



Facultad de Veterinaria

Trabajo de  
Fin de Grado

Análisis de diversidad y  
estructuración genética para la  
conservación de poblaciones de  
trucha común (*Salmo trutta*) en  
ríos Pirenaicos de Cataluña

Beatriz Viso Salas

**Grado en Veterinaria**

Año 2020-2021

Modalidad de Trabajo: Experimental

## RESUMEN

La trucha común (*Salmo trutta*) es una especie piscícola de agua continental que habita en los ríos de la Península Ibérica. Esta especie tiene un alto valor como recurso genético, siendo importante su conservación. La Península Ibérica es un reservorio natural de esta especie.

Debido a la repoblación con truchas domesticadas de origen centroeuropeo, en muchos ríos de la Península Ibérica existe un cierto grado de introgresión con las poblaciones autóctonas, ésta se mide, principalmente, mediante el uso de un marcador genético específico, el locus LDH-C\*, que presenta alelos diagnóstico entre repobladores y poblaciones nativas ibéricas.

Desde 1997, algunos ríos pirenaicos fueron designados como refugios genéticos para proteger la diversidad genética de esta especie. En estos ríos fue prohibida la repoblación con truchas de origen centroeuropeo, aunque se mantienen las actividades relacionadas con la pesca. Algunas localidades son analizadas cada dos o tres años para monitorizar el impacto de la introgresión, debida, en su mayor parte, a la repoblación en ríos cercanos no pertenecientes a refugios genéticos. Además, también se monitorea la diversidad y estructura genética de las diferentes poblaciones mediante marcadores moleculares, con el fin de detectar diferencias genéticas entre las poblaciones nativas.

En total, 229 individuos pertenecientes a siete localizaciones muestrales (6 localidades en ríos pirenaicos y el Centro Piscícola Bagà, perteneciente a la Generalitat de Catalunya) fueron genotipados para 6 marcadores microsatélites y para el locus LDH-C\*, analizando así la diversidad genética, la estructura poblacional y la introgresión causada por la repoblación.

Los valores de diversidad genética fueron similares a los obtenidos en estudios anteriores realizados en esta zona y en otros ríos mediterráneos. Se encontraron diferencias significativas entre distintas cuencas, mientras que, entre localidades dentro de un mismo río las diferencias fueron mínimas, exceptuando el río Ter, en el cual se encuentra una población bastante introgresada, aumentando su diferenciación con respecto a las poblaciones nativas. En cuanto a la frecuencia del alelo LDH-C\*90 resultó ser nula en el río Noguera Pallaresa y alcanzó sus valores máximos en una de las poblaciones analizadas en el río Ter, siendo esta la más introgresada. A partir de los resultados obtenidos, finalmente, se expone la situación actual de las truchas pirenaicas y métodos para mantener la diversidad genética en los refugios genéticos.

Palabras clave: trucha común, conservación, impacto de la repoblación, refugios genéticos, loci microsatélites, locus LDH-C, diversidad genética, estructura poblacional, introgresión, frecuencia del alelo LDH-C\*90.

## RESUMO

A troita común (*Salmo trutta*) é una especie de auga continental que habita nos ríos da Península Ibérica. Esta especie ten un alto valor como recurso xenético, sendo importante a súa conservación. A Península Ibérica é un reservorio natural desta especie.

Por mor da repoboación con troitas de orixe centroeuropea, en moitos ríos da Península Ibérica existe un certo grao de introgresión, ésta mídese, principalmente, mediante o uso dun marcador específico, o locus LDH-C\*, o cal presenta alelos diagnóstico entre repoboadores e poboacións nativas ibéricas.

Dende 1997, algúns ríos pirenaicos foron designados como refuxios xenéticos, para protexer a diversidade xenética desta especie. Nestos ríos, foi prohibida a repoboación con troitas de orixe centroeuropea, aínda que se manteñen as actividades relacionadas coa pesca. Algunhas destas localidades son analizadas cada dous ou tres anos para monitorizar o impacto da introgresión, debida, na súa maior parte, á repoboación en ríos cercanos non pertencentes a refuxios xenéticos.

Ademáis, tamén se monitora a diversidade xenética e estrutura das diferentes poboacións, á fin de detectar diferenzas xenéticas entre as poboacións nativas.

En total, 229 individuos pertencentes a sete localizacións (6 localidades en ríos pirenaicos e mailo Centro Piscícola Bagà, pertencente á Generalitat de Cataluña) foron xenotipados para 6 marcadores microsatélites e para o locus LDH-C\*, analizando así a diversidade xenética, a estrutura poboacional e a introgresión causada pola repoboación.

Os valores de diversidade xenética foron similares aos obtidos en estudos anteriores realizados nesta zona e noutros ríos mediterráneos. Atopáronse diferenzas significativas entre distintas concas, mentres que, entre localidades dentro do mesmo río as diferenzas foron mínimas, exceptuando o río Ter, no cal atópase una poboación bastante introgresada, aumentando a súa diferenciación con respecto ás poboacións nativas. En canto a frecuencia do alelo LDH-C90\* resultou ser nula no río Noguera Pallaresa e alcanzou os seus valores máximos nunha das poboacións analizadas no río Ter, sendo ésta a máis introgresada.

Finalmente, expónse a situación actual das troitas pirenaicas e métodos para manter a diversidade xenética nos refuxios xenéticos.

Palabras clave: troita común, conservación, impacto da repoboación, refuxios xenéticos, loci microsatélites, locus LDH-C, diversidade xenética, estrutura poboacional, introgresión, frecuencia do alelo LDH-C90\*.

## ABSTRACT

The brown trout (*Salmo trutta*) is a freshwater species, that lives in the rivers of de Iberian Península. This species has an important value as a genetic resource, being its conservation important. The Iberian Peninsula is a natural reservoir for this species.

Due to the restocking with Central European origin trout, in many rivers of the Iberian Peninsula there is a certain degree of introgression, which is measured mainly through the use of a specific marker, the LDH-C locus, which presents diagnostic alleles between stocks and native populations.

Since 1997, some Pyrenean rivers have been designed as genetic refuges to protect the genetic diversity of this species. Restocking with Central European origin trout was prohibited in these rivers, although activities related to fishing continue. Some localities from these refuges are analysed every two or three years to monitor the introgression impact, mainly, due to restocking in nearby rivers that do not belong to genetic refuges.

Moreover, the genetic diversity and population structure is also monitored, in order to detect genetic differences between the native populations.

In total, 229 individuals belonging to seven sites (six locations from Pyrenean rivers and the Bagà hatchery, from Generalitat de Catalunya) were genotyped for six microsatellite markers and for the LDH-C\* locus, thus analyzing genetic diversity, population structure and introgression caused by restocking.

The genetic diversity values were similar to those obtained on previous studies found at this region and other Mediterranean rivers. Significant genetic differences between rivers were found, while, the differences between localities within rivers were lower, except within Ter river, where a high introgressed population was found, increasing its differentiation from native populations. The frequency of the LDH-C90\* allele (which suggests stocking activities) was null in Noguera Pallaresa river and its maximum value was reached in a population from Ter river.

Finally, the current status of Pyrenean brown trout is exposed and some methods to keep the genetic diversity at the genetic refuges are defined.

Key words: Brown trout, conservation, stocking impact, genetic refuges, microsatellite markers, LDH-C locus, genetic diversity, population structure, introgression, allele LDH-C90\* frequency.

**1. Introducción**

**1.1. Trucha común (*Salmo trutta*)**

**1.1.1. Factores que afectan a las poblaciones de trucha**

**1.2. Marcadores moleculares**

**1.2.1. Loci microsatélites**

**2. Objetivos del Trabajo de Fin de Grado (TFG)**

**3. Material y métodos**

**3.1. Material biológico**

**3.2. Extracción de ADN**

**3.3. Análisis de loci microsatélites**

**3.4. Amplificación de loci microsatélites mediante PCR *multiplex***

**3.5. Genotipado en secuenciador automático**

**3.6. Análisis del locus LDH-C\***

**3.6.1. Genotipado del locus LDH-C\* en gel de agarosa**

**3.7. Estimadores de diversidad genética**

**3.7.1. Riqueza alélica (RA)**

**3.7.2. Heterocigosis observada ( $H_o$ ) y heterocigosis esperada ( $H_e$ )**

**3.7.3. Coeficiente de consanguinidad**

**3.8. Equilibrio Hardy – Weinberg ( $H - W$ )**

**3.9. Análisis de estructura poblacional y diferenciación entre poblaciones**

**4. Resultados y discusión**

**4.1. Diversidad genética**

**4.2. Estructura genética**

**4.3. Estrategias de gestión y conservación**

**5. Conclusiones**

**6. Bibliografía**

## 1. Introducción

### 1.1. Trucha común (*Salmo trutta*)

La trucha común (*Salmo trutta*) es un pez de la familia Salmonidae, perteneciente al orden Salmoniformes. Es un pez de talla media que no suele superar los 100 cm de longitud y los 20 kg de peso. Posee dos aletas dorsales, la primera cuenta con un número de 9 a 11 radios ramificados y la otra es una aleta adiposa, próxima al extremo caudal. Las escamas que recubren su cuerpo son de muy pequeño tamaño y poseen entre 110 y 125 en la línea lateral. La coloración de estas es muy variable, pero normalmente poseen manchas negras o rojas oceladas por toda la superficie (Figura 1), a excepción de la aleta caudal (Kottelat y Freyhof, 2007).



Figura 1. Imagen de un ejemplar de trucha común (*Salmo trutta*).

Su alimentación consta de moluscos, invertebrados bentónicos, anfibios y otros peces de menor tamaño. A medida que aumentan su tamaño y pasan a adultos se convierten en ictiófagos (Hyatt, 1979; Hunter *et al.*, 1991).

En cuanto a su distribución natural, esta especie se extiende por Europa, el oeste de Asia, Atlántico noreste, Mar Báltico, Mar del Norte, Mar Mediterráneo, Mar Negro y Mar Caspio. A partir de 1863, por su interés para la pesca deportiva, fue introducida en numerosos sitios del mundo (Eschmeyer, 2010; Alonso *et al.*, 2010).

La trucha común es una especie ovípara, cuya reproducción es sexual y externa. El periodo de puesta se sitúa entre noviembre y enero. La puesta se deposita en la grava y el número de huevos oscila entre 1000 a 2000 por kg de peso. La incubación tiene una duración de 40 días. Esta especie alcanza la madurez sexual entre los 2 y 3 años de vida (Klemetsen *et al.*, 2003).

