G'GTNACC | 60° |
| <i>Bst</i> NI | CC'(A/T)GG | 60° |
| <i>Eco</i> RI | G'AATTC | 37° |
| <i>Eco</i> RV | GAT'ATC | 37° |
| <i>Hind</i> III | A'AGCTT | 37° |
| <i>Mlu</i> I | A'CGCGT | 37° |
| <i>Mse</i> I | T'TAA | 37° |
| <i>Nco</i> I | C'CATGG | 37° |
| <i>Nde</i> I | CA'TATG | 37° |
| <i>Nhe</i> I | G'CTAGC | 37° |
| <i>Pvu</i> II | CAG'CTG | 37° |
| <i>Sac</i> I | GAGCT'C | 37° |
| <i>Sac</i> II | CCGC'GG | 37° |
| <i>Taq</i> I | T'CGA | 65° |

(') representa el punto preciso de corte.

3.- *Tratamiento de los datos*

3.1.- *Cálculo del contenido de ADN celular con citometría de flujo*

El contenido de ADN de las células de corazón de cada muestra analizada (C_m) se determina calculando el cociente entre la fluorescencia media en las células del pez (F_m) y la fluorescencia media de las células humanas (F_h) y multiplicando por el contenido de ADN de las células humanas (C_h) tomado en el presente estudio como 7 pg. La misma muestra de solución estándar de sangre periférica humana fue usada durante todo el análisis para permitir que los resultados fuesen comparables.

$$C_m = \frac{\bar{F}_m}{\bar{F}_h} \times C_h$$

Para la adquisición de los núcleos del tejido cardiaco y obtención de los valores de fluorescencia se empleo el programa LYSIS II Becton Dickinson.

3.2.- *Variabilidad intrapoblacional*

3.2.1.- *Aloenzimas*

Los datos obtenidos de los zimogramas se introdujeron en una hoja de cálculo y más tarde se codificaron en una matriz de entrada en lenguaje FORTRAM para ser procesados mediante el programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989).

Mediante este programa, se obtuvieron las frecuencias alélicas y también se analizaron los parámetros de variabilidad genética de las poblaciones híbridas y de los supuestos parentales, y se comprobó el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los parámetros de variabilidad genética estudiados fueron el número medio de alelos por locus (A), la tasa de polimorfismo (P) y la heterocigosidad observada (H_o) y teórica o esperada (H_T).

En el cálculo del número medio de alelos por locus se empleó la fórmula

$$A = \frac{\sum a}{r}$$

donde r = número de loci y a = número de alelos en un locus.

La tasa de polimorfismo se mide como el tanto por ciento de loci polimórficos por población. En el presente trabajo se ha considerado un locus como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común era igual o menor al 95% (criterio del 95%).

La heterocigosis teórica se calcula en función del número medio de alelos existentes en cada locus y de la frecuencia que éstos presentan. Se estima mediante la fórmula:

$$H_T = \sum \frac{h}{r}$$

donde r = número de loci y h = índice de diversidad genética de cada locus y viene definido por la fórmula:

$$h = 1 - \sum q_i^2$$

donde q_i es la frecuencia del alelo i en el locus dado.

Cuando la población está en equilibrio la heterocigosis observada (H_o) debe ser semejante a la teórica (H_T), que entonces será equivalente a la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto en un locus dado. Sin embargo, cuando las poblaciones no son panmícticas, como presumiblemente ocurre con los individuos híbridos en los que todos los cruces no son igualmente probables y en los que determinados loci aparecen fijados en heterocigosis en toda la población, se da un exceso de heterocigosis observada muy por encima de la esperada. En estos casos el único estimador de la probabilidad de encontrar a un individuo heterocigotos en un locus dado es la heterocigosis observada (H_o).

La ley de Hardy-Weinberg especifica que las frecuencias génicas y genotípicas permanecen invariables generación tras generación, por lo que si en una población dada encontramos dos alelos a y b de un mismo locus, siendo p la frecuencia del alelo a y q la frecuencia del alelo b , entonces $p + q = 1$, y la frecuencia con que aparecerá un individuo homocigoto aa , un homocigoto bb o un heterocigoto ab vendrá dada por la fórmula:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Esta ley se basa en dos hipótesis de partida que son el considerar a las poblaciones como infinitas y panmícticas (fecundación al azar) y, además, asume que no se dan en ellas fenómenos dispersivos como mutaciones, migración o selección. En el caso de los organismos híbridos estas asunciones son insalvables,

ya que las poblaciones no parecen ser panmícticas, ni tampoco infinitas (Avisé *et al.*, 1992; Vrijenhoek, 1994) y además parece existir una selección ecológica fuerte sobre determinados clones (Vrijenhoek, 1984a).

3.2.2.- ADN mitocondrial

La longitud de los fragmentos de restricción se determinó con el programa GelReader v2.0 (NCSA Software Tools Group, 1991) a partir de las fotografías tomadas sobre los geles y usando como referencia distintos marcadores de talla de hasta 2000 pb que se hicieron migrar en cada gel con las muestras.

Los patrones de corte (número de fragmentos y longitud de los mismos) producidos por las distintas enzimas sobre el citocromo *b* permitieron determinar los haplotipos existentes, constituyendo un haplotipo todos aquellos individuos que mostraban el mismo patrón de corte para cada una de las enzimas analizadas.

3.3.- Variabilidad interpoblacional

3.3.1.- Aloenzimas

A partir de las frecuencias alélicas obtenidas en los zimogramas se puede estimar el grado de diferenciación genética que se ha producido entre dos poblaciones. Para calcular esta diferenciación se utilizan ciertos índices que son capaces de estimar el número de sustituciones alélicas que han sido acumuladas desde la separación de dos grupos. O lo que es lo mismo, el número neto de codones sustituidos en un locus desde que esas dos poblaciones comenzaron a evolucionar por separado.

Existe una gran variedad de índices para calcular la divergencia o distancia genética entre las poblaciones y todos ellos han sido definidos partiendo de

distintas asunciones biológicas y matemáticas que les proporcionan ciertas propiedades y ciertas limitaciones.

Los índices más comúnmente usados son los de Cavalli-Sforza & Edwards (1967), Fitch (1971), Nei (1972), Rogers (1972), Nei (1978), Wright (1978) y Hillis (1984), y de entre ellos destacamos las distancias de Nei (1972) y de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) (distancias de arco y cuerda). Una discusión más detallada de la mayoría de los índices existentes puede verse en Wright (1978) y Nei (1987).

El índice de Nei es uno de los más utilizados en la literatura a pesar de haber sido criticado (Farris, 1981; Hillis, 1984) ya que, por un lado, asume una tasa de sustitución de genes por locus uniforme tanto entre distintos loci como entre organismos, y por otro lado, es una distancia no métrica, incumpliendo el axioma matemático de la desigualdad del triángulo. Sin embargo, este último inconveniente parece corregirse al aumentar el número de loci estudiados (Nei *et al.*, 1983).

La distancia de Nei (D) se mide como:

$$D = - \ln I$$

donde I representa la identidad genética entre las dos poblaciones, variando entre 0 y 1 (ningún alelo en común o todos en común e igual frecuencia). La identidad genética se obtiene de la fórmula:

$$I = \frac{\sum X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}}$$

donde X_i = frecuencia del alelo i en la población X, e Y_i = frecuencia del alelo i en la población Y.

El índice de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) es también muy utilizado en la literatura ya que no presenta algunas de las limitaciones del índice de Nei, incorporando asunciones realistas desde el punto de vista biológico sobre la naturaleza de los cambios evolutivos que modifican las frecuencias génicas (Swofford & Olsen, 1990).

$$D_{arc} = \sqrt{(1/L) \sum_L (2\theta/\pi)^2}$$

donde $\theta = \cos^{-1} \sum \sqrt{X_i Y_i}$ siendo X_i = frecuencia del alelo i en la población X, e Y_i = frecuencia del alelo i en la población Y.

Para el cálculo de las distancias genéticas entre distintas poblaciones de especies bisexuales se utilizó también el programa BIOSYS-1 introduciendo en la opción SIMDIS del programa el índice deseado para la estima de la distancia genética.

3.3.2.- ADN mitocondrial

A partir de los patrones de corte de las enzimas se puede calcular la divergencia nucleotídica entre dos individuos siguiendo el método de Nei & Li (1979). La divergencia nucleotídica entre dos individuos o poblaciones se define como el número medio de sustituciones por secuencia nucleotídica (d) y viene representado por la fórmula:

$$d = 2\Gamma t$$

donde Γ es la tasa de sustituciones nucleotídicas durante el tiempo transcurrido t .

Sin embargo, la divergencia nucleotídica suele estimarse a partir de la simple medida de la proporción de fragmentos de restricción que comparten dos

taxa para una secuencia determinada (Upholt, 1977), por lo que si N_x , N_y y N_{xy} representan el número de fragmentos de restricción obtenidos de la secuencia del individuo X, del individuo Y y los compartidos por X e Y respectivamente, la proporción de fragmentos compartidos se calcularía mediante la fórmula:

$$F = \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y}$$

Por tanto, el número de sustituciones por nucleótido (o aproximadamente, el porcentaje de nucleótidos sustituidos) se estima mediante la fórmula:

$$p = \frac{-\ln F}{r}$$

donde r es el número de pares de bases que son reconocidas por las enzimas en el punto de corte. Como r varía entre unas enzimas empleadas y otras, el valor de p debe calcularse independientemente para aquellas enzimas que reconozcan una secuencia de cuatro, cinco o seis pares de bases, y el valor final de la distancia será la media ponderada de estos valores (ver revisión en Avise, 1994 sobre otras estimas de la divergencia nucleotídica).

Para realizar estos cálculos, se ha usado el programa REAP v4.0 (McElroy *et al.*, 1992) y de esta forma se generó una matriz de porcentaje de sustituciones nucleotídicas por secuencia de reconocimiento (d) siguiendo el método antes expuesto (Nei & Li, 1979).

3.4.- *Reconstrucciones filogenéticas*

Los datos obtenidos del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción nos permiten abordar la filogenia de los individuos en base al citocromo *b*.

Para el estudio de la filogenia hemos considerado dos aproximaciones distintas (ver amplias revisiones en Swofford & Olsen, 1990; Avise, 1994): en la primera, se tiene en cuenta los datos de distancias genéticas, y en la segunda, se tiene en cuenta los datos cualitativos o de estados del carácter.

3.4.1.- *Distancias genéticas*

Esta primera aproximación consiste en estimar cuantitativamente las divergencias a nivel genético que existen entre dos secuencias de nucleótidos, dos individuos o dos organismos u OTUs (Operational Taxonomic Units). Las unidades en que se mide las distancias genéticas varía con la fuente de información molecular, y así, para electroforesis de aloenzimas, las distancias genéticas se interpretan como el número neto de codones sustituidos en un locus que han sido acumuladas desde la separación de dos grupos, mientras que para estudios de fragmentos de restricción del ADN se estiman como el número medio de sustituciones de bases por secuencia nucleotídica (Avise, 1994).

El procedimiento básico para construir la filogenia del grupo consiste en generar una matriz de OTU x OTU en la que aparezcan las distancias genéticas estimadas entre cada dos taxa. A partir de esta matriz, el método consiste en buscar la distancia más pequeña estimada entre dos taxa. Una vez encontrada, los dos OTUs (por ejemplo A y B) que presentan esta menor distancia entre sí son agrupados o unidos mediante un nodo interno y esta unión será reflejada representando los dos OTU en los extremos de sendas ramas unidas por el nodo en una posición apropiada a lo largo de un eje de distancias. La matriz se analiza

de nuevo para encontrar la siguiente distancia menor de entre las que quedan, y si ésta se diese entre un nuevo OTU (C) y otro que ya se hubiese agrupado previamente (por ejemplo A), la unión no se establecería directamente entre ellos, sino entre el nuevo OTU (C) y el nodo interno (A-B) previamente formado. La posición en el eje de distancias en la que aparecería el nuevo nodo interno se determinaría mediante el cálculo de la media aritmética entre las distancias de C con respecto a los otros dos OTUs (A y B), agrupados previamente.

De este modo, cada rama del nodo se representa del mismo tamaño debido a que cada OTU contribuye de igual manera en el cálculo de las distancias medias. Por ello, este método también se conoce como “unweighted pair group method with arithmetic averages” (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973). Una de las principales características de este método es que asume una tasa de evolución similar en todas las ramas del dendrograma, o lo que es lo mismo, que la divergencia que se ha producido entre los distintos OTUs ha sido al mismo ritmo.

Existen otros tres métodos ampliamente usados para estimar filogenias a partir de distancias genéticas y se diferencian del UPGMA, básicamente, en que no asumen esta uniformidad en cuanto a la tasa de evolución entre las distintas ramas del dendrograma. Estos tres métodos son el de FITCH-MARGOLIASH (Fitch & Margoliash, 1967), el de NEIGHBOR-JOINING (Saitou & Nei, 1987), y el de WAGNER (Farris, 1972).

De entre estos tres métodos destacamos de Neighbor-Joining para el tratamiento de los datos obtenidos con el análisis de restricción, ya que se asemeja mucho al UPGMA y, además, es adecuado para aquellos casos en los que se observan tasas de cambio molecular diferentes entre distintas ramas del dendrograma. Con este método se construye una matriz de distancias transformadas en las que la separación entre cada par de nodos se corrige en base a la divergencia media que presentan éstos con respecto al resto de los nodos (Saitou & Nei, 1987). El efecto que se consigue mediante este ajuste es el de

normalizar la divergencia de cada taxón por su tasa de evolución media (Swofford & Olsen, 1990).

Usando la matriz de distancias obtenidas a partir de las sustituciones nucleotídicas se creó un dendrograma en el que se agrupan los taxa en función de la similitud de las secuencias nucleotídicas y para ello se empleó el programa MEGA v1.01 (Kumer *et al.*, 1993)

3.4.2.- Datos cualitativos

Las técnicas moleculares aquí estudiadas son también capaces de proporcionar caracteres discretos que serán empleados para hacer reconstrucciones filogenéticas. Los caracteres a estudiar vienen definidos por distintos estados que pueden ser dos (caracteres binarios, como la presencia o la ausencia de ese carácter) o pueden ser tres o más (carácter multiestado, como el tipo de nucleótido que se encuentre en una posición particular en la secuencia del ADN). La técnica empleada en cada caso nos proporcionará el estado del carácter que presenta cada OTU.

En el caso de datos aloenzimáticos los caracteres considerados son los loci mientras que los estados del carácter son las posibles combinaciones alélicas que se pueden dar en cada locus. En los estudios con enzimas de restricción cada enzima con que se trata la secuencia sería el carácter a considerar, mientras que los estados del carácter lo constituirían todos los posibles patrones de corte (número de fragmentos y tamaño de los mismos) que produciría una endonucleasa concreta.

A partir de las matrices de estados del carácter y usando los principios de parsimonia podemos construir un árbol filogenético en el que se requiera el menor número de pasos evolutivos para explicar las diferencias observadas entre los OTUs (método de máxima parsimonia). Este método se puede emplear tanto

para caracteres ordenados (como los fragmentos de restricción) como para caracteres desordenados (los alelos de un locus en electroforesis de aloenzimas) y presenta la ventaja de que puede emplearse sobre caracteres que no tienen polaridad (aquellos en los que no se conoce el estado ancestral y el estado del descendiente).

Al igual que ocurre con los datos de distancias genéticas, para las matrices de estados del carácter también existen distintos métodos de análisis en los que varían las asunciones de cómo ocurren las transformaciones en los estados del carácter. Los más comúnmente usados son:

El método de parsimonia de Wagner (Farris, 1970; Kluge & Farris, 1969), en el que se considera la reversibilidad de los estados del carácter dentro de un árbol con igual probabilidad de cambio en ambas direcciones. Los caracteres que utiliza son binarios o multiestado ordenados, considerándose la reversibilidad sólo entre aquellos estados adyacentes.

El método de parsimonia de Dollo (Farris, 1977), puede ser aplicado sobre caracteres binarios o multiestado ordenados en los que además se conozca la polaridad en dichos caracteres (se conozca el estado ancestral), aunque no es una exigencia. Este método es apropiado cuando la probabilidad de reversión de un estado del carácter a otro no es la misma que en el sentido contrario (asimetría). Por ello, se ha sugerido que este método es el más apropiado para caracteres basados en fragmentos de restricción (DeBry & Slade, 1985; Avise, 1994) debido a que la pérdida de un punto de corte para una enzima de restricción es más probable que la aparición de un punto de corte nuevo. Una mutación puntual que sustituya un nucleótido en una zona de corte elimina la posibilidad de reconocimiento por parte de la enzima de restricción.

El método de parsimonia de Camin-Sokal (Camin & Sokal, 1965) es el menos usado en estudios moleculares ya que parte de la asunción de que los cambios evolutivos son irreversibles.

En cualquier caso, a partir de cierto número de caracteres y de OTUs, el número de árboles filogenéticos que se podría construir es enorme y para limitarnos a aquellos en los que la filogenia se explica desde un punto de vista más parsimonioso se suelen utilizar distintos algoritmos (exhaustivos, branch-and-bound, heurísticos) que hacen una búsqueda selectiva de aquellos árboles en los que se explica las diferencias genéticas entre los OTUs mediante un menor número de pasos evolutivos (menor longitud en las ramas).

Finalmente, para estimar cuánto de real tiene nuestra inferencia de la filogenia, se usan, entre otros, ciertos métodos de entre los que destaca el de Bootstrap. En un bootstrap los datos son muestreados al azar, con reemplazamiento, del conjunto de datos original, hasta que se obtiene otro conjunto de datos que contiene el número original de observaciones (réplica). Tras efectuar múltiples réplicas, los caracteres son pesados de acuerdo con el número de veces que aparecen en cada réplica, y así, si una agrupación concreta aparece en el 95% o más de los árboles construidos mediante las réplicas empleadas, se puede concluir que esa agrupación se soporta significativamente (a un nivel del 95%).

Para los datos aloenzimáticos las reconstrucciones filogenéticas se realizaron a partir de la comparación de matrices de pasos para cada locus siguiendo el procedimiento recomendado por Mabee & Humphries (1993). Las matrices de pasos se construyen enumerando todos los estados del carácter que han aparecido y las distancias entre ellos. En el caso de aloenzimas, todas las combinaciones alélicas que se han encontrado entre las distintas poblaciones para un locus determinado, y calculando el número mínimo de pasos evolutivos que

serían necesarios para pasar de una combinación alélica a otra (de un estado del carácter a otro).

En esta metodología se considera con igual probabilidad tanto la pérdida como la ganancia de un alelo, por lo que cuanto mayor sea el número de alelos en que se diferencian dos combinaciones alélicas determinadas mayor número de pasos será necesario para pasar de una a otra y por tanto mayor será la distancia entre ellas.

Sin embargo, si construimos las matrices de pasos sólo en base a las combinaciones alélicas observadas en los taxa actuales podemos omitir estados del carácter que podrían estar presentes en los taxones ancestrales. Por tanto, se debería considerar todas las combinaciones alélicas posibles para construir el árbol más parsimonioso. Mardulyn & Pasteels (1994) propusieron un método alternativo sencillo para no tener que calcular todas las combinaciones alélicas y que está basado en ciertas reglas para calcular, a partir de los estados observados, aquellos que serían estrictamente necesarios para garantizar la búsqueda del árbol más parsimonioso. Para generar el árbol más parsimonioso a partir de las matrices de pasos con los datos aloenzimáticos usamos el programa PAUP versión 3.1.1 (Swofford, 1993).

También utilizamos el programa REAP versión 4.0 para generar una matriz de estado del carácter de los haplotipos a partir de los resultados de los fragmentos de restricción, considerando la digestión con cada enzima de restricción como un carácter y el patrón de corte que produce sobre una determinada secuencia como el estado del carácter.

Por otro lado, para crear el árbol más parsimonioso a partir de la matriz original de estados del carácter de los haplotipos también se usó el programa PAUP version 3.1.1 (Swofford, 1993). Para estos análisis se usó *Chondrostoma polylepis* como grupo externo.

RESULTADOS

1.- El complejo Tropicophoxinellus alburnoides

1.1.- Análisis de la ploidía y de la proporción de sexos

Durante los muestreos realizados en las principales cuencas hidrográficas por donde se distribuye el complejo *T. alburnoides* se capturaron un total de 177 ejemplares (Tabla 1) distribuidas por todas las cuencas hidrográficas donde ha sido citada la especie (Duero, Tajo, Guadiana y Guadalquivir) excepto en la del Odiel.

De los resultados iniciales, habría que destacar el hecho de que aparecieron individuos triploides ($3n=75$) en todas las poblaciones seleccionadas de las cuencas del Duero, Tajo, Guadiana y Guadalquivir.

En segundo lugar, también habría que destacar que en todas las poblaciones el número de hembras encontrado superó desproporcionadamente al de machos.

El tercer resultado importante consistió en que la proporción de individuos diploides frente a la de triploides varió de una población a otra, independientemente de que pertenecieran a la misma cuenca hidrográfica, al igual que lo hizo la proporción de machos frente a la de hembras.

También aparecieron un número apreciable de individuos a los que no se les pudo determinar el sexo por observación directa de las gónadas. La causa más probable es que se trate de individuos juveniles que no hayan desarrollado aún sus gónadas como parece indicar el pequeño tamaño de muchos de ellos, pero también pudo influir la época de captura. No habría que descartar tampoco la existencia de individuos estériles con malformaciones genitales como

consecuencia de su origen híbrido pero en ausencia de algún estudio al respecto, se consideran aquí como individuos juveniles.

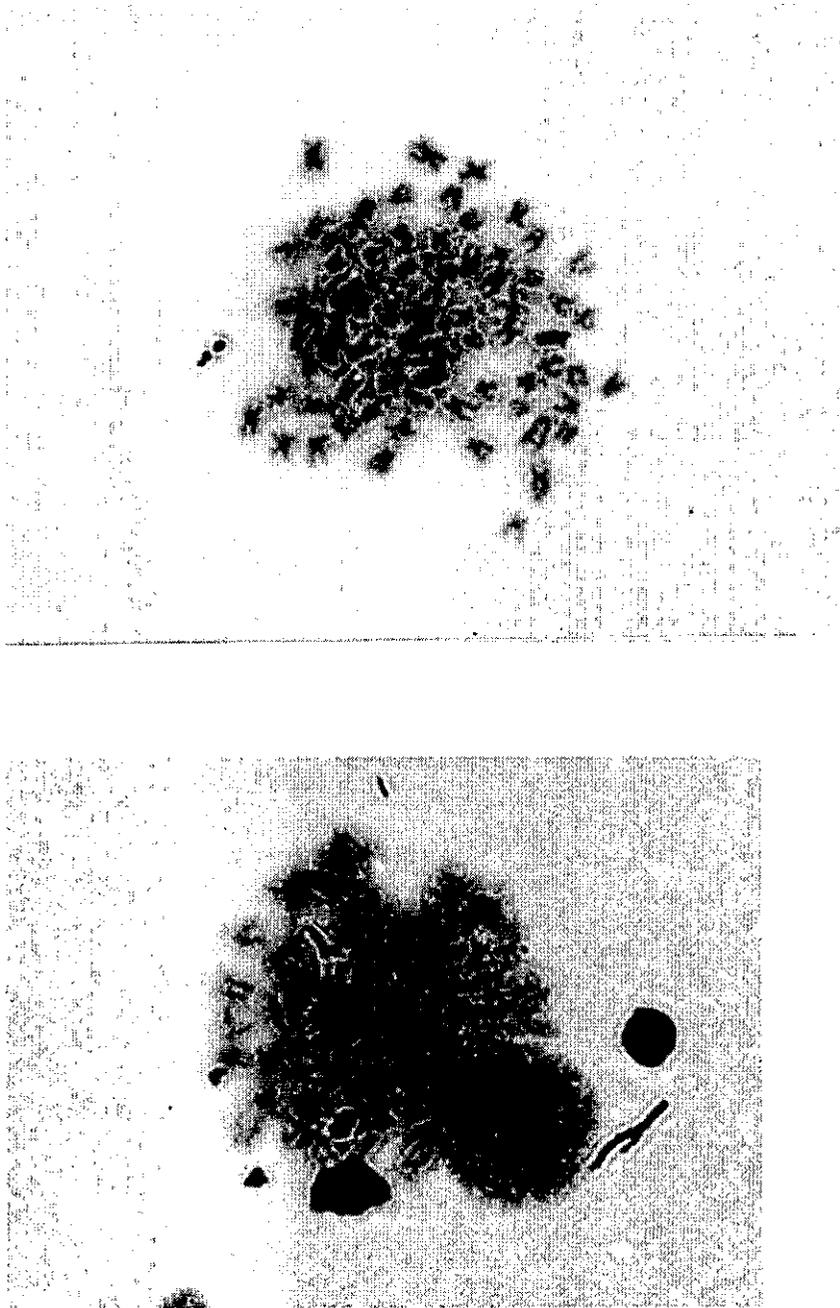


Fig. 5. Cariotipos de un individuo triploide $3n=75$ en la parte superior y de otro diploide $2n=50$ de *T. alburnoides*.

Si bien los tamaños de las poblaciones fueron moderados, los resultados obtenidos son indicativos de la composición de las poblaciones ya que en muchos casos éstas estaban confinadas en pequeñas pozas debido a un período prolongado de sequía. Considerando de forma individual las poblaciones analizadas para una mejor comprensión los resultados fueron:

Río Águeda: La relación de machos frente a la de hembras fue de 1:9 es decir, los machos supusieron el 9,1% del total frente al 81,8% de las hembras. El tanto por ciento restante son individuos juveniles. En cuanto a la ploidía, resalta el hecho de que los individuos triploides sobrepasan, con mucho, el número de individuos diploides en esta población. Los individuos triploides supusieron el 77,8% frente al 21,2% de los diploides (Tabla 7).

Tabla 7. Proporción de sexos y ploidías en la población del complejo *T. alburnoides* del río Águeda.

| Localidad | Sexo | Ploidía | | Total |
|---|--------------|-----------|------------|-------|
| | | Diploides | Triploides | |
| Río Águeda (La Fregeneda, Salamanca) | Machos | 1 | 2 | 3 |
| | Hembras | 6 | 21 | 27 |
| | Juveniles | 0 | 3 | 3 |
| | Total | 7 | 26 | 33 |

Río Arrago: En este río la proporción de machos frente a la de hembras fue de 1:2. El 25,9% de los individuos fueron machos y el 51,8% de hembras, aunque se recolectaron muchos individuos juveniles, por lo que la verdadera proporción de hembras en la población puede ser mayor.

El número de individuos diploides resultó ser mayor (62,9%) que el de triploides (37,1%) en esta población, siendo hembras la mayoría de los diploides (Tabla 8).

Tabla 8. Proporción de sexos y ploidías en la población del complejo *T. alburnoides* del río Árrago.

| Localidad | Sexo | Ploidía | | Total |
|----------------------------------|--------------|-----------|------------|-------|
| | | Diploides | Triploides | |
| Río Árrago (Cadalso, Cáceres) | Machos | 5 | 2 | 7 |
| | Hembras | 8 | 6 | 14 |
| | Juveniles | 4 | 2 | 6 |
| | Total | 17 | 10 | 27 |

Río Almonte: La proporción de machos frente a la de hembras resultó estar muy desplazada hasta éstas últimas siendo de 1:6,5. Los machos supusieron el 10,6% frente al 66,6% de las hembras y, además, aparecieron un número apreciable de individuos juveniles (Tabla 9).

Al igual que en el río Árrago, la población del Almonte presentó un número mayor de individuos diploides (66,6%) que de triploides.

Tabla 9. Proporción de sexos y ploidías en la población del complejo *T. alburnoides* del río Almonte.

| Localidad | Sexo | Ploidía | | Total |
|-------------------------------------|--------------|-----------|------------|-------|
| | | Diploides | Triploides | |
| Río Almonte (Jaraicejo, Cáceres) | Machos | 2 | 2 | 4 |
| | Hembras | 18 | 8 | 26 |
| | Juveniles | 6 | 3 | 9 |
| | Total | 26 | 13 | 39 |

Río Tiétar: Se caracterizó por no haber encontrado ningún macho entre la muestra colectada, por lo que la proporción de éstos en la población debe ser muy baja, estando prácticamente toda la población compuesta por hembras. A diferencia de las otras dos poblaciones estudiadas en la cuenca del Tajo, la del Tiétar muestra de nuevo una mayor proporción de individuos triploides que de

diploides, consistiendo los primeros un 73,9% frente al 26,1% de los individuos diploides (Tabla 10).

Tabla 10. Proporción de sexos y ploidías en la población del complejo *T. alburnoides* del río Tiétar.

| Localidad | Sexo | Ploidía | | Total |
|-----------------------------------|--------------|-----------|------------|-------|
| | | Diploides | Triploides | |
| Río Tiétar (Iglesuela, Toledo) | Machos | 0 | 0 | 0 |
| | Hembras | 5 | 14 | 19 |
| | Juveniles | 1 | 3 | 4 |
| | Total | 6 | 17 | 23 |

Río Estena: Debido a la sequía, la población del complejo *T. alburnoides* estaba muy reducida y limitada a pequeñas pozas en la parte alta del río y por ello se capturó un número considerable de individuos juveniles frente al de adultos. De cualquier forma, la proporción de machos frente a la de hembras resultó ser prácticamente de 1:3, siendo los machos el 16,1% del total de individuos capturados y las hembras el 41,9% (Tabla 11).

Con respecto a la ploidía, el número de triploides (58,1%) excedió al de diploides (41,9%).