Existen dos formas de vida en relación con el comportamiento reproductivo de esta especie: la residente, que realiza todo su ciclo vital en el medio fluvial, y la anádroma o migratoria (trucha de mar o reo), que alcanza su madurez sexual en el medio marino para luego volver al río,

preferentemente a la zona en la que nacieron (proceso conocido como *homing*), en la época de reproducción (Berg y Berg, 1987; Elliot, 1989). La forma anádroma se distribuye en los ríos de vertiente Atlántica, por encima del paralelo 42° N (Bouza *et al.*, 1999), frente a la forma de vida residente en el área suratlántica ibérica y mediterránea. Además, las hembras son más frecuentemente anádromas, mientras que los machos siguen, con mayor frecuencia que las hembras, una estrategia de vida residente. Individuos anádromos y residentes pueden convivir y reproducirse entre ellos como parte de la misma población (Jonsson, 1989; Hindar *et al.*, 1991; Gibson, 1993; Hansen *et al.*, 2000). No hay una separación clara entre las historias de vida migratorias, así ejemplares de *S. trutta* previamente anádromos pueden adoptar posteriormente una historia de vida de agua dulce (Klemetsen *et al.*, 2003).

La península Ibérica representa un reservorio genético de trucha común (Suarez *et al.*, 2001). La mayoría de las poblaciones en este territorio son fruto de complejas historias evolutivas y el contacto entre linajes antiguos y adaptaciones locales (Antunes *et al.*, 2002, Sanz *et al.*, 2002; Snoj *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2010a).

Se han descrito hasta siete linajes matriarcales de trucha común mediante la utilización de ADN mitocondrial (ADNmt), distribuidos de manera geográfica a lo largo del rango de distribución natural de la especie. Estos siete linajes son el Adriático (AD), Atlántico (AT), Danubio (DA), Marmoratus (MA), Mediterráneo (ME), Tigris (TI) y Duero (DU) (Bernatchez, 2001; Susnik *et al.*, 2005; Vera *et al.*, 2010a; Cortey *et al.*, 2010). Cuatro de estos linajes (ME, AD, AT y DU) están presentes en las poblaciones nativas de trucha común de la Península Ibérica (Suarez *et al.*, 2001; Cortey *et al.*, 2004, 2009; Vera *et al.*, 2010a). Los linajes AT y DU se encuentran principalmente en los ríos atlánticos; mientras que ME y AD en los que desembocan al Mediterráneo. Hay evidencias que sugieren que el linaje DU podría ser un vestigio de una colonización ancestral, anterior al linaje AT, ahora más numeroso, y al ME y AD. Este linaje es endémico de la Península Ibérica, por lo que tiene un gran interés conservacionista (Vera *et al.*, 2010a; Vera *et al.*, 2015). Estos cuatro linajes colonizaron de forma natural la Península Ibérica y se distribuyeron siguiendo un complejo patrón resultante del aislamiento fruto de procesos de sequía que aíslan las diferentes cuencas hidrográficas, contactos secundarios con otros linajes y la reciente introducción de stocks foráneos (Sanz *et al.*, 2006).

Respecto a los ríos atlánticos, generalmente en los mediterráneos se observan mayores diferencias genéticas debidas al aislamiento de las poblaciones locales y a la distribución en mosaico de los linajes mayoritarios en esta zona (Cortey *et al.*, 2004), aunque, rondando el límite de reo, la diferenciación en ríos atlánticos también es importante, ya que este representa un conector entre cuencas (Bouza *et al.*, 1999). En los Pirineos se preservan las poblaciones mediterráneas más estables de trucha en la Península Ibérica (Almodovar *et al.*, 2012). En este área, los bajos niveles

de caudal durante el verano reducen el flujo genético entre las poblaciones, creciendo así las diferencias genéticas entre poblaciones vecinas (Cortey *et al.*, 2004, Araguas *et al.*, 2004, Vera *et al.*, 2010b, Fernández-Cebrián *et al.*, 2014).

### **1.1.1. Factores que afectan a las poblaciones de trucha**

Las amenazas a los ecosistemas fluviales, como el cambio climático, modificaciones en las cuencas, pérdida de hábitats y la transferencia de stocks de truchas de piscifactoría, las cuales se usaron para repoblaciones en ríos, están modificando los patrones estructurales de las poblaciones truchícolas de la Península Ibérica. Los ríos mediterráneos están más afectados por la variabilidad de las precipitaciones y, por tanto, del caudal debido a las grandes diferencias entre años húmedos y años de sequía (Trigo *et al.*, 2004). El cambio climático podría llegar a impedir la conexión entre poblaciones, aumentando el aislamiento, lo que aumentaría el riesgo de extinción de poblaciones locales durante este siglo (Almodovar *et al.*, 2012).

Además, las truchas peninsulares han sufrido introgresión debida a la hibridación con stocks de origen centroeuropeo (García-Marín *et al.*, 1999b; Aparicio *et al.*, 2005; Almodovar *et al.*, 2006; Vera *et al.*, 2018), utilizados para aumentar las poblaciones en ríos para la pesca, debido a su valor socioeconómico. Algunos marcadores genéticos han servido para monitorizar el impacto genético de la liberación de estos stocks foráneos. Estos marcadores demostraron que las truchas foráneas se han reproducido exitosamente con las poblaciones nativas, existiendo niveles variables de hibridación, sobre todo, cuando los individuos no fueron estresados por la pesca tras su liberación (García-Marín *et al.*, 1998). Entre ellos, el más utilizado ha sido el locus de la Lactato Deshidrogenasa C (LDH-C\*), ya que el alelo LDH-C100\* está fijado en las poblaciones nativas ibéricas, mientras que el alelo LDH-C90\* está fijado en el caso de las poblaciones centroeuropeas, de las que proceden los stocks de los centros piscícolas ibéricos (Martinez *et al.*, 1993) La introgresión tiende a ser mayor en localidades con aguas fértiles y descarga estable (Almodovar *et al.*, 2006). Al contrario que en los ríos Atlánticos, en los mediterráneos se ha observado una introgresión significativa (García-Marín *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2000, 2002, 2006; Araguas *et al.*, 2004). Se han descrito muchas consecuencias negativas, incluyendo la reducción de las poblaciones nativas y la pérdida de diversidad, lo que lleva, en algunos casos, al reemplazamiento total de las poblaciones nativas (Araguas *et al.*, 2004, 2017; Sanz *et al.*, 2006).

En el este de los Pirineos, la zona de la cuál proceden las muestras del presente trabajo, se ha observado en algunos estudios una introgresión del 1% por año (Araguas *et al.*, 2004). El porcentaje de introgresión genética a nivel general se ha estimado entre un 5% y un 10%, alcanzándose en España valores de hasta el 20% en algunas poblaciones, aunque el valor medio se sitúa en torno al 13,4%, observándose menor incidencia en ríos que en lagunas o embalses

(Martínez *et al.*, 1993; Almodóvar *et al.*, 2006; Vilas *et al.*, 2010; Preston *et al.*, 2013; Vera *et al.*, 2018).

Desde 1997, para aumentar las poblaciones nativas, el Gobierno de Cataluña creó refugios genéticos en algunos ríos del Pirineo catalán en los cuales no se encontró evidencia de introgresión o era muy reducida. En estos refugios la liberación de truchas está prohibida, pero se permite la pesca. Algunos estudios indican que el establecimiento de estos refugios no ha reducido la abundancia de alelos de repoblación, pero sí ha decrecido la velocidad de introgresión. En algunas zonas ha aumentado el número de alelos procedentes de poblaciones de piscifactoría (Araguas *et al.*, 2008, 2017), lo que puede deberse a migraciones de estas truchas liberadas en otras zonas no protegidas (García-Marín *et al.*, 1998).

En España, se ha prohibido recientemente la repoblación de poblaciones naturales con truchas de stock centroeuropeo (Artículo 52.2, Ley 42/2007 del Patrimonio Natural y la Biodiversidad). Algunas administraciones están reemplazando selectivamente estos individuos foráneos con individuos nativos y promoviendo traslocaciones de individuos salvajes (Fernández-Cebrián *et al.*, 2014), siguiendo las recomendaciones para una administración sostenible (Marco-Ruis *et al.*, 2013).

## **1.2. Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares de ADN son segmentos genómicos que tienen una ubicación física identificable en los cromosomas y cuya herencia es rastreable. Un marcador molecular puede ser un gen o, simplemente, una región del ADN sin función conocida, como, por ejemplo, los loci microsatélites utilizados en este trabajo.

### **1.2.1. Loci microsatélites**

Los loci microsatélites, STRs (*Short Tandem Repeats*) o SSR (*Simple Sequence Repeats*) son repeticiones en tándem de un número variable o VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) de secuencias de 2 a 6 pares de bases, pueden consistir en dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos e incluso penta y hexanucleótidos, el número de veces que se repite un segmento dentro de un locus se denomina n. Se trata de secuencias altamente variables entre y dentro de un mismo individuo, estas variaciones se manifiestan como diferencias en la longitud entre los distintos alelos de un mismo locus y surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones de estas secuencias. Un microsatélite está formado por este fragmento repetitivo y dos regiones flanqueantes. Para que un microsatélite sea útil, las regiones flanqueantes deben estar altamente conservadas, de forma que se puedan diseñar los cebadores o *primers*, los cuales tendrán la misma secuencia que éstas. Algunas de las principales características de los microsatélites son:

- Herencia mendeliana simple como marcadores codominantes, permitiendo la distinción entre homocigotos y heterocigotos.
- Gran polimorfismo y alta variabilidad alélica por locus.
- Correspondencia del marcador con un único locus genético, facilitando su genotipado.
- Potencial transferencia entre especies próximas genéticamente.
- Facilidad de tipificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) y el uso de cebadores o *primers* específicos.
- Facilidad de acceso e intercambio de microsatélites gracias al almacenamiento de las secuencias de los *primers* en bases de datos genómicas.

La detección de estos microsatélites se basa en la amplificación por PCR de la región que los contiene, empleando cebadores complementarios a las regiones flanqueantes.

Una ventaja de estos marcadores es que el tejido utilizado no necesita ser de mucha calidad e incluso ADN en estado avanzado de degradación es suficiente para ser analizado.

Sin embargo, existen algunos problemas en la interpretación a la hora del genotipado de estos marcadores, como son:

- La existencia de **alelos nulos**: esto ocurre cuando los cebadores no amplifican uno de los alelos debido a que la secuencia de unión al cebador o el mismo cebador no está bien conservada. Esto se refleja como un exceso en la detección de homocigotos.
- **Tartamudeo** o *Stuttering*: artefactos generados durante la reacción de PCR como consecuencia del deslizamiento (*slippage*) de la polimerasa. Esto se traduce en picos que, normalmente, tienen una unidad de repetición menos que el alelo real que los precede.
- **Pérdida alélica** o *Drop-out*: pérdida de alelos en un perfil genético al favorecerse la amplificación de un alelo en detrimento del otro cuando realmente hay heterocigosis. Suele deberse a una mala calidad del ADN o a una cantidad de ADN escasa.

## **2. Objetivos del trabajo de fin de grado (TFG)**

Los objetivos del presente trabajo fin de grado son:

- Estimar los niveles de diversidad genética en poblaciones de trucha común del Pirineo Catalán, utilizando diferentes marcadores moleculares (i.e. loci microsatélites y el locus LDH-C\*).
- Evaluar los niveles de introgresión genética procedente de repoblaciones realizadas con stocks de origen centroeuropeo criados en piscifactoría.
- Analizar la estructuración genética poblacional en la zona de estudio para la identificación de unidades poblacionales diferenciadas.
- Definir estrategias de gestión y conservación adecuadas para mantener los recursos genéticos naturales identificados.

### 3. Material y métodos

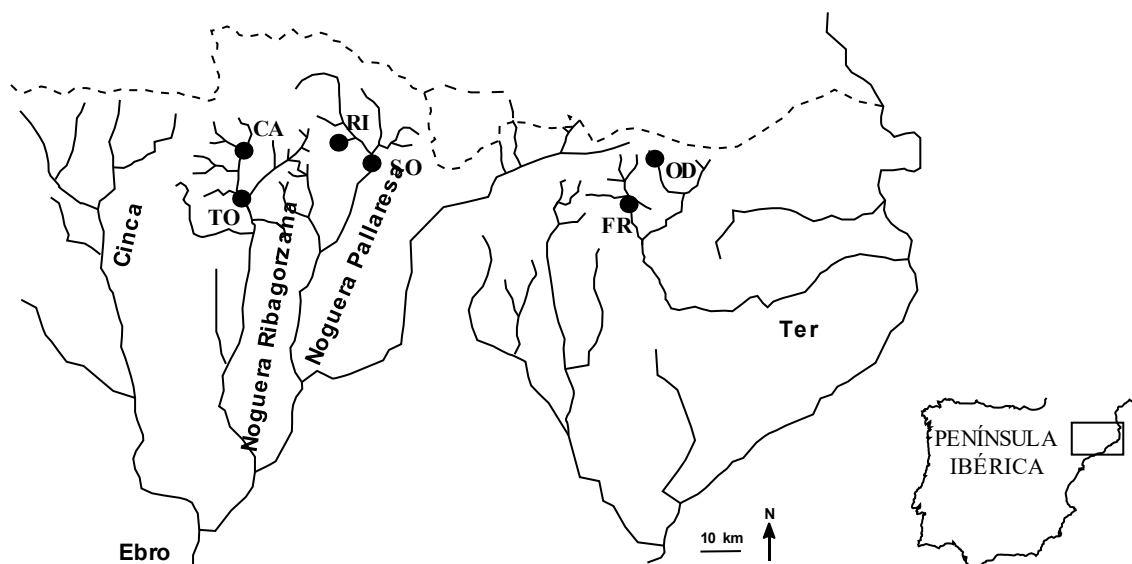
#### 3.1. Material biológico

Se analizaron un total de 229 ejemplares, de los que 180 pertenecen a poblaciones salvajes y 49 pertenecen al Centro Piscícola Bagà, cuyos ejemplares, de origen centroeuropeo (linaje AT), se han utilizado para las repoblaciones en la zona de estudio. Las localidades de las que se recogieron muestras para este trabajo aparecen reflejadas en la *Tabla 1*. Todas las muestras pertenecen a las campañas de monitorización de las poblaciones de trucha común que realiza la Generalitat de Catalunya y han sido cedidas por el Dr. José Luis García Marín de la Universitat de Girona.

*Tabla 1. Localidades analizadas en este trabajo. Se indica la localidad, el río, el código de las muestras dependiendo de su localidad, el número de individuos analizados (N) y las coordenadas UTM.*

Localidad	Cuenca	Código	N	UTMX	UTMY
Riu d'Òden	Río Ter	OD	30	441514	4689885
Freser	Río Ter	FR	30	431206	4676202
Rialp	Río Noguera Pallaresa	RI	30	348934	4702015
Sort	Río Noguera Pallaresa	SO	30	346501	4698393
Cardet	Río Noguera Ribagorzana	CA	30	317579	4706207
Castilló de Tor	Río Noguera Ribagorzana	TO	30	314322	4700258
Bagà	Centro Piscícola	BA	49		

Las muestras recogidas pertenecen al río Ter y de dos de los afluentes pirenaicos más importantes del río Ebro (Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana, ver *Figura 2*).



*Figura 2. Mapa de los puntos de muestreo utilizados en el presente trabajo. Los códigos de las localidades se muestran en la Tabla 1. La línea de guiones indica la frontera entre España, Francia y Andorra.*

### 3.2. Extracción de ADN

Para la obtención de ADN se utilizó una porción de la aleta adiposa de cada individuo a estudiar. Para su extracción se empleó el método de Chelex® (Walsh *et al.*, 1991). Este método se basa en la utilización de la resina Chelex-100, que tiene efecto quelante catiónico, lo que significa que secuestra moléculas con carga positiva, y protege al ADN de la ruptura a altas temperaturas. Esto sucede porque el ADN, debido a los grupos fosfato, tiene carga negativa, quedando en la fase acuosa separado de moléculas con carga positiva.

La resina se prepara al 10% y se calienta a 60°C. Las muestras de aleta, que llegan conservadas en etanol entre el 70% - 90%, se mezclan con 130 µL de resina por cada pocillo. Se lleva a la centrífuga para que la muestra y la resina se junten y, después, en el termociclador se programa a 100°C durante 15 minutos.

Una vez enfriados, a unos 18°C, se adiciona la Proteinasa K (PK, 4µL por pocillo a una concentración de 20 mg/ml) para eliminar proteínas del medio (como nucleasas, que degradarían el ADN) y se lleva de nuevo al termociclador, donde se programará 1 hora a 56°C, 15 minutos a 100°C y un enfriamiento a 18°C.

Finalmente, se centrifuga a 13000 revoluciones durante 10 segundos y se conserva en nevera (4°C) o en congelador (-20°C) hasta su utilización.

El ADN que se obtiene por este método no es totalmente puro, pero tiene una calidad suficiente para la realización de la PCR. Además, es un método rápido, barato, requiere de pocos reactivos y de poca cantidad de muestra y es sencillo de realizar en cualquier laboratorio. Cabe destacar que, al utilizarse una parte de la aleta adiposa, es un método mínimamente invasivo y no requiere del sacrificio de los individuos a muestrear.

### 3.3. Análisis de loci microsatélites

Para este estudio fueron seleccionados cinco microsatélites: SSHaeIII.14.20 (Goodier, no publicado), Ssa85 (O' Reilly *et al.*, 1996), SsoSL438 (Slettan *et al.*, 1996), Str591INRA (Presa y Guyomard, 1996), Str73INRA (Estoup *et al.*, 1993). Sus características principales se encuentran reflejadas en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Relación de loci microsatélites utilizados en este trabajo. Se indica su motivo de repetición, su secuencia de sus cebadores o primers para ser amplificados por PCR y su referencia bibliográfica.

Microsatélite	Motivo	Secuencias de primers	Referencia
<b>Str73INRA</b>	GT	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGTAAGTAGACCTA-3'	Estoup <i>et al.</i> 1993
<b>SsaHaeIII14.20</b>	GT	5'- QCTGCTATCACCTTGCTCTA -3' 5'- ATCTCTTCCTGGCTATTTG -3'	Goodier (no publicado) NºGenebank:U10050
<b>Ssa85</b>	GT	5'-AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC-3' 5'-ACCCGCTCCTCACTTAATC-3'	O'Reilly <i>et al.</i> 1996
<b>SsoSL438</b>	GT	5'-GACAACACACAACCAAGGCAC-3' 5'-TTATGCTAGGTCTTTATGCATTGT-3'	Slettan <i>et al.</i> 1996
<b>Str591INRA</b>	CT	5'-CTGGTGGCAGGATTTGA-3' 5'-CACTGTCTTTCGTTCTT-3'	Presa y Guyomard, 1996

Además de estos microsatélites, en este trabajo también se utilizó un marcador molecular específico de repoblación, el locus LDH-C\*. Este marcador permite diferenciar los individuos nativos, los cuales tienen el alelo LDH-C100\* fijado, de los individuos pertenecientes al stock centroeuropeo o descendientes de éstos, que presentan el alelo LDH-C90\* fijado o en heterocigosis, respectivamente.

### 3.4. Amplificación de loci microsatélites mediante PCR *multiplex*

Para la amplificación de los diferentes loci microsatélites a estudiar se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN deseado a partir de una sola molécula.

La técnica de PCR se basa en la acción de la enzima polimerasa, que permite la replicación celular para la síntesis de dos nuevas hebras a partir de una hebra molde. Para ello es necesaria la presencia de los *primers* que comenzarán la reacción.

La técnica de PCR consta de tres fases: primeramente, una **fase de desnaturalización inicial** a 94-96°C durante un tiempo que varía entre los 30 segundos y los 2 minutos, donde la doble hélice de ADN se separa al romperse los puentes de hidrógeno que mantienen unidas ambas hebras. La segunda fase es la **fase de hibridación o annealing**, donde los cebadores o *primers* se unen a sitios específicos complementarios de las hebras de ADN, previamente separadas (deben ser complementarios a estas regiones, pero no entre sí, para evitar la autoreplicación). La temperatura oscila entre los 40-60°C y puede durar desde 30 segundos a 1 minuto. La última fase es la de **extensión o elongación**, en la cual la ADN polimerasa realiza las copias de las dos hebras de ADN molde y crea dos moléculas de doble cadena. Durante esta fase la temperatura se eleva hasta

los 72°C (utilizando Taq polimerasa, ADN polimerasa termorresistente derivada de la bacteria termal *Thermus aquaticus*) y tiene una duración de entre 1 a 2 minutos. Estas tres fases se repiten durante un número determinado de ciclos (normalmente entre 25-30). En cada ciclo, el número de copias del fragmento deseado se duplica, obteniéndose millones de copias al final de la reacción.