Tabla 11. Proporción de sexos y ploidías en la población del complejo *T. alburnoides* del río Estena.

| Localidad | Sexo | Ploidía | | Total |
|--|--------------|-----------|------------|-------|
| | | Diploides | Triploides | |
| Río Estena (Navas de Estena, C. Real) | Machos | 4 | 1 | 5 |
| | Hembras | 1 | 12 | 13 |
| | Juveniles | 8 | 5 | 13 |
| | Total | 13 | 18 | 31 |

Río Gévora: La proporción de machos frente a la de hembras resultó ser de prácticamente 1:2, representando los machos el 30,4% del total de la población y las hembras el 56,5%. El 13,1% restante se debió a individuos juveniles (Tabla 12).

En cuanto a la proporción de diploides y triploides, los últimos resultaron ser más numerosos con un 65,2% frente a un 34,8% de los diploides.

Tabla 12. Proporción de sexos y ploidías en la población del complejo *T. alburnoides* del río Gévora.

| Localidad | Sexo | Ploidía | | Total |
|--|--------------|-----------|------------|-------|
| | | Diploides | Triploides | |
| Río Gévora (Alburquerque, Cáceres) | Machos | 4 | 3 | 7 |
| | Hembras | 2 | 11 | 13 |
| | Juveniles | 2 | 1 | 3 |
| | Total | 8 | 15 | 23 |

Río Alburrel: La proporción de hembras que se encontró en esta población fue muy superior a la de machos siendo la relación de 13:1. Los porcentajes encontrados fueron de un 6,3% para los machos y de un 81,2% para las hembras (Tabla 13).

En esta población el número de ejemplares diploides resultó ser ampliamente mayor al de triploides, siendo los porcentajes de un 87,5% para los diploides y de un 12,5% para los triploides.

Tabla 13. Proporción de sexos y ploidías en la población del complejo *T. alburnoides* del río Alburrel.

| Localidad | Sexo | Ploidía | | Total |
|--|--------------|-----------|------------|-------|
| | | Diploides | Triploides | |
| Río Alburrel (Valencia de Alcántara, Cáceres) | Machos | 1 | 0 | 1 |
| | Hembras | 11 | 2 | 13 |
| | Juveniles | 2 | 0 | 2 |
| | Total | 14 | 2 | 16 |

Río Rumblar: La proporción obtenida de machos frente a la de hembras supuso una relación casi de 1:7, siendo el porcentaje de machos un 12% frente al 80% que se obtuvo en el caso de las hembras (Tabla 14).

Los individuos triploides superaron a los diploides con un porcentaje del 68% frente al 32% de los diploides. Los valores absolutos figuran en la Tabla 14.

Tabla 14. Proporción de sexos y ploidías en la población del complejo *T. alburnoides* del río Rumblar.

| Localidad | Sexo | Ploidía | | Total |
|---|--------------|-----------|------------|-------|
| | | Diploides | Triploides | |
| Río Rumblar (El Centenillo, Jaén) | Machos | 1 | 2 | 3 |
| | Hembras | 6 | 14 | 20 |
| | Juveniles | 2 | 1 | 3 |
| | Total | 9 | 17 | 26 |

Si consideramos conjuntamente los datos obtenidos para cada población obtendremos unos datos globales que pueden darnos una idea de la estructura poblacional como una unidad. Además, en cada población los tamaños muestrales pueden sesgar los valores obtenidos para las proporciones de sexos y ploidías, por lo que una visión del conjunto de las poblaciones manejaría un tamaño de muestra mayor que evitaría este problema.

En la Tabla 15 se reflejan los valores globales para todas las poblaciones obteniéndose que el 13,8% de los individuos analizados fueron machos, el 66,5% fueron hembras y el 19,7% juveniles.

Paralelamente, la proporción de ploidías resultó ser del 45,9% para los individuos diploides y el 54,1% para los triploides.

Tabla 15. Proporción de sexos y ploidías en todas las poblaciones del complejo *T. alburnoides*.

| | Sexo | Ploidía | | Total |
|------------------------------|--------------|-----------|------------|-------|
| | | Diploides | Triploides | |
| Todas las Poblaciones | Machos | 18 | 12 | 30 |
| | Hembras | 57 | 88 | 145 |
| | Juveniles | 25 | 18 | 43 |
| | Total | 100 | 118 | 218 |

Habría que mencionar finalmente, que al igual que lo obtenido por Collares-Pereira (1985), en un número apreciable de individuos diploides y triploides, el conteo de cromosomas no siempre arrojó valores de $2n=50$ y $3n=75$, respectivamente. También se obtuvieron valores de $2n=48$ y 49 ó de $3n=70$, 71 , 72 y 73 , aún cuando el conteo se efectuó sobre varias placas mitóticas en un mismo individuo.

Los muestreos más intensivos realizados en la población del río Águeda para analizar el fenómeno de la hibridación permitieron que se dispusiese de un mayor número de individuos (233 ejemplares). Como se indicó en el capítulo de Material y Métodos, todos los ejemplares fueron llevados al laboratorio y sexados, pero sólo una parte de ellos (132 ejemplares) fueron cariotipados y sometidos a electroforesis de proteínas. Algo parecido ocurrió con la población del río Estena, aunque en ésta, prácticamente todos los ejemplares capturados fueron analizados. Los resultados obtenidos para la proporción de sexos y ploidía se detallan en la Tabla 16.

Si analizamos los ejemplares capturados vemos que en la población del río Águeda la proporción de machos frente a la de hembras fue prácticamente de 1:5, constituyendo los machos el 18% frente al 80,7% de las hembras. Al aumentar el tamaño de la población se observa que la proporción de machos prácticamente se duplica con respecto a los datos que ya teníamos de esta población (9,1%), mientras que la proporción de hembras permanece casi invariable (81,8%). En la

población del río Estena se aumentó poco el número de capturas por lo que las proporciones que ya teníamos de esta población se alteraron ligeramente en favor de las hembras.

Tabla 16. Proporción de sexos y de ploidías sobre el total de individuos capturados y examinados respectivamente para las poblaciones del complejo *T. alburnoides* en los ríos Águeda y Estena.

| | Sexo | Ploidía | | | Total | Total |
|-----------------------------------|--------------|---------|----|----|-----------|-----------|
| | | 2n | 3n | 4n | examinado | capturado |
| Río Águeda | | | | | | |
| (La Fregeneda, Salamanca) | Machos | 31 | 3 | 3 | 37 | 42 |
| | Hembras | 10 | 80 | 2 | 92 | 188 |
| | Juveniles | 0 | 3 | 0 | 3 | 3 |
| | Total | 41 | 86 | 5 | 132 | 233 |
| Río Estena | | | | | | |
| (Navas de Estena, Ciudad Real) | Machos | 4 | 1 | 0 | 5 | 5 |
| | Hembras | 1 | 12 | 0 | 13 | 22 |
| | Juveniles | 8 | 5 | 0 | 13 | 14 |
| | Total | 13 | 18 | 0 | 31 | 41 |

En cuanto a la ploidía, el primer hecho a resaltar, por encima de cualquier proporción, es el de la aparición de 5 individuos tetraploides con $4n = 100$. Estos individuos no se distinguieron morfológicamente del resto de la población y, además, presentaron una proporción de sexos aparentemente compensada con 3 machos y dos hembras.

El resto de los datos obtenidos para estas dos poblaciones se pueden ver en la Tabla 16 y de ellos resulta evidente que los machos resultaron ser predominantemente diploides, aunque también se encontraron algunos individuos

triploides. Sin embargo, las hembras fueron en su mayoría triploides, encontrándose algunas diploides.

En la población del río Águeda, tres individuos inmaduros que también entraron en el análisis, resultaron ser triploides, mientras que en la población del río Estena los 13 juveniles capturados fueron mayoritariamente diploides.

Por tanto, los individuos triploides supusieron el 65,2% del total de la muestra del río Águeda. Del mismo modo, en el río Estena, los triploides resultaron ser el 58,1% de la muestra. Sin embargo, estos porcentajes de ploidías no debemos interpretarlos como representativos de estas poblaciones ya que, como se comentó anteriormente, los ejemplares no se eligieron al azar seleccionándose intencionadamente casi todos los machos para ser cariotipados y analizados mediante electroforesis de proteínas. Dado que éstos son predominantemente diploides, estaríamos cometiendo un error al sobrestimar la proporción de individuos diploides (34,8% respecto al 21,2% estimado para 33 individuos).

Con respecto a los valores de contenido de ADN medidos con citometría de flujo se confirmó la existencia de individuos poliploides $3n$ y $4n$, obteniéndose valores discretos que permiten distinguir de forma inequívoca unos individuos de otros y con respecto a los individuos diploides.

Los valores encontrados fueron representados en histogramas de frecuencia con el programa LISYS II apareciendo dos picos discretos de contenido de ADN (uno para la muestra de sangre humana tomada como referencia y otro para la muestra problema), con coeficientes de variación (varianza obtenida en la medida de la fluorescencia en los 20.000 núcleos analizados) entre 0,5 % y 5 %. Los resultados vienen expresados en la Tabla 17.

Tabla 17. Contenidos de ADN obtenidos para los distintos niveles de ploidía obtenidos en los ejemplares del complejo *T. alburnoides*. El contenido de ADN se midió en picogramos (pg).

| Nivel de ploidía | Índice de ADN | | Contenido de ADN (pg) |
|------------------|---------------|------|-----------------------|
| | Rango | Moda | |
| Diploides | 0,39-0,41 | 0,41 | 2,87 |
| Triploides | 0,57-0,61 | 0,60 | 4,27 |
| Tetraploides | 0,79-0,83 | 0,81 | 5,67 |

El contenido de ADN obtenido para otras especies de ciprínidos analizadas en este trabajo resultó ser muy próximo al encontrado para los individuos diploides del complejo *T. alburnoides*. Para *Leuciscus carolitertii* el contenido medio de ADN fue de 2,79 pg mientras que para *Ch. polylepis duriensis* fue de 2,95 pg, por lo que no pudo ser utilizado para estudiar las posibles especies parentales que dieron lugar a los híbridos.

1.2.- Análisis poblacional mediante electroforesis de proteínas

A partir de los 132 individuos seleccionados en la población del río Águeda se desarrolló un estudio exhaustivo de aloenzimas para tratar de resolver algunas cuestiones sobre el fenómeno de la hibridación.

Durante la puesta a punto de la técnica se analizaron un total de 23 sistemas enzimáticos obteniéndose buenos resultados en 19 de ellos (Tabla 18). En los otros cuatro sistemas enzimáticos (Aconitasa, Proteína quinasa, Sorbitol deshidrogenasa y Xantina deshidrogenasa) no se consiguieron resultados satisfactorios en la resolución de los zimogramas, a pesar de haber utilizado distintos tampones.

Tabla 18. Sistemas enzimáticos, tejidos y tampones utilizados en la electroforesis de proteínas.

| Sistema enzimático | Código | Locus | Tejido | Tampón |
|-----------------------------------|----------|----------------|----------------|--------|
| Aspartato aminotransferasa | 2.6.1.1 | <i>sAAT-1*</i> | Músculo/Hígado | A |
| | | <i>mAAT-1*</i> | Músculo/Hígado | A |
| Adenilato quinasa | 2.7.4.3 | <i>AK*</i> | Músculo | A |
| Carbonato deshidratasa | 4.2.1.1 | <i>CAH-1*</i> | Hígado | B |
| | | <i>CAH-2*</i> | Hígado | B |
| Creatina quinasa | 2.7.3.2 | <i>CK*</i> | Músculo | A |
| Esterasa | 3.1.1.- | <i>EST*</i> | Músculo | D |
| Fumarato hidratasa | 4.2.1.2 | <i>FH*</i> | Músculo | D |
| Glioxalasa-I | 4.4.1.5 | <i>GLO*</i> | Músculo | B |
| Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa | 1.1.1.8 | <i>GAPDH*</i> | Músculo | B |
| Glucosa -6-fosfato isomerasa | 5.3.1.9 | <i>GPI-1*</i> | Músculo/Hígado | C |
| | | <i>GPI-2*</i> | Músculo | D |
| Isocitrato deshidrogenasa (NADP+) | 1.1.1.14 | <i>IDHP-1*</i> | Músculo | A |
| | | <i>IDHP-2*</i> | Hígado | A |
| | | <i>IDHP-3*</i> | Hígado | A |
| Lactato deshidrogenasa | 1.1.1.27 | <i>LDH-1*</i> | Músculo/Hígado | C |
| | | <i>LDH-2*</i> | Músculo/Hígado | C |
| Malato deshidrogenasa | 1.1.1.37 | <i>sMDH-1*</i> | Músculo | A |
| | | <i>sMDH-2*</i> | Hígado | A |
| Enzima Málica (NAD+) | 1.1.1.40 | <i>ME-1*</i> | Músculo | B |
| | | <i>ME-2*</i> | Hígado | B |
| Manosa-6-fosfato isomerasa | 5.3.1.8 | <i>MPI*</i> | Hígado | A |
| Peptidasa-B | 3.4.11.4 | <i>PEPB*</i> | Músculo | B |
| Fosfogluconato deshidrogenasa | 1.1.1.44 | <i>PGDH*</i> | Hígado | C |
| Fofoglucomutasa | 2.7.5.1 | <i>PGM*</i> | Hígado | C |
| Superóxido dismutasa | 1.15.1.1 | <i>SOD*</i> | Músculo/Hígado | C |

Tampones: A= Tris-citrato pH= 7, B= Tris-citrato pH= 8.0, C= Poulik pH= 8.6, D= Tris-malato-EDTA pH= 6.9.

Los 19 sistemas enzimáticos codificaron para 26 loci putativos que después fueron utilizados en rutina para los 132 individuos de la población del río Águeda y para todas las especies analizadas como supuestos parentales. Siete de estos sistemas enzimáticos fueron codificados por más de un locus, tratándose de loci específicos de distintos tejidos en cuatro casos (IDHP, LDH, ME y GPI).

1.2.1.- La población del río Águeda

Tras el análisis aloenzimático, los genotipos encontrados para los 26 loci examinados en la población del complejo *T. alburnoides* del río Águeda se clasificaron en tres categorías distintas en función del grado de polimorfismo presentado para cada uno de los tres niveles de ploidía (Tabla 19):

1.- Loci monomórficos. Son aquellos que resultaron iguales en todos los individuos del complejo. Catorce de los loci estudiados aparecen en esta categoría ya que no presentaron polimorfismo independientemente de su nivel de ploidía y, por tanto, no resultaron útiles como loci marcadores que permitiesen distinguir entre supuestos híbridos y supuestos individuos bisexuales.

2.- Loci polimórficos. Se consideraron en esta categoría aquellos loci que presentaron polimorfismo al menos para algún nivel de ploidía. Dentro de esta categoría han aparecido nueve loci, aunque los individuos tetraploides resultaron ser homocigotos para todos ellos a excepción de para *ME-2**. Los individuos triploides presentaron un mayor número de loci polimórficos (*GPI-2**, *IDHP-2**, *sMDH-2**, *ME-2** y *MPI**) y prácticamente la totalidad, a excepción de *MPI**, fueron polimórficos para los individuos diploides.

En aquellos individuos diploides, triploides o tetraploides en los que apareció un alelo distinto al más frecuente (alelo *-100**), el genotipo siempre fue

heterocigoto no apareciendo nunca este segundo alelo en homocigosis. Al igual que en los loci monomórficos, éstos tampoco nos son de utilidad para distinguir individuos híbridos de los bisexuales, apareciendo individuos polimórficos con una frecuencia similar entre los diploides y los triploides.

3.- Loci en los que todos los individuos del complejo resultaron ser heterocigotos. Esta categoría está constituida por tres loci (*sAAT-1**, *PGDH** y *PGM**). Todos los individuos analizados en la población del río Águeda resultaron ser heterocigotos para estos tres loci independientemente de su sexo y de su ploidía. Además, algunos individuos triploides heterocigotos presentaron tres alelos distintos en el locus *PGDH** (Tabla 19).

La heterocigosis encontrada mediante aloenzimas fue muy alta en los ejemplares diploides del complejo *T. alburnoides* del río Águeda ($H_o = 0,151 \pm 0,063$). Esta heterocigosis se calculó sólo en los peces diploides (la mayoría de ellos machos) y se observó que excedía a la heterocigosis esperada ($H_e = 0,094 \pm 0,034$) bajo el modelo del equilibrio de Hardy-Weinberg. Este exceso de heterocigosis surge como consecuencia de la heterocigosidad fijada en los tres loci (*sAAT-1**, *PGDH**, y *PGM**) que apareció también en los individuos triploides y en los tetraploides de este río.

La heterocigosis fijada en varios loci se ha comprobado que es una característica de los vertebrados unisexuales híbridos (Vrijenhoek, 1990) ya que estos loci fijados en heterocigosis son precisamente los diagnósticos entre las dos especies parentales que originaron al híbrido, siendo el genotipo heterocigoto la expresión en codominancia de los alelos heredados de los dos parentales.

Tabla 19. Patrones genotípicos encontrados en el complejo *T. alburnoides* en la población del río Águeda.

| Locus | Río Águeda (Duero) | | |
|---|--|--------------------------|----------------------------|
| | Genotipos del Complejo <i>T. alburnoides</i> | | |
| | individuos Diploides | individuos Triploides | individuos Tetraploides |
| 1. Loci monomórficos en el complejo: | | | |
| <i>mAAT-1*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>CK*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>FH*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>GLO1*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>GAPDH*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>GPI-1*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>IDHP-1*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>IDHP-3*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>LDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>LDH-2*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>sMDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>ME-1*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>PEPB*</i> | aa | aaa | aaaa |
| <i>SOD*</i> | aa | aaa | aaaa |
| 2. Loci polimórficos: | | | |
| <i>AK*</i> | aa,ab | aaa | aaaa |
| <i>CAH-1*</i> | aa,ab | aaa | aaaa |
| <i>CAH-2*</i> | aa,ab | aaa | aaaa |
| <i>EST*</i> | aa,ab | aaa | aaaa |
| <i>GPI-2*</i> | aa,ab,ac | aaa,aac | aaaa |
| <i>IDHP-2*</i> | aa,ab | aaa,aab | aaaa |
| <i>sMDH-2*</i> | aa,ab | aaa,aab,abb | aaaa |
| <i>ME-2*</i> | aa.ab | aaa,(ab) ¹ | aaaa,(ab) ¹ |
| <i>MPI*</i> | aa | aaa,aab | aaaa |
| 3. Loci fijados en heterocigosis: | | | |
| <i>sAAT-1*</i> | ab | (ab) ¹ | abbb |
| <i>PGDH*</i> | ab,ac | aab,abb,abc | abbb,aacc |
| <i>PGM*</i> | ab | aab,abb | abbb |

(1) genotipos en los que la resolución de los zimogramas no permitió inferir la dosis génica.

Los datos obtenidos rechazan claramente la hipótesis de una segregación mendeliana en la población del río Águeda del complejo *T. alburnoides* indicando que toda la población estaría constituida por individuos híbridos. Por tanto, todos los individuos triploides y tetraploides, así como los diploides que *a priori* se pensaba que constituían la fracción bisexual de la población, son híbridos.

Finalmente, habría que destacar que para algunos loci en individuos triploides heterocigotos se encontraron variaciones en las proporciones de los alelos. Por ejemplo, en los loci *sMDH-2**, *PGDH** y *PGM** de ciertos individuos aparecieron combinaciones alélicas del tipo AAB, mientras que para otros individuos la combinación fue del tipo ABB. En algunos individuos híbridos del río Águeda se detectó para el locus *PGDH** la combinación de tres alelos distintos ABC.

La importancia de esta variación en la dosis génica es crucial para tratar de determinar el origen de la poliploidización, descartándose un mecanismo de duplicación genética (Cimino, 1972) como base para la síntesis de individuos triploides.

1.2.2.- Patrones de dosis génica

Los genotipos de los heterocigotos triploides (3n) y tetraploides (4n) pueden inferirse con cierta facilidad a partir de los patrones de dosis génica reconocidos por las diferencias en las intensidades de tinción en las bandas de los zimogramas electroforéticos.

Como puede apreciarse en la Tabla 19, en esta población se han detectado individuos poliploides con genotipos heterocigotos entre los que varía la proporción de alelos para un locus dado. Esto se ha determinado porque presentan distintas intensidades en las bandas correspondientes a cada alelo. Por

ejemplo, en los individuos triploides heterocigotos para el locus *sMDH-2** de ambas poblaciones se puede inferir su genotipo como **aab* ó **abb* basándonos en los patrones de dosis génica (Fig. 6).

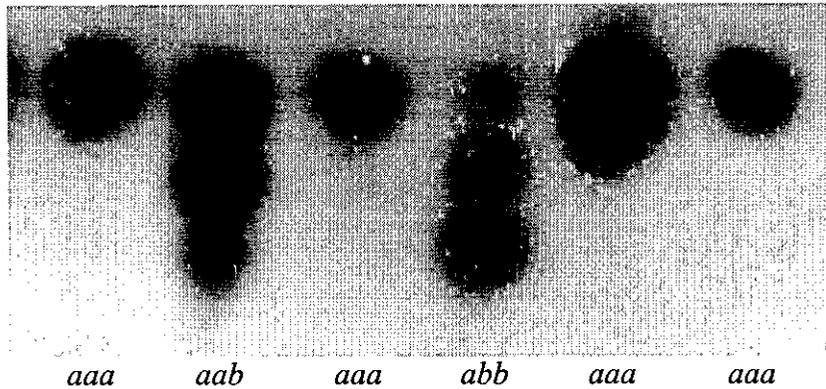


Fig. 6. Patrones de dosis génica de los diferentes genotipos.

Expresándolo con otras palabras, si una proteína está compuesta por dos subunidades para ser funcional (dimérica), y un genotipo del tipo **aab* está aportando dos dosis de una subunidad de tipo A y una dosis de una subunidad de tipo B. Éstas van a polimerizar al azar en dímeros funcionales de acuerdo con lo esperado tras el desarrollo del binomio $(2A + B)^2$, resultando la siguiente proporción de bandas: 4AA:4AB:1BB. Paralelamente, el genotipo **abb* aportará dos dosis de la subunidad de tipo B y una dosis de la subunidad de tipo A por lo que, tras la polimerización, se producirá una proporción de bandas del tipo 1AA:4AB:4BB.

Sin embargo, las excepciones fueron los loci *ME-2**, *sAAT-1** en los que la resolución de las bandas obtenidas en los zimogramas con los tampones utilizados no nos permitieron inferir la dosis génica en los individuos poliploides (Tabla 19).

2.- Las especies parentales

2.1.- Las especies del río Águeda

Si los individuos híbridos del complejo *T. alburnoides* se han caracterizado por poseer ciertos loci fijados en heterocigosis, las especies parentales implicadas deberán ser distinguidas inequívocamente analizando su genotipo. Éste deberá ser similar al de los híbridos y presentarán sólo uno de los dos alelos presentes en los loci fijados en heterocigosis.

A fin de conocer qué especie o especies actuaron como parentales, se examinó mediante electroforesis de proteínas la variabilidad aloenzimática en distintas especies de ciprínidos comenzando por las existentes en el río Águeda y su afluente, el río Turones (Tabla 4). Estas especies fueron *Leuciscus carolitertii*, *Chondrostoma polylepis duriensis* y *Rutilus lemmingii*.

Los parámetros de variabilidad genética encontrados para las especies del río Águeda incluido el complejo *T. alburnoides* se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Variabilidad genética de las especies del río Águeda consideradas como posibles parentales de los híbridos del complejo *T. alburnoides*. Entre paréntesis figuran los errores estándar.

| Población | Nº medio de ejemplares por locus | Nº medio de alelos por locus | Porcentaje de loci polimórficos | Heterocigosis media | |
|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| | | | | Conteo directo H_o | Esperado según Hardy Weinberg H_T |
| híbridos diploides (Río Águeda) | 25,0 (0,8) | 1,5 (0,1) | 26,9 | 0,151 (0,063) | 0,094 (0,034) |
| <i>L. carolitertii</i> (Río Águeda) | 29,2 (1,1) | 1,1 (0,1) | 7,7 | 0,025 (0,015) | 0,026 (0,026) |
| <i>Ch. polylepis</i> (Río Águeda) | 25,7 (1,2) | 1,3 (0,1) | 11,5 | 0,010 (0,005) | 0,031 (0,012) |
| <i>R. lemmingii</i> (Río Turones) | 19,8 (0,1) | 1,0 (0,0) | 3,8 | 0,020 (0,020) | 0,015 (0,015) |

Los parámetros de variabilidad encontrados para las tres especies consideradas mostraron valores de heterocigosidad observada semejantes a las esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg. La excepción, como ya se ha comentado, la constituyó los individuos diploides del complejo en los que se encontró un exceso de heterocigosis como consecuencia de su condición híbrida.

Con respecto al polimorfismo, cabría destacar que las poblaciones de *L. carolitertii* y de *R. lemmingii* presentaron valores bajos si los comparamos con *Ch. polylepis* y con los híbridos de *T. alburnoides*.

El análisis aloenzimático llevado a cabo sobre los 26 loci antes comentados permitió comparar las especies consideradas como posibles parentales de los híbridos de *T. alburnoides* del río Águeda. Los patrones alélicos de éstas y los genotipos de los híbridos se reflejan conjuntamente en la Tabla 21 para una fácil comparación.

Hay que hacer notar que las diferencias en la codificación de los alelos con respecto a la Tabla 19 se deben a la recodificación necesaria, por la presencia de nuevos alelos procedentes de otras especies, siguiendo las recomendaciones de Shaklee *et al.* (1990). La presencia de nuevos alelos en el análisis hace variar la posición relativa de los demás con respecto a la migración y por tanto su codificación. Este hecho será tenido en cuenta en el resto de las tablas comparativas.

Tabla 21. Patrones genotípicos de los híbridos *T. alburnoides* y alelos encontrados en las especies del río Águeda consideradas como posibles parentales. En mayúscula se destacan los alelos diagnósticos respecto al complejo *T. alburnoides*.

| Cuenca | Duero | | | | | |
|---|--|-----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|---------------------|
| | Genotipos de <i>T. alburnoides</i> híbridos | | | Alelos en | | |
| Locus | 2n | 3n | 4n | <i>L. carolitertii</i> | <i>Ch. polylepis</i> | <i>R. lemmingii</i> |
| 1. Loci monomórficos en el complejo: | | | | | | |
| <i>CK*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B |
| <i>GLO1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a |
| <i>IDHP-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a |
| <i>LDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B |
| <i>LDH-2*</i> | aa | aaa | aaaa | a | B,C | B |
| <i>sMDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a |
| <i>ME-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a |
| <i>PEPB*</i> | aa | aaa | aaaa | a | B | B |
| <i>SOD*</i> | aa | aaa | aaaa | a | B | C |
| 2. Loci polimórficos: | | | | | | |
| <i>mAAT-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a |
| <i>AK*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a | B | a |
| <i>CAH-1*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a | a | B(nulo) |
| <i>CAH-2*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a,b | a | a |
| <i>EST*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a | C | a |
| <i>FH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,b | a |
| <i>GAPDH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a |
| <i>GPI-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B,C |
| <i>GPI-2*</i> | aa,ab,ac | aaa,aaac | aaaa | a | a,c | a |
| <i>IDHP-2*</i> | aa,ac | aaa,aac | aaaa | a | D | B |
| <i>IDHP-3*</i> | aa | aaa | aaaa | a | C | B |
| <i>sMDH-2*</i> | aa,ab | aaa,aab,abb | aaaa | a | a,b | b |
| <i>ME-2*</i> | aa,ab | aaa,(ab) ¹ | aaaa,(ab) ¹ | a,b | a,b | a |
| <i>MPI*</i> | aa | aaa,aac | aaaa | a,c | a,B | a |
| 3. Loci con heterocigosis fijada: | | | | | | |
| <i>sAAT-1*</i> | ab | (ab) ¹ | abbb | a | b | b |
| <i>PGDH*</i> | ab,ac | aab,abb,abc | abbb,aacc | a | b | b |
| <i>PGM*</i> | ab | aab,abb | abbb | a | a,b | b |

(1) Genotipos en los que la resolución de los zimogramas no permitió inferir la dosis génica.

Los resultados obtenidos muestran claramente que *Ch. polylepis* y *R. lemmingii* no son las especies parentales que generaron los híbridos de *T. alburnoides*. Los alelos encontrados en diversos loci no aparecieron en los individuos híbridos por lo que su genotipo no es compatible con el teórico que deberían presentar cualquiera de las especies parentales.

Chondrostoma polylepis duriensis presentó siete loci diagnósticos con respecto a los híbridos (*AK**, *EST**, *IDHP-2**, *IDHP-3**, *LDH-2**, *PEPB** y *SOD**) y presentó un alelo marcador en el locus *MPI** que tampoco estaba presente en los híbridos. *Rutilus lemmingii* mostró nueve loci diagnósticos respecto a los híbridos de *T. alburnoides* siendo éstos: *CAH-1**, *CK**, *IDHP-2**, *IDHP-3**, *LDH-1**, *LDH-2**, *PEPB**, *GPI-1** y *SOD**.

Los alelos encontrados en *L. carolitertii* tanto para los tres loci fijados en heterocigosis en los híbridos como para el resto (Tabla 21), pusieron de manifiesto que esta especie fue la que actuó como uno de los parentales de los híbridos del Duero. Sin embargo, el otro parental no se ha conseguido identificar en las muestras que se han analizado de la cuenca del Duero.

Dado que ha quedado patente que las especies del género *Leuciscus* están implicadas en la formación de los híbridos de *T. alburnoides*, se hizo necesario abordar un estudio aloenzimático exhaustivo sobre distintas poblaciones del género *Leuciscus* en la Península Ibérica, ya que cabría la posibilidad de que otra taxa dentro de este género fuese la otra especie parental que hibridó con *L. carolitertii* en el río Águeda.