La reacción de PCR se realiza en un equipo termociclador, en el cual se programan las temperaturas y los tiempos. El termociclador consta de un bloque térmico de metal que puede ser calentado y enfriado a gran velocidad y deben poseer una tapa térmica, de forma que no se evapore el contenido de las muestras.

En el análisis de los loci microsatélites se utilizó una reacción PCR *multiplex*, que permite la amplificación conjunta de los cinco marcadores.

Cada locus consta de dos cebadores, el Directo (o *Forward*) y el Reverso. Uno de ellos, en este caso el *Forward*, está marcado en su extremo 5' con distintos fluorocromos para su posterior análisis en el secuenciador automático (PET™, 6FAM™, VIC™ y NED™; Applied Biosystems). Cada uno de estos fluorocromos emite un color diferente. El marcaje de los distintos loci se selecciona en base al rango alélico de la especie, de forma que dos loci alejados en tamaño alélico pueden compartir el mismo fluorocromo en la misma reacción. Esto permite la lectura simultánea de diferentes marcadores amplificados, optimizando el mínimo número de reacciones y fluorocromos necesarios.

Para la realización de la PCR *multiplex*, se utilizó un volumen final de 9,5 µL, de los cuales 0,5 corresponden al ADN extraído por el método Chelex® y el resto corresponden a una mezcla en la cual, por cada pocillo, se añaden: 3 µL de agua milliQ (MQ), 5 µL de 2X (1,05 X) Master Mix Promega (donde se incluye el tampón, los dNTPs y el MgCl<sub>2</sub>) y 1 µL de 10X (1,05 X) del mix de *primers* (preparado con 1 µM (0,10 µM) de cada *primer* (*forward* y reverso) para SsHaeIII14.20 y Ssa85, 0,5 µM (0,05 µM) de cada *primer* de SsoSL438, 0,75 µM (0,08 µM) para Str73 y 4 µM (0,42 µM) para Str591).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cyler (Applied Biosystems) y constó del siguiente programa: 1) desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, 2) 30 ciclos de PCR (95°C durante 1 minuto, 54°C durante un minuto y 72°C durante 1 minuto), y 3) fase de extensión final a 72°C durante 15 minutos y 4) fase de enfriamiento a 12°C.

### 3.5. Genotipado en secuenciador automático

Para el genotipado de los fragmentos de ADN amplificados mediante la PCR *multiplex* se utilizó un secuenciador automático ABI PRISM® 3730 XL GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Se utilizaron los siguientes fluorocromos para cada uno de los loci microsatélite:

- Para el locus Str591, se usó VIC (color verde)
- Para SshaeIII14.20, VIC (verde)
- Para Str73, NED (amarillo)
- Para Ssa85, 6-FAM (azul)
- Para SsaSL-438, NED (amarillo)

Se usó el mismo marcador para dos loci (Str591INRA y SsHaeIII14.20), con rangos alélicos diferenciados en estudios previos en trucha común (Sanz *et al.*, 2009; Araguas *et al.*, 2017).

Antes de introducir la placa en el secuenciador, se deben desnaturalizar las muestras durante 2-3 minutos a 95°C en un termociclador y luego enfriarse a 12°C. Además, en el secuenciador, ningún pocillo debe entrar vacío ya que se quemaría el capilar, por ello, los pocillos que carezcan de muestra deberán rellenarse con agua MQ.

### 3.6. Análisis del locus LDH-C\*

El locus LDH-C\*, es un marcador muy utilizado para la identificación de repoblaciones en poblaciones naturales de trucha en la Península Ibérica (Martínez *et al.*, 1991; Vera *et al.*, 2013; Araguas *et al.*, 2017; Vera *et al.*, 2018). Para este locus hay dos posibles alelos: el alelo LDH-C100\*, que está fijado en las poblaciones nativas ibéricas de trucha común, y el alelo LDH-C90\*, fijado en las poblaciones de origen centroeuropeo. Por lo tanto, este marcador permite cuantificar el impacto de las repoblaciones realizadas con individuos del stock centroeuropeo del centro piscícola, estimando la frecuencia del alelo LDH-C90\* en las poblaciones naturales muestreadas.

Para análisis de este locus, se utiliza una PCR simple, con un volumen total de muestra de 24,4 µL, de los cuales 0,4 µL pertenecen al ADN molde obtenido mediante el método Chelex® y el resto a la mezcla de reacción. Esta mezcla está compuesta de: 14,87 µL de agua MQ, 5 µL de Buffer 5 X (1,02 X), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (0,77 µM), 2,5µL de dNTPs a 2 mM (0,20 µM), 0,34 µL del *primer* Ldh-5 Forward a 50 µM (0, 70 µM), 0,34 µL del *primer* Ldh-5 Reverso a 50 µM (0,70 µM) y 0,2 µL de TAQ a 5 u/ µL (0,04 u/µL).

En este caso, la reacción de PCR simple se produjo en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) y constó de las siguientes fases: 1) Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 2) 35 ciclos de PCR (95°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/ 1 min), y 3) extensión final a 72°C durante 10 min.

### 3.6.1. Genotipado del locus LDH-C\* en gel de agarosa

Para evaluar la amplificación, el método más usado es la visualización del fragmento amplificado mediante electroforesis en un gel de agarosa. En estos se produce la separación de los fragmentos de ADN en disolución al someterlos a un campo eléctrico.

Para realizar este método se coloca el gel de agarosa en una cubeta de electroforesis de forma que quede sumergido en el medio TBE (Tris-Borato-EDTA, 0,5x). El TBE es una sustancia tampón con un pH de 8, aproximadamente. Las moléculas de ADN, cuando se encuentran en un ambiente con pH superior a 5, se dotan de carga negativa, por lo que este medio permite que éstas se desplacen hacia el polo positivo.

Antes de testar todos los individuos, en un gel de agarosa pequeño, se testan unos 9 individuos, para comprobar la amplificación (bandas difusas/ ausentes).

Para la preparación del gel de agarosa pequeño se utilizaron 35 mL de Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA, 0,5x), 1 g de agarosa y 1,75 µL de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, 10000x). Este último reactivo es un agente intercalante de ADN que emite fluorescencia al ser excitado, lo que permite la visualización del ADN al ser iluminado en una lámpara de luz UV o azul.

En uno de los pocillos debe usarse un marcador de tamaño conocido, de forma que se pueda estimar la migración y el peso molecular, en este estudio se compararon las muestras con el marcador *Base Pair Ladder* (Invitrogen), que tiene distintas moléculas que difieren en tamaño en 100 pares de bases. Para ello, se añade 1 µL de este marcador, 1 µL de azul de bromofenol (10x) y 6 µL de agua MQ. En el resto de los pocillos se administran 7 µL de la PCR preparada anteriormente y 1 µL de azul de bromofenol (10x). De esta forma en todos los pocillos habrá el mismo volumen. El Azul de Bromofenol o Azul de Carga es una tinción que permite saber si se está administrando bien la PCR dentro del pocillo del gel de agarosa, además, también hace que la muestra se vaya al fondo del pocillo debido a su mayor densidad con respecto al tampón. Este reactivo viene comercialmente en polvo, al llegar al laboratorio se prepara con Xylene Cyanol (0,25 g) y Glicerol en agua al 30% (30 mL). Se añaden 0,25 g de Azul de Bromofenol.

Una vez que se han testado estos individuos y se ha comprobado que los productos de amplificación se ven claramente (y por tanto que la reacción PCR ha funcionado correctamente), se procede a la digestión de los fragmentos amplificados por PCR del locus en cada ejemplar para obtener un marcador de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP de sus

siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*; McMeel *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2018). Para ello, se hacen digestiones con la enzima de restricción Bse LI, que se encarga de cortar (o no) los fragmentos de ADN amplificados. Por cada pocillo, se administra la siguiente cantidad: 2,7µL de agua MQ, 1µL de tampón Tango 10 X (1 X), 0,3µL de enzima Bse LI de 10 unidades/µL (Thermo Scientific) (0,3 unidades/µL). De esta mezcla se añade a cada pocillo 4 µL, que contienen 6 µL de la PCR preparada anteriormente con el marcador LDH-C\*. Para realizar la digestión, se utiliza el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) y se programa a 55°C durante 2 horas y 30 min.

Para la preparación de un gel grande de agarosa en el análisis de todas las muestras, se utilizaron: 200 mL de Buffer TBE 0,5x, 2 g de agarosa y 10 µL de SYBR. Para testar a los individuos en el gel de agarosa, en uno de los pocillos del gel (preferentemente el central), se carga el marcador, en el resto se cargan las diferentes muestras (utilizando diferentes puntas de pipeta, ya que se trata de diferentes individuos). Después, se tapa la cubeta y se conectan los cables negro y rojo (correspondientes al polo negativo y positivo, respectivamente). Las muestras correrán siempre hacia el polo positivo, por lo tanto, habrá que ponerlas lo más cerca posible del cable negro (polo negativo). Se realiza la electroforesis a voltaje constante de 110 V. Para comprobar que está funcionando, observar que salgan burbujas de ambos lados de la cubeta. Este proceso tendrá una duración de al menos 20 minutos.

Una vez finalizado se comprobará el número y posición de las bandas para cada individuo y se genotipará conforme a si son homocigotos 100/100, 90/90 o heterocigotos 90/100. El alelo LDH-C100\* no presenta la diana de restricción de Bse LI, por lo tanto, el fragmento no se corta (fragmento de longitud 460 pb), mientras que el alelo LDH-C90\* sí la presenta, cortándose el fragmento amplificado en dos, uno de 360 y otro de 100 pb. Así, se puede asociar fácilmente los diferentes patrones observados a cada uno de los tres genotipos esperados, correspondiéndose el de una banda en 460 pb al homocigoto para el alelo LDH-C100\*, el de dos bandas (360 y 100 pb) al homocigoto para el alelo LDH-C90\* y el de tres bandas (460, 360 y 100 pb) al heterocigoto (*ver Figura 3*).

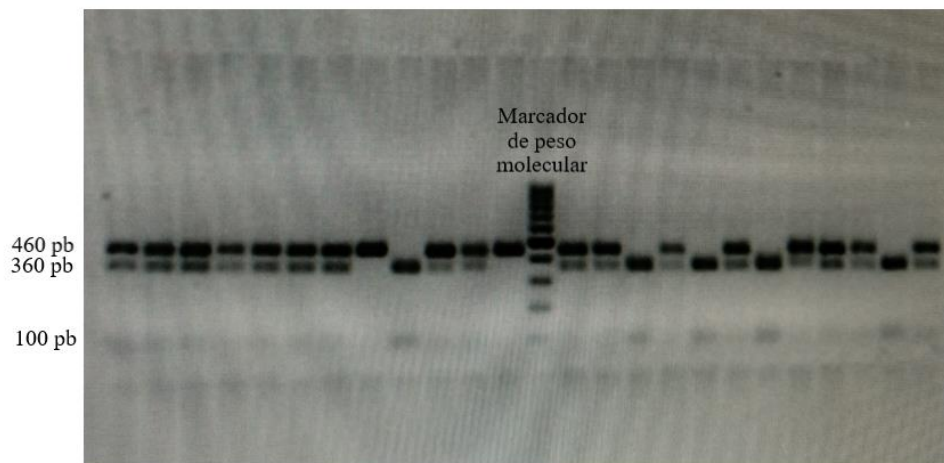


Figura 3. Imagen de un gel de agarosa para el marcador LDH-C\*. Aparecen individuos homocigotos para el alelo LDH-C100\* (banda superior; 460pb), homocigotos para el alelo LDH-C90\* (dos bandas inferiores; 360 pb y 100 pb) y heterocigotos (tres bandas). El marcador de peso molecular (carril central) se corresponde con un marcador con bandas que difieren 100 pb, siendo la menor de 100 pb.

### 3.7. Estimadores de diversidad genética

Los estimadores de diversidad genética (heterocigosis observada, heterocigosis esperada y coeficiente de consanguinidad) fueron calculados, por locus y población, mediante el programa GENEPOP v. 4.7.5 (Rousset, 2008). Después, se realizó un promedio sobre el total de loci para obtener valores medios por población. También se estimó el número de alelos (A) y la riqueza alélica (RA) por locus y población utilizando el programa FSTAT v 2.9.3 (Goudet, 2001).

#### 3.7.1. Riqueza alélica (RA)

La riqueza alélica (RA) estima el número de alelos por locus, ya que este se encuentra afectado por el tamaño muestral. Este valor está corregido para comparar entre distintos tamaños muestrales entre poblaciones. En este caso, se utiliza para comparar las poblaciones nativas con respecto a Bagá (N=49), ya que el resto de las poblaciones tienen un tamaño muestral de 30 individuos.

#### 3.7.2. Heterocigosis observada (Ho) y heterocigosis esperada (He)

Se considera que un locus es polimórfico al 99% cuando el alelo más común se observa en una frecuencia inferior a 0,99.

La **heterocigosis observada (Ho)** es la proporción de individuos heterocigotos en una muestra de una población determinada.

La **heterocigosis esperada (He)** es la proporción de heterocigotos que se esperaría en condiciones de Equilibrio Hardy-Weinberg y se calcula de la siguiente manera:

$He = 1 - \sum_{i=1}^n x_i^2$  (Nei, 1973; Nei *et al.*, 1987), donde  $x_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  y  $n$  el número de alelos.

### 3.7.3. Coeficiente de consanguinidad ( $F_{IS}$ )

El parámetro  $F_{IS}$  permite cuantificar el exceso o déficit de heterocigotos por locus en una población determinada respecto a las condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg. Este coeficiente se calcula de la siguiente manera:

$$F_{IS} = (He - Ho) / He$$

Si el valor de  $F_{IS}$  es negativo, habrá un exceso de heterocigotos, mientras que, si es positivo, existirá un defecto de heterocigotos en la población estudiada.

### 3.8. Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W)

La Ley de Hardy-Weinberg, formulada por Godfrey H. Hardy y Wilhelm Weinberg en 1908, estudia el efecto de la reproducción en las frecuencias alélicas y genotípicas de una determinada población. Según ésta, en una población grande bajo apareamiento aleatorio (panmixia), sin selección, mutación o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán constantes entre generaciones.

Para un mismo locus con dos alelos (A y B), cuyas frecuencias alélicas son  $p$  y  $q$ , respectivamente, las frecuencias de los genotipos de la progenie serían AA ( $p^2$ ), BB ( $q^2$ ) y AB ( $2pq$ ).

Pueden producirse desviaciones del Equilibrio Hardy-Weinberg por varios factores:

- Los apareamientos no se producen al azar
- Existen subdivisiones de las poblaciones (Principio de Wahlund)
- Antepasados comunes
- Selección natural (por ej., posible ventaja de los heterocigotos sobre los homocigotos)
- Migración
- Diferencias entre sexos
- Técnica de muestreo incorrecta
- Presencia de alelos nulos y errores de genotipado (*stuttering* y *drop-out*)

Si un locus se desvía significativamente de H-W en varias poblaciones puede que se haya producido una selección que afecte a este locus o, más probablemente, que existan alelos nulos. Si una población se desvía de H-W para un número variable de loci puede deberse a subdivisiones dentro de la población (efecto Wahlund), migración o a que los apareamientos no se producen al azar.

Para este trabajo se utilizó un test exacto de probabilidad mediante el uso del programa GENEPOP v. 4.7.5, testando las frecuencias genotípicas observadas y esperadas en condiciones de equilibrio H-W bajo un nivel de significación de 0,05 y aplicando la corrección de Bonferroni para tests múltiples (nivel de significación corregido = 0,05 / N° de loci estudiados).

### 3.9. Análisis de estructura poblacional y diferenciación entre poblaciones

Para el análisis de la estructura poblacional se utilizaron los estadísticos F o índices de fijación (Wright, 1969). Estos estadísticos descomponen la diversidad genética total observada ( $H_T$ ) en:

- Diversidad intrapoblacional ( $H_S/H_T$ ), en donde  $H_T$  es la heterocigosis esperada en la población total y  $H_S$  la heterocigosis esperada en cada subpoblación.
- Diversidad interpoblacional ( $F_{ST}$ ; Nei, 1973). El  $F_{ST}$  es el coeficiente relativo de diferenciación poblacional y analiza la diferenciación entre las diferentes subpoblaciones estudiadas con respecto al total. Se calcula de la siguiente manera:  $(H_S - H_T) / H_T$ . El valor oscila entre un mínimo de 0, que indicaría que las subpoblaciones son idénticas, es decir, que no existe diferenciación genética entre subpoblaciones, y un máximo de 1, cuando hay fijación de alelos alternativos en las diferentes subpoblaciones. Este valor puede desglosarse en  $F_{SC}$ , que indica la diferenciación entre poblaciones dentro de grupos poblacionales y  $F_{CT}$ , que identifica la diferenciación entre grupos.

Los valores de  $F_{ST}$  por locus, por pares de poblaciones y global en el total de poblaciones se estimaron con el programa FSTAT v 2.9.3, calculándose su significación con 10.000 permutaciones. Para obtener los valores de los diferentes estadísticos F de Wright se utilizó el análisis de varianza molecular (AMOVA), implementado en el programa ARLEQUIN v 3.5.2 (Excoffier *et al.*, 2005). Este es un método estadístico que permite realizar un análisis jerárquico de la diversidad genética, permitiendo analizar las diferencias genéticas totales entre las poblaciones ( $F_{ST}$ ) entre poblaciones dentro de grupo ( $F_{SC}$ ) o entre grupos poblacionales ( $F_{CT}$ ), creados *a priori*. Así, el método de agrupación se aplicó a las poblaciones silvestres (OD, FR, RI, SO, CA y TO) por cuenca. Un primer grupo estuvo formado por las poblaciones OD y FR, pertenecientes al río Ter; el segundo grupo por RI y SO, que pertenecen al río Noguera Pallaresa, y el tercer grupo formado por CA y TO, del río Noguera Ribagorzana. Para este estudio se excluyeron las muestras del Centro Piscícola Bagà (BA). El valor de significación de todos los

estadísticos se testó utilizando 10.000 permutaciones. Además, se realizaron los cálculos teniendo en cuenta todos los marcadores y excluyendo el locus LDH-C\*.

Finalmente, se utilizó el método Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE v 2.3.4. (Falush *et al.*, 2007) para estimar el número de unidades poblacionales (K) presentes en la zona de estudio. Este método minimiza el desequilibrio de ligamiento y de HW dentro de los grupos creados. Los valores de K testados fueron de 1 hasta 7 (número de poblaciones + 1), realizándose cinco réplicas para cada valor de K testado. Para cada réplica, se utilizó un período de calentamiento (*burn-in*) de 50.000 pasos seguido por 200.000 réplicas de Monte Carlo. El valor más probable de K se estimó siguiendo el método de Evanno *et al.* (2005) utilizando el programa STRUCTURE HARVESTER v 0.6.94 (Earl y vonHoldt, 2012). Las representaciones gráficas de los resultados de STRUCTURE se obtuvieron mediante la aplicación web CLUMPAK (Kopelman *et al.*, 2015), para agrupar los resultados de las diferentes réplicas de cada valor de K en una única gráfica.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Diversidad genética

A partir de los genotipos de los marcadores microsatélites y el locus LDH-C\* (*Anexo I*), se estimaron las frecuencias génicas en las distintas poblaciones analizadas (*Tabla 3*).

Para el locus SsHaeIII14.20 se han encontrado 15 alelos comprendidos en un rango de 294 a 338 pares de bases (pb). Las frecuencias de los diferentes alelos por población se encuentran entre 0,000 y 0,900 (alelo 298, población OD). Se han encontrado, en total, 5 alelos privados, que son los siguientes (entre paréntesis sus frecuencias): 294 en la población RI (0,017), 320 en la población TO (0,017), 334 en BA (0,031), 336 en FR (0,033) y 338 en BA (0,010). Estos alelos privados se encuentran solamente en esa población, teniendo una frecuencia de 0 en el resto.

Para el locus Ssa85 se han encontrado 10 alelos diferentes, con tamaño entre 100 y 118 pb. Las frecuencias observadas por población se encuentran en un rango de 0,000 a un máximo de 0,531 (alelo 112 en la población BA). En total, se encontraron 2 alelos privados, que son: alelo 100 en la población OD y alelo 118 en TO, ambos con una frecuencia de 0,017.