2.2.- Análisis aloenzimático de las poblaciones ibéricas del género *Leuciscus*.

Para tratar de localizar a la otra especie parental implicada en el fenómeno de la hibridación se realizó un análisis aloenzimático sobre 19 poblaciones de distintas especies del género *Leuciscus* usando los 26 loci empleados en el estudio del complejo *T. alburnoides*. Para ello se seleccionaron cuatro poblaciones de *L. carolitertii*, catorce poblaciones de *L. pyrenaicus* y una población de *L. cephalus*. A falta de una caracterización genética para las especies muestreadas en las distintas localidades se siguió la nomenclatura y los

patrones de distribución sugeridos para las especies del género *Leuciscus* por Doadrio *et al.* (1991).

Los alelos encontrados en las distintas poblaciones analizadas se confrontaron con los genotipos obtenidos para los miembros del complejo *T. alburnoides* de la población del río Águeda (Tabla 22).

De entre los resultados obtenidos hay que destacar que ninguna de las poblaciones consideradas en el estudio presentó un patrón de alelos compatible con el que teóricamente debería presentar la otra especie parental que hibridase con *L. carolitertii* para producir los híbridos.

Si nos fijamos en los loci fijados en heterocigosis en los híbridos del complejo *T. alburnoides* (*sAAT-1**, *PGDH** y *PGM**) la otra especie parental debería presentar a la vez los cuatro alelos complementarios a los presentados por *L. carolitertii*, o sea, *sAAT-1*d*, *PGDH*c*, *PGDH*d* y *PGM*c*. En ninguna población se encontraron individuos que presentasen esta combinación de alelos en los tres loci mencionados, y sólo algunos de ellos, como *PGDH*c* o *PGM*c* aparecieron por separado y en baja frecuencia en determinadas poblaciones como son las de los ríos Almonte, Tiétar, Valparaíso, Almonte, Estena, Valdehornos y Matarraña.

Tabla 22. Patrones genotípicos encontrados en el complejo *T. alburnoides* en la población del río Águeda y alelos presentes en todas las poblaciones del género *Leuciscus*.

| Río | Águeda | | | Pesquero | Almonte | Tiétar | Cedena | Estena | Valparaíso | Valdehornos | Fresneda | Guadalmena | Bogarra | Algar | Serpis | Bullent | Barret | |
|---|---|-----------------------|------------------------|----------|---------|--------|--------|--------|------------|-------------|----------|------------|---------|-------|--------|---------|--------|--|
| | Genotipos del Complejo <i>T. alburnoides</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | Alelos en <i>Leuciscus pyrenaicus</i> |
| Locus | 2n | 3n | 4n | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Loci monomórficos en el complejo: | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>mAAT-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | b | a,b | a,b | a | a | a | a | |
| <i>CK*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>FH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>GLO1*</i> | aa | aaa | aaaa | a,b,c | a,b | a | a | a | a | a | a | ? | a | a,d | a,d | a | a | |
| <i>GAPDH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a,b | a | a | a,d | a | a | a | a,d | a | a | |
| <i>IDHP-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a,b | a | a | a | a,b | |
| <i>IDHP-3*</i> | aa | aaa | aaaa | b | b | b | b | a | a | a | a | a | a | d | d | d | c | |
| <i>LDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a,c | a | a | a,b | a | a | a | a | a | |
| <i>LDH-2*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a,b | a | |
| <i>sMDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a,c | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a,c | a | |
| <i>ME-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a,c | a | a | a,b | a | a | a | a | a | |
| <i>PEPB*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>GPI-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>SOD*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | |
| 2. Loci polimórficos: | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>AK*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>CAH-1*</i> | aa,ad | aaa | aaaa | ? | a,b,d | ? | a | a,b | a | a,d | ? | ? | ? | ? | a | ? | ? | |
| <i>CAH-2*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | ? | a,b | ? | a,c | a | ? | a | ? | ? | ? | ? | a,b | ? | ? | |
| <i>EST*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a,c,d | a,c | ? | a,b,c | a,c,d | a,b,c | a,c | ? | ? | ? | ? | b | d | a,c | |
| <i>GPI-2*</i> | aa,ad,ae | aaa,aac | aaaa | a,c | a,d | a | a | a | a | a | a | a,b | a,c | a | a | a | a | |
| <i>IDHP-2*</i> | aa,ab | aaa,aab | aaaa | b | b | b | b | a | a | a | a | a | a | d | d | d | c | |
| <i>sMDH-2*</i> | aa,ab | aaa,aab,abb | aaaa | a | a | a,c | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>ME-2*</i> | aa,ad | aaa,(ad) ¹ | aaaa,(ad) ¹ | a,b,d | ? | a,b,c | a,b | a,d | ? | a,b | b | a,b,d | a,b,c | a,d | a,b,d | ? | b,d | |
| <i>MPI*</i> | aa | aaa,aac | aaaa | a | a,c | a,c | a | a,c | a | a,c | a | a | a | a | a,c | a | a | |
| 3. Loci fijados en heterocigosis: | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>sAAT-1*</i> | ad | (ad) ¹ | addd | a | a,b | a | a,b | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>PGDH*</i> | ac,ad | aac,acc,acd | accc,aadd | a,b | a,c | a,c | a | a | a,c | a | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>PGM*</i> | ac | aac,acc | accc | a | a,b,c | a | a | a,c | a | a,c | a | a | a,b | a | a | a | a | |

(1) Genotipos en los que la resolución de los zimogramas no permitió inferir la dosis génica. (?) Loci para los que no se tuvo zimogramas interpretables.

Tabla 22. Patrones genotípicos encontrados en el complejo *T. alburnoides* en la población del río Águeda y alelos presentes en todas las poblaciones del género *Leuciscus*.

| Río | Águeda | | | Arnoia | Boedo | Eresma | Águeda | Matarraña |
|---|---|-----------------------|------------------------|--|-------|--------|---------------------------------|-----------|
| Locus | Genotipos del Complejo <i>T. alburnoides</i> | | | Alelos en <i>Leuciscus carolitertii</i> | | | Alelos en <i>L. cephalus</i> | |
| | 2n | 3n | 4n | | | | | |
| 1. Loci monomórficos en el complejo: | | | | | | | | |
| <i>mAAT-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a |
| <i>CK*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a |
| <i>FH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | b |
| <i>GLO1*</i> | aa | aaa | aaaa | a,c | a | a | a | a |
| <i>GAPDH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | d |
| <i>IDHP-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a |
| <i>IDHP-3*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a,c |
| <i>LDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a,c |
| <i>LDH-2*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a,b | a | a |
| <i>sMDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,b | a | a | a,c |
| <i>ME-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a |
| <i>PEPB*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a |
| <i>GPI-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a,b |
| <i>SOD*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a |
| 2. Loci polimórficos: | | | | | | | | |
| <i>AK*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a | a | a | a | a |
| <i>CAH-1*</i> | aa,ad | aaa | aaaa | a,c | a | a | a | a |
| <i>CAH-2*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a,b | a | a | a,b | a,b |
| <i>EST*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a,b | a | a,b,c | a | c |
| <i>GPI-2*</i> | aa,ad,ae | aaa,aae | aaaa | a | a | a | a | a |
| <i>IDHP-2*</i> | aa,ab | aaa,aab | aaaa | a | a | a | a | a,c |
| <i>sMDH-2*</i> | aa,ab | aaa,aab,abb | aaaa | a | a | a | a | a |
| <i>ME-2*</i> | aa,ad | aaa,(ad) ¹ | aaaa,(ad) ¹ | a,d | a | a,b | a,d | a |
| <i>MPI*</i> | aa | aaa,aac | aaaa | a,c | a | a,c | a,c | a,b,c |
| 3. Loci fijados en heterocigosis: | | | | | | | | |
| <i>sAAT-1*</i> | ad | (ad) ¹ | addd | a | a | a | a | a,c |
| <i>PGDH*</i> | ac,ad | aac,acc,acd | accc,aadd | a | a,b | a | a | a |
| <i>PGM*</i> | ac | aac,acc | accc | a | a | a | a | a,c |

(1) Genotipos en los que la resolución de los zimogramas no permitió inferir la dosis génica. (?) Loci para los que no se tuvo zimogramas interpretables.

Independientemente de estos loci fijados en heterocigosis, la mayoría de las poblaciones presentaron algunos alelos que no se encontraron en los individuos del complejo *T. alburnoides*, aunque sólo podemos considerar algunos de ellos como diagnósticos de la población y utilizarlos, por tanto, para descartar esa población como posible parental. Entre éstos tenemos dentro de *L. pyrenaicus* el alelo *IDHP-3*b* en las poblaciones de los ríos de la cuenca del Tajo (Pesquero, Almonte, Tiétar y Cedená), los alelos *mAAT-1*b* y *ME-2*b* en la población de esta especie del río Fresneda (Guadalquivir), los alelos *IDHP-2*d* e *IDHP-3*d* de las poblaciones levantinas (Algar, Serpis, Bullent y Font de Barret), los alelos *EST*b* y *EST*d* de las poblaciones del Serpis y Bullent, respectivamente y por último los alelos *FH*b* y *GAPDH*d* en la población de *L. cephalus* del río Matarraña.

Además, el análisis aloenzimático ha permitido caracterizar genéticamente buena parte de las poblaciones ibéricas de *Leuciscus* y aunque no han aparecido loci marcadores entre las distintas especies, salvo para *L. cephalus* (*GAPDH**), sí han aparecido loci y alelos marcadores para determinadas poblaciones por lo que parece necesario un mejor conocimiento de la estructura de las poblaciones y el análisis filogenético de éstas.

2.2.2.- *Las especies griegas*

Como ya ha sido comentado, se evidenció como necesario extender la búsqueda de los parentales a las poblaciones griegas de *Leuciscus* dada la implicación en la hibridación de las especies de este género en la Península Ibérica. Por otro lado, la consideración de *T. hellenicus* (Stephanidis, 1939) como una subespecie de *T. alburnoides* en Grecia (Stephanidis, 1971) ha hecho pensar que nos encontramos frente a un fenómeno de vicarianza. Por esta razón, la otra especie parental podría encontrarse entre las especies de cualquiera de estos dos géneros.

Dentro del género *Leuciscus*, existe una gran controversia a nivel taxonómico para determinar el número de especies y la distribución de las mismas (Bianco, 1983; Bianco & Knezevik, 1987, Economidis, 1991). Por ello, se hizo necesario afrontar primero un análisis filogenético de las especies basándonos en poblaciones capturadas en las distintas cuencas hidrográficas. Una vez conocidas las especies existentes, se contrastaron genéticamente con la población de *L. carolitertii* del río Águeda para comprobar su implicación en el fenómeno de la hibridación.

En el análisis aloenzimático de las especies griegas se estudiaron además especies procedentes de otras localidades fuera de Grecia (Tabla 3). Se incluyeron poblaciones de *Leuciscus cephalus cephalus* (L. 1758) y *L. c. cabeda* Risso, 1826 y se introdujo *Leuciscus (Telestes) souffia muticellus* (Bonaparte, 1837) como grupo externo.

Los resultados preliminares del estudio con aloenzimas obligaron a desestimar tres de los loci estudiados para las especies ibéricas debido a sus resultados irregulares en cuanto a resolución (*GLO**, *ME-1** y *ME-2**). En cambio, y para mejorar el número de loci a utilizar en el análisis filogenético, se emplearon otros cinco hasta ahora no utilizados. Estos fueron: *ADH** y *PK** (Tris-citrato pH=7); *EST-2** (litio potasio pH=8,2); *PEPA** (Tris-citrato pH=8) y *PGM-2** (Poulik pH=8,6).

De los 28 loci examinados 25 resultaron ser polimórficos (criterio del 99%). El número medio de alelos por locus fue de 1,3 mientras que el polimorfismo varió desde un mínimo de $P=0,034$ en las poblaciones de *L. c. vardarensis* de los ríos Pinios y Sperchios, hasta un máximo de $P=0,379$ en la población de *L. c. macedonicus* del río Nestos (Tabla 23). El bajo polimorfismo de las poblaciones de los ríos Pinios y Sperchios pareció deberse al número bajo de ejemplares estudiados, sin embargo, este polimorfismo bajo también se encontró en la población de *L. c. peloponnensis* del Lago Stymphalia y en *L. carolitertii*, en las que se estudió un número mayor de individuos.

Tabla 23. Variabilidad genética de las poblaciones griegas de *Leuciscus* expresadas como el número medio de alelos por locus, polimorfismo (P) y heterocigosis (H). Entre paréntesis figuran los errores estándar. Los números junto a los nombres de especies indican las poblaciones de procedencia tal y como se relatan en la Tabla 3.

| Población | Nº medio de ejemplares por locus | Nº medio de alelos por locus | Porcentaje de loci polimórficos | Heterocigosis media | |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| | | | | Conteo directo H_o | Esperado según Hardy-Weinberg H_T |
| 1 <i>L. kaedicus</i> | 18.8 (0.4) | 1.2 (0.1) | 0.172 | 0.016 (0.009) | 0.049 (0.022) |
| 2 <i>L. c. peloponnensis</i> | 8.9 (0.1) | 1.3 (0.1) | 0.310 | 0.057 (0.028) | 0.077 (0.028) |
| 3 <i>L. c. peloponnensis</i> | 18.5 (0.8) | 1.2 (0.1) | 0.138 | 0.056 (0.031) | 0.049 (0.024) |
| 4 <i>L. c. peloponnensis</i> | 24.0 (0.0) | 1.1 (0.0) | 0.34 | 0.001 (0.001) | 0.011 (0.010) |
| 5 <i>L. c. albus</i> | 13.2 (0.3) | 1.3 (0.1) | 0.172 | 0.047 (0.024) | 0.076 (0.029) |
| 6 <i>L. cf. svalize</i> | 25.0 (0.3) | 1.4 (0.1) | 0.241 | 0.035 (0.013) | 0.062 (0.022) |
| 7 <i>L. c. albus</i> | 12.7 (0.1) | 1.3 (0.1) | 0.241 | 0.034 (0.021) | 0.074 (0.026) |
| 8 <i>L. c. albus</i> | 11.6 (0.2) | 1.2 (0.1) | 0.172 | 0.025 (0.013) | 0.062 (0.027) |
| 9 <i>L. cf. svalize</i> | 24.4 (0.2) | 1.2 (0.1) | 0.69 | 0.004 (0.002) | 0.026 (0.014) |
| 10 <i>L. c. vardarensis</i> | 13.0 (0.2) | 1.3 (0.1) | 0.207 | 0.026 (0.015) | 0.060 (0.026) |
| 11 <i>L. c. vardarensis</i> | 13.9 (0.3) | 1.1 (0.1) | 0.69 | 0.005 (0.003) | 0.027 (0.018) |
| 12 <i>L. c. vardarensis</i> | 5.7 (0.1) | 1.0 (0.0) | 0.34 | 0.000 (0.000) | 0.018 (0.018) |
| 13 <i>L. c. vardarensis</i> | 2.6 (0.1) | 1.1 (0.1) | 0.34 | 0.017 (0.017) | 0.029 (0.029) |
| 14 <i>L. c. vardarensis</i> | 8.8 (0.2) | 1.3 (0.1) | 0.276 | 0.073 (0.029) | 0.111 (0.039) |
| 15 <i>L. c. vardarensis</i> | 12.0 (0.2) | 1.3 (0.1) | 0.241 | 0.044 (0.019) | 0.083 (0.030) |
| 16 <i>L. c. vardarensis</i> | 10.8 (0.4) | 1.3 (0.1) | 0.172 | 0.047 (0.021) | 0.076 (0.031) |
| 17 <i>L. c. vardarensis</i> | 9.3 (0.5) | 1.4 (0.1) | 0.241 | 0.055 (0.024) | 0.086 (0.030) |
| 18 <i>L. c. macedonicus</i> | 14.8 (0.1) | 1.4 (0.1) | 0.31 | 0.071 (0.030) | 0.129 (0.040) |
| 19 <i>L. c. macedonicus</i> | 7.6 (0.2) | 1.4 (0.1) | 0.379 | 0.070 (0.035) | 0.166 (0.042) |
| 20 <i>L. borysthenicus</i> | 9.6 (0.2) | 1.3 (0.1) | 0.276 | 0.032 (0.017) | 0.093 (0.031) |
| 21 <i>L. c. cephalus</i> | 5.0 (0.0) | 1.3 (0.1) | 0.172 | 0.055 (0.037) | 0.093 (0.040) |
| 22 <i>L. c. cabeda</i> | 5.9 (0.1) | 1.3 (0.1) | 0.31 | 0.046 (0.026) | 0.118 (0.036) |
| 23 <i>T. souffia multicellus</i> | 29.7 (0.2) | 1.2 (0.1) | 0.172 | 0.024 (0.013) | 0.030 (0.014) |
| 24 <i>L. carolitertii</i> | 26.6 (1.7) | 1.1 (0.0) | 0.34 | 0.012 (0.011) | 0.012 (0.011) |

Por otro lado, los valores de heterocigosis observados variaron entre un mínimo de $H_o=0,000$ en la población de *L. c. vardarensis* del río Sperchios y de $H_o=0,001$ en la población de *L. c. peloponnensis* del Lago Stymphalia hasta un máximo de $H_o=0,073$ en la población de *L. c. vardarensis* del río Aliakmon. La heterocigosis media observada por locus resultó ser menor a la esperada basándonos en lo esperado según la ley de Hardy-Weinberg en todas las poblaciones a excepción la de *L. c. peloponnensis* del río Alfios, donde H_o fue mayor, y la de *L. carolitertii* donde H_o y H_T fueron iguales.

También se observaron valores bajos de variabilidad genética en poblaciones aisladas con un área de distribución muy restringida, resultando evidente en poblaciones como las de *L. c. peloponnensis* del Lago Stymphalia ($P=0,034$, $H_o=0,001$), *L. c. vardarensis* de la población de Kirintos, en la Isla de Euboia ($P=0,069$, $H_o=0,005$) y la de *L. keadicus* del río Evrotas ($P=0,172$, $H_o=0,016$). Sin embargo, *Leuciscus carolitertii* también presentó valores bajos de variabilidad genética ($P=0,034$, $H_o=0,012$) y muestra una distribución relativamente grande respecto a las otras poblaciones mencionadas.

Por el contrario, las dos poblaciones estudiadas de *L. c. macedonicus* fueron las que presentaron valores mayores de variabilidad genética ($P=0,310-0,379$, $H_o=0,071-0,070$) y a éstas se les unió la población de *L. c. vardarensis* del río Aliakmon ($P=0,276$, $H_o=0,073$).

Tabla 24. Bajo la diagonal se muestran las distancias de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) (distancias de cuerda) y sobre la diagonal figuran las distancias de Nei (1972) entre todas las poblaciones de *Leuciscus* y *Telestes* consideradas como posibles parentales fuera de la Península Ibérica. Los números son los indicados en la Tabla 3

| Población | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | ++++ | 0.551 | 0.448 | 0.522 | 0.474 | 0.509 | 0.504 | 0.491 | 0.532 | 0.683 | 0.480 | 0.631 | 0.646 | 0.589 | 0.596 | 0.501 | 0.618 | 0.407 | 0.420 | 0.455 | 0.580 | 0.607 | 0.946 | 0.607 |
| 2 | 0.585 | ++++ | 0.091 | 0.233 | 0.122 | 0.141 | 0.059 | 0.058 | 0.075 | 0.435 | 0.409 | 0.334 | 0.359 | 0.280 | 0.320 | 0.247 | 0.329 | 0.144 | 0.310 | 0.299 | 0.280 | 0.290 | 0.870 | 0.332 |
| 3 | 0.544 | 0.259 | ++++ | 0.237 | 0.131 | 0.097 | 0.089 | 0.059 | 0.104 | 0.365 | 0.307 | 0.301 | 0.349 | 0.317 | 0.334 | 0.187 | 0.320 | 0.180 | 0.232 | 0.333 | 0.287 | 0.304 | 0.800 | 0.376 |
| 4 | 0.575 | 0.418 | 0.410 | ++++ | 0.072 | 0.145 | 0.208 | 0.178 | 0.211 | 0.362 | 0.385 | 0.369 | 0.276 | 0.295 | 0.336 | 0.273 | 0.334 | 0.231 | 0.252 | 0.360 | 0.289 | 0.270 | 0.727 | 0.362 |
| 5 | 0.551 | 0.320 | 0.320 | 0.246 | ++++ | 0.058 | 0.098 | 0.094 | 0.112 | 0.370 | 0.358 | 0.348 | 0.256 | 0.270 | 0.293 | 0.242 | 0.319 | 0.169 | 0.252 | 0.316 | 0.275 | 0.275 | 0.751 | 0.335 |
| 6 | 0.567 | 0.334 | 0.283 | 0.330 | 0.230 | ++++ | 0.142 | 0.091 | 0.122 | 0.430 | 0.418 | 0.291 | 0.293 | 0.312 | 0.327 | 0.210 | 0.327 | 0.218 | 0.289 | 0.356 | 0.331 | 0.300 | 0.876 | 0.375 |
| 7 | 0.564 | 0.237 | 0.273 | 0.401 | 0.289 | 0.345 | ++++ | 0.027 | 0.035 | 0.339 | 0.331 | 0.279 | 0.281 | 0.224 | 0.247 | 0.246 | 0.264 | 0.107 | 0.275 | 0.269 | 0.209 | 0.243 | 0.739 | 0.237 |
| 8 | 0.567 | 0.225 | 0.235 | 0.356 | 0.269 | 0.268 | 0.194 | ++++ | 0.031 | 0.336 | 0.321 | 0.216 | 0.267 | 0.211 | 0.230 | 0.165 | 0.231 | 0.115 | 0.238 | 0.273 | 0.219 | 0.201 | 0.745 | 0.255 |
| 9 | 0.572 | 0.246 | 0.281 | 0.388 | 0.291 | 0.311 | 0.193 | 0.168 | ++++ | 0.334 | 0.365 | 0.245 | 0.243 | 0.209 | 0.209 | 0.222 | 0.227 | 0.122 | 0.289 | 0.286 | 0.185 | 0.228 | 0.716 | 0.220 |
| 10 | 0.629 | 0.520 | 0.493 | 0.496 | 0.492 | 0.524 | 0.479 | 0.467 | 0.479 | ++++ | 0.209 | 0.202 | 0.157 | 0.185 | 0.202 | 0.323 | 0.157 | 0.281 | 0.222 | 0.453 | 0.175 | 0.240 | 0.697 | 0.368 |
| 11 | 0.556 | 0.511 | 0.469 | 0.500 | 0.481 | 0.523 | 0.476 | 0.466 | 0.494 | 0.386 | ++++ | 0.157 | 0.139 | 0.118 | 0.103 | 0.295 | 0.095 | 0.207 | 0.163 | 0.364 | 0.226 | 0.236 | 0.671 | 0.290 |
| 12 | 0.609 | 0.468 | 0.464 | 0.496 | 0.471 | 0.448 | 0.448 | 0.388 | 0.424 | 0.382 | 0.352 | ++++ | 0.086 | 0.062 | 0.061 | 0.183 | 0.041 | 0.213 | 0.269 | 0.401 | 0.183 | 0.110 | 0.788 | 0.243 |
| 13 | 0.619 | 0.488 | 0.485 | 0.439 | 0.418 | 0.450 | 0.450 | 0.427 | 0.425 | 0.345 | 0.327 | 0.265 | ++++ | 0.059 | 0.079 | 0.235 | 0.043 | 0.216 | 0.245 | 0.393 | 0.173 | 0.153 | 0.693 | 0.212 |
| 14 | 0.601 | 0.434 | 0.454 | 0.456 | 0.427 | 0.450 | 0.409 | 0.379 | 0.393 | 0.377 | 0.320 | 0.246 | 0.237 | ++++ | 0.051 | 0.241 | 0.028 | 0.150 | 0.221 | 0.278 | 0.150 | 0.114 | 0.683 | 0.176 |
| 15 | 0.599 | 0.456 | 0.468 | 0.475 | 0.425 | 0.454 | 0.418 | 0.388 | 0.389 | 0.388 | 0.299 | 0.221 | 0.262 | 0.237 | ++++ | 0.272 | 0.041 | 0.193 | 0.267 | 0.372 | 0.152 | 0.146 | 0.674 | 0.215 |
| 16 | 0.547 | 0.394 | 0.367 | 0.447 | 0.415 | 0.393 | 0.418 | 0.351 | 0.404 | 0.472 | 0.459 | 0.372 | 0.418 | 0.422 | 0.424 | ++++ | 0.216 | 0.225 | 0.238 | 0.390 | 0.268 | 0.201 | 0.842 | 0.330 |
| 17 | 0.604 | 0.462 | 0.463 | 0.473 | 0.453 | 0.469 | 0.438 | 0.393 | 0.413 | 0.336 | 0.274 | 0.193 | 0.212 | 0.176 | 0.197 | 0.399 | ++++ | 0.184 | 0.219 | 0.329 | 0.139 | 0.116 | 0.662 | 0.170 |
| 18 | 0.528 | 0.343 | 0.374 | 0.409 | 0.352 | 0.408 | 0.305 | 0.304 | 0.309 | 0.441 | 0.380 | 0.391 | 0.402 | 0.353 | 0.371 | 0.402 | 0.365 | ++++ | 0.106 | 0.165 | 0.112 | 0.164 | 0.736 | 0.242 |
| 19 | 0.539 | 0.460 | 0.415 | 0.431 | 0.419 | 0.446 | 0.433 | 0.404 | 0.436 | 0.410 | 0.346 | 0.443 | 0.431 | 0.415 | 0.437 | 0.427 | 0.399 | 0.258 | ++++ | 0.283 | 0.206 | 0.211 | 0.851 | 0.353 |
| 20 | 0.543 | 0.452 | 0.466 | 0.493 | 0.464 | 0.483 | 0.442 | 0.434 | 0.449 | 0.549 | 0.505 | 0.519 | 0.516 | 0.440 | 0.506 | 0.507 | 0.480 | 0.390 | 0.466 | ++++ | 0.239 | 0.263 | 0.770 | 0.389 |
| 21 | 0.608 | 0.443 | 0.456 | 0.459 | 0.437 | 0.480 | 0.408 | 0.399 | 0.380 | 0.376 | 0.415 | 0.375 | 0.371 | 0.352 | 0.350 | 0.443 | 0.332 | 0.311 | 0.395 | 0.430 | ++++ | 0.132 | 0.646 | 0.226 |
| 22 | 0.607 | 0.451 | 0.465 | 0.445 | 0.441 | 0.459 | 0.428 | 0.383 | 0.412 | 0.429 | 0.423 | 0.307 | 0.359 | 0.310 | 0.341 | 0.407 | 0.317 | 0.363 | 0.416 | 0.433 | 0.341 | ++++ | 0.820 | 0.195 |
| 23 | 0.705 | 0.676 | 0.664 | 0.651 | 0.658 | 0.688 | 0.650 | 0.649 | 0.646 | 0.638 | 0.619 | 0.664 | 0.631 | 0.629 | 0.629 | 0.677 | 0.623 | 0.643 | 0.671 | 0.647 | 0.624 | 0.676 | ++++ | 0.716 |
| 24 | 0.606 | 0.472 | 0.497 | 0.490 | 0.468 | 0.502 | 0.415 | 0.422 | 0.404 | 0.500 | 0.446 | 0.416 | 0.391 | 0.365 | 0.389 | 0.471 | 0.365 | 0.416 | 0.483 | 0.511 | 0.411 | 0.403 | 0.642 | ++++ |

Cuando se analizaron las distancias genéticas de Nei (Tabla 24), se obtuvieron valores bajos entre *L. cf. svallize* del río Thiamis y las poblaciones de *L. c. albus* de los ríos Louros y Arachthos ($D=0,027-0,035$), y entre *L. c. albus* del río Evinos y la población de *L. cf. svallize* del Lago Trichonis ($D=0,058$). También se encontraron distancias genéticas bajas entre las dos poblaciones de *L. c. macedonicus* ($D=0,106$) y entre las distintas poblaciones de *L. c. vardarensis* ($D=0,028-0,086$) si exceptuamos las poblaciones de la Isla de Euboia y la del Lago Prespa.

Las mayores distancias genéticas se dieron entre *Leuciscus (Telestes) souffia* y *Leuciscus keadicus* ($D=0,946$), siendo en general muy altas, como era de esperar, entre *L. (Telestes) souffia* y el resto de las especies de *Leuciscus* ($D=0,407-0,683$). La muestra de *L. c. cephalus* procedente del Danubio mostró las distancias genéticas más pequeñas con las poblaciones de *L. c. macedonicus* del río Strymon ($D=0,112$) y de *L. c. cabeda* de Italia ($D=0,132$).

A partir de las frecuencias alélicas se calcularon las distancias genéticas de Cavalli-Sforza (distancias de cuerda). Basándonos en ellas, se construyó un dendrograma con todas las poblaciones por el método de UPGMA, con el fin de conocer la similitud entre ellas y tratar de delimitar que grupos son homogéneos, para después abordar las relaciones filogenéticas entre éstos (Fig. 7).

En el dendrograma aparecieron *L. keadicus* y *L. borysthenicus* como ramas independientes. Además, se distinguieron otras dos ramas que agruparon a un gran número de poblaciones. En el primer grupo se unieron todas las poblaciones analizadas de *L. cf. svallize*, *L. c. peloponnensis* y *L. c. albus*, y también se les unió la población de *L. c. vardarensis* del Lago Prespa (todas ellas de la parte sur y oeste de Grecia). Sin embargo, la población del Lago Prespa fue la más diferenciada dentro de este grupo, mostrando unas distancias genéticas de Nei moderadas ($D=0,165-0,273$), un locus diagnóstico (*IDHP-1**) y un alelo exclusivo (*mAAT-1*95*) con una frecuencia menor al 0,05%.