En cuanto al locus SsoSL438, fueron identificados 7 alelos, con un rango entre 89 y 105 pb. Las frecuencias alélicas poblacionales se encontraron en un rango entre 0,000 y 0,483 (alelo 97 en la población TO). Se encontró un solo alelo privado, el alelo 89 en la población FR, con una frecuencia de 0,100 en esta población.

Para el locus STR591INRA, se cuantificaron, en total, 18 alelos, comprendidos en un rango entre 148 y 196 pb. Sus frecuencias se encontraron entre 0,000 y 0,918 (alelo 148 en BA). En total, se observaron 6 alelos privados: alelo 164 en la población SO (frecuencia = 0,050); alelo 168 en BA (0,020); 184 en RI (0,017) y alelos 186, 188 y 192 en la población FR (0,100, 0,233 y 0,033, respectivamente).

En cuanto al locus STR73INRA, fueron observados 5 alelos comprendidos entre los 138 y 146 pb. La máxima frecuencia encontrada fue de 0,917, para el alelo 142 en la población OD. No fue encontrado ningún alelo privado en las poblaciones estudiadas.

En el caso del locus LDH-C\*, se detectaron dos alelos, que, como ya se ha comentado anteriormente, se encuentran fijados, en el caso del alelo LDH-C90\*, en las poblaciones de Centro Europa y stocks de piscifactoría, y, en el caso del alelo LDH-C100\*, en las nativas. Como era de esperar, en la población BA, procedente de la piscifactoría de Bagà, se encontró una frecuencia de 1,000 para el alelo LDH-C90\* (i.e. población fijada para este alelo), concordante con su origen alóctono respecto a poblaciones ibéricas. Las poblaciones RI y SO, pertenecientes al río Noguera Pallaresa, tienen una frecuencia de 1,000 para el alelo LDH-C100\*, lo que sugeriría que presentan componente nativo ibérico. En el resto de las poblaciones (OD, FR, CA y TO), existe un cierto

grado de hibridación entre acervos genéticos nativos y de repoblación, siendo la población FR la más introgresada, con una frecuencia de 0,300 para el alelo LDH-C90\*, y OD, la menos introgresada de estas cuatro, con una frecuencia de 0,017 para este mismo alelo.

Tabla 3. Frecuencias génicas por locus microsatélite y población. Se indica el número de individuos que fueron genotipados (N). Para cada locus se indican los alelos detectados (primera columna) y sus frecuencias en las distintas poblaciones analizadas. En negrita se resaltan las frecuencias de los alelos privados (encontrados en una única población).

<b>SsHaeIII14.20</b>	<b>OD</b>	<b>FR</b>	<b>RI</b>	<b>SO</b>	<b>CA</b>	<b>TO</b>	<b>BA</b>
N	30	30	30	30	30	30	49
294	0,000	0,000	<b>0,017</b>	0,000	0,000	0,000	0,000
298	0,900	0,433	0,367	0,450	0,500	0,433	0,031
300	0,017	0,400	0,400	0,383	0,167	0,317	0,000
302	0,000	0,000	0,183	0,150	0,033	0,033	0,000
308	0,050	0,000	0,017	0,017	0,150	0,150	0,000
312	0,017	0,033	0,017	0,000	0,033	0,017	0,276
320	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,017</b>	0,000
322	0,000	0,067	0,000	0,000	0,017	0,000	0,286
324	0,017	0,033	0,000	0,000	0,067	0,017	0,224
326	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,010
328	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,122
330	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,010
334	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,031</b>
336	0,000	<b>0,033</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
338	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,010</b>
<b>Ssa85</b>							
N	30	30	30	30	30	30	49
100	<b>0,017</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
102	0,117	0,067	0,067	0,033	0,000	0,000	0,000
104	0,050	0,017	0,017	0,150	0,183	0,133	0,071
106	0,300	0,083	0,100	0,067	0,000	0,000	0,020
108	0,383	0,417	0,250	0,217	0,067	0,150	0,020
110	0,067	0,283	0,317	0,317	0,450	0,367	0,184
112	0,067	0,133	0,250	0,217	0,150	0,200	0,531
114	0,000	0,000	0,000	0,000	0,133	0,133	0,122
116	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,051
118	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,017</b>	0,000
<b>SsoSL438</b>							
N	30	30	30	30	30	30	49
89	0,000	<b>0,100</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
95	0,033	0,117	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
97	0,267	0,133	0,133	0,133	0,433	0,483	0,143
99	0,250	0,600	0,433	0,450	0,050	0,050	0,408
101	0,200	0,033	0,250	0,317	0,383	0,300	0,082
103	0,250	0,017	0,183	0,100	0,083	0,067	0,122
105	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,100	0,245

<b>Str591INRA</b>							
N	30	30	30	30	30	30	49
148	0,000	0,167	0,017	0,000	0,067	0,100	0,918
150	0,017	0,050	0,000	0,000	0,133	0,017	0,051
162	0,200	0,000	0,217	0,133	0,083	0,000	0,000
164	0,000	0,000	0,000	<b>0,050</b>	0,000	0,000	0,000
166	0,450	0,000	0,167	0,217	0,267	0,200	0,000
168	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,020</b>
170	0,000	0,000	0,233	0,200	0,000	0,000	0,000
172	0,000	0,000	0,083	0,067	0,067	0,100	0,010
174	0,000	0,000	0,017	0,033	0,017	0,067	0,000
176	0,050	0,000	0,050	0,083	0,350	0,467	0,000
178	0,000	0,000	0,017	0,033	0,017	0,000	0,000
180	0,050	0,000	0,183	0,150	0,000	0,017	0,000
182	0,233	0,417	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
184	0,000	0,000	<b>0,017</b>	0,000	0,000	0,000	0,000
186	0,000	<b>0,100</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
188	0,000	<b>0,233</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
192	0,000	<b>0,033</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
196	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,033	0,000
<b>Str73INRA</b>							
N	30	30	30	30	30	30	49
138	0,000	0,000	0,000	0,000	0,133	0,400	0,000
140	0,033	0,483	0,667	0,717	0,633	0,517	0,102
142	0,917	0,350	0,333	0,283	0,117	0,067	0,173
144	0,033	0,050	0,000	0,000	0,050	0,000	0,306
146	0,017	0,117	0,000	0,000	0,067	0,017	0,418
<b>LDH-C*</b>							
N	30	30	30	30	30	30	49
90	0,017	0,300	0,000	0,000	0,117	0,133	1,000
100	0,983	0,700	1,000	1,000	0,883	0,867	0,000

En la *Tabla 4* se presentan los resultados de diversidad alélica para los 5 microsatélites estudiados y el locus LDH-C\*. Todos los microsatélites son polimórficos, es decir, se ha encontrado más de un alelo en todos ellos. El número de alelos por locus (A) en las poblaciones se encuentra entre un mínimo de 2, en el caso del locus Str73INRA en las poblaciones RI y SO, y un máximo de 10 alelos, para el locus Str591INRA en esas mismas poblaciones. El número de alelos medio por población se encuentra en un rango entre 5,2, en la población SO, y 6,6, en la población CA. En el caso del locus LDH-C\*, el número de alelos varía entre 1, en las poblaciones donde se encuentra fijada una de las variantes (RI, SO y BA) y 2, en las poblaciones con heterocigosis (OD, FR, CA y TO).

Los valores de riqueza alélica (RA) por locus se encuentran comprendidos entre 2 (Str73INRA en RI y SO) y 10 (Str591INRA en RI y SO) y el valor promedio poblacional de la riqueza alélica

se sitúa entre 5,2 en SO y 6,6 en CA. En el caso del LDH, los valores de riqueza alélica se encuentran entre 1 (RI, SO y BA) y 2 (OD, FR, CA y TO).

La heterocigosis esperada ( $H_e$ ) por locus se encuentra en un rango entre 0,160, en el caso del locus Str73INRA para la población OD, y 0,869, para el locus Str591INRA en la población SO. Los valores medios por población de  $H_e$  se encuentran entre 0,519 (OD) y 0,693 (RI). La heterocigosis esperada en el caso del locus LDH-C\* es nula en las poblaciones RI, SO y BA, y se encuentra entre 0,209 (CA) y 0,430 (FR) en las poblaciones con presencia de ambos alelos (OD, FR, CA y TO). Por otra parte, la heterocigosis observada ( $H_o$ ) se encuentra entre 0,100, para el locus SsHaeIII14.20 en la población OD, y 0,933, en la población SO para el locus Str591INRA.

En el caso de estudios realizados en Galicia por Vera *et al.* (2018), el número medio de alelos por locus y población abarca un rango mucho mayor (1-19) que el detectado en la zona pirenaica estudiada. Ocurre lo mismo para la riqueza alélica y la heterocigosis esperada. Sin embargo, en muestras de la cuenca del río Sil, una población presentaba varios loci monomórficos (Str58, Str60, Str543, Str591 y Ssa197), es decir, con un único alelo detectado (Vera *et al.*, 2018), mientras que todos los marcadores moleculares resultaron polimórficos para todas las poblaciones en el presente trabajo. Los niveles de diversidad son similares a los obtenidos con los mismos loci microsatélite en el Pirineo Catalán en estudios previos (Araguas *et al.*, 2017).

En la *Tabla 4* se recogen también los marcadores que se desvían del equilibrio Hardy-Weinberg en cada población. Siete de los 42 test para los loci microsatélite se desviaron significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg (HW) después de aplicar la corrección de Bonferroni ( $P = 0,0083$ ). Estos desequilibrios se encontraron en: el locus SsHaeIII14-20, poblaciones OD y BA; en Ssa85, población OD; en SsoSL438, poblaciones OD, RI y SO y en Str591INRA, población OD. OD es la población en la que se encuentran más valores significativos (4). En el resto de las poblaciones (FR, CA y TO) no se encontraron desviaciones significativas del equilibrio HW ( $P > 0,0083$ ). Estudios anteriores utilizando los mismos loci microsatélites, mencionan la presencia de exceso de homocigotos para el locus SsoSL438 y la existencia de alelos nulos y exceso de homocigotos en el caso del locus Str591INRA, como posibles causas de la desviación del equilibrio H-W en éstos (Araguas *et al.*, 2017). Sin embargo, como ninguna población se vio altamente afectada sobre loci, Araguas *et al.* (2017) utilizaron todos los marcadores moleculares para los posteriores análisis, tal y como se ha realizado en el presente estudio.

En cuanto al coeficiente de consanguinidad ( $F_{IS}$ ), teniendo en cuenta los valores que se desviaron significativamente del equilibrio H-W ( $P < 0,0083$ ), para el locus SsHaeIII14-20, en la población OD, se detectó un defecto de heterocigotos y en la población BA, un exceso de heterocigotos, compatible con la premisa de que esta última población pertenece a un centro piscícola y los cruzamientos dirigidos podrían aumentar el número de heterocigotos en los stocks. Para el locus

Ssa85, también se encuentra defecto de heterocigotos en la población OD. En cuanto al locus SsoSL438, se observó defecto de heterocigotos en las poblaciones OD, RI y SO. En el locus Str591INRA también se observó defecto de heterocigotos para la población OD. Para el locus Str73INRA y el marcador específico de repoblación LDH-C\*, no se encontraron valores significativos, lo cual podría sugerir panmixia entre repobladores nativos.

Tabla 4. Valores promedios por locus y población. Se indica en negrita el locus microsatélite y el código de población. Se releja el número de alelos encontrado en cada población para cada locus (A), la riqueza alélica (RA), la heterocigosis esperada (He), la heterocigosis observada (Ho), el equilibrio Hardy-Weinberg (HW) y el coeficiente de consanguinidad ( $F_{IS}$ ) (marcados los significativos con \*).

		<b>OD</b>	<b>FR</b>	<b>RI</b>	<b>SO</b>	<b>CA</b>	<b>TO</b>	<b>BA</b>
<b>SsHaeIII14</b>	A	5	6	6	4	9	8	9
	RA	5,000	6,000	6,000	4,000	9,000	8,000	7,726
	He	0,191	0,654	0,683	0,637	0,703	0,702	0,782
	Ho	0,100	0,733	0,667	0,700	0,733	0,534	0,836
	HW	0,008*	0,920	0,557	0,835	0,439	0,015	0,001*
	$F_{IS}$	0,478*	-0,121	0,024	-0,098	-0,043	0,240	-0,070*
<b>Ssa85</b>	A	7	6	6	6	6	6	7
	RA	7,000	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000	6,696
	He	0,755	0,730	0,774	0,791	0,730	0,779	0,667
	Ho	0,467	0,633	0,700	0,800	0,766	0,867	0,734
	HW	0,000*	0,391	0,113	0,103	0,647	0,735	0,013
	$F_{IS}$	0,382*	0,133	0,096	-0,012	-0,050	-0,113	-0,101
<b>SsoSL438</b>	A	5	6	4	4	5	5	5
	RA	5,000	6,000	4,000	4,000	5,000	5,000	5,000
	He	0,776	0,608	0,713	0,683	0,664	0,671	0,739
	Ho	0,767	0,567	0,567	0,625	0,700	0,633	0,755
	HW	0,000*	0,015	0,000*	0,008*	0,639	0,282	0,022
	$F_{IS}$	0,012*	0,068	0,205*	0,086*	-0,055	0,057	-0,022
<b>Str591INRA</b>	A	6	6	10	10	8	8	4
	RA	6,000	6,000	10,000	10,000	8,000	8,000	3,457
	He	0,713	0,744	0,841	0,869	0,785	0,726	0,155
	Ho	0,534	0,700	0,800	0,933	0,800	0,833	0,163
	HW	0,001*	0,283	0,194	0,310	0,013	0,700	1,000
	$F_{IS}$	0,252*	0,059	0,049	-0,074	-0,019	-0,147	-0,054
<b>Str73INRA</b>	A	4	4	2	2	5	4	4
	RA	4,000	4,000	2,000	2,000	5,000	4,000	4,000
	He	0,160	0,639	0,452	0,415	0,571	0,581	0,697
	Ho	0,167	0,634	0,467	0,300	0,534	0,400	0,775
	HW	1,000	0,425	1,000	0,180	0,345	0,024	0,405
	$F_{IS}$	-0,043	0,008	-0,033	0,277	0,066	0,312	-0,113
<b>LDH-C*</b>	A	2	2	1	1	2	2	1
	RA	2,000	2,000	1,000	1,000	2,000	2,000	1,000
	He	0,033	0,430	0,000	0,000	0,209	0,234	0,000

	Ho	0,033	0,433	no info	no info	0,233	0,266	no info
	HW	no info	0,074	no info	no info	1,000	1,000	no info
	F <sub>IS</sub>	no info	0,380	no info	no info	-0,115	-0,137	no info
<b>Media</b>	A	5,400	5,600	5,600	5,200	6,600	6,200	5,800
	RA	5,400	5,600	5,600	5,200	6,600	6,200	5,376
	He	0,519	0,675	0,693	0,679	0,691	0,692	0,608
	Ho	0,407	0,616	0,646	0,643	0,715	0,668	0,652
	HW	<6,15e-013**	0,068	0,000*	0,025	0,290	0,070	<8,11e-016**
	F <sub>IS</sub>	0,216	0,088	0,068	0,053	-0,036	0,035	-0,072

En la *Tabla 5* se presentan resumidos los valores promedio de diversidad genética por población. El número de alelos medio por población oscila entre 5,200 (SO) y 6,600 (CA) (*Tabla 5*). La riqueza alélica también se encuentra en este mismo rango. La heterocigosis observada (Ho) fue mínima en la población OD, con un valor de 0,407 y máxima en la población CA, donde su valor fue de 0,715. En cuanto a la heterocigosis esperada (He), su valor mínimo también se encontró en la población OD, con 0,519, sin embargo, su valor máximo fue de 0,693, en la población RI. El coeficiente de consanguinidad (F<sub>IS</sub>) promedio sobre loci indica que hay un exceso de heterocigotos en las poblaciones BA y CA, solo significativo en BA (*Tabla 4*).

Comparando estos resultados con estudios previos en la zona de los Pirineos se comprueba que el número de alelos mínimo es mayor (5,200) que el encontrado anteriormente (2,500), la riqueza alélica y la heterocigosis esperada también es mayor en el presente estudio que en el previo realizado por Araguas *et al.*, (2017), el cual cubría básicamente poblaciones en refugios genéticos y zonas adyacentes. En el caso de estudios realizados en Galicia, la riqueza alélica por población alcanzó un mínimo de 1,6 (Vera *et al.*, 2018), siendo este un valor mucho más bajo que el mínimo obtenido en este estudio (5,200). Esto se puede deber a la existencia de una población prácticamente aislada en la zona del río Sil, la cual, muy probablemente, se originó a partir de una sola pareja de ejemplares de trucha común (Vera *et al.*, 2018). Este grado de aislamiento no se ha comprobado para ninguna población en el presente trabajo en el Pirineo Catalán. Los resultados obtenidos en este estudio para los distintos estimadores de diversidad genética (número de alelos, riqueza alélica y heterocigosis esperada) son mucho más similares a los obtenidos en la zona del sureste de la Península Ibérica en poblaciones mediterráneas de la Comunidad Valenciana (Vera *et al.*, 2013).

En cuanto a la frecuencia del alelo LDH-C90\* (F LDH-C90\*; *Tabla 5*), se encontró el valor máximo en BA, ya que, como se ha mencionado anteriormente, estos individuos pertenecen al Centro Piscícola Bagà y tienen un origen centroeuropeo, siendo esta frecuencia del 100%. En cuanto a las poblaciones silvestres, se encontró la máxima introgresión en la población FR, perteneciente al río Ter, en la cual, hay una frecuencia del 30% para dicho alelo. En las

poblaciones RI y SO no se detectó la presencia del alelo LDH-C90\*, por lo que se considera que estas poblaciones, pertenecientes al río Noguera Pallaresa, mantienen su genoma completamente nativo. Es muy importante tener esto en cuenta a la hora de realizar acciones para mejorar la diversidad genética, ya que ríos como el Noguera Pallaresa deberían ser monitorizados y especialmente protegidos para evitar la introgresión y, en ríos como el Ter, será necesario implementar medidas para disminuir la introgresión genética e impedir que la introgresión existente en la población FR se difunda a otras localidades.

La introgresión representa una amenaza para la conservación de especies debido a la pérdida de las adaptaciones locales (Hansen, 2002; Nicola & Almodovar, 2002). Estos resultados se asemejan a los obtenidos en estudios realizados en ríos que desembocan en la vertiente mediterránea de la Península Ibérica (Vera *et al.*, 2013). Vera *et al.* (2013) también encontraron solamente dos poblaciones aparentemente nativas en muestras valencianas, con el alelo LDH-C100\* fijado. Además, encontraron una población capturada en medio natural en la cual el alelo LDH-C90\* estaba fijado, siendo una población de piscifactoría naturalizada. Esta situación no se detectó en el presente trabajo, donde la máxima frecuencia del alelo LDH-C90\* encontrada en una localidad fue del 30% en la población FR.

Sin embargo, comparando estos resultados con estudios en Galicia (Vera *et al.*, 2018), en el presente trabajo se encuentra una mayor proporción de poblaciones introgresadas y una mayor frecuencia del alelo LDH-C90\* en general. Estos resultados son esperados, ya que estudios previos en la Península Ibérica muestran un mayor impacto de las repoblaciones en la cuenca Mediterránea que Atlántica (Almodóvar *et al.*, 2006, Bouza *et al.*, 1999, 2000), aunque también importante en cuencas de áreas fluviales gallegas con clima mediterráneo e hidrología estacional inestable (Vera *et al.*, 2018).

Si se comparan los datos obtenidos en esta misma zona, concretamente en el río Ter (OD y FR), se observa que, en anteriores estudios, la frecuencia del alelo LDH-C90\* era nula hasta el año 2014 (Araguas *et al.*, 2017). Sin embargo, actualmente, la población FR representa la población con mayor frecuencia de este alelo (30%), esto indica un aumento de la introgresión, ocasionado posiblemente por repoblación con truchas de origen centroeuropeo presentes en zonas contiguas por repoblaciones pasadas o por repoblación ilegal. Esta situación es preocupante ya que, en estudios anteriores se había demostrado que las poblaciones del río Ter se mantuvieron totalmente nativas durante 24 años de monitoreo (Araguas *et al.*, 2017).

Tabla 5. Niveles de diversidad genética poblacional promedios. Se refleja el número de individuos genotipados (N), el número de alelos observados (A), la riqueza alélica (RA), la heterocigosis observada (Ho), la heterocigosis esperada (He), el coeficiente de hibridación ( $F_{IS}$ ) y la frecuencia del alelo LDH-C90\* ( $F_{LDH-C90*}$ ).