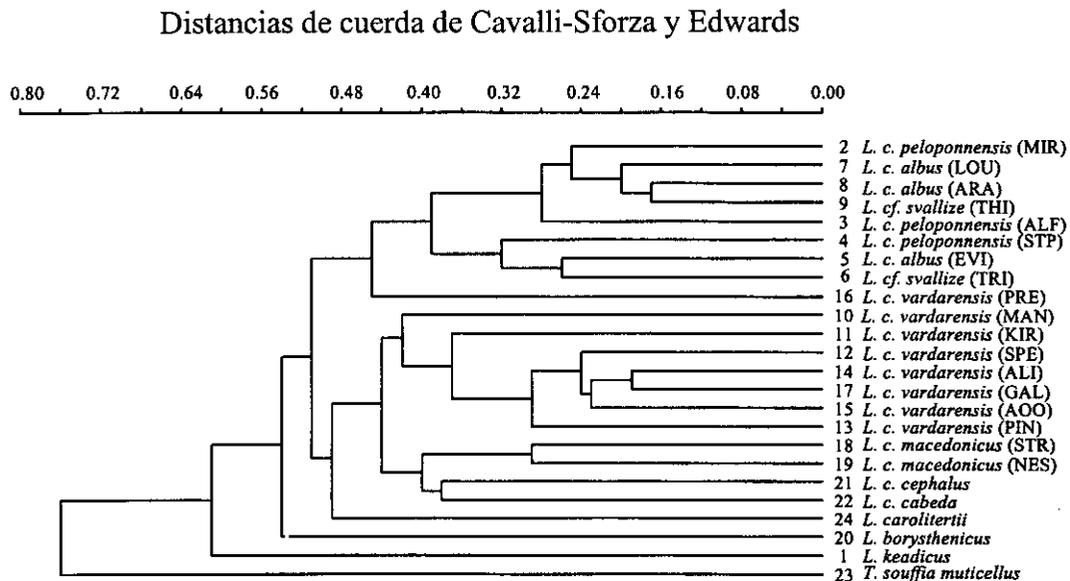


Fig. 7. Dendrograma obtenido a partir del análisis de UPGMA para todas las poblaciones europeas consideradas. Entre paréntesis figuran las abreviaturas de las localidades para una mejor identificación de las poblaciones.

En la segunda rama se agruparon el resto de las poblaciones de *L. c. vardarensis* y también las dos analizadas de *L. c. macedonicus*, y las de *L. c. cephalus* y *L. c. cabeda*. La especie ibérica *L. carolitertii* apareció agrupada junto a ellas en esta rama pero fue la más diferenciada de todas mostrando unas distancias de Nei entre 0,170 y 0,368 y encontrándose dos alelos únicos (*mAAT-1*90* y *MPI-1*110*). El patrón de distribución de este grupo comprende el centro y oeste de Europa y la parte norte de Grecia.

A partir de los agrupamientos obtenidos en las ramas del UPGMA se efectuó un análisis filogenético, aunque considerando a *L. carolitertii* y *L. "prespensis"* (la población del Lago Prespa) como dos grupos independientes al presentar gran diferenciación dentro de las ramas en las que aparecieron. También se incluyó *Leuciscus (Telestes) souffia* como grupo externo. Por tanto, los grupos considerados fueron: *L. keadicus*, *L. borysthenicus*, *L. carolitertii*, *L. "prespensis"*, *L. cephalus* (incluyendo *L. c. cephalus*, *L. c. cabeda* y todas las poblaciones de *L. c. vardarensis* y de *L. c. macedonicus*) y *L. peloponnensis* (en

la que se incluyen todas las poblaciones antes denominadas como *L. c. peloponnensis*, *L. c. albus* y *L. cf. svallize*).

El análisis de parsimonia que se efectuó a partir de la matriz de pasos dio como resultado un único árbol con 134 pasos usando 25 caracteres (Figura 8). La topología del árbol resultó ser diferente de la que se obtuvo en el UPGMA con datos de distancias genéticas. En esta ocasión *L. peloponnensis* y *L. cephalus* constituyeron un grupo hermano con respecto a *L. "prespensis"*, en contra de lo esperado por las distancias geográficas.

Todas las especies europeas, a excepción de *L. borysthenicus*, constituyen un grupo hermano con respecto a *L. carolitertii*.

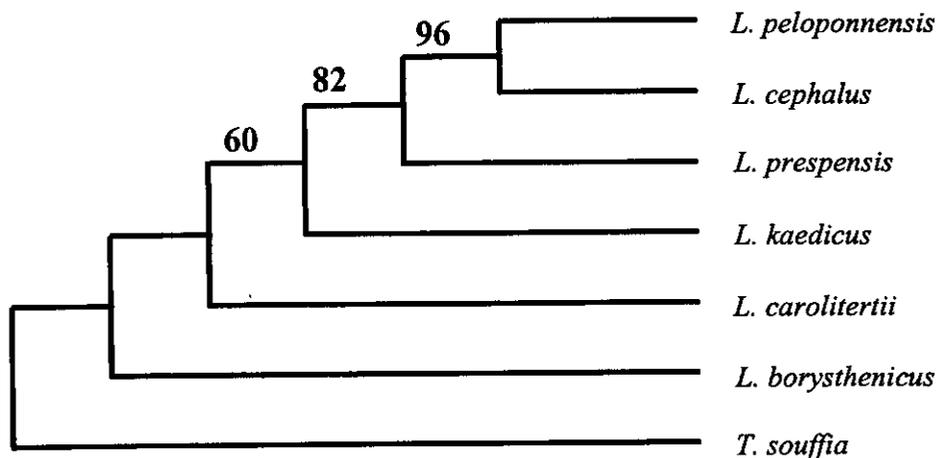


Fig. 8. Árbol más parsimonioso obtenido a partir del análisis aloenzimático. Los números que hay sobre las ramas indican el porcentaje de entre las 200 réplicas de bootstrap en que se encontró la unión indicada. Sólo se han señalado las uniones que aparecieron con una frecuencia mayor al 50%.

Si enumeramos los alelos encontrados en las poblaciones analizadas de estas especies y los situamos junto a los de *L. carolitertii* y los genotipos encontrados para el complejo *T. alburnoides* (Tabla 25) podemos analizar la posibilidad de que alguna de éstas sea la otra especie parental.

Tabla 25. Patrones genotípicos de los híbridos *T. alburnoides* y alelos encontrados en las especies griegas de *Leuciscus* e italiana de *Telestes*. En mayúscula se señala los alelos que no han sido encontrados en el complejo *T. alburnoides* y que ayudan a desechar estas especies como parentales. (-) loci no estudiados para las especies griegas.

| Locus | Cuenca del Duero (España) | | | Poblaciones griegas y Sureuropeas | | | | | | |
|---|---|-----------------------|------------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | Genotipos de <i>T. alburnoides</i> híbridos | | | Alelos en | | | | | | |
| | 2n | 3n | 4n | <i>L. carolitertii</i> | <i>L. peloponnensis</i> | <i>L. prespensis</i> | <i>L. borysthenicus</i> | <i>L. keadicus</i> | <i>L. cephalus</i> | <i>T. souffia</i> |
| 1. Loci monomórficos en el complejo: | | | | | | | | | | |
| <i>mAAT-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,B | a | a | a | a,B | a |
| <i>CK*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>FH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,B | a | a | a | a | a,C |
| <i>GAPDH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,B | a,B | B,C | a,B | a,B,C | a |
| <i>GLO1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | - | - | - | - | - | - |
| <i>GPI-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | E,D | a,C,E | a | a | a,C,E | a,B |
| <i>IDHP-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,E | C | a | a | a | D |
| <i>IDHP-3*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,C | C | C | C,D | a,C | B |
| <i>LDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,B | a | a | a | a,D | C |
| <i>LDH-2*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,B | a | a | a | a,B | B |
| <i>sMDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,B | a | a | a | a,B | a |
| <i>ME-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | - | - | - | - | - | - |
| <i>PEPB*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,C | a | a,D | G | a,B,E | F |
| <i>SOD*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,D | a | C | E | a | a,B |
| 2. Loci polimórficos: | | | | | | | | | | |
| <i>AK*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a | a,b | a | a | a | a,C | a |
| <i>CAH-1*</i> | aa,ae | aaa | aaaa | a | B,C,D | D | a,e | G | a,B,C,D,e,F | a |
| <i>CAH-2*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a,b | a,b,C,D | b | C,E | C | a,b,C | E |
| <i>EST*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a | a,B,D | a | E | E,F | a,B,c,E | a |
| <i>GPI-2*</i> | aa,ab,ad | aaa,aaad | aaaa | a | a,C | a | a | a | a,C | a |
| <i>IDHP-2*</i> | aa,ab | aaa,aab | aaaa | a | a,D | a | a,D | a,D | a,C | C |
| <i>sMDH-2*</i> | aa,ab | aaa,aab,abb | aaaa | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>ME-2*</i> | aa,ab | aaa,(ab) ¹ | aaaa,(ab) ¹ | a,b | - | - | - | - | - | - |
| <i>MPI*</i> | aa | aaa,aaf | aaaa | a,f | a,D,E | a | D | E | a,C,D | B,D |
| 3. Loci con heterocigosidad fijada: | | | | | | | | | | |
| <i>sAAT-1*</i> | ab | (ab) ¹ | abbb | a | a | a,C | a | a | a,E | D |
| <i>PGDH*</i> | ac,ad | aac,acc,acd | accc,aadd | a | a,d,E | a,d | d | d | a,B;c | a |
| <i>PGM*</i> | ab | aab,abb | abbb | a | a,b,C | a,b | b,C | C | a,b | b |

Todas las especies consideradas de *Leuciscus* presentaron loci diagnósticos (Tabla 25) a excepción de *L. cephalus*. Las especies que más se discriminan como posibles parentales fueron *T. souffia* y *L. keadicus*, con nueve loci diagnósticos no presentes en los híbridos, y después *L. borysthenicus*, con seis loci diagnósticos. *Leuciscus peloponnensis* y *L. "prespensis"* mostraron dos y tres loci diagnósticos respectivamente.

Leuciscus cephalus no mostró ningún locus diagnóstico, como ya se ha comentado, sin embargo, muestra hasta 25 alelos en el total de las poblaciones estudiadas que no son mostrados por los híbridos del complejo *T. alburnoides* (Tabla 25). En el resto de las especies, la presencia de distintos alelos no presentes en los híbridos es también abundante, y a ello habría que añadirle el fenómeno inverso, ya que algunos alelos presentes en los híbridos de *T. alburnoides* no están presentes en ninguna de estas especies (*sAAT-1*b*, *IDHP-2*b*, *sMDH-2*b* y *MPI*f*).

Para concluir, destaca el hecho de que ninguna de estas especies posea la combinación de alelos complementaria a la de *L. carolitertii* en los loci fijados en heterocigosis, que permitiría originar los híbridos de *T. alburnoides* por lo que hemos de desestimar estas especies como candidatos a parentales.

En el caso de *L. cephalus*, el considerable número de poblaciones estudiadas que abarcan al menos cuatro subespecies y la gran variabilidad intra e interpoblacional mostrada explicarían que al tomar el conjunto de los alelos mostrados en esta especie siempre aparezca un nivel compartido por el complejo *T. alburnoides*. De cualquier forma la presencia y ausencia de alelos parece confirmar que *L. cephalus* constituiría el grupo hermano de las especies ibéricas de *Leuciscus*.

2.3.- Las especies del género *Tropidophoxinellus*

Se analizaron las dos especies existentes de este género en Grecia ya que, en espera de otros resultados concluyentes, los estudios morfológicos llevados a cabo por Stephanidis (1971) situaban al complejo ibérico dentro del género *Tropidophoxinellus*. Aunque parece evidente la implicación de otra especie del género *Leuciscus*, la posibilidad de la existencia de un fenómeno de vicarianza fue tenida en cuenta por lo que se analizó su patrón alélico para contrastar su implicación como especies parentales (Tabla 26).

Las dos especies griegas presentaron combinaciones alélicas distintas a la teórica de la segunda especie parental. *Tropidophoxinellus spartiaticus* se caracterizó por presentar cinco alelos diagnósticos respecto al complejo *T. alburnoides* (*CAH-2**, *GPI-2**, *PEPB**, *PGM** y *SOD**), además de otros tres alelos no presentes en la población ibérica (Tabla 26).

Por su parte, *T. hellenicus* mostró una diferenciación alélica aun mayor con respecto al complejo *T. alburnoides* con ocho loci diagnósticos (*CAH-2**, *CK**, *IDHP-2**, *IDHP-3**, *sMDH-1**, *ME-1**, *GPI-2** y *SOD**) e igual número de alelos marcadores no presentes en el complejo ibérico.

Por el contrario, ninguna de las dos especies griegas presentó varios de los alelos encontrados en los loci polimórficos del Complejo *T. alburnoides* del río Águeda (*AK*b*, *CAH-1*c*, *sMDH-2*b*, *PGDH*b* y *PGDH*c*). Estos alelos no se encontraron en *L. carolitertii*, por lo que deben aportarse por la otra especie parental. De esta manera, se refuerza su descarte como especies parentales y su diferenciación genética.

Tabla 26. Patrones genotípicos de los híbridos *T. alburnoides*, alelos encontrados la población de *L. carolitertii* del río Águeda y alelos encontrados en *T. hellenicus* y *T. spartiaticus* en Grecia.

| Locus | Cuenca del Duero (España) | | | Grecia | | |
|---|--|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| | Genotipos de <i>T. alburnoides</i> híbridos | | | Alelos en | | |
| | 2n | 3n | 4n | <i>L. carolitertii</i> | <i>T. spartiaticus</i> | <i>T. hellenicus</i> |
| 1. Loci monomórficos en el complejo: | | | | | | |
| <i>mAAT-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a |
| <i>CK*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B |
| <i>FH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a,B |
| <i>GAPDH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a,B |
| <i>GLO1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,B | a |
| <i>GPI-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a,B |
| <i>IDHP-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a |
| <i>IDHP-3*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,B | B |
| <i>LDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a |
| <i>LDH-2*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a,B |
| <i>sMDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B |
| <i>ME-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B |
| <i>PEPB*</i> | aa | aaa | aaaa | a | B | a |
| <i>SOD*</i> | aa | aaa | aaaa | a | D | B,C |
| 2. Loci polimórficos: | | | | | | |
| <i>AK*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a | a | a,C |
| <i>CAH-1*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a | a | a,B |
| <i>CAH-2*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a,b | C | C,D |
| <i>EST*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a | ? | ? |
| <i>GPI-2*</i> | aa,ab,ad | aaa,aaad | aaaa | a | a | C |
| <i>IDHP-2*</i> | aa,ab | aaa,aab | aaaa | a | C | C |
| <i>sMDH-2*</i> | aa,ab | aaa,aab,abb | aaaa | a | a | a |
| <i>ME-2*</i> | aa.ab | aaa,(ab) ¹ | aaaa,(ab) ¹ | a,b | ? | ? |
| <i>MPI*</i> | aa | aaa,aab | aaaa | a,b | a | a,b |
| 3. Loci con heterocigosidad fijada: | | | | | | |
| <i>sAAT-1*</i> | ab | (ab) ¹ | abbb | a | b,C | b |
| <i>PGDH*</i> | ab,ac | aab,abb,abc | abbb,aacc | a | a | a,D |
| <i>PGM*</i> | ab | aab,abb | abbb | a | C | b,C |

(?) indica que no se obtuvieron buenos resultados en estos loci que permitiesen su comparación.

Otros resultados de interés obtenidos tras el análisis con aloenzimas consisten, por una parte, en el bajo polimorfismo encontrado en la población de *T. spartiaticus* ($P=0,125$) frente a *T. hellenicus* ($P=0,458$). Por otra parte, se encontraron 6 loci diagnósticos entre las poblaciones analizadas de ambas especies.

2.4.-Análisis aloenzimático de distintos ciprínidos ibéricos

El estudio realizado sobre diversas especies del género *Leuciscus* ha confirmado a *L. carolitertii* como una de las especies parentales, pero no ha conseguido determinar quién es la segunda especie parental que originó los híbridos de *T. alburnoides*. Por tanto, se hizo necesario dirigir nuestro estudio sobre otras especies de ciprínidos que habitan la Península Ibérica y sobre otras poblaciones del complejo *T. alburnoides* por si en éstas se hallase la especie que hibrida con *L. carolitertii*.

La búsqueda de los loci marcadores se efectuó sobre diez poblaciones comprendidas en siete taxa que pueden considerarse como candidatos para hibridar con miembros del complejo *T. alburnoides*.

Los valores de variabilidad genética encontrados indicaron que la mayoría de las muestras de estas especies no presentaron desviaciones significativas de los cruces esperados al azar. En general, la heterocigosidad observada (H_o) se ajustó a la esperada (H_e) para cada muestra (Tabla 27) y las proporciones genotípicas para cada locus simple se ajustaron a lo esperado por el equilibrio de Hardy-Weinberg. La excepción fue la población de *Leuciscus sp.* del río Estena en la que se encontró un exceso de heterocigosis que superó considerablemente a lo esperado por el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Por otro lado, en *Iberocypris palaciosi* y *Anaocypris hispanica* se encontraron valores altos de heterocigosidad considerablemente mayores que los encontrados en el resto de los taxa aquí analizados, sin embargo, estos valores no superaron a la heterocigosidad esperada.

Hay que hacer constar que los dos ejemplares analizados de *Ch. polylepis willkommii* del río Jándula no se han mostrado en la Tabla 27 ya que su número es demasiado pequeño y, por tanto, carecería de sentido incluirlos en un análisis de la variabilidad.

Tabla 27. Variabilidad genética de las especies ibéricas consideradas como posibles parentales de los híbridos del complejo *T. alburnoides*. Entre paréntesis figuran los errores estándar.

| Población | Nº medio de ejemplares por locus | Nº medio de alelos por locus | Porcentaje de loci polimórficos | Heterocigosis media | |
|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| | | | | Conteo directo H_0 | Esperado según Hardy Weinberg H_T |
| Híbridos diploides (Río Águeda) | 25,0 (0,8) | 1,5 (0,1) | 26,9 | 0,151 (0,063) | 0,094 (0,034) |
| <i>L. carolitertii</i> (Río Águeda) | 29,2 (1,1) | 1,1 (0,1) | 7,7 | 0,025 (0,015) | 0,026 (0,026) |
| <i>Ch. polylepis</i> (Río Águeda) | 25,7 (1,2) | 1,3 (0,1) | 11,5 | 0,010 (0,005) | 0,031 (0,012) |
| <i>R. lemmingii</i> (Río Turones) | 19,8 (0,1) | 1,0 (0,0) | 3,8 | 0,020 (0,020) | 0,015 (0,015) |
| <i>L. pyrenaicus</i> (Río Estena). | 19,3 (0,6) | 1,3 (0,1) | 15,4 | 0,042 (0,022) | 0,051 (0,022) |
| <i>Leuciscus sp.</i> (Río Estena) | 15,8 (0,5) | 1,5 (0,1) | 38,5 | 0,233 (0,076) | 0,172 (0,047) |
| <i>R. lemmingii</i> (Río Estena) | 16,2 (0,7) | 1,5 (0,1) | 26,9 | 0,067 (0,027) | 0,090 (0,030) |
| <i>A. hispanica</i> (Río Estena) | 4,9 (0,1) | 1,4 (0,1) | 38,5 | 0,138 (0,046) | 0,137 (0,040) |
| <i>I. palaciosi</i> (Río Jándula) | 10,3 (0,4) | 1,6 (0,1) | 50,0 | 0,193 (0,056) | 0,202 (0,042) |
| <i>R. lemmingii</i> (Río Robledillo) | 12,0 (0,0) | 1,3 (0,1) | 26,9 | 0,067 (0,033) | 0,089 (0,032) |

La alta heterocigosis encontrada para *Leuciscus sp.* del río Águeda puso de manifiesto que este taxón, aún no descrito, puede tratarse de un nuevo complejo híbrido, lo cual es también apoyado por el hecho de que sólo se encontró un ejemplar macho en una muestra de 70 individuos capturados. Además, el contenido de ADN que se detectó en algunos ejemplares analizados fue del mismo orden que el encontrado para individuos triploides del complejo *T. alburnoides*. Debido a estas sospechas y a la presencia de alelos marcadores que

lo excluían como implicado en la hibridación se decidió eliminar este taxón del resto del estudio.

Otros resultados de interés obtenidos con el análisis aloenzimático indican que, en general, las poblaciones de aquellas especies procedentes de la cuenca del Guadiana y Guadalquivir parecen tener mayores niveles de diversidad genética que las procedentes de la cuenca del Duero. Por ejemplo, *Rutilus lemmingii* de los ríos Estena y Robledillo presentaron mayor diversidad genética que la muestra de esta especie del río Turones (cuenca del Duero).

Para una mejor comparación de los alelos encontrados en las distintas especies que se han estudiado con los presentes en las formas híbridas, se han representado conjuntamente en la Tabla 28.

Utilizando tan solo los 14 loci que han aparecido en homocigosis podemos excluir varias especies como posibles progenitoras de los híbridos del complejo *T. alburnoides*. Los alelos diagnósticos encontrados para algunas especies consideradas en estos loci aparecen en la tabla en letras mayúsculas (Tabla 28).

Se han encontrado múltiples alelos diagnósticos de especies repartidos entre varios loci y que excluyen claramente a *Ch. polylepis*, *R. lemmingii*, *A. hispanica* e *Iberocypris palaciosii* como posibles progenitores de los *T. alburnoides* de ambos ríos. Por ejemplo, los alelos encontrados para *Ch. polylepis duriensis* en 7 loci (Tabla 28) no están presentes en los híbridos de *T. alburnoides* estudiados. Igualmente, la población de *R. lemmingii* del Duero presenta alelos diagnósticos en 9 loci que no están presentes en los híbridos y de las que podríamos destacar *CK**, *LDH-1**, *LDH-2**, *PEPB** y *SOD** que son monomórficos para el complejo *T. alburnoides*. Del mismo modo, se podrían enumerar los alelos diagnósticos en las otras poblaciones de estas dos especies (Tabla 28).

Tabla 28. Patrones de expresión genética en *T. alburnoides* híbridos y el resto de las posibles especies parentales. (*L. c.*) *Leuciscus carolitertii*, (*Ch. p. d.*) *Chondrostoma polylepis duriensis*, (*R. l.*) *Rutilus lemmingii*, (*L. p.*) *Leuciscus pyrenaicus*, (*A. h.*) *Anaocypris hispanica*, (*I. p.*) *Iberocypris palaciosi*, (*Ch. p. w.*) *Chondrostoma polylepis willkommii*. En mayúsculas se marcan los alelos diagnósticos con respecto al complejo.

| Cuenca | Duero | | | | | | Guadiana | | | Guadalquivir | | | |
|---|--|-----------------------|------------------------|-----------|--------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|--------------|------------------|
| | Genotipos de <i>T. alburnoides</i> híbridos | | | Alelos en | | | Alelos en | | | Alelos en | | | |
| | Locus | 2n | 3n | 4n | <i>L. c.</i> | <i>Ch. p. d.</i> | <i>R. l.</i> | <i>L. p.</i> | <i>R. l.</i> | <i>A. h.</i> | <i>I. p.</i> | <i>R. l.</i> | <i>Ch. p. w.</i> |
| 1. Loci monomórficos en el complejo: | | | | | | | | | | | | | |
| <i>mAAT-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a,b | a | a |
| <i>CK*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B | a | B | a | a | a,B | Bb | a |
| <i>FH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,b | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>GAPDH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a,c | a,c,D | a | a | a,c | a,B,c | a,c |
| <i>GLO1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a,B | a | a | a,B | a | a |
| <i>GPI-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B,D | a | B,D | a,c | a | a,c | B,D | a |
| <i>IDHP-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | a | a | a,B | a | a |
| <i>IDHP-3*</i> | aa | aaa | aaaa | a | D | B | a | a | C | a | a,e | a | a |
| <i>LDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>LDH-2*</i> | aa | aaa | aaaa | a | B,C | B | a | B | a | a | A/B ² | a | B |
| <i>sMDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | a | C | a | a | B | a |
| <i>ME-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | a | B,C | a | a | a | D | a |
| <i>PEPB*</i> | aa | aaa | aaaa | a | F | F | a | D | B,E | a | a | a,D | C |
| <i>SOD*</i> | aa | aaa | aaaa | a | D | E | a | E | B | a | C | E | C |
| 2. Loci polimórficos: | | | | | | | | | | | | | |
| <i>AK*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a | B | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>CAH-1*</i> | aa,ad | aaa | aaaa | a | a | B(nulo) | a,c | e | a | a | a,e | e | e |
| <i>CAH-2*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a,c | a | a | a | a,D | a,D,E | a | a | a,B | B |
| <i>EST*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a | C | a | a,b,d | a,d | a,d | a,d | a,d | d | d |
| <i>GPI-2*</i> | aa,ab,ac | aaa,aaac | aaaa | a | a,c | a | a | a | a,b | a | a,c | a | a,c |
| <i>IDHP-2*</i> | aa,ac | aaa,aac | aaaa | a | D | B | a | a | a,c | a | a,e | a | a |
| <i>sMDH-2*</i> | aa,ab | aaa,aab,abb | aaaa | a | a,b | b | a | a | a,b | a | a,b | a | a |
| <i>ME-2*</i> | aa,ab | aaa,(ab) ¹ | aaaa,(ab) ¹ | a,b | a,b | a | a,b | a,b | a,b | a,b | a,b | a,b | a |
| <i>MPI*</i> | aa | aaa,aad | aaaa | a,d | a,C | a | a,d | B,C | a,d | a,d | a,d | a,C | a |
| 3. Loci con heterocigosidad fijada: | | | | | | | | | | | | | |
| <i>sAAT-1*</i> | ab | (ab) ¹ | abbb | a | b | b | a | a,b | b | a | a,b | b | b |
| <i>PGDH*</i> | ac,ad | aac,acc,acd | accc,aadd | a | c | c | a | c,d | B | c | c | c | c |
| <i>PGM*</i> | ac | aac,acc | accc | a | a,c | c | a,c | c,D | a,c | a,B | c,D | B | B |

(1) La resolución de los zimogramas no permitió determinar la dosis génica. (2) Todos los individuos fueron heterocigotos para este locus.

Anaocypris hispanica presentó 8 alelos marcadores distribuidos en seis loci (*sMDH-1**, *PEPB**, *SOD**, *CAH-2**, *IDHP-3**, y *PGDH**) que no se encontraron en las poblaciones de híbridos. La especie *Iberocypris palaciosii* mostró 7 alelos pertenecientes a 6 loci que no aparecieron en los híbridos entre los que destacan el alelo diagnóstico *SOD*d* y los dos alelos fijados en heterocigosis encontrados en el locus *LDH-2**.

Sin embargo, la especie *L. carolitertii* del río Águeda no puede ser excluida como especie parental de los híbridos del río Águeda siguiendo este criterio, confirmándose lo ya expuesto anteriormente.

2.5.- Análisis aloenzimático en distintas poblaciones del complejo *T. alburnoides*

Usando las poblaciones del complejo *T. alburnoides* analizadas para determinar las proporciones de sexo y ploidía se realizó un estudio exhaustivo centrado en los tres loci fijados en heterocigosis para los híbridos de *T. alburnoides* del río Águeda.

En todas las poblaciones, a excepción de la del río Estena, se observó la presencia de heterocigosis fijada en estos tres loci en todos los individuos. Por ello se ha concluido que todas las poblaciones de *T. alburnoides* excepto la del río Estena estaban compuestas por de híbridos.

En la población del río Estena (que cronológicamente fue la última estudiada) se encontraron algunos ejemplares en los que aparecían estos loci expresados en forma homocigótica por lo que se completó el estudio aloenzimático extendiéndose al total de los 26 loci analizados para la población del río Águeda.

Se ha preferido comentar los resultados completos obtenidos en la población del río Estena, por su relevancia, de forma independiente.

2.5.1.- La población del río Estena

El análisis de aloenzimas realizado en la población del complejo *T. alburnoides* del río Estena permitió clasificar de nuevo los loci en tres categorías en función de su polimorfismo e independientemente de su grado de ploidía (Tabla 29):

1.- Loci monomórficos en todos los individuos del complejo. Once loci entrarían ahora en esta categoría ya que no presentan ningún tipo de polimorfismo en los individuos de esta población. Este hecho indica un mayor grado de polimorfismo en la población del río Estena que la previamente analizada del río Águeda.

2.- Loci polimórficos. Aparecieron 11 loci dentro de esta categoría. Todos los loci, a excepción de *mAAT**, resultaron ser polimórficos en los individuos triploides mientras que sólo *CAH-1** y *ME-2** lo fueron en los individuos diploides.

3.- Loci en los que parte de los individuos del complejo resultaron ser heterocigotos. Esta categoría está constituida en esta población por cuatro loci (*sAAT-1**, *mMDH-2**, *PGDH** y *PGM**). Una subpoblación de individuos analizados en la población del río Estena resultaron ser heterocigotos para estos cuatro loci independientemente de su sexo y de su ploidía. De los 31 ejemplares estudiados, 20 mostraron heterocigosidad fijada para estos cuatro loci diagnósticos, sin embargo, 11 individuos fueron homocigotos para estos mismos loci mostrando respectivamente los alelos *sAAT-1*b*, *mMDH-2*b*, *PGDH*b* y *PGM*b*.

De los análisis aloenzimáticos realizados sobre la muestra de *T. alburnoides* del río Estena se desprende que en esta población aparecen individuos sexuales además de los híbridos, a diferencia de lo que ocurrió en la población del río Águeda donde todos los individuos analizados resultaron ser híbridos.

Tabla 29. Patrones genotípicos encontrados en el complejo *T. alburnoides* en la población del río Estena.

| Locus | Río Estena (Guadiana) | | |
|---|----------------------------------|---------------------------|---|
| | Genotipos de individuos híbridos | | Alelos en <i>T. alburnoides</i> no híbridos |
| | individuos Diploides | individuos Triploides | |
| 1. Loci monomórficos en el complejo: | | | |
| <i>AK*</i> | aa | aaa | a |
| <i>CK*</i> | aa | aaa | a |
| <i>CAH-2*</i> | aa | aaa | a,b |
| <i>GLO1*</i> | aa | aaa | a |
| <i>IDHP-1*</i> | aa | aaa | a |
| <i>LDH-1*</i> | aa | aaa | a |
| <i>LDH-2*</i> | aa | aaa | a |
| <i>sMDH-1*</i> | aa | aaa | a |
| <i>ME-1*</i> | aa | aaa | a |
| <i>PEPB*</i> | aa | aaa | a |
| <i>SOD*</i> | aa | aaa | a |
| 2. Loci polimórficos: | | | |
| <i>mAAT-1*</i> | ab | aaa | a |
| <i>CAH-1*</i> | aa,ab | aaa,aab,aac | a,c |
| <i>EST*</i> | aa | aaa,bbb,(ab) ¹ | a,b |
| <i>FH*</i> | aa | aaa,aab | a |
| <i>GAPDH*</i> | aa | aaa,aab | a |
| <i>GPI-1*</i> | aa | aaa,aab | a |
| <i>GPI-2*</i> | aa | aaa,aab,abb | a,b |
| <i>IDHP-2*</i> | aa | aaa,aab | a,b |
| <i>IDHP-3*</i> | aa | aaa,aab | a,b |
| <i>ME-2*</i> | aa,ab | abb,bbb | a,b |
| <i>MPI*</i> | aa | aaa,aab | a |
| 3. Loci fijados en heterocigosis en parte de la población: | | | |
| <i>sAAT-1*</i> | ab | (ab) ¹ | b |
| <i>sMDH-2*</i> | ab | aab,abb | b |
| <i>PGDH*</i> | ab | aab,abb | b |
| <i>PGM*</i> | ab | aab,abb | b |

(1) genotipos en los que la resolución de los zimogramas no permitió inferir la dosis génica.

Los cuatro loci fijados en heterocigosis en los híbridos del río Estena (*sAAT-1**, *mMDH-2**, *PGDH** y *PGM**) también resultaron de gran utilidad para determinar las especies parentales y, así, nos encontramos que los alelos obtenidos para *L. pyrenaicus* y para los *T. alburnoides* no híbridos del río Águeda son consistentes con que estas dos especies sean los parentales de los híbridos de la cuenca del Guadiana.

Se analizaron las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci polimórficos de este subgrupo de 11 individuos supuestamente no híbridos y, aunque la muestra fue pequeña, las frecuencias observadas no se desviaron sustancialmente de los cruces esperados al azar. Además, la heterocigosidad observada para este subgrupo ($H_o = 0,084 \pm 0,032$) no excedió a la esperada mostrándose en unos niveles similares ($H_e = 0,092 \pm 0,031$).

Se podría concluir, por tanto, que una porción del complejo *T. alburnoides* del río Estena está compuesta por individuos diploides que se han originado mediante una reproducción sexual.

Los *T. alburnoides* no híbridos y *L. pyrenaicus* de la población del río Estena se definen, por tanto, como las especies parentales de los híbridos de *T. alburnoides* de esta población.

En esta población no se detectaron individuos híbridos con tres alelos expresándose a la vez como ocurriera en la población del río Águeda. Sin embargo, en buena parte de los loci polimórficos se detectaron distintas dosis génicas por variación en la proporción de alelos que componen su genotipo heterocigoto, por lo que parece confirmarse que los individuos poliploides no surgieron como consecuencia de un mecanismo de duplicación génica.

Finalmente, en la Tabla 30 se ha querido resumir los resultados obtenidos para las especies analizadas como candidatas junto con los genotipos de los individuos híbridos de las poblaciones del Águeda y del Estena.

Tabla 30. Patrones de expresión genética en *T. alburnoides* y el resto de las posibles especies parentales. (*L. c.*) *Leuciscus carolitertii*, (*Ch. p. d.*) *Chondrostoma polylepis duriensis*, (*R. l.*) *Rutilus lemmingii*, (*T. a.*) *Tropidophoxinellus alburnoides*, (*L. p.*) *Leuciscus pyrenaicus*, (*A. h.*) *Anaocypris hispanica*, (*I. p.*) *Iberocypris palaciosi*, (*Ch. p. w.*) *Chondrostoma polylepis willkommii*. En mayúsculas se señalan los alelos diagnósticos con respecto al complejo.

| Cuenca | Duero | | | | | | Guadiana | | | | Guadalquivir | | | | | |
|---|---|-----------------------|------------------------|-----------|--------------|------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------|--------------|--------------|--------------|------------------|--------------|--------------|------------------|
| | Genotipos de <i>T. alburnoides</i> híbridos | | | Alelos en | | | Genotipos de <i>T. alb.</i> híbridos | | Alelos en | | Alelos en | | | | | |
| | Locus | 2n | 3n | 4n | <i>L. c.</i> | <i>Ch. p. d.</i> | <i>R. l.</i> | 2n | 3n | <i>T. a.</i> | <i>L. p.</i> | <i>R. l.</i> | <i>A. h.</i> | <i>I. p.</i> | <i>R. l.</i> | <i>Ch. p. w.</i> |
| 1. Loci monomórficos en el complejo: | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>CK*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B | aa | aaa | a | a | B | a | a,B | Bb | a | |
| <i>GLO1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | aa | aaa | a | a | a,B | a | a,B | a | a | |
| <i>IDHP-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | aa | aaa | a | a | a | a | a,B | a | a | |
| <i>LDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B | aa | aaa | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>LDH-2*</i> | aa | aaa | aaaa | a | B,C | B | aa | aaa | a | a | B | a | A/B ² | a | B | |
| <i>sMDH-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | aa | aaa | a | a | a | C | a | B | a | |
| <i>ME-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | aa | aaa | a | a | B,C | a | a | D | a | |
| <i>PEPB*</i> | aa | aaa | aaaa | a | F | F | aa | aaa | a | a | D | B,E | a | a,D | C | |
| <i>SOD*</i> | aa | aaa | aaaa | a | D | E | aa | aaa | a | a | E | B | C | E | C | |
| 2. Loci polimórficos: | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>mAAT-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | ab | aaa | a | a | a | a | a,b | a | a | |
| <i>AK*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a | B | a | aa | aaa* | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>CAH-1*</i> | aa,ad | aaa | aaaa | a | a | B(nulo) | aa,ac | aaa,aac,aae | a,e | a,c | e | a | a,e | e | e | |
| <i>CAH-2*</i> | aa,ac | aaa | aaaa | a,c | a | a | aa | aaa | a,D | a | a,D | a,D,E | a | a,B | B | |
| <i>EST*</i> | aa,ab | aaa | aaaa | a | C | a | aa | aaa,ddd,(ad) ¹ | a,d | a,b,d | a,d | a,d | a,d | d | d | |
| <i>FH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a,b | a | aa | aaa,aab | a | a | a | a | a | a | a | |
| <i>GAPDH*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | a | aa | aaa,aac | a | a,c | a,c,D | a | a,c | a,B,c | a,c | |
| <i>GPI-1*</i> | aa | aaa | aaaa | a | a | B,D | aa | aaa,aac | a | a | B,D | a,c | a,c | B,D | a | |
| <i>GPI-2*</i> | aa,ab,ac | aaa,aaac | aaaa | a | a,c | a | aa | aaa,aab,abb | a,b | a | a | a,b | a,c | a | a,c | |
| <i>IDHP-2*</i> | aa,ac | aaa,aac | aaaa | a | D | B | aa | aaa,aae | a,e | a | a | a,c | a,e | a | a | |
| <i>IDHP-3*</i> | aa | aaa | aaaa | a | D | B | aa | aaa,aae | a,e | a | a | C | a,e | a | a | |
| <i>sMDH-2*</i> | aa,ab | aaa,aab,abb | aaaa | a | a,b | b | ab | aab,abb | b | a | a | a,b | a,b | a | a | |
| <i>ME-2*</i> | aa,ab | aaa,(ab) ¹ | aaaa,(ab) ¹ | a,b | a,b | a | aa,ab | abb,bbb | a,b | a,b | a,b | a,b | a,b | a,b | a | |
| <i>MPI*</i> | aa | aaa,aad | aaaa | a,d | a,C | a | aa | aaa,aad | a | a,d | B,C | a,d | a,d | a,C | a | |
| 3. Loci con heterocigosidad fijada: | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>sAAT-1*</i> | ab | (ab) ¹ | abbb | a | b | b | ab | (ab) ¹ | b | a | a,b | b | a,b | b | b | |
| <i>PGDH*</i> | ac,ad | aac,acc,acd | accc,aadd | a | c | c | ac | aac,acc | c | a | c,d | B | c | c | c | |
| <i>PGM*</i> | ac | aac,acc | accc | a | a,c | c | ac | aac,acc | c | a,c | c,D | a,c | a,B | c,D | B | |

(1) La resolución de los zimogramas no permitió determinar la dosis génica. (2) Todos los individuos fueron heterocigotos para este locus.

3.- *Modos de reproducción*

En principio se consideraron los tres modos de reproducción unisexuales encontrados en los vertebrados (partenogénesis, ginogénesis e hibridogénesis) como los posibles en el complejo *T. alburnoides*.

La partenogénesis y la ginogénesis son modos de reproducción estrictamente clonales en los que se replican fielmente el genotipo materno (diploide o triploide). Sin embargo, las hembras ginogenéticas necesitan esperma de machos de una especie "hospedadora" de reproducción sexual para activar la embriogénesis de sus huevos que no han sufrido reducción en el número cromosómico. La electroforesis de proteínas no supondría una herramienta útil para distinguir entre estos dos modos de reproducción y, además, la variabilidad genética entre distintas poblaciones resultaría muy baja debido a que la única fuente de variabilidad sería la aportada por las mutaciones. Sin una parte experimental de laboratorio en la que se analice a fondo los mecanismos citogenéticos no podríamos discriminar entre estos dos modos de reproducción clonal.

En contraste, la hibridogénesis es un modo de reproducción hemiclonal mediante el cual las hembras híbridas segregan exclusivamente genoma materno a sus ovocitos funcionales (Cimino, 1972; Schultz, 1969). Por ejemplo, si caracterizamos el genotipo de un híbrido como *AB*, en el caso de que utilizase la hibridogénesis como modo de reproducción, éste producirá huevos haploides conteniendo sólo el genoma materno tipo *A* y el genoma paterno del tipo *B* será eliminado. El genoma de tipo *B* posteriormente será reemplazado en cada generación tras el cruce con machos de la especie *B* restituyéndose la condición híbrida en la descendencia. Si la pérdida del genoma de tipo *B* ocurre con anterioridad a la ovogénesis, las proteínas codificadas por el material genético de

tipo *B* no se expresará en los huevos de una hembra hibridogénica, y por tanto no los apreciaríamos en los zimogramas de la electroforesis. Sin embargo, si el genoma de tipo *B* se pierde durante meiosis-I, los productos genéticos tipo *B* sí pueden expresarse y mediante electroforesis no seríamos capaces de detectar la hibridogénesis.

En los huevos de hembras hibridogénicas de la rana Europea, *Rana esculenta*, se expresan sólo aloenzimas maternas como consecuencia de una exclusión premeiótica del genoma paterno (Graf & Polls-Pelaz, 1989). La exclusión premeiótica también ocurre en peces hibridogénicos del género *Poeciliopsis* (Cimino, 1972). Por el contrario, en la reproducción clonal partenogénica y ginogénica se obtiene la expresión diploide de los dos alelos parentales.

Para verificar estas predicciones se analizaron los patrones aloenzimáticos de los ovocitos primarios maduros de 63 hembras híbridas del complejo *T. alburnoides* de río Águeda. De los tres loci con heterocigosidad fijada en las células somáticas el locus *sAAT-1** no se expresó en los ovocitos por lo que no se pudo utilizar para comprobar sobre el modo de reproducción empleado.

Sin embargo, para los loci *PGDH** y *PGM** sólo se encontró uno de los dos alelos que aparecían fijados en heterocigosis y siempre el mismo. Además, en cada caso, se comprobó que los alelos diagnósticos correspondientes a *L. carolitertii* fueron los que no se expresaron en los ovocitos de los híbridos y por tanto su genoma debe ser el que se excluye en la ovogénesis antes de la meiosis-I.

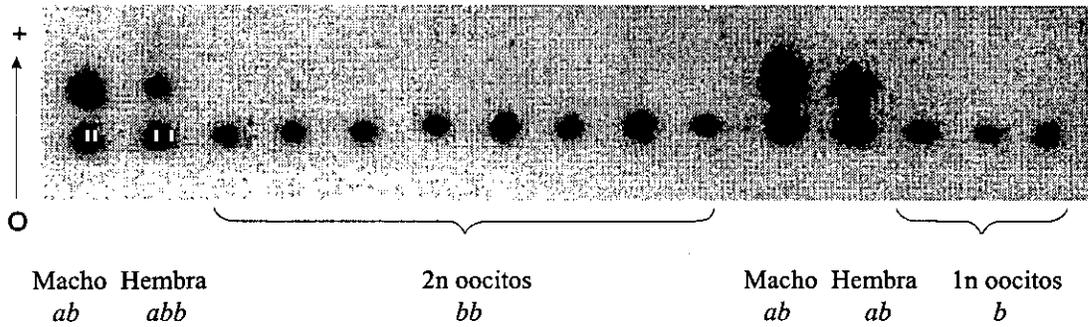


Fig. 9. Patrón de dosis génica para ovocitos primarios de hembras híbridas.

Estos resultados indican sin duda que los híbridos del complejo *T. alburnoides* utilizan la hibridogénesis como modo de reproducción para mantener sus poblaciones y que las especies del género *Leuciscus* son las que están funcionando como donadoras de esperma para fertilizar los huevos de las hembras híbridas. Este punto viene además, reforzado por el hecho de que se ha detectado una variabilidad genética considerable entre las poblaciones de *T. alburnoides* híbridos analizadas que sólo pueden ser debidas al aporte de un material genético recombinante como es el proporcionado por las especies del género *Leuciscus*.

4.- *Análisis del citocromo b del ADN mitocondrial*

4.1.- *Análisis de los haplotipos*

Dado que tiene una herencia citoplasmática, el ADN mitocondrial puede usarse para identificar el ancestro materno de los linajes híbridos que no sufren recombinación.

En las poblaciones de *R. lemmingii* y *A. hispanica* el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen del citocromo *b* dio como resultado la existencia de patrones de corte para la mayoría de las 19 enzimas de restricción que hemos utilizado en el presente estudio, muy divergentes con respecto a los hallados en el resto de los taxones considerados (Tabla 5). Un análisis preliminar de la secuencia de este gen confirma el alto grado de diferenciación de estas dos especies con respecto a las demás, por lo que tratar de estimar la divergencia de la secuencia a partir de los fragmentos de restricción es innecesaria.

Por este motivo, y dado que los patrones de corte encontrados en estas especies difieren mucho de los encontrados en los híbridos de *T. alburnoides*, se descartó definitivamente a ambas como posibles especies maternas en la hibridación y no se incluyeron tanto en el análisis de haplotipos como en análisis filogenéticos posteriores.

Para el resto de los taxones analizados, se encontró polimorfismo en 10 de las 19 enzimas de restricción estudiadas (Tabla 31), produciendo distintos patrones de corte sobre el fragmento amplificado del citocromo *b*. Las 9 enzimas restantes (*AvaI*, *BclII*, *BglIII*, *HindIII*, *MluI*, *NdeI*, *PvuII*, *SacI* y *SacII*) resultaron ser monomórficas.

Los patrones de digestión producidos por estas diez enzimas permitieron distinguir claramente seis haplotipos distintos (Tabla 31).

Tabla 31. Fragmentos de restricción diagnósticos entre las especies consideradas como posibles parentales y los miembros del complejo *T. alburnoides*. Los fragmentos de restricción se expresan como caracteres binarios (0 = ausencia, 1 = presencia).

| | <i>Ava</i> II | <i>Bam</i> HI | <i>Bst</i> EII | <i>Bst</i> NI | <i>Eco</i> RI | <i>Eco</i> RV | <i>Mse</i> I | <i>Nco</i> I | <i>Nhe</i> I | <i>Taq</i> I |
|------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Haplotipo | abcde | fgh | ijk | lmnopkrs | tuv | wxyzA | BCDEFG | HIJ | KLM | NOPQRS |
| I | 01001 | 110 | 001 | 00010010 | 001 | 00001 | 011100 | 110 | 001 | 011010 |
| II | 01001 | 110 | 001 | 10111000 | 001 | 00001 | 011100 | 001 | 001 | 011010 |
| III | 11010 | 110 | 001 | 10111000 | 001 | 00001 | 011100 | 001 | 001 | 011010 |
| IV | 11010 | 001 | 001 | 10010100 | 110 | 00001 | 110010 | 110 | 110 | 101001 |
| V | 00110 | 001 | 110 | 01000001 | 110 | 10010 | 000001 | 001 | 001 | 000101 |
| VI | 00110 | 001 | 110 | 01000001 | 110 | 11100 | 000001 | 001 | 001 | 000101 |

El haplotipo I (hap-I) está presente exclusivamente en los individuos diploides, triploides y tetraploides del complejo *T. alburnoides* del río Águeda no presentándose en ninguna otra especie de las consideradas en este estudio.

Los haplotipos II y III (hap-II y -III) aparecieron en la población del complejo *T. alburnoides* del río Estena. El grupo de *T. alburnoides* no híbridos presentó únicamente el haplotipo II, mientras que entre los individuos híbridos se encontraron los dos haplotipos. Ambos haplotipos están muy emparentados entre sí diferenciándose exclusivamente en el patrón de corte producido por *Ava*II. Por el contrario, estos haplotipos acumularon más diferencias con respecto al haplotipo I, pudiendo discriminarse claramente en los patrones de restricción de las enzimas *Ava*II, *Bs*NI y *Nco*I. En la población de *L. pyrenaicus* del río Estena también se encontró el haplotipo II. Un ejemplo de patrón de corte se puede ver en la Figura 10.

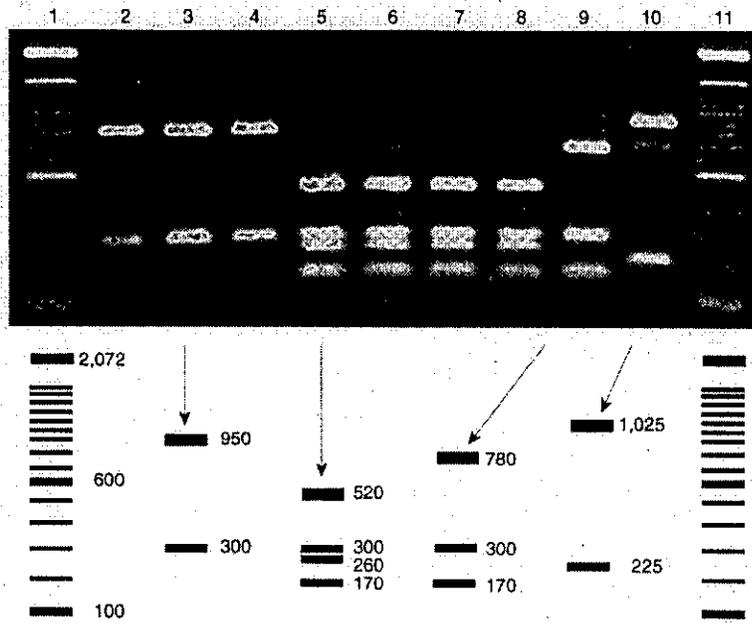


Fig. 10. Patrón de corte para la enzima *BstNI*.

Las poblaciones de *L. carolitertii* y *Ch. polylepis* del río Águeda presentaron haplotipos distintos a los encontrados para el complejo *T. alburnoides* de este río. *Leuciscus carolitertii* presentó el haplotipo IV (hap-IV), que difiere del haplotipo I de *T. alburnoides* por los patrones de restricción de siete enzimas. Estas son *AvaiI*, *BamHI*, *BstNI*, *EcoRI*, *MseI*, *NheI* y *TaqI*.

Del mismo modo, *Ch. polylepis duriensis* resultó ser polimórfica presentando dos haplotipos muy próximos (hap-V y hap-VI) que difirieron entre sí sólo en los patrones de corte de la enzima *EcoRV*. Sin embargo, estos dos haplotipos divergieron considerablemente del haplotipo I presentado por el complejo *T. alburnoides*, encontrándose en ambos casos patrones de corte diferentes en nueve de las diez enzimas polimórficas (Tabla 31).

4.2.- Divergencias nucleotídicas

El porcentaje de divergencia en la secuencia del Citocromo *b* entre estos haplotipos (Tabla 32) se estimó calculando la proporción de fragmentos de restricción que comparten dos haplotipos para una secuencia determinada siguiendo el método de Nei & Li (1979).

Tabla 32. Porcentaje en la secuencia de divergencia ($d \times 100$) entre los haplotipos obtenidos para el Citocromo *b* en el complejo *T. alburnoides*.

| Haplotipos | I | II | III | IV | V |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| II | 0,953 | – | | | |
| III | 1,449 | 0,503 | – | | |
| IV | 3,292 | 3,682 | 3,145 | – | |
| V | 7,454 | 7,334 | 5,664 | 4,314 | – |
| VI | 7,491 | 7,357 | 5,718 | 4,387 | 0,345 |

En primer lugar habría que destacar que la divergencia encontrada en la secuencia entre las poblaciones del complejo *T. alburnoides* de los ríos Águeda y Estena fue baja, comprendiendo entre 0,953 y 1,449%.

Paradójicamente, los valores observados de divergencia de la secuencia resultaron ser relativamente más bajos entre las poblaciones de *T. alburnoides* y de *L. pyrenaicus* (0,503-0,953%) que entre las dos poblaciones de *T. alburnoides*. Por el contrario, *L. carolitertii* presentó valores de divergencia mayores con respecto a *T. alburnoides* encontrándose que éstos variaron entre 3,145% y 3,682%.

Los haplotipos de *Ch. polylepis* resultaron ser aún más divergentes (5,664-7,491%) con respecto a los encontrados para las poblaciones de *T. alburnoides*.

Estos resultados indican que de *Ch. polylepis* pertenece a un grupo más distante con respecto a *T. alburnoides* que las especies del género *Leuciscus* por lo que está de acuerdo con el tratamiento dado por Howes (1991) para esta

especie situándola dentro del linaje “Abramin” mientras que *T. alburnoides* y *Leuciscus* pertenecen al grupo “*Leuciscus*”.

4.3.- Análisis filogenético basado en ADN mitocondrial

Para establecer las relaciones filogenéticas y evolutivas existentes entre los cinco haplotipos obtenidos para el citocromo *b* se utilizaron las matrices de distancias nucleotídicas y de estados del carácter construidas a partir de los patrones de corte producidos por las enzimas de restricción.

Basándonos en la taxonomía y en los criterios moleculares mencionados antes, se eligió *Ch. polylepis* como grupo externo para realizar un análisis filogenético con los cinco haplotipos.

A partir de la matriz de distancias nucleotídicas se construyó un dendrograma para los haplotipos (Figura 11) que resultó tener la misma topología que el obtenido cuando se aplicó el método de máxima parsimonia sobre la matriz de estados del carácter.

Todos los individuos diploides, triploides y tetraploides del complejo *T. alburnoides* aparecieron agrupados junto a *L. pyrenaicus* presentando esta agrupación una consistencia elevada (con un valor de bootstrap del 99% en el análisis de parsimonia), mientras que *L. carolitertii* resultó ser el grupo basal a pesar de haberse constatado su condición de especie parental de los híbridos del río Águeda.

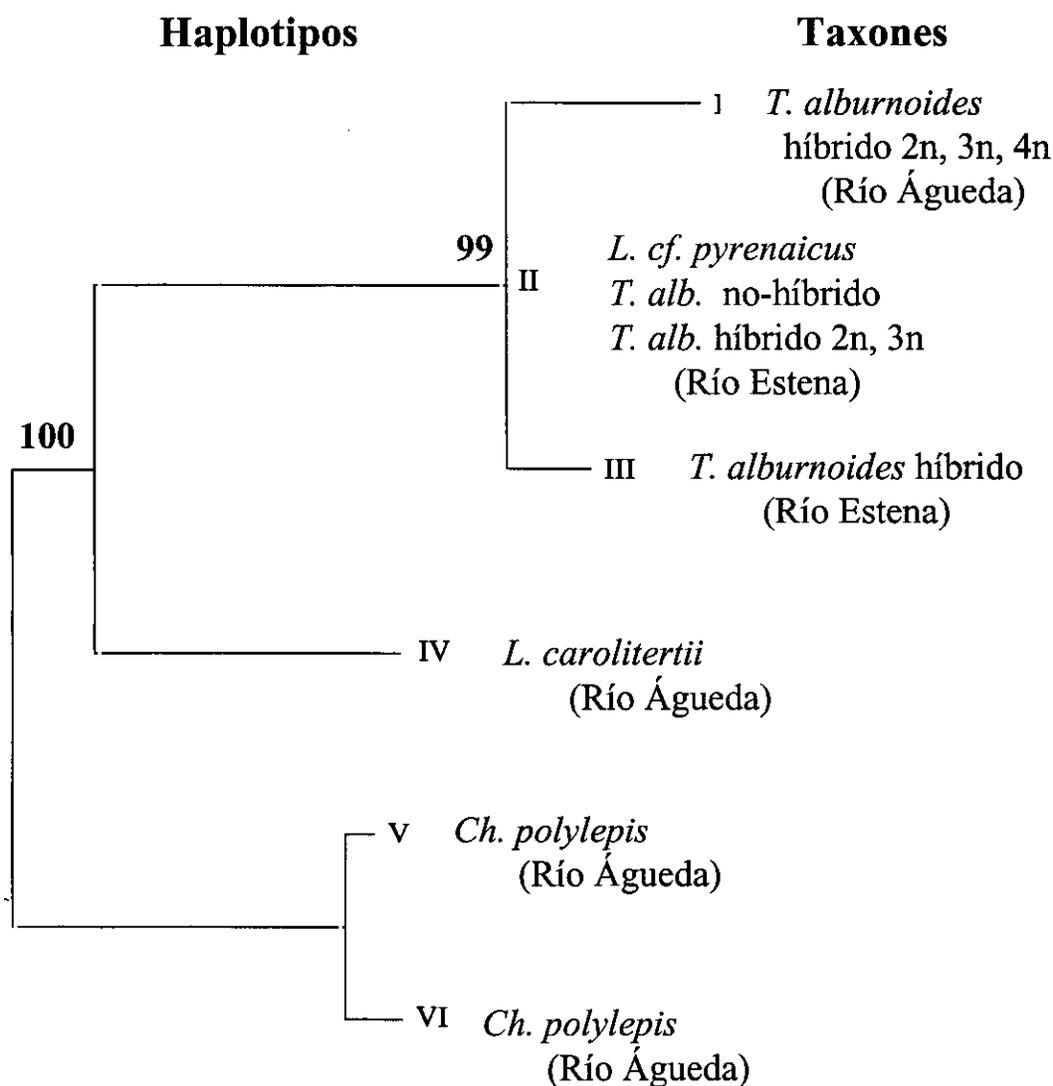


Fig. 11. Relaciones filogenéticas del complejo *T. alburnoides* usando ADN mitocondrial.

Las poblaciones de *L. carolitertii* del río Águeda y de *L. pyrenaicus* del río Estena se distinguieron perfectamente para el ADN mitocondrial ya que presentaron haplotipos distintos para el citocromo *b* (hap-IV y hap-II, respectivamente), pero el análisis filogenético indica claramente que el genoma de la especie materna debe ser más próximo al presentado por *L. pyrenaicus* que al que se encuentra en *L. carolitertii*.

DISCUSIÓN

1.- Estructura poblacional

1.1.-Sexos

El análisis de la proporción de sexos entre las distintas poblaciones estudiadas del complejo *T. alburnoides* puso de manifiesto que prácticamente en todas ellas el sex ratio está notablemente desplazado hacia las hembras. Esto es una característica típica de una población de organismos unisexuales, donde las hembras siempre superan en número a los machos (Dawley 1989). Sin embargo, en el complejo *T. alburnoides*, si consideramos todas las poblaciones conjuntamente, se encuentra una presencia notable de machos, que se estimó en términos globales en el 13,8%. Este valor es algo más alto que en otros organismos unisexuales, aunque los machos son frecuentes en la rana hibridogénica *Rana esculenta* (Graf & Polls-Pelaz, 1989).

Sin embargo, el porcentaje de machos varió de una forma muy acusada entre las distintas poblaciones. Los valores más bajos se dieron en las poblaciones del río Tiétar, donde no se encontró ninguno, y del río Alburrel, donde aparecieron con una frecuencia del 6,3%, ambas pertenecientes a la cuenca del Tajo. Por el contrario, en la población del río Gévora se encontraron los valores más altos apareciendo los machos en este río con una frecuencia del 30,4%.

Debido a que los tamaños muestrales de cada población pueden producir un sesgo en las estimas de la proporción de sexos, éste puede verse corregido cuando los datos se tratan globalmente. Por tanto, consideramos que los valores de proporción de machos cercanos al 14% pueden ser los más próximos a la realidad. Además de estas consideraciones, debemos admitir que existen ciertas variaciones intrapoblacionales en la proporción de sexos, dependiendo por ejemplo, de la presencia o no de individuos no híbridos con reproducción sexual.

Como ejemplo de lo expuesto anteriormente se pueden señalar los datos obtenidos en la población del río Águeda donde la proporción de sexos pasó del 9,1% al 18% al incrementar a 233 individuos el tamaño muestral analizado.

El porcentaje de *T. alburnoides* machos en el río Águeda (18%) resultó ser muy superior al valor obtenido por otros autores para este mismo río, habiéndose encontrado previamente valores del 3,2% (Peris *et al.* 1994). Otros valores estimados de la proporción de machos sobre distintas poblaciones de la cuenca del Duero (Collares-Perira, 1983) también resultaron ser muy bajos (5,3%).

El bajo número de ejemplares machos encontrado en otros trabajos contrasta con la proporción encontrada en el presente estudio, pudiendo deberse a un efecto del muestreo. Esto puede ocurrir por el uso de redes con unas luces de malla grande o por llamar más la atención del colector en el caso de pesca eléctrica los ejemplares de mayor tamaño. Al seleccionar los individuos más grandes, que corresponderían a las hembras (Collares-Pereira, 1883, 1984; Fernández-Delgado & Herrera, 1994), se pudo haber producido un sesgo importante en la población hacia éstas.

Por el contrario, en el sur de la Península Ibérica los análisis efectuados sobre una población del río Mascatomiza (cuenca del Guadalquivir) dieron como resultado una proporción de machos del 12% (Herrera, 1991; Fernández-Delgado & Herrera, 1994) siendo ésta similar a la encontrada por nosotros en la población del río Rumberal, también de la cuenca del Guadalquivir. Un 12% de machos también apareció en la población del río Estena de la cuenca del Guadiana.

No se dispone de otras referencias con las que comparar las proporciones de sexos para nuestros datos sobre las poblaciones de las cuencas del Tajo y Guadiana. Los grupos de machos y hembras estudiados por Collares-Pereira (1984) no parecen ser muestras al azar de las poblaciones ya que el trabajo pretende estudiar su morfología y dimorfismo sexual para lo cual se necesita un número similar de machos y de hembras.

1.2.- Ploidía

En cuanto a la ploidía, destaca el hecho de la aparición de individuos triploides en todas las poblaciones estudiadas. Este dato indica que el fenómeno de la hibridación no tiene un carácter local o regional y se extiende por todo el rango de distribución del complejo (Duero, Tajo, Guadiana y Guadalquivir). La extensión de la poliploidía también ha sido contrastada sobre 46 poblaciones del complejo *T. alburnoides* en localidades portuguesas de las cuencas del Duero, Tajo, Sado y Guadiana (Collares-Pereira, 1983) y en la cuenca del Guadalquivir (Lobillo *et al.* 1989).

El análisis de la ploidía en diferentes poblaciones también recogió una variación importante en la proporción de individuos diploides y triploides. A excepción del río Tiétar, las otras poblaciones de la cuenca del Tajo presentaron una proporción mayor de individuos diploides que de triploides, mientras que en el Duero, Guadiana y Guadalquivir la tendencia fue a la inversa. La proporción de triploides varió entre un máximo encontrado en la población del río Águeda (77,8%) y un mínimo encontrado en el río Alburrel (12,5%).

Si tenemos en cuenta todas las poblaciones, los datos globales indican un cierto equilibrio entre el total de individuos diploides y triploides (45,9% frente al 54,1%, respectivamente), aunque estas proporciones no tienen mayor significado que el hecho mismo de constatar la presencia de individuos poliploides y por tanto de hibridación.

Si comparamos nuestros resultados globales con los obtenidos por otros autores encontramos diferencias en las proporciones, encontrándose en nuestro caso un número menor de ejemplares triploides. En estudios previos sobre distintas poblaciones del Duero, Tajo, Sado y Guadiana se encontraron proporciones del 31,3% para los individuos diploides y del 68,7% para los triploides (Collares-Pereira, 1983, 1985). Por otro lado, los resultados obtenidos para una población del complejo *T. alburnoides* en el Guadalquivir fueron del

20% para los individuos diploides y del 80% para los triploides (Lobillo *et al.*, 1989).

En aquellas poblaciones en las que la proporción de individuos diploides resultó ser mayor, cabría esperar la existencia de una proporción de individuos no híbridos bisexuales y por tanto diploides. Sin embargo, los resultados obtenidos en la población del río Águeda nos obliga a manejar con cuidado suposiciones de este tipo ya que en esta población todos los individuos diploides (entre los que se encontraban bastantes machos) resultaron ser híbridos al tener fijados en heterocigosis ciertos loci.

Los individuos machos resultaron ser predominantemente diploides pero su presencia no debe ser considerada, a tenor de los resultados, como indicativa de la existencia de individuos con reproducción sexual.

La existencia de individuos machos ha sido explicada en otras especies por la incorporación en los ovocitos reducidos de las hembras híbridas de esperma de la especie paterna que transporte genes determinantes del sexo masculino (Goddard *et al.*, 1989) En el complejo *T. alburnoides* no se conoce el sistema por el que se rige la determinación del sexo, aunque los resultados sugieren que el nivel de ploidía debe de jugar un papel importante. En el Tajo las hembras resultaron ser tanto diploides como triploides, aunque varió según las poblaciones.

Con respecto a las hembras, se encontró que éstas fueron casi siempre triploides en las cuencas del Duero, Guadiana y Guadalquivir, aunque también se encontraron algunas diploides. Para la cuenca del Duero nuestros datos fueron similares a los obtenidos por Collares-Pereira (1983), encontrándose que el 87% de las analizadas resultaron ser diploides.

La proporción de juveniles analizados fue considerable suponiendo el 19,7% del total de los individuos estudiados por lo que tenemos una cierta

garantía de que no se favorecieron las hembras obteniéndose individuos de todas las clases de edad. La determinación del sexo en estos individuos resultó ser muy difícil ya que los ejemplares de *T. alburnoides* maduran sexualmente en su segundo año de vida (1+) (Fernández-Delgado & Herrera, 1994; Peris *et al.*, 1994). Por tanto, los juveniles recolectados, casi todos ellos en los meses de noviembre y diciembre, debían ser de la clase de edad 0+.

La mayoría de los juveniles resultaron ser diploides, por lo que no habría que descartar que varios de estos ejemplares fuesen machos en los que debido al menor tamaño de la gónada y la fase de quiescencia en la que se encuentra ésta entre los meses de julio y febrero, se dificultase su identificación.

Si la extensión de la triploidía entre las distintas poblaciones estudiadas constituye un resultado de importancia dentro de los ciprínidos por las implicaciones evolutivas que ello conlleva, no menos importante ha sido constatar la existencia de individuos tetraploides dentro del complejo *T. alburnoides*.

El fenómeno de la tetraploidía no es muy común en el complejo y sólo se han detectado cinco individuos en el río Águeda. No han aparecido en ninguna otra de las poblaciones analizadas, ni siquiera en la del río Estena, por lo que pueden considerarse muy raros si los comparamos con los diploides y triploides.

Aunque la tetraploidía ya había sido sugerida por Collares-Pereira (1995) como probable, ésta ha sido la primera ocasión en la que se ha constatado la presencia de individuos con una dotación cromosómica de $4n$ en el complejo *T. alburnoides* mediante el conteo de cromosomas y el análisis del contenido de ADN.

Los individuos tetraploides de *T. alburnoides* pueden haber surgido a partir de individuos triploides intermedios en los que se producirían ovocitos triploides al no sufrir éstos una reducción durante la meiosis. Sin embargo, la

tetraploidía no parece que sea un fenómeno común entre los organismos unisexuales en los que abundan más los casos de triploidía. Entre los peces, se ha descrito la presencia de tetraploidía fundamentalmente en las familias *Salmonidae*, *Catostomidae* y *Cyprinidae*, siendo característico dentro de esta última familia en las especies europeas *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* y *Aulopyge hugeli* (Berberovic *et al.*, 1973; Hafez *et al.*, 1978; Raicu *et al.*, 1981) y muy generalizado en el género *Barbus* (ver Collares-Pereira, 1989; Machordom, 1992).

También se han descrito formas tetraploides dentro de la especie ibérica *Iberocypris palaciosi* (Álvarez *et al.*, 1986). Dentro de los organismos unisexuales sólo se han descrito formas tetraploides en el género *Cobitis* (Vasil'ev & Vasil'eva, 1982; Vasil'ev *et al.*, 1989) y en anfibios son comunes las formas híbridas tetraploides en el género *Ambystoma* (Bogart & Licht, 1986; Lowcock *et al.*, 1987).

1.2.1.- Contenido de ADN

La citometría de flujo se ha revelado en el presente estudio como una herramienta muy útil para la determinación de la ploidía. Con ella se obtienen resultados muy satisfactorios y fiables, evitando el tedioso protocolo del cariotipado y la búsqueda en el microscopio de un número apropiado de placas metafásicas. Presenta también la ventaja de que puede utilizarse sobre tejidos de individuos congelados pudiéndose procesar el material ya recolectado y sobre el que no se había efectuado el cariotipo.

Los contenidos de ADN encontrados para diploides, triploides y tetraploides permitieron discriminar fácilmente entre ellos. Potencialmente, se podrá utilizar esta técnica para conocer la ploidía de los individuos sin tener que

sacrificarlos con lo que se podrán abordar estudios reproductivos y ecológicos en cautividad.

El contenido de ADN también ha sido utilizado para determinar la existencia de individuos mosaico, es decir, aquellos que presentan células somáticas con contenidos diploides y triploides de material genómico (Dawley & Goddard, 1988a; Goddard *et al.*, 1989). En nuestro caso no han aparecido individuos mosaico entre los estudiados.

Debido a la especificidad de los valores del contenido de ADN, se ha podido utilizar éste como un carácter marcador entre especies. De esta forma se puede identificar con relativa facilidad el contenido de ADN en los híbridos y determinar las especies supuestamente parentales, ya que los híbridos deben presentar un contenido de ADN intermedio al que presentan las especies parentales (Dawley & Goddard, 1988a). Sin embargo, las especies de ciprínidos que se han considerado como posibles parentales presentaron valores de ADN cercanos entre sí y a los encontrados en los ejemplares híbridos diploides por lo que no se pudo usar con esta finalidad en el presente estudio.

El contenido de ADN encontrado en *Leuciscus sp.* de la población del río Estena, que ha sido analizado como posible parental, mostró valores del mismo orden de magnitud que los de los individuos híbridos triploides, por lo que probablemente se trate también de individuos triploides. Si asumimos que los ciprinidos ibéricos presentan normalmente un número cromosómico de $2n=50$ cabría encontrar valores del contenido de ADN entre 2,7 pg y 3 pg como los encontrados para los individuos diploides del complejo, para *Leuciscus carolitertii* o para *Ch. poplylepis*. Sin embargo, *Leuciscus sp.* mostró valores muy semejantes a los de *T. alburnoides* triploides.

2.- El origen híbrido de *T. alburnoides*

Uno de nuestros objetivos ha sido el tratar de determinar si las formas diploides y poliploides del complejo *T. alburnoides* constituyen un nuevo caso dentro de los vertebrados unisexuales.

La presencia en las poblaciones naturales de individuos triploides y un sex ratio muy desplazado hacia las hembras hizo pensar a varios autores en la existencia de hibridación entre miembros del complejo *T. alburnoides* y alguna otra especie próxima (Collares-Pereira, 1989; Herrera, 1991; Peris *et al.*, 1994; Velasco, 1994; Fernández-Delgado & Herrera, 1994). Incluso, estos autores han admitido como probable un modo de reproducción basado en la ginogénesis, según la cual las hembras híbridas sólo necesitarían ser estimuladas por esperma de una especie próxima parental. Sin embargo, hasta ahora no se habían abordado estudios moleculares que corroborasen o desmintiesen esta hipótesis.

Los datos genéticos han puesto de manifiesto la naturaleza híbrida de la mayoría de los individuos diploides y de todos los individuos poliploides de los ríos Águeda y Estena.

Los análisis aloenzimáticos llevados a cabo sobre la población del río Águeda revelaron que tanto los *T. alburnoides* diploides como los poliploides de esta población son híbridos constituidos como consecuencia de la combinación de dos genomas distintos procedentes de dos especies con reproducción sexual.

La heterocigosis encontrada para los organismos diploides ($H_o=0,150 \pm 0,063$) excedió de forma clara a la esperada según el equilibrio de Hardy-Weinberg y esto se produjo como consecuencia de la heterocigosis fijada para tres loci (*sAAT-1**, *PGDH** y *PGM**) en todos los individuos de la población del río Águeda.

En una población natural y en equilibrio la proporción de individuos heterocigotos para dos alelos *p* y *q* viene dado por la fórmula de la ley de Hardy-

Weingberg: $p^2 + 2pq + q^2$. Esta proporción alcanza su máximo cuando p y q son igualmente probables y entonces $2pq=50\%$, pero la aplicación de la fórmula indica que irremediablemente encontraríamos una proporción también alta de individuos homocigotos siendo $p^2=q^2=25\%$.

Si nos hallamos en una situación como la encontrada para los individuos del complejo *T. alburnoides* en el río Águeda, en la que todos mostraron un patrón de bandas en heterocigosis en los tres loci mencionados, sólo pueden existir dos explicaciones posibles:

- a) Que los zimogramas no muestran en realidad dos alelos en heterocigosis de un mismo locus sino que en realidad se trata de dos loci monomórficos (bien ligados o independientes).
- b) Que los zimogramas si muestran los alelos de un mismo locus, estando éstos en heterocigosis, por lo que la población no se rige por la ley de Hardy-Weinberg o lo que es lo mismo, no se originaron como consecuencia de una reproducción sexual sino de una hibridación.

La primera explicación fue cuidadosamente valorada, pero dos aspectos del estudio realizado permitieron rechazarla. En primer lugar, ningún otro ciprínido de los analizados aquí presentó en este nivel de migración dos loci, ya fuesen monomórficos o no, para los tres sistemas enzimáticos implicados, encontrándose siempre un único locus.

En segundo lugar los patrones de bandas encontrados en los zimogramas de los ovocitos de las hembras del complejo mostraron sólo una de las dos bandas. Si se hubiese tratado de dos loci, en los ovocitos se habría expresado el producto génico de ambos, independientemente de que los huevos fuesen haploides o no. Sin embargo, al encontrarse en los ovocitos sólo una banda en cada uno de los tres loci, no cabe otra posibilidad más que se trate de dos alelos de un mismo locus (Graf & Polls-Pelaz, 1989).

Un simple cálculo ratifica el que estamos ante un fenómeno de hibridación. Si estimásemos la probabilidad de encontrar un individuo surgido a partir de reproducción sexual y que sea heterocigoto para tres loci ésta sería de $(1/2)^3$, o lo que es igual 0,125. Por tanto, la probabilidad de encontrar 31 individuos machos, como los encontrados en el río Águeda, surgidos a partir de reproducción sexual y heterocigotos para tres loci es decididamente muy pequeña, $(0,125)^{31} = 10^{-28}$ (Vrijenhoek, comunicación personal).

En definitiva, diferentes aproximaciones dan como resultado que la población del complejo *T. alburnoides* del río Águeda se originó como consecuencia de un fenómeno de hibridación. En primer lugar, las proporciones de sexos y ploidías, en segundo lugar la alta heterocigosis encontrada y por último la ausencia de segregaciones mendelianas como consecuencia de la alteración de los mecanismos de reproducción sexual. La hibridación actuaría como el fenómeno causal y conector de todas estas alteraciones observadas (Dawley, 1989; Vrijenhoek, 1994).

Como cabría esperar, el grado de similitud entre el genotipo de las dos especies que hibridaron es muy alto (Dawley, 1989; Moritz *et al.*, 1989). La existencia de tan sólo tres loci fijados en heterocigosis del total de 26 analizados en la población del río Águeda indica que las especies parentales sólo mostraron tres loci diagnósticos entre ellos. A modo de comparación, entre las especies *Poeciliopsis monacha* y *Poeciliopsis lucida*, que forman híbridos hibridogenéticos, existen 5 loci diagnósticos (Vrijenhoek *et al.*, 1978).

A parte de los loci fijados en heterocigosis, los híbridos del río Águeda mostraron polimorfismo en otros nueve loci pudiendo aportarse esta variabilidad por cualquiera de las dos especies parentales. En los catorce restantes no se observó polimorfismo alguno por lo que probablemente serán muy parecidos para las dos especies parentales.

Además del origen híbrido de los individuos del complejo, resulta igualmente llamativo el hecho de que no aparecieran individuos no híbridos dentro de la población del río Águeda. Se ha sospechado el carácter híbrido de las formas poliploides pero no se pensaba lo mismo de las diploides. Collares-Pereira (1985, 1987) propuso distintas hipótesis sobre el origen de formas diploides y triploides pero consideraba que una parte importante de los individuos diploides tenían una reproducción sexual normal constituyendo la verdadera especie *T. alburnoides* (*Rutilus alburnoides*, según su criterio). Estos individuos bisexuales serían, además, quienes hibridasen con alguna especie emparentada para formar los híbridos.

Nuestros resultados para la población del río Águeda no parecían confirmar esta hipótesis ya que todos los individuos analizados con aloenzimas resultaron ser híbridos. Sin embargo, una subpoblación de individuos bisexuales podría existir en muy baja frecuencia, y no haber sido muestreada. También podría darse el caso de que todo el complejo a nivel de la Península Ibérica estuviese constituido por individuos híbridos y *Tropidophoxinellus alburnoides* no sea una buena especie sino un híbrido interespecífico entre dos especies emparentadas. Como se ha visto en la población del río Estena esto no es así, pero esta hipótesis se ha barajado durante la casi totalidad de este estudio.

Para tratar de explicar lo que puede ocurrir en la población del río Águeda, debemos recordar que en los organismos unisexuales se produce una herencia clonal (partenogénesis y ginigénesis) o hemiclonal (hibridogénesis) del material genético de las especies parentales (Vrijenhoek *et al.*, 1977; Dawley, 1989; Goddard & Dawley, 1990; Goddard & Schulz, 1993). Por tanto, independientemente del modo de reproducción empleado, los híbridos del complejo *T. alburnoides* podrían existir sin la presencia de alguna de estas especies parentales a excepción de la especie parental dadora de espermatozoides en el caso de que la reproducción sea hibridogénica (Schultz, 1969).

Partiendo de este hecho, la presencia exclusiva de híbridos en esta población puede ocurrir porque: a) los híbridos se forman en otra cuenca donde existen los dos parentales, colonizando posteriormente los híbridos la cuenca del río Águeda, b) los híbridos habrían desplazado por competencia a alguna de las especies parentales restringiéndolas a zonas muy localizadas o extinguiéndolas de la cuenca.

En ambos casos sería necesario que los híbridos contasen con una adaptabilidad y éxito ecológico mayor que las especies parentales. Este hecho ha sido ampliamente contrastado para otros vertebrados unisexuales como en *Cnemidophorus* o en *Poecilipsis* (Maslin, 1968; Cuellar, 1977; Vrijenhoek, 1979, 1984; Vrijenhoek & Lerman, 1982; Vrijenhoek *et al.*, 1992), en los que se han encontrado poblaciones formadas exclusivamente por híbridos que han conseguido colonizar nuevas áreas de dispersión o han conseguido adaptarse mejor a condiciones variables del ambiente. Ello hace que compitan en superioridad con las especies parentales que terminan siendo desplazadas.

2.1.- Dosis genéticas y poliploides

En los individuos poliploides híbridos resultó de gran utilidad el poder interpretar los patrones de intensidad de bandas en los loci en heterocigosis ya que permitieron la determinación de la dosis genética. El conocer la dosis genética en un locus dado permite determinar las frecuencias alélicas y caracterizar de una forma más precisa las poblaciones de individuos poliploides.

Además, el conocimiento del genotipo completo en las formas poliploides permite determinar la existencia de distintos clones o hemiclones. La variabilidad genética estimada a partir de estos clones nos va a permitir abordar distintos aspectos relacionados con la dinámica de las poblaciones (Vrijenhoek, 1989; Moritz *et al.*, 1989) y la duración y persistencia de las mismas. También, será de

gran utilidad en estudios ecológicos en los que se confronta el éxito ecológico entre distintos clones o se compararan con las especies parentales (Vrijenhoek, 1984, 1990; Weterington *et al.*, 1987).

La diversidad clonal puede aportar información básica sobre el origen de las formas híbridas, indicando si el fenómeno de la hibridación fue puntual o se produjo como consecuencia de múltiples hibridaciones entre las especies parentales (Quattro *et al.*, 1991), y también se puede utilizar para averiguar cuál fue el origen de la poliploidía (Quattro *et al.*, 1992b).

La presencia de las formas poliploides en los organismos unisexuales es un fenómeno bastante extendido. Se ha estimado que alrededor del 65% de las formas estudiadas hasta el momento presentan algún grado de poliploidía, siendo mucho más común entre ellas los organismos triploides (Vrijenhoek *et al.*, 1989).

Las dos hipótesis más probable en cuanto a la formación de los individuos triploides parten de puntos radicalmente distintos. La primera de estas hipótesis, también conocida como del “origen espontáneo”, sugiere que el momento mismo de la poliploidización es anterior a la hibridación. Según esta hipótesis, una hembra perteneciente a un taxón bisexual normal produciría ovocitos diploides y después estos serían fecundados por espermatozoides de otra especie originándose un individuo triploide que también será híbrido (Cuellar, 1974, 1977).

La segunda hipótesis propone un “origen híbrido primario” según el cual la alteración en la meiosis que produciría huevos no reducidos se produce en hembras híbridas. Ahora bien, asumiendo que partimos de un individuo híbrido, la adquisición de la triploidía podría producirse como consecuencia de dos fenómenos distintos:

- a) por la adición de un tercer genoma (Schultz, 1969) procedente de cualquiera de las especies parentales, que se uniría al ovocito en el que no se ha producido meiosis y que por tanto es idéntico a cualquier

célula somática con genotipo híbrido. Las combinaciones posibles serían: $AB+A=AAB$, ó $AB+B=ABB$

- b) por una duplicación genómica durante la meiosis (Cimino, 1972). En este caso, la supresión de la división ecuatorial durante la anafase meiótica traería como consecuencia la no reducción genética del material cromosómico, previamente duplicado en la profase. Este ovocito con dos dotaciones cromosómicas idénticas se fecundaría después por cualquiera de las especies parentales originándose los siguientes casos:

$$AA+A=AAA; AA+B=AAB \text{ ó } BB+A=BBA; BB+B=BBB$$

Según este modelo, se encontrarían individuos triploides homocigotos y, además, la heterocigosis que cabría esperar sería considerablemente baja (Avisé *et al.*, 1992).

No se han detectado individuos triploides homocigotos en la población del río Águeda, siendo altos los niveles de heterocigosis encontrados. En los datos encontrados para las poblaciones del complejo *T. alburnoides* aparecieron genotipos del tipo *AAB* y *ABB* para los loci ya comentados y en el caso de la población del río Águeda se encontraron tres alelos expresándose al mismo tiempo en el locus *PGDH** de algunos individuos. Este hecho por si sólo parece descartar la posibilidad de que se estén produciendo triploides según el modelo de la duplicación genética.

Si nos encontramos ante un caso de hibridogénesis, las hembras híbridas con genotipo *AAB* producirían ovocitos del tipo *AA* que al ser fecundados por esperma del tipo *B* de la especie paterna, originarían un nuevo individuo *AAB*.

Los individuos triploides con genotipo *ABB* probablemente serán los responsables de la aparición de las hembras diploides ya que al descartar el material genético tipo *B* producirían ovocitos haploides *A*. Estos ovocitos se

fecundarían con espermatozoides de la especie parental de tipo *B* originando individuos diploides *AB*. Eventualmente, algunas de estas hembras, por el fenómeno de la adición genómica, volverían a producir triploides del tipo *ABB*. Hay que tener en cuenta que los genotipos del tipo *AAB* son mucho más frecuentes que los del tipo *ABB*, y ésta podría ser la causa.

Otra explicación para la aparición de genotipos del tipo *ABB* requeriría la existencia de machos híbridos con espermatozoides viables, pero esto no parece que ocurra ya que tendríamos que encontrar también genotipos del tipo *AA* y *AAA*.

Estudios realizados por otros autores sobre organismos unisexuales, sobretodo en el género *Poeciliopsis* han confirmado que la producción de los híbridos triploides también debe ser explicado por el modelo de adición genómica (Quattro *et al.*, 1992b).

Por otro lado, la presencia de formas tetraploides en los híbridos parece tener una gran importancia desde el punto de vista evolutivo. Se ha postulado que los individuos tetraploides contribuyen sirviendo como un paso intermedio en la evolución de la duplicación genética y de esta forma conseguir de niveles de ploidía mayores (Schultz, 1969, 1980). De esta forma, la adición de un cuarto genoma en un individuo triploide podría causar un efecto de compensación en la meiosis y originar un individuo en el que se instaurase un mecanismo de reproducción sexual (Astaurov, 1969; Vasil'ev *et al.*, 1989).

Además, la existencia de gran abundancia de material genético facilita que las dotaciones cromosómicas extras sean un campo de experimentación idóneo para ensayar nuevas posibilidades proporcionadas por las mutaciones, por lo que teóricamente proporcionaría una mayor radiación adaptativa (Ohno, 1970). Sin embargo, otros autores no son de esta opinión y piensan que, a medio plazo, la acumulación de mutaciones deletéreas, que no han podido purgarse por la ausencia de recombinación, terminarán por hacer inviables estas formas híbridas (Muller, 1964; Vrijenhoek, 1989; Moritz *et al.*, 1989).

3.- Búsqueda de las especies parentales

3.1.- La especie paterna

De las tres especies de ciprínidos analizadas en la población del río Águeda, dos de ellas, *Ch. polylepis duriensis* y *R. lemmingii*, fueron descartadas con toda fiabilidad como especies implicadas en la hibridación. Las aloenzimas mostraron patrones compatibles para los tres loci *sAAT-1**, *PGDH** y *PGM** que se han encontrado fijados en heterocigosis en los híbridos. Sin embargo los alelos marcadores observados en varios loci (seis en *Ch. polylepis* y nueve en *R. lemmingii*) indican no sólo que no son las especies parentales, sino que están bastante alejadas taxonómicamente con respecto a los teóricos parentales que originaron los híbridos del río Estena.

Por el contrario, el patrón de alelos encontrado en *L. carolitertii* resultó ser perfectamente compatible con el que teóricamente debería presentar una de las especies parentales. Si el genotipo de dos especies que hibridan para constituir un organismo unisexual debe ser lo suficientemente próximo para que no se produzca una ruptura total del mecanismo de la meiosis o no existan incompatibilidades a nivel del desarrollo embrionario (Moritz *et al.*, 1989) parece lógico pensar que las especies implicadas en la hibridación deben ser al menos filogenéticamente cercanas.

Hasta el momento, no se han descrito casos de vertebrados unisexuales formados por el cruce entre especies de dos géneros distintos (Vrijenhoek, 1989b) por lo que si una de las especies implicadas en la hibridación es *L. carolitertii*, parece claro que la otra especie parental debe pertenecer al género *Leuciscus*.

De la literatura referente a los organismos unisexuales se desprende que, ocasionalmente, en algunos géneros surge un taxón que presenta un genoma altamente inestable (quizá debido a un proceso incipiente de especiación) y que puede hibridar con otro u otros taxones del mismo género.

La búsqueda de la otra especie parental en otros ríos diferentes del río Águeda estuvo basada en el hecho de que los híbridos pueden permanecer como poblaciones estables aún en ausencia de una de las especies parentales siempre que el material genético de ésta tenga una herencia clonal o hemiclinal en el híbrido (Vrijenhoek, 1979; Schenck & Vrijenhoek, 1986).

3.1.1.- El género *Leuciscus* de la Península Ibérica

El estudio aloenzimático de un número considerable de poblaciones ibéricas de distintas especies del género *Leuciscus* ha puesto de manifiesto varios hechos importantes: En primer lugar que la variabilidad genética encontrada tanto a nivel intraespecífico como interespecífico para este género es menor a la que en principio cabría esperar. Prácticamente no se encuentran loci diagnósticos que diferencien las poblaciones de *L. carolitertii* y de *L. pyrenaicus* y solamente *FH*b* nos permitió discriminar la única población de *L. cephalus* muestreada. Datos similares han sido encontrados por otros autores en poblaciones portuguesas de *L. carolitertii* y *L. pyrenaicus* (Coelho *et al.*, 1995).

A nivel intraespecífico, el polimorfismo detectado para las poblaciones tanto de *L. carolitertii* como de *L. pyrenaicus* fue bajo, destacando la población del río Boedo donde el polimorfismo encontrado fue del 7%. Sin embargo, estos datos contrastan con los encontrados para otras especies con las que comparte su distribución como es el caso de *Ch. polylepis duriensis* (Coelho, 1992).

En primera instancia, podría deducirse que la diferenciación entre estas especies puede haber sido reciente. Sin embargo, en el análisis poblacional se han encontrado algunas localidades con alelos marcadores que podrían indicar la existencia de una heterogeneidad considerable a nivel intraespecífico que estuviese enmascarando las verdaderas diferencias interespecíficas.

Finalmente, y con respecto a la búsqueda de las especies parentales, se ha de concluir que no ha aparecido entre ninguna de las poblaciones estudiadas individuos que presentasen una combinación alélica complementaria a la de *L. carolitertii* para poder ser considerado como la otra especie parental.

3.1.2.- El género *Leuciscus* en Europa

Como ya se ha indicado, debido a la complejidad taxonómica que presenta este género en Grecia, se realizó un análisis filogenético usando distancias genéticas y caracteres cualitativos para ver cuales son las especies a considerar.

Los resultados del UPGMA (Figura 8) muestran que el género *Leuciscus* en Grecia está compuesto por tres grupos, dos de los cuales se corresponden con especies bien diferenciadas (*L. keadicus* y *L. borysthenicus*) y el tercero, politépico y heterogéneo, compuesto por al menos tres especies diferentes: *L. peloponnensis*, distribuido por el Peloponeso y oeste de Grecia (ríos Alfios, Miras, Evinos, Louros, Arachthos y Thiamis y los lagos Stymphalia y Trichonis), *L. "prespensis"*, restringido al Lago Prespa y *L. cephalus* presente en el norte y este de Grecia.

Las poblaciones antes consideradas como *L. cf. svallize* (Stephanidis, 1971; Tsingenopoulos & Karakousis, 1996) y *L. c. albus* (Economidis, 1991; Economidis & Banarescu, 1991) deben considerarse como pertenecientes a *L. peloponnensis* debido a la ausencia de alelos exclusivos y sus bajas distancias genéticas frente a la población del Peloponeso de *L. peloponnensis* a partir de la cual fue descrita esta especie. Estos resultados confirman, por una parte, las conclusiones de Bianco & Knezevic (1987), quienes consideran a *L. svallize* restringida a la región de Dalmacia, y por otra, apoyan que *L. c. albus* se encuentre sólo en el Lago Trasimeno en Italia (Bianco & Recchia, 1983).

Aunque la designación taxonómica de la población de *Leuciscus* del Lago Prespa es compleja, consideramos que se debe considerar como una especie independiente dada la diferenciación genética que presenta frente a otras poblaciones de *Leuciscus* y por ello se ha incluido en el análisis filogenético. En el árbol obtenido del UPGMA *L. "prespensis"* aparece unida junto a *L. peloponnensis* existiendo una considerable distancia geográfica entre las poblaciones de ambas especies, sin embargo, no aparece junto a *L. cephalus* a pesar de su proximidad geográfica.

Paralelamente, *L. cephalus* en Grecia aparece diferenciada en dos grandes grupos correspondiendo a las subespecies *L. c. vardarensis* y *L. c. macedonicus*, la primera con una distribución en el centro y norte de Grecia y la segunda distribuida por Macedonia.

Los resultados obtenidos mediante distancias genéticas y los basados en datos cualitativos no coincidieron plenamente ya que difieren en la posición en la que sitúan a *L. "prespensis"*. El análisis filogenético basado en datos cualitativos indicó que *L. peloponnensis* y *L. cephalus* son grupos hermanos respecto al resto de las especies de *Leuciscus*. Sin embargo, las distancias genéticas indicaron que la especie más próxima a *L. peloponnensis* es *L. "prespensis"*.

Cabe destacar también que *L. borysthenicus* resultó ser la especie más distante desde el punto de vista filogenético de entre todas las analizadas, sin embargo, el análisis de bootstrap mostró cierta inestabilidad en esta rama del árbol.

La comparación de los alelos presentados por las especies griegas del género *Leuciscus* con los existentes en *L. carolitertii* y con los genotipos del complejo *T. alburnoides* no dió como resultado el encontrar la especie parental. Ello es debido a que no se encontró la combinación de alelos teórica de la otra especie parental y se rechazaron una a una las especies aquí consideradas.

3.1.3.- El género *Tropidophoxinellus*

Se pueden distinguir dos aspectos especialmente relevantes del análisis de aloenzimas efectuado sobre las dos especies del género *Tropidophoxinellus*. En primer lugar hay que dejar claro que ninguna de ellas actuó como especie parental en la hibridación ya que el patrón de alelos encontrado en ambas no es compatible con el teórico buscado.

En segundo lugar, y pese a la semejanza morfológica entre estas dos especies y *T. alburnoides*, hay que remarcar que *T. hellenicus* y *T. spartiaticus* presentaron una diferenciación genética importante con respecto a las poblaciones ibéricas del complejo. Por un lado, se detectó la presencia de varios loci diagnósticos (ocho y cinco loci, respectivamente) entre las especies griegas y la ibérica. Por otro, la posesión de distintos alelos marcadores en estas especies no presentes en el complejo y *vice versa*.

La diferenciación genética a nivel de loci diagnósticos del complejo *T. alburnoides* con respecto a *T. hellenicus* y *T. spartiaticus* resultó ser comparable con la que se da entre aquel y géneros como *Rutilus* y *Chondrostoma* presentes en la Península Ibérica.

El escaso número de individuos no híbridos de *T. alburnoides* de que se disponía no ha aconsejado abordar un análisis de la divergencia genotípica basado en distancias genéticas. Sin embargo, un estudio de este tipo, contando con un número más elevado de individuos, sería imprescindible para estimar la diferenciación entre estas especies. De cualquier forma, todo parece indicar que la inclusión del taxón ibérico en el género *Tropidophoxinellus* no tiene consistencia desde un punto de vista genético.

Paralelamente, la gran divergencia encontrada entre las dos poblaciones estudiadas de *T. hellenicus* y *T. spartiaticus* resulta sorprendente para dos especies de un mismo género. Sin embargo, este análisis debe hacerse extensible

a otras poblaciones de ambas especies para poder confirmar el grado de diferenciación genética.

El poco éxito obtenido sobre las poblaciones griegas de *Leuciscus* y *Tropidophoxinellus* y la diferenciación tan importante con respecto a la población de *L. carolitertii* nos llevó a pensar que seguramente el fenómeno de la hibridación estaría restringido a la Península Ibérica y que debía hacerse un estudio más minucioso de las poblaciones de otros ciprínidos ibéricos y del complejo *T. alburnoides*.

3.1.4.- Otras especies ibéricas

Cuando la búsqueda de las especies parentales se dirigió sobre otros taxones ibéricos pertenecientes a otros géneros los resultados tampoco fueron satisfactorios. Se obtuvieron resultados interesantes para algunos taxones cuando se analizaron los tres loci fijados en heterocigosis para los *T. alburnoides* híbridos. Los alelos complementarios a los de *Leuciscus carolitertii* para estos tres loci se encontraron en varios individuos de las poblaciones del Guadiana y Guadalquivir de *Rutilus lemmingii*, mientras que para otros taxones (*Anaocypris hispanica*, *Iberocypris palaciosi*, *Ch. polylepis willkommii*) se encontraron los alelos complementarios sólo en alguno de estos tres loci. Por el contrario el análisis del resto de los 26 loci conllevó el descarte de todos estos taxones examinados por presentar múltiples alelos diagnósticos (Tabla 23).

Se ha constatado la presencia de formas intermedias atribuibles a híbridos entre *T. alburnoides* y *A. hispanica* en algunos ríos de la cuenca del Guadiana (Doadrio, comunicación personal) y también se ha capturado algún ejemplar en el transcurso de este trabajo con morfología intermedia entre *T. alburnoides* y *Ch. polylepis* en los ríos Almonte y Arrago. Además se ha especulado con la posibilidad de que *I. palaciosi* formase parte de un fenómeno de hibridación entre

Ch. polylepis y *T. alburnoides*. Por todo ello se estimó la posibilidad de que alguna de estas especies pudiese estar implicada en la hibridación como especie parental.

La población de *Leuciscus sp.* fue apartada del análisis ante la sospecha de que se tratase de un nuevo complejo, muy relacionado con el estudiado aquí, que pudiese distorsionar algunos de los resultados obtenidos. Presentan una morfología muy próxima a la de *L. pyrenaicus* y en ellos se detectó únicamente un individuo macho entre 70 ejemplares disecados. Además, se encontró un contenido de ADN similar al de los híbridos triploides y una heterocigosis observada muy superior a la esperada.

Paralelamente, en *I. palaciosi* se ha observado un locus (*LDH-2**) en el que los 11 individuos analizados fueron heterocigotos y se ha descrito la presencia de poliploidía (Alvarez *et al.*, 1986), por lo que se sospechó también su implicación en algún complejo híbrido. Sin embargo, en el presente estudio no se ha podido abordar su ploidía ya que de los 11 individuos estudiados sólo se disponía de parte de sus tejidos que fueron empleados en la electroforesis. Por otro lado, la presencia de niveles de heterocigosis dentro de los esperados por el equilibrio de Hardy-Weinberg y el bajo número de individuos estudiados para el locus *LDH-2** hacen pensar que se puede tratar de una especie sexual normal o que la mayoría de ellos lo sea.

3.2.- *La especie materna*

Tras analizar individuos del complejo procedentes de distintas poblaciones finalmente se identificó la especie materna. En algunos ejemplares en el río Estena apareció el genotipo homocigoto para los loci marcadores compatible con el de *L. pyrenaicus* para hibridar y generar los organismos híbridos. Estos resultados clarificaron definitivamente el proceso de hibridación interespecífica

en la que *L. carolitertii* y *L. pyrenaicus* juegan el papel de especie parental paterna en sus rangos de distribución respectivos, mientras que estos ejemplares verdaderos de *T. alburnoides* desempeñan el papel de la especie parental materna.

Se confirma, por tanto, que existe una fracción dentro de la población del complejo que no tiene un origen híbrido y que previsiblemente se reproduce sexualmente. Los valores observados de heterocigosis confirman este aspecto y el análisis de su ploidía indicó que se tratan de ejemplares diploides. En cuanto al sexo, se han encontrado individuos machos y hembras, pero la mayoría de ellos resultaron ser juveniles.

En lo referente a los biotipos híbridos encontrados en la población del río Estena, destaca la presencia de variabilidad genética respecto a la población del río Águeda. En la población del río Estena se detectó la presencia de nuevos alelos no presentes en la población del Duero y cambios en las frecuencias alélicas en general.

Destaca la presencia de un nuevo locus fijado en heterocigosis en los híbridos de la población del Guadiana presentándose el alelo lento *sMDH*b* que aparece en una frecuencia muy baja en la población del río Águeda. Estas diferencias a nivel genético entre los híbridos de estas dos poblaciones pueden atender en parte a la existencia de dos especies parentales distintas (*L. carolitertii* y *L. pyrenaicus*). Sin embargo, aquellas diferencias proporcionadas por alelos que no se encuentran en las especies del género *Leuciscus* deben ser atribuibles a variaciones interpopulacionales de la especie materna.

Las enormes dificultades encontradas para detectar estos individuos no híbridos hacen suponer que los verdaderos individuos de *T. alburnoides* puedan estar limitados a unas pocas poblaciones en toda la Península como ocurre con la especie materna del complejo *Poeciliopsis monacha-lucida* (Schenck & Vrijenhoek, 1986). En esta especie, las poblaciones que aún persisten de *P. monacha* están situadas en tramos altos de algunos ríos en los que no existe el

biotipo híbrido o su presencia es muy limitada. Algo similar podría estar ocurriendo con las poblaciones de *T. alburnoides* no híbridos.

En el río Estena sólo se pudieron detectar 11 individuos en el tramo más alto donde convive con los biotipos híbridos, pero es muy probable que en la mayoría de los ríos por donde se distribuye el complejo no se encuentren estas formas no híbridas.

Otro aspecto a considerar sería el de la descripción originaria de la especie ya que si el biotipo que más abunda en la naturaleza tiene un origen híbrido sería necesario comprobar si los sintipos conservados en el Museo de Historia Natural de Viena (NMW 49749, 15 ejemplares y NMW 49778, 12 ejemplares) corresponde a individuos híbridos o no.

Por último, habría que resaltar la necesidad de abordar estudios exhaustivos sobre el complejo para estimar la biodiversidad de las formas no híbridas y adoptar las medidas necesarias para su conservación. Si se confirmase la escasez de poblaciones de *T. alburnoides* no híbridos, seguramente nos encontraríamos frente a uno de los vertebrados más amenazados dentro de la ictiofauna europea.

4.- *La hibridogénesis*

Desafortunadamente, no es fácil realizar experimentos de fecundación artificial en condiciones de laboratorio por lo que no se pudo analizar directamente el sistema de reproducción. Sin embargo, el análisis aloenzimático de los ovocitos primarios maduros de individuos de la muestra del río Águeda indicaron que se da un sistema de reproducción hibridogenética tanto en individuos diploides como poliploides. La expresión hemizigótica de las aloenzimas de estos ovocitos producidos por hembras híbridas sugirió que el

genoma de la especie paterna *L. carolitertii* fue excluido previamente a la meiosis.

La exclusión premeiótica del genoma paterno impide la expresión de los genes paternos en ovocitos maduros de otros sistemas hibridogénéticos como en *Rana esculenta* (Graf and Polls-Pelaz, 1989). Por otro lado, las investigaciones citogenéticas llevadas a cabo en biotipos del género *Poeciliopsis* con reproducción hibridogénética demostraron directamente la exclusión de uno de los genomas parentales antes de la ovogénesis y meiosis-I (Cimino, 1972). Por este motivo, en los zimogramas de los ovocitos sólo apareció una banda correspondiente a uno de los alelos, y siempre el mismo, que correspondía al aportado por la especie materna *T. alburnoides*.

El sistema hibridogénético de *T. alburnoides* descarta directamente el genoma paterno de *L. carolitertii* y produce huevos con material genético de *T. alburnoides* haploides o diploides dependiendo de si la hembra fuese diploide o triploide. Aunque la mayoría de los individuos hibridogénéticos son diploides (por ejemplo, *Poeciliopsis*), también se han encontrado casos de individuos hibridogénéticos triploides en salamandras del género *Ambystoma*, peces del género *Phoxinus* y ranas *Rana esculenta* (Berger, 1973; Bogart *et al.*, 1985; Graf & Polls-Pelaz, 1989; Goddard *et al.*, 1989).

La reproducción hibridogénética en hembras de *T. alburnoides* requiere la disponibilidad de un hospedador paterno, genéticamente compatible, del género *Leuciscus*. Con él se mantendrá una estrecha relación de dependencia por el esperma para la fecundación de sus huevos. Por tanto, las poblaciones de *T. alburnoides* híbridos deberán de estar ligadas irremediabilmente a las de *Leuciscus*. La coexistencia de las especies del género *Leuciscus* con el complejo *T. alburnoides* en el rango de distribución de éste último apoyaría esta tesis.

La presencia de la especie materna (*T. alburnoides* no híbridos) en las poblaciones de híbridos es prescindible ya que, como se ha comentado, su

material se transmite en la hibridogénesis de forma hemiclonal sin recombinación alguna y sufriendo solamente las alteraciones producidas por las mutaciones. Por tanto, si llegase a entrar en competencia con el biotipo híbrido podría ser reducida en su número de efectivos o incluso desplazada del todo de esa población.

Por el contrario, la relación que se establece entre el biotipo híbrido y la especie paterna es de dependencia ya que forzosamente necesita de su esperma para fecundar en cada generación a sus huevos. Aunque llegase también a competir con ella por determinados recursos tróficos o por el espacio, su incidencia negativa sobre la especie paterna terminaría por repercutirle ya que quedarían pocos machos disponibles para su reproducción. Si los híbridos no consiguen reproducirse, el reclutamiento de individuos 0+ sería nulo y disminuiría de forma natural la porción de éstos, disminuyendo también la presión sobre la especie parental que tendrá la oportunidad de recuperar su tamaño poblacional.

En el caso de organismos con fecundación interna como es el caso de *Poeciliopsis* este equilibrio debe ser muy estricto ya que las hembras híbridas sólo conseguirían reproducirse si existiesen muchos machos de la especie hospedadora y no todos ellos consiguiesen una hembra coespecífica. Sin embargo, en el caso de que la reproducción sea externa, seguramente existirá una cantidad mayor de esperma disponible que puede fecundar indirectamente las puestas de las hembras híbridas de *T. alburnoides*. De esta forma, tamaños menores en las poblaciones de *Leuciscus* podrían mantener mayores cantidades de individuos híbridos.

En la muestra del río Estena *L. pyrenaicus* resultó ser el hospedador parental por lo que se asume que esta especie estará desempeñando el papel de especie paterna en todo su rango de distribución. La especie *L. carolitertii*, que presenta una distribución alopátrida con respecto a *L. pyrenaicus* ejercerá el papel de hospedador paterno en aquellas poblaciones de híbridos de *T. alburnoides* que coincidan con su rango de distribución.

Las relaciones evolutivas de *L. carolitertii* y de *L. pyrenaicus* necesitarían ser estudiadas con más detalle. Un análisis aloenzimático previo de diversas poblaciones de *L. pyrenaicus* procedentes de la cuenca del Guadiana sugieren que en realidad estas poblaciones pertenecen a la especie *L. carolitertii* (Coelho *et al.*, 1995). Nuestros datos aloenzimáticos son congruentes con esta interpretación. Sin embargo, el ADN mitocondrial de la población de *L. pyrenaicus* del río Estena resultó ser diferente al de *L. carolitertii* y no difirió de el encontrado en *T. alburnoides*. Una explicación posible sería que la población de *L. pyrenaicus* del río Estena estuviese constituida por formas reticulares. Además, la especiación de los linajes a partir de un ADN mitocondrial ancestral puede ser la explicación para esta aparente contradicción.

La incorporación y expresión de los genes de los *Leuciscus* parentales pueden beneficiar a los híbridos en dos sentidos. El primero, consiste en que la expresión parental puede incrementar la similaridad de los híbridos a las hembras de *Leuciscus* y por tanto incrementar la probabilidad de los cruces en los híbridos (Lima *et al.*, 1996). En segundo lugar, la expresión de los genes paternos puede ayudar a los híbridos a adaptarse a condiciones locales para las que las especies parentales están ya bien adaptadas. Por ejemplo, la variación paterna contribuye a adaptaciones termales en *Poeciliopsis* hibridogénéticos (Bulger & Schultz, 1982). Las formas hibridogénéticas de *Poeciliopsis* pueden usar tres hospedadores parentales diferentes, *P. lucida*, *P. occidentalis* y *P. latidens* dependiendo del sistema fluvial (Schultz, 1977). Es probable que investigaciones más profundas sobre los ejemplares del complejo *T. alburnoides* revelen la existencia de otros hospedadores parentales. De hecho, y como se ha comentado, se han encontrado individuos con morfología intermedia entre el complejo *T. alburnoides* y otras especies de ciprínidos, sin embargo, la diferente época de maduración sexual entre estos taxones puede estar detrás de la escasez de estos cruces.

Un número alto de machos de *T. alburnoides* no deberían ser considerado como indicativo de una reproducción sexual. Por ejemplo, todos los machos estudiados en la población del río Águeda fueron identificados como híbridos. Dichos machos podrían ser el resultado del esperma de machos de *Leuciscus* que transportasen genes determinadores de sexo masculino, como fue sugerido para machos ginogenéticos del ciprínido *Phoxinus eos-neogaeus* (Goddard *et al.*, 1989). Los machos híbridos en el presente estudio resultaron ser casi todos diploides. Estos pueden ser hibridogenéticos, y como los machos de la especie hibridogenética *Rana esculenta*, ser fértiles e incluso comunes (Graf & Polls-Pelaz, 1989). Sin embargo, la presencia de machos hibridogenéticos puede tener consecuencias genéticas de gran importancia. Del cruce entre machos y hembras hibridogenéticos del tipo A^*B (donde * indica un genoma hemiclonal) resulta la producción de progenie del tipo A^*A^* , y por tanto, *T. alburnoides* no híbridos con reproducción sexual podrían generarse de este modo. Sin embargo, una descendencia del tipo A^*A^* no ha sido encontrada en este estudio, y si existen, deben tener un bajo éxito debido a la expresión de mutaciones deletéreas que se irían acumulando en el genoma hemiclonal no recombinante. Una carga mutacional considerable se ha demostrado en otros sistemas hibridogenéticos (Graf & Polls-Pelaz, 1989; Leslie & Vrijenhoek, 1978).

5.- El análisis del ADN mitocondrial

Como ocurre en *Poeciliopsis*, los híbridos unisexuales de *T. alburnoides* pueden caracterizarse por tener múltiples orígenes como consecuencia de distintos fenómenos de hibridación. Los análisis de aloenzimas y de ADN mitocondrial en *Poeciliopsis* hibridogenéticos han identificado claramente distintos linajes que surgieron independientemente tanto dentro como entre distintos sistemas fluviales (Quattro *et al.*, 1991; Vrijenhoek *et al.*, 1977, 1978). Del mismo modo, los híbridos de *T. alburnoides* de los ríos Águeda y Estena

difieren respecto a los haplotipos encontrados, siendo el haplotipo I el presente en el río Águeda mientras que los haplotipos II y III aparecen en el río Estena.

Los individuos no híbridos diploides de *T. alburnoides* que presentan el haplotipo II se han encontrado en el río Estena, por tanto el linaje hibridogénico portador del hap-II es probable que tenga un origen endémico, aunque esta hipótesis tiene que contrastarse con marcadores nucleares adicionales. Por el contrario, para los híbridos que presentan el haplotipo-I (río Águeda) y el haplotipo-III (río Estena) no se les encontró el linaje sexual correspondiente. Estos haplotipos pueden constituir genotipos huérfanos (Turner *et al.*, 1983) que en su día existieron en poblaciones locales del ancestro materno pero que ahora están extinguidos. Otra posibilidad sería que estos haplotipos todavía puedan existir en linajes sexuales raros o que permanezcan sin muestrear. Sería necesario hacer un análisis exhaustivo de aloenzimas y de ADN mitocondrial en otros ríos donde se localicen formas similares a los *T. alburnoides* no híbridos la Península Ibérica.

El análisis del ADN mitocondrial reveló que el verdadero *T. alburnoides* ancestral aportó el genoma mitocondrial a estos híbridos, sin embargo, esta especie materna putativa (no híbrida) no fue identificada en la muestra analizada del río Águeda. Por el contrario, los *T. alburnoides* híbridos del río Estena claramente involucran a *L. pyrenaicus* como una de las especies parentales y a los ejemplares no híbridos hallados de *T. alburnoides* como la otra especie parental.

Una consecuencia de gran relevancia del presente estudio con ADN mitocondrial es el reconocimiento de que la alfa-taxonomía del complejo *T. alburnoides* y el grupo *Leuciscine* necesitan una revisión profunda.

La morfología y citología de este grupo altamente reticulado no ha identificado claramente barreras específicas o mayores niveles de relación específica (Collares-Pereira, 1989; Howes, 1991). El análisis aloenzimático

proporciona algo de resolución en el presente estudio, pero el conjunto de estos marcadores no fueron demasiado divergentes.

Sin embargo, el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen del Citocromo *b* proporcionó una resolución más clara de las diferencias entre *T. alburnoides*, *L. carolitertii* y *Ch. polylepis*. Secuencias adicionales del ADN mitocondrial pueden resultar ser una herramienta poderosa para categorizar este grupo tan dificultoso. También serían muy útiles marcadores adicionales del ADN nuclear, dado que no son tan conservativos como las aloenzimas, para identificar claramente los híbridos y sus progenitores.

CONCLUSIONES

Los resultados principales del presente estudio se pueden resumir en las siguientes conclusiones:

- 1.- Se ha comprobado que la existencia de individuos triploides en todas las poblaciones analizadas del complejo *T. alburnoides* que fueron muestreadas en diferentes cuencas hidrográficas representativas de toda su área de distribución.
- 2.- La proporción de sexos en el complejo *T. alburnoides* ha resultado estar descompensada a favor de las hembras en todas las poblaciones analizadas.
- 3.- El nivel de ploidía y la proporción de sexos en el complejo *T. alburnoides* fue diferente entre las poblaciones estudiadas; habiéndose encontrado para el total de las mismas un 13,8% de machos frente a un 66,5% de hembras y un 45,9% de individuos diploides frente a un 54,1% de triploides.
- 4.- En la población del río Águeda se ha constatado la presencia de individuos tetraploides dentro del complejo *T. alburnoides*.
- 5.- Se encontró un contenido medio de ADN nuclear de 2,87 pg para los individuos diploides del complejo *T. alburnoides*. Este dato no pudo ser utilizado como un carácter para diferenciar individuos híbridos y parentales ya que el valor se solapa con el de otras especies estudiadas.
- 6.- Los análisis aloenzimáticos para la población del río Águeda han revelado que todos los individuos del complejo *T. alburnoides*, indistintamente de su nivel de ploidía, son heterocigotos para tres loci. Además, presentan un exceso en los valores de heterocigosis observada. Estos datos confirman que la población del

complejo *T. alburnoides* del río Águeda constituyen un nuevo caso dentro de los vertebrados unisexuales con un origen híbrido interespecífico.

7.- Los estudios abordados en otras poblaciones diferentes a las del río Águeda del complejo *T. alburnoides* indicaron que en todas ellas aparece el mismo fenómeno de hibridación.

8.- Los estudios aloenzimáticos del complejo *T. alburnoides* del río Águeda (cuenca del Duero) revelaron que *L. carolitertii* es una de las especies parentales. En las poblaciones del complejo *T. alburnoides* de las cuencas del Tajo, Guadiana y Guadalquivir, *L. carolitertii* es reemplazada como especie parental por *L. pyrenaicus*, una especie muy próxima filogenéticamente de la anterior.

9.- Debido a que inicialmente no se encontró la otra especie parental implicada en la hibridación se realizó un estudio de las poblaciones del género *Leuciscus* de la Península Ibérica, no apareciendo en ellas la otra especie parental. Además, los resultados de este estudio indican que la taxonomía actual del género *Leuciscus* en la Península Ibérica no es congruente con la estructura genética de las poblaciones y por tanto debería ser revisada.

10.- Tampoco fue encontrada la otra especie parental cuando se amplió el estudio a las poblaciones europeas del género *Leuciscus*. Igualmente, se comprobó que la taxonomía de estas poblaciones no es congruente con la estructura genética de las mismas.

11.- Se analizaron también las dos especies conocidas del género *Tropidophoxinellus* descartándose ambas como la especie parental.

12.- Un estudio más exhaustivo sobre distintas poblaciones del complejo *T. alburnoides* en la Península Ibérica dio como resultado encontrar la especie que hibrida con *L. pyrenaicus* en el río Estena para originar los híbridos denominados *T. alburnoides*.

13.- Se encontraron machos y hembras de la especie parental que fue diploide y que presenta un área de distribución muy restringida dentro del río Estena. Aunque por lo reducido del área de distribución que ocupa la especie parental parece lógico pensar que los ejemplares utilizados para describir *T. alburnoides* sean híbridos, mucho más extendidos en la naturaleza, es necesario un estudio de los sintipos depositados en el Museo de Viena.

14.- El estudio de aloenzimas sobre ovocitos maduros de hembras híbridas de la población del río Águeda indicó que el modo de reproducción empleado por los híbridos es la hibridogénesis. Mediante este método, el material genético de *Leuciscus* es descartado durante la meiosis produciéndose ovocitos que portan exclusivamente el material de los *T. alburnoides* no híbridos.

15.- Los estudios del polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial indicaron que, en la hibridogénesis, las especies del género *Leuciscus* actúan como especie paterna y los *T. alburnoides* no híbridos como especie materna.

16.- La baja densidad de *T. alburnoides* no híbridos encontrada en este estudio, consistente sólo en una pequeña población en el río Estena, indican que sería necesario abordar un estudio exhaustivo sobre el estado de conservación de esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, R. M. 1954/1956. Peixes de Portugal e Ilhas adjacentes. Chaves para a sua denominação. Portug. Acta Biol. (B), 5.
- Álvarez, I., Machordom, A. & Doadrio, I. 1986. Complejo diploide-poliploide en *Iberocypris palaciosi* (Pisces, Cyprinidae). 1º Congr. Nac. Herpet. (Benicassim, 1-3 Nov).
- Arai, K., Matsubara, K. & Suzuki, R. 1991. Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the Loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57: 2167-2172.
- Avise, J. C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool., 23: 465-481.
- Avise, J. C. 1986. Mitochondrial DNA and evolutionary genetics of higher animals. Phil. Trans. R. Soc. Lond. (B), 312: 325-342.
- Avise, J. C. 1989. Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. Evolution, 43: 1192-1208.
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall. New York. 511 pp.
- Avise, J. C. & Ball, R. M. Jr. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. Oxford Surv. Evol., 7: 45-67.
- Avise, J. C. & Lansman, R. A. 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. Pp. 147-164. En: Evolution of genes and proteines. Nei, M. y Koehn, R. K. (eds.), Sinauer Associates Inc., Sunderland.

- Avise, J. C. & Vrijenhoek, R. C. 1987. Mode of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of the genus *Poeciliopsis*. *Mol. Biol. Evol.*, 4(5): 514-525.
- Avise, J. C., Giblin-Davidson, C., Laerm, J., Patton, J. C. & Lansman, R. A. 1979. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher *Geomys pinetis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 6694-6698.
- Avise, J. C., Quattro, J. M. & Vrijenhoek, R. C. 1992. Molecular clones within organismal clones. *Evol. Biol.*, 26: 225-246.
- Balsano, J. S., Darnell, R. M. & Abramoff, P. 1972. Electrophoretical evidence of triploidy associated with populations of the gynogenetic teleost *Poecilia formosa*. *Copeia*, 2: 292-297.
- Banarescu, P. 1964. Fauna Republicii Populare Romine. Pisces-Osteichthyes, 13. Acad. Republ. Pop. Romine, Bucuresti.
- Banarescu, P. 1990. Zoogeography and history of the freshwater fish fauna of Europe. En: *The Fresh Water Fishes of Europe*. Holcik, J. (ed.). Aula-Verlag, Wiesbaden.
- Banarescu, P., Blanc, M., Huroeau, J. C. & Grandet, J. 1971. European Inland waterfish. A multilingual Catalogue. Fishing News, England.
- Berberovic, L. J., Hadziselmovic, R., Pavlovic, B. & Sofradzija, A. 1973. Chromosome set of the species *Aulopyge hugeli* Heckel, 1841. *Bull. Scient. Cons. Acads. RSF Yugosl.* (A), 18: 10-11.
- Berg, L. S. 1932. Übersicht der Verbreitung des Süßwasserfische Europas. *Zoogeographica*, 1 (2): 107-208.
- Berger, L. 1973. Systematics and hybridization in European green frogs of *Rana esculenta* complex. *Journal of Herpetology*, 7: 1-10.

- Bianco, P. G. 1983. *Leuciscus lucumonis* n. sp. from Italy. (Pisces: Cyprinidae). *Senckenbergiana biologica*, 64: 81-87.
- Bianco, P. G. & Knezevic, B. 1987. The *Leuciscus cephalus* complex (Pisces, Cyprinidae) in western Balkanic area. Proceedings of V Congress of European Ichthyologists, 49-55.
- Bianco, P. G. & Recchia, F. 1983. The Leuciscinae of the *Squalius* species complex in Italy (Pisces, Cyprinidae). *Bolletino di Zoologia*, 50: 15-19.
- Bogart, J. P. & Licht, L. E. 1986. Reproduction and the origin of polyploids in hybrid salamanders of the genus *Ambystoma*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, 28: 605-617.
- Bogart, J. P., Licht, L. E., Oldham, M. J. & Darbyshire, S. J. 1985. Electrophoretic identification of *Ambystoma laterale* and *Ambystoma texanum* as well as their diploid and triploid interspecific hybrid (Amphibia: Caudata) on Pelee Island, Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, 63: 340-347.
- Bogart, J. P., Lowcock, L. A., Zeyl, C. W. & Mable, B. K. 1987. Genome constitution and reproductive biology of hybrid salamanders, genus *Ambystoma*, on Kelleys Island in Lake Erie. *Canadian Journal of Zoology*, 65: 2188-2201.
- Brown, W. M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. Pp. 62-68. En: *Evolution of genes and proteins*. Nei, M. y Koehn, R. K. (eds.). Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Brown, W. M. & Wright, J. W. 1979. Mitochondrial DNA analysis and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). *Science*, 203: 1247-1249.
- Buen, F. 1930. Notas sobre la fauna ictiológica de nuestras aguas dulces. *Not. Res. Inst. Esp. Ocean., Ser. II*, 46: 1-62.

- Buen, F. 1935/1936. Catálogo de los peces ibéricos: de la planicie continental, aguas dulces, pelágicos y de los abismos próximos. 1ª Parte. Inst. Español de Oceanografía.
- Bulger, A. J. & Schultz, R. J. 1982. Origins of thermal adaptation in northern vs southern populations of a unisexual hybrid fish. *Evolution*, 36:1041-1050.
- Buth, D. G. 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. *Annual Review in Ecology and Systematic*, 15: 501-522.
- Buth, D. G., Dowling, T. E. & Gold, J. R. 1993. Molecular and cytological investigations. Pp. 83-127. En: *Cyprinid fishes, systematics, biology and exploitation..* Winfield, I. J. y Nelson, J. S. (eds.). Chapman & Hall, London.
- Camin, J. H. & Sokal, R. R. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution*, 19: 311-326.
- Capello, F. B. 1880. Catálogo dos peixes de Portugal. Mem. Acad. Real Sc. Lisboa, Nova Série, 6.
- Cavalli-Sforza, L. L. & Edwards, A. W. F. 1967. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedure. *Evolution*, 21: 550-570.
- Cimino, M. C. 1972. Egg production, polyploidization and evolution in a diploid all-female fish of the genus *Poeciliopsis*. *Evolution*, 26: 294-306.
- Coelho, M. M. 1992. Genetic differentiation in the iberian cyprinids *Chondrostoma polylepis* Steindachner, 1865 and *Ch. willkommii* Steindachner, 1866. *Archiv für Hydrobiologie*, 125: 487-498.
- Coelho, M. M., Brito, R. M., Pacheco, T. R., Figueiredo, D. & Pires, A. M. 1995. Genetic variation and divergence of *L. pyrenaicus* and *L. carolitertii* (Pisces, Cyprinidae). *Journal of Fish Biology*, 47: 243-258.

- Collares-Pereira, M. J. 1983. Estudo sistemático e citogenético dos pequenos ciprinídeos ibéricos pertencentes aos géneros *Chondrostoma* Agassiz, 1835 *Rutilus* Rafinesque, 1820 e *Anaocypris* Collares-Pereira, 1983. Unpubl. Ph. D. Diss., Univ. of Lisbon.
- Collares-Pereira, M. J. 1984. The "*Rutilus alburnoides* (Steindachner, 1866) complex" (Pisces, Cyprinidae). I. Biometrical analysis of some Portuguese populations. *Arq. Mus. Boc. (A)*, 2: 111-143.
- Collares-Pereira, M. J. 1985. The "*Rutilus alburnoides* (Steindachner, 1866) complex" (Pisces, Cyprinidae). II. First data on the karyology of a well-established diploid-triploid group. *Arq. Mus. Boc. (A)*, 3: 69-90.
- Collares-Pereira, M. J. 1987. The evolutionary role of hybridization: the example of a natural Iberian fish population. *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May, 1986, Vol. I*: 83-92. Berlin.
- Collares-Pereira, M. J. 1989. Hybridization in European Cyprinids: Evolutionary potential of Unisexual populations. Pp. 281-288. En: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. Dawley, R. y Bogart, J. (ed.). New York State Museum, Albany, New York.
- Cuellar, O. 1974. On the origin of parthenogenesis in vertebrates: the cytogenetic factors. *The American Naturalist*, 108: 625-648.
- Cuellar, O. 1977. Genetic homogeneity and speciation in the parthenogenetic lizards *Cnemidophorus velox* and *C. mexicanus*, evidence from interspecific histocompatibility. *Evolution*, 31: 24-31
- Daget, J. 1968. Diversité des faunes de poissons dans les cours d'eau du Portugal. *Arq. Mus. Boc., Not. Supl.*, 2 (15): 21-26.

- Dawley, R. M. 1989. An introduction to unisexual vertebrates. Pp. 281-288. En: Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. Dawley, R. y Bogart, J. (ed.). New York State Museum, Albany, New York.
- Dawley, R. M. & Goddard, K. A. 1988a. Diploid-triploid mosaics among unisexual hybrids of the minnows *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus*. Evolution, 42: 649-659.
- Dawley, R. M. & Goddard, K. A. 1988b. Clonal inheritance of a diploid nuclear genome by a hybrid freshwater minnow (*Phoxinus eos-neogaeus*, Pisces: Cyprinidae). Evolution, 44: 1052-1065.
- Dawley, R. M., Schultz, R. J. & Goddard, K. A. 1987. Clonal reproduction and polyploidy in unisexual hybrids of *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus* (Pisces, Cyprinidae). Copeia, 1997: 275-283.
- DeBry, R. W & Slade, N. A. 1985. Cladistic analysis of restriction endonuclease cleavage maps within a maximum-likelihood framework. Systematic Zoology, 34: 21-34.
- Densmore, L. D., III., Moritz, C. C., Wright, J. W. & Brown, W. M. 1989. Mitochondrial-DNA analysis and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). IV. Nine sexlineatus-group unisexuals. Evolution, 43: 969-983.
- Dessauer, H. C. & Cole, C. J. 1989. Diversity between and within nominal forms of unisexual teiid lizards. Pp. 281-288. En: Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. Dawley, R. y J. Bogart, J. (ed.). New York State Museum, Albany, New York.
- Doadrio, I. 1988. Delimitation of areas in the Iberian Peninsula on the basis of fresh waters fishes. Bonn. Zool. Beitr., 39: 113-128.
- Doadrio, I. 1989. Catálogo de los Peces de Agua Dulce del Museo Nacional de Ciencias Naturales. C.S.I.C.

- Doadrio, I., Elvira, B. & Bernat, Y. (eds.). 1991. Peces continentales españoles. Inventario y clasificación de zonas fluviales. Colección Técnica, ICONA, Madrid. 221 pp.
- Dowling, T. E., Moritz, C. & Palmer, J. 1990. Nucleic Acids II: Restriction site Analysis. Pp. 45-126. En: Molecular Systematics. Hillis, D. M. y Moritz, C. (eds.). Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Echelle, A. A. & Mosier, D. T. 1982. *Medina clarkhubbsi*, n. sp. (Pisces: Atherinidae), an all-female species. *Copeia*, 1982: 533-540.
- Economidis, P. S. 1991. Check List of Freshwater Fishes of Greece. Hellenic Society for the Protection of Nature. Athens.
- Economidis, P. S. & Banarescu, P. 1991. The distribution and origin of freshwater fishes in the Balkan Peninsula, especially in Greece. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, 76: 257-283.
- Elvira, B. 1987. Taxonomic revision of the genus *Chondrostoma* Agassiz, 1835 (Pisces, Cyprinidae). *Cybium*, 11: 111-140.
- Elvira, B. 1990. Iberian endemic freshwater fishes and their conservation status in Spain. *Journal of Fish Biology*, 37 (A): 231-232.
- Elvira, B. 1995. Native and exotic freshwater fishes in Spanish river basins. *Freshwater Biology*, 33: 103-108.
- Farris, J. S. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology*, 19: 83-92.
- Farris, J. S. 1972. Estimating phylogenetic trees from distance matrix. *American Naturalist*, 106: 645-668.
- Farris, J. S. 1977. Phylogenetic analysis under Dollo's law. *Systematic Zoology*, 26: 77-88.

- Farris, J. S. 1981. Distance data in phylogenetic analysis. Pp. 3-23. En: Advances in Cladistics. Proceedings of the First Meeting of the Willi Henning Society. Funk, V. A. y Brooks, D. R. (eds.). New York Botanical Garden, Bronx.
- Ferguson, A. B. 1980. Hybrids and Polyploids. En: Biochemical Systematics and Evolution. Blackie (ed.). Glasgow. London.
- Fernández-Delgado, C. & Herrera, M. 1994. Population structure, growth and reproduction of *Tropidophoxinellus alburnoides* (Steindachner, 1866) in an intermittent stream of the Guadalquivir River basin (southern Spain). Arch. Hydrobiol., 130 (3): 359-369.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specified tree topology. Systematic Zoology, 20: 406-416.
- Fitch, W. M. & Margoliash, E. 1967. Construction of phylogenetic trees. Science, 155: 279-284.
- Goddard, K. & Dawley, R. 1990. Clonal inheritance of a diploid nuclear genome by a hybrid freshwater minnows. Evolution, 44: 1052-1065.
- Goddard, K. & Schulz, R. J. 1993. Aclonal reproduction by polyploid members of the clonal hybrid species *Phoxinus eos-neogaeus*. Copeia, 1993(3): 650-660.
- Goddard, K. A., Dawley, R. M. & Dowling, T. E. 1989. Origin and genetic relationships of diploid, triploid and diploid-triploid mosaic biotypes in the *Phoxinus eos-neogaeus* unisexual complex. Pp. 281-288. En: Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. Dawley, R. y Bogart, J. (eds.). New York State Museum, Albany, New York.
- Gold, J. R., Li, Y. C., Shipley, N. S. & Powers, P. K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosomes banding. Journal of Fish Biology, 37: 563-575.

- Graf, J. D. & Müller, W. P. 1979. Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex. *Experientia*, 35: 1574-1576.
- Graf, J. D. & Polls-Pelaz, M. 1989. Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. Pp. 281-288. En: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. Dawley, R. y Bogart, J. (eds.). New York State Museum, Albany, New York.
- Graf, J. D., Karch, F. & Moreillon, M. C. 1977. Biochemical variation in the *Rana esculenta* complex: A new hybrid from related to *Rana perezi* and *Rana ridibunda*. *Experientia*, 33: 1582-1584.
- Günther, A. 1868. *Catalogue of the fishes in the British Museum*, 7. London.
- Gyllensten, U. & Wilson, A. C. 1986. Mitochondrial DNA of salmonids. Inter- and intraspecific variability detected with restriction enzymes. Pp. 301-317. En: *Population Genetics and Fishery Management*. Ryman, N. y Utter, F. (eds.). Washington Sea Grant Program, University Washington Press, Seattle & London.
- Hafez, R., Labat, R. & Quillier, R. 1978. Étude cytogénétique chez quelques espèces de cyprinidés de la région Midi-Pyrénées. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse*, 114 (1-2): 122-159.
- Harrison, R. G. 1993. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford Univ. Press, Oxford, England.
- Helling, M. 1943. Novo catálogo dos Peixes de Portugal em coleção no Museu de Zoologia da Universidade de Coimbra. *Mem. Est. Mus. Zool. Univ. Coimbra*, 149.
- Herrera, M. 1991. Estrategias en los ciclos de vida de una comunidad de ciprinidos en un arroyo de primer orden en la cuenca del río Guadalquivir. Ph. D. Thesis, Universidad de Córdoba. 91 pp.

- Hillis, D. M. 1984. Misuse and modification of Nei's genetic distance. *Systematic Zoology*, 33: 238-240.
- Howes, G. J. 1991. Systematics and biogeography: An overview. Pp 1-33. En: *Cyprinid Fishes: Systematic, Biology and Exploitation*. Winfield, Y. J. y Nelson, J. S (eds.). Chapman and Hall, London.
- Hubbs, C. L. & Hubbs, L. C. 1932. Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. *Science*, 76: 628-630.
- ICONA. 1986. Lista Roja de los Vertebrados de España. Publicaciones del Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Kligerman, A. D. & Bloom, S. E. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34: 266-269.
- Kluge, A. G. & Farris, J. S. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology*, 18: 1-32.
- Knobloch, Y. W. 1972. Intergeneric hybridization in flowering plants. *Taxon*, 21: 97-103.
- Kumer, S., Tamura, K. & Nei, M. 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis. The Pennsylvania State University, University Park.
- Ladiges, W. 1978. Pisces. En: *Limnofauna Europaea*. Illies, J. y Fischer, G. (eds.). Verlag, Stuttgart.
- Lehninger, A. L. 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. New York.
- Lelek, A. 1980. Threatened freshwater fishes of Europe. Council of Europe, Nature and Environmental series, 18.
- Leslie, J. F. & Vrijenhoek, R. C. 1978. Genetic dissection of clonal inherited genomes of *Poeciliopsis*. I. Linkage analysis and preliminary assessment of deleterious gene loads. *Genetics*, 90: 801-811.

- Lima, N. R. W., Kobak C. J. & Vrijenhoek, R. C. 1996. Evolution of sexual mimicry in sperm-dependent clonal forms of *Poeciliopsis* (Pisces: Poeciliidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 9: 185-203.
- Lobillo, J., Herrera, M., Delgado, J. V., Alonso, A. & Fernández-Delgado, C. 1989. Distribución diploide triploide en una población de *Rutilus alburnoides* (Steindachner, 1866) (Pisces, Cyprinidae) del sur de España. *Actas XXIV Jornadas de Genética Luso Españolas*. 90 pp.
- Lowcock, L. A., Licht, L. E. & Bogart, J. P. 1987. Nomenclature in hybrid complexes of *Ambystoma* (Urodela: Ambystomatidae): No case for erection of hybrid "Species". *Syst. Zool.*, 36: 328-336.
- Lozano-Rey, L. 1919. Los peces de la fauna ibérica en la colección del Museo, en 1 de enero de 1919. *Trab. Mus. Nac. Cienc. natur., Ser. Zool.*, 39, Madrid.
- Lozano-Rey, L. 1935. Los peces fluviales de España. *Mem. R. Acad. Cien. Ex. Fis. Nat.*, 5, Madrid.
- Lozano-Rey, L. 1947. Peces ganoideos y fisóstomos. *Mem. R. Acad. Cien. Ex. Fis. Nat.*, 11, Madrid.
- Mabee, P. & Humphries, J. 1993. Coding polymorphic data: examples from allozymes and ontogeny. *Systematic Biology*, 42: 166-181.
- Machordom, A. 1992. Filogenia y evolución del género *Barbus* en la Península Ibérica mediante marcadores moleculares. Ph. D. Tesis, Universidad Complutense de Madrid. 258 pp.
- Mardulyn, P. & Pasteels, J. M. 1994. Coding allozyme data using step matrices: Defining new original states for the ancestral taxa. *Systematic Biology*, 43: 567-572.
- Maslin, T. P. 1968. Taxonomic problems in parthenogenetic vertebrates. *Systematic Zoology*, 17: 219-231.

- Matson, R. H. 1984. Application of electrophoretic data in avian systematics. *The Auk*, 101: 717-729.
- McElroy, D., Moran, P., Bermingham, E. & Kornfield, I. 1992. REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *J. Heredity*, 83: 157-158.
- Medrano-Sanz, L. V. 1944. Contribución a la fauna ictiológica española. *Biología de las aguas continentales III*. Inst. Forestal Invest. y Experien., 30: 1-66.
- Meyer, A. 1993. Molecular phylogenetic studies of fishes. En: *Evolution and Genetics of Aquatic Organisms*. Beaumont, A. R. (ed.). Chapman and Hall, New York.
- Moore, W. S., 1984. Evolutionary ecology of unisexual fishes. Pp. 329-398. En: *Evolutionary Genetics of fishes*. B. J. Turner (ed.). Plenum Press, New York.
- Moritz, C., Dowling, T. E. & Brown, W. M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292.
- Moritz, C., Brown W. M., Densmore, D., Wright, W., Vyas, D., Donnellan, S., Adams, M. & Baverstock, P. 1989. Genetic diversity and the dynamics of hybrid parthenogenesis in *Cnemidophorus* (Teiidae) and *Heteronotia* (Gekonidae). Pp. 281-288. En: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. Dawley, R. y Bogart, J. (eds.). New York State Museum, Albany, New York.
- Muller, H. J. 1964. The relation of mutation to mutational advance. *Mutat. Res.*, 1: 2-9.
- Murphy, R. W., Sites, J. W., Buth, D. G. & Haufler, Ch. H. 1990. Proteins I: Isozyme electrophoresis. Pp. 45-126. En: *Molecular Systematics*. Hillis,

- D. M. y Moritz, C. (eds.). Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- NCSA Software Tools Group. 1991. NCSA Gel Reader for the Macintosh. University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Nei, M. 1972. Genetic distances among populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei, M. & Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76: 5269-5273.
- Nei, M., Tajima, F. & Tatenó, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153-170.
- Nobre, A. 1932. Peixes das Águas Doces de Portugal. *Bol. Min. Agricultura*, 13 (2) (1ª Sér): 5-44.
- Nobre, A. 1935. Fauna Marinha de Portugal. Y. Vertebrados (Mamíferos, Répteis e Peixes). Porto.
- Ohno, S. 1970. *Evolution by Gene Duplication*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Osório, B. 1888. Aditamento ao catálogo dos peixes de Portugal. *Jorn. Sci. Math. Phy. Nat.*, 12 (1ª Sér.), 47. Lisbon.
- Parker, E. D. 1979. Ecological implications of clonal diversity in parthenogenetic morphospecies. *American Zoologist*, 19: 753-762.
- Parker, E. D., Walker, J. M. & Paulissen, M. A. 1989. Clonal diversity in *Cnemidophorus*: Ecological and morphological consequences. Pp. 281-

288. En: Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. Dawley, R. y Bogart, J. (eds.). New York State Museum, Albany, New York.
- Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, J. Catalan & J. Britton-Davidian. 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Collection Technique et Documentation, Lavoisier. Paris. 217 pp.
- Peris, S. J., Martín, A. & Velasco, J. C. 1994. Age, growth and reproduction of the cyprinid *Tropidophoxinellus alburnoides* (Stephanidis, 1974) in River Águeda, West-Central Spain.
- Purdom, C. E. 1993. Genetic and Fish Breeding. Chapman and Hall. London, England.
- Quattro, J. M., Avise, J. C. & Vrijenhoek, R. C. 1991. Molecular evidence for multiple origins of hybridogenetic fish clones (Poeciliidae: *Poeciliopsis*). Genetics, 127: 391-398.
- Quattro, J. M., Avise, J. C. & Vrijenhoek, R. C. 1992a. An ancient clonal lineage in the fish genus *Poeciliopsis* (Atheriniformes: Poeciliidae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 348-352.
- Quattro, J. M., Avise, J. C. & Vrijenhoek, R. C. 1992b. Mode of origin and sources of genotypic diversity in triploid fish clones (Poeciliidae: *Poeciliopsis*). Genetics, 130: 621-628.
- Raicu, P., Taisescu, E. & Banarescu, P. 1981. *Carassius carassius* and *Carassius auratus*, a pair of diploid-tetraploid representative species (Pisces, Cyprinidae). Cytologia, 46: 233-240.
- Rogers, J. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distances. Studies in Genetics VII, Univ. Texas Pub., 7213: 145-153.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406-425.

- Schenck, R. & Vrijenhoek, R. C. 1986. Spatial and temporal factors affecting coexistence among sexual and clonal forms of *Poeciliopsis*. *Evolution*, 40: 1060-1070.
- Schmidt, T. R. & Gold, J. R. 1993. Complete sequence of the mitochondrial cytochrome b gene in the cherryfin shiner, *Lythrurus roseipinnis* (Teleostei: Cyprinidae). *Copeia*, 3: 880-883.
- Schultz, R. J. 1969. Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *Am. Nat.*, 103: 605-619.
- Schultz, R. J. 1977. Evolution and ecology of unisexual fishes. *Evol. Biol.*, 10: 277-331.
- Schultz, R. J. 1980. The role of polyploidy in the evolution of fishes. Pp. 313-339. En: *Polyploidy: Biological Relevance*. Lewis, W. H. (ed.). Plenum Publ. Co., New York.
- Schwartz, F. J. 1972. World Literature to Fish Hybrids, with an Analysis by Family, Species, and Hybrid. Publ. Gulf Coast Res. Lab. Mus., 3: 1-328.
- Schwartz, F. J. 1981. World Literature to Fish Hybrids, with an Analysis by Family, Species, and Hybrid: Supplement I. NOAA Tech. Report NMFS SSRF-750, U. S. Dept. of Commerce.
- Seabra, A. F., de. 1911. Catalogue Systématique des Vertébrés du Portugal. V. Poissons. *Bull. Soc. Port. Soc. Port. Sc. Nat.*, 5 (3): 129-224.
- Seeley, H. G. 1886. The freshwater fishes of Europe. Cassel & Comp. Ltd., London.
- Shaklee, J. B., Allendorf, F. W., Morizot, D. C. & Whitt, G. S. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 119: 2-15.

- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, W. H. and Co., San Francisco.
- Soumalainen, E., Saura, A. & Lokki, J. 1987. Cytology and evolution in parthenogenesis. CRC Press, Boca Raton.
- Spolsky, C. & Uzzell, T. 1986. Evolutionary history of the hybridogenetic hybrid frog *Rana esculenta* as deduced from mtDNA analyses. Mol. Biol. Evol., 3: 44-56.
- Steindachner, F. H. 1866. Ichthyologischer Bericht über eine nach Spanien und Portugal unternommene Reise (Dritte Fortsetzung). Sitzungsber. der Kais. Akad. der Wissenschaften, 54: 261-272.
- Stephanidis, A. 1971. Poissons d'eau douce du Péloponnèse. Biologia Gallo-Hellenica, 3: 163-212.
- Stephanidis, A. 1974. On some fish of the Ioniokorinthian region (W. Greece Ect). A new genus of Cyprinidae: *Tropidophoxinellus* N. Gen. Biol. Gallo-Hellenica, 5 (2): 235-257.
- Swofford, D. L. 1993. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Smithsonian Institute, Washington, DC.
- Swofford, D. L. & Olsen, G. J. 1990. Phylogeny reconstruction. Pp. 411-501. En: Molecular Systematics. Hillis, D. M. & Moritz, C. (eds.). Sinauer, Sunderland, MA.
- Swofford, D. L. & Selander, R. K. 1989. BIOSYS-1. A PC program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. University of Illinois.
- Tsingenopoulos, C. & Karakousis, Y. 1996. Phylogenetic relationships of *Leuciscus keadicus*, an endemic cyprinid species from Greece, with other greek species in the genus *Leuciscus*. Folia Zoologica, 45: 87-93.

- Tunner, B. J. & Heppich, S. 1981. Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. *Naturwissenschaften*, 68: 207-208.
- Turner, B. J. 1982. The evolutionary genetics of a unisexual fish, *Poecilia formosa*. Pp. 265-305. En: *Mechanisms of Speciation*. Barigozzi, C. (ed.). Alan liss, New York.
- Turner, B. J., Balsano, J. S., Monaco, P. J. & Rasch, E. M. 1983. Clonal diversity and evolutionary dynamics in a diploid-triploid breeding complex of unisexual fishes (*Poecilia*). *Evolution*, 37: 798-809.
- Upholt, W. B. 1977. Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digest. *Nucleic Acid Researches*, 4: 1257-1265.
- Uzzell, T. & Darevsky, I. S. 1975. Biochemical evidence for the hybrid origin of the parthenogenetic species of the *Lacerta saxicola* complex (Sauria, Lacertidae), with the discussion of some evolutionary and ecological implications. *Copeia*, 1975: 204-222.
- Uzzell, T., Berger, L. & Günther. 1975. Diploid and triploid progeny from a diploid female of *Rana esculenta* (Amphibia, Salientia). *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.*, 127: 81-91.
- Vasil'ev, V. P. & Vasilieva, E. D. 1982. A new diploid-polyploid complex in fishes. *Dokl. An. URSS*, 266: 250-252.
- Vasil'ev, V. P., Vasilieva, E. D. & Osinov, A. G. 1989. Evolution of a diploid-triploid-tetraploid complex in fishes of the genus *Cobitis* (Pisces, Cobitidae). Pp. 281-288. En: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. Dawley, R. y Bogart, J. (eds.). New York State Museum, Albany, New York.

- Velasco, J. C. 1994. Atlas de los peces de las provincias de Salamanca y Zamora. Valoración de especies y tramos fluviales. Ph. Tesis. Univ. Salamanca.
- Vieira, A. X. L. 1898. Catálogo dos Peixes de Portugal em colecção no Museu de Zoologia da Universidade de Coimbra. Ann. Sc. Nat., 4.
- Vindeløv, L. V., Christensen, I. J., Keiding, N., Spang-Thomsen, M. & Nissen, N. I. 1982. Long term storage of samples for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry*, 3: 317-322.
- Vrijenhoek, R. C. 1975. Gene dosage in diploid and triploid fishes (*Poeciliopsis*, Poeciliidae). Pp. 463-475. En: *Isozymes. Genetics and Evolution*. C. L. Market (ed.). Vol. 4. Academic Press, New York.
- Vrijenhoek, R. C. 1979. Factors affecting clonal diversity and coexistence. *American Zoologist*, 19: 787-797.
- Vrijenhoek, R. C. 1984a. Ecological differentiation among clones: The frozen niche variation model. Pp. 217-231. En: *Population Biology and Evolution*. Wóhrmann, K. y Loeschcke, V. (eds.). Springer, Heidelberg, Germany.
- Vrijenhoek, R. C. 1984b. The evolution of clonal diversity in *Poeciliopsis*. En: *Evolutionary Genetics of Fishes*. Turner, B. J. (ed.). Plenum Press, New York.
- Vrijenhoek, R. C. 1989. Genetic and ecological constraints on the origins and establishment of unisexual vertebrates. Pp. 281-288. En: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. Dawley, R. y Bogart, J. (eds.). New York State Museum, Albany, New York.
- Vrijenhoek, R. C. 1989. Genotypic diversity and coexistence among sexual and clonal forms of *Poeciliopsis*. Pp. 386-400. En: *Speciation and its consequences*. Otte, D. & Endler, J. (eds.). Sinauer Associates, Sunderland, Ma.

- Vrijenhoek, R. C. 1990. Genetic diversity and the ecology of asexual populations. Pp. 175-197. En: Population Biology and Evolution. Wóhrmann, K. y Jain; S. (eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Vrijenhoek, R. C. 1994. Unisexual fish: model systems for studying ecology and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25: 71-96.
- Vrijenhoek, R. C. & Lerman, S. 1982. Heterozygosity and developmental stability under sexual and asexual breeding systems. *Evolution*, 36: 768-776.
- Vrijenhoek, R. C. & Schultz, R. J. 1974. Evolution of a trihybrid unisexual fish (*Poeciliopsis*: Poeciliidae). *Evolution*, 28: 306-319.
- Vrijenhoek, R. C., Angus, R. A. & Schultz, R. J. 1977. Variation and heterozygosity in sexually vs clonally reproducing populations of *Poeciliopsis*. *Evolution*, 31: 767-781.
- Vrijenhoek, R. C., Angus, R. A. & Schultz R. J. 1978. Variation and clonal structure in a unisexual fish. *Amer. Natur.*, 112: 41-55.
- Vrijenhoek, R. C., Dawley, R. M., Cole, C. J. & Bogart, J. P. 1989. A list of known unisexual vertebrates. Pp. 281-288. En: Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. Dawley, R. y Bogart, J. (eds.). New York State Museum, Albany, New York.
- White, M. J. D. 1978. Modes of speciation. Freeman, San Francisco.
- Wilson A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Jr., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowsky, K., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D. & Stoneking, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375-400.

Wright, C. A. 1978. Biochemical and Immunological Taxonomy of Animals. Academy Press, London.

Zouros, E., Freeman, K. R., Ball, A. O. & Pogson G. H. 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*, 359: 412-414.