	N	A	RA	Ho	He	$F_{IS}$	F LDH-C90*
<b>OD</b>	30	5,4	5,4	0,407	0,519	0,216	0,017
<b>FR</b>	30	5,6	5,6	0,616	0,675	0,088	0,300
<b>RI</b>	30	5,6	5,6	0,646	0,693	0,068	0,000
<b>SO</b>	30	5,2	5,2	0,643	0,679	0,053	0,000
<b>CA</b>	30	6,6	6,6	0,715	0,691	-0,036	0,117
<b>TO</b>	30	6,2	6,2	0,668	0,692	0,035	0,133
<b>BA</b>	49	5,8	5,4	0,652	0,608	-0,072	1,000

#### 4.2. Estructura genética

El coeficiente de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) global en la zona de estudio (media  $\pm$  desviación estándar) fue de  $0,262 \pm 0,211$  ( $P < 0,001$ ). El rango de valores de  $F_{ST}$  por locus varió desde 0,086 detectado en el locus Ssa85 hasta 0,663 en el locus LDH-C\*, indicando el enorme peso del locus LDH-C\* en la diferenciación poblacional (Tabla 6). Cuando exclusivamente se tuvo en cuenta los loci microsatélites, el valor de  $F_{ST}$  se redujo hasta  $0,224 \pm 0,086$  (Tabla 6).

Comparando esta diferenciación con estudios realizados anteriormente en la misma zona, la diferenciación genética era ligeramente inferior ( $F_{ST} = 0,244 < 0,262$ ; Araguas *et al.*, 2017), lo que puede ser debido a que se han analizado un menor número de localidades en el presente trabajo. El valor de  $F_{ST}$  obtenido en este trabajo es muy similar al obtenido en ríos valencianos (0,2268; Vera *et al.*, 2013), sin embargo, en ríos gallegos este valor es superior (0,289; Vera *et al.*, 2018).

Tabla 6. Valores de heterocigosis total ( $H_T$ ), heterocigosis en cada subpoblación ( $H_S$ ) y el coeficiente de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ). Todos los valores de  $F_{ST}$  fueron significativos ( $P < 0,001$ ).

Locus	$H_S$	$H_T$	$F_{ST}$
SsHaeIII14.20	0,622	0,748	0,169
Ssa85	0,747	0,817	0,086
SsoSL438	0,693	0,784	0,115
Str591INRA	0,690	0,917	0,247
Str73INRA	0,502	0,707	0,290
LDH-C*	0,129	0,384	0,663
<b>Microsatélites</b>	0,564	0,726	0,224
<b>SE</b>	0,094	0,080	0,086

Los valores de  $F_{ST}$  por pares, sin incluir el locus LDH-C\*, abarcaron desde -0,0080 (SO-RI) a 0,3740 (BA-OD), siendo las comparaciones que incluyen a BA las más elevadas (Tabla 7). Todos fueron significativos, excepto los pares SO-RI ( $F_{ST} = -0,0080$ ;  $P = 0,60238$ ) y TO-CA ( $F_{ST} = 0,0104$ ;  $P = 0,00714$ ) que se corresponden con pares de poblaciones de la cuenca del río Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana, respectivamente. El par correspondiente a la cuenca del Ter (OD-FR) mostró diferenciación alta y significativa ( $F_{ST} = 0,2056$ ;  $P < 0.001$ ), posiblemente debido al diferente impacto de las repoblaciones en ambas. En cuanto a los valores incluyendo el LDH-C\*, el mínimo fue -0,0080 (SO-RI) y el máximo 0,4819 (BA-OD), aumentando, como era de esperar, al comparar las poblaciones con BA (que tiene fijado el alelo LDH-C90\*) y con las poblaciones más introgresadas, como ocurre al comparar otras poblaciones nativas con RI. Sin embargo, disminuye al comparar las poblaciones nativas con la población OD, cuando se incluye este marcador. Todos los pares comparados fueron significativos excepto los dos mencionados anteriormente, sugiriendo una diferenciación genética importante en esta zona. Estos valores sugieren una distribución de la diversidad genética por cuencas, siendo mayores las diferencias entre cuencas que dentro de ellas.

Tabla 7.  $F_{ST}$  por pares. Encima de la diagonal se encuentran los valores sin LDH y, abajo, incluyendo este marcador. Los valores destacados en negrita son los significativos. Los valores en cursiva muestran las comparaciones entre poblaciones dentro de una misma cuenca fluvial.

$F_{ST}$	OD	FR	RI	SO	CA	TO	BA
OD	0	<b>0.2024</b>	<b>0.2014</b>	<b>0.2081</b>	<b>0.2345</b>	<b>0.2587</b>	<b>0.3740</b>
FR	<i>0,2056</i>	0	<b>0.0784</b>	<b>0.0820</b>	<b>0.1585</b>	<b>0.1648</b>	<b>0.2424</b>
RI	<b>0,2005</b>	<b>0,0937</b>	0	-0.0080	<b>0.0905</b>	<b>0.1100</b>	<b>0.2654</b>
SO	<b>0,2072</b>	<b>0,0971</b>	<i>-0,0080</i>	0	<b>0.0711</b>	<b>0.0962</b>	<b>0.2772</b>
CA	<b>0,2291</b>	<b>0,1521</b>	<b>0,0909</b>	<b>0,0721</b>	0	0.0119	<b>0.2702</b>
TO	<b>0,2526</b>	<b>0,1564</b>	<b>0,1104</b>	<b>0,0970</b>	<i>0,0104</i>	0	<b>0.2754</b>
BA	<b>0,4819</b>	<b>0,3106</b>	<b>0,4026</b>	<b>0,4113</b>	<b>0,3747</b>	<b>0,3742</b>	0

Los resultados de AMOVA confirmaron las diferencias entre cuencas fluviales. Asignaron un 85,18% de variación genética dentro de localidades, siendo menor al eliminar el locus LDH-C\* (Tabla 8). El porcentaje de variación mínimo se encontró entre poblaciones dentro de cuencas ( $F_{SC}$ ), teniendo y sin tener en cuenta el locus LDH-C\*, mientras que el porcentaje de variación asociado a diferencias entre cuencas ( $F_{CT}$ ) siempre fue superior (Tabla 8). Así, se comprobó que los pares pertenecientes a la misma cuenca no mostraban valores significativos, lo que concuerda con el valor de  $F_{SC}$  obtenido. Esto es así excepto en la cuenca del río Ter, donde las diferencias entre las dos localidades estudiadas sí resultaron significativas, posiblemente porque una de ellas se encuentra altamente introgresada, difiriendo genéticamente de todas las poblaciones nativas.

Estudios del Mediterráneo muestran un porcentaje de variación dentro de poblaciones menor al obtenido en el presente trabajo (Vera *et al.*, 2013; Araguas *et al.*, 2017). En comparación con

estudios realizados en Galicia, el porcentaje de variación entre grupos y entre poblaciones dentro de grupos es menor en este trabajo, esto parece explicarse por el mayor aislamiento de las poblaciones en la zona sur-mediterránea de Galicia, debido, principalmente, a factores humanos (Vera *et al.*, 2018).

Tabla 8. Resultados de AMOVA (no incluyen población BA). Se observan los estadísticos F ( $F_{SC}$ ,  $F_{CT}$  y  $F_{ST}$ ), el componente de variación entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos y entre poblaciones y el porcentaje de variación en estas mismas. Los resultados entre paréntesis no incluyen el locus LDH-C\*.

	Estadístico F	Componente Varianza	% Variación
<b>Entre poblaciones (<math>F_{ST}</math>)</b>	0,14824*** (0,14855***)	1,97832 (1,24607)	14,83 (14,86)
<b>Entre cuencas (<math>F_{CT}</math>)</b>	0,07769*** (0,08109***)	0,15677 (0,15652)	7,77 (8,11)
<b>Entre poblaciones dentro de cuenca (<math>F_{SC}</math>)</b>	0,07650*** (0,07341***)	0,14237 (0,13020)	7,06 (6,75)
<b>Dentro de poblaciones</b>		1,71890 (1,64336)	85,18 (85,14)

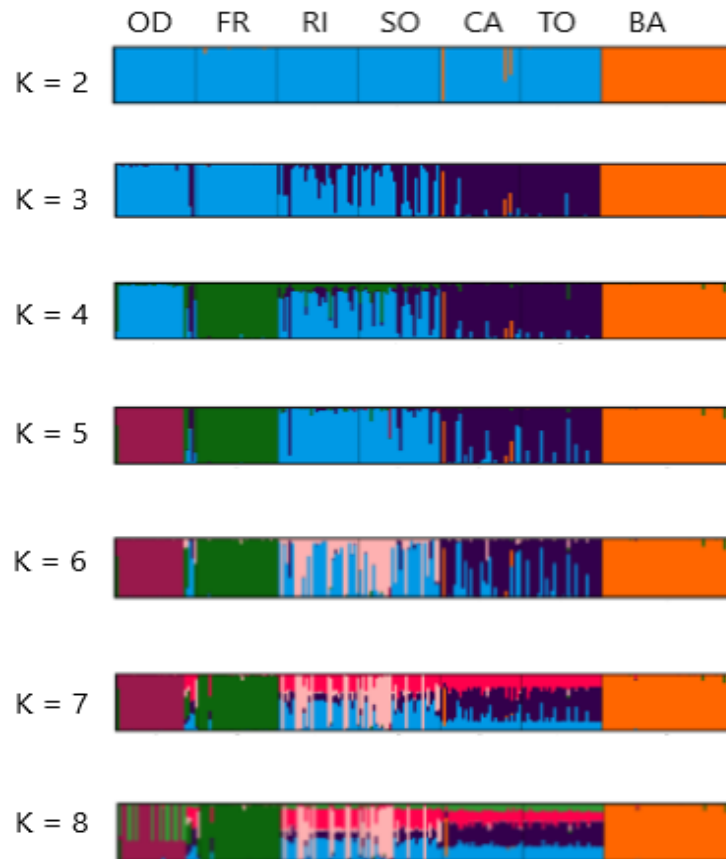
Los análisis de agrupación mediante métodos Bayesianos del programa STRUCTURE, confirmaron los resultados de estructura previamente descritos: la existencia de dos unidades poblacionales diferenciadas en el río Ter, mientras que, en los ríos Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana, las localidades estudiadas fueron genéticamente muy similares. El valor de K más probable, según el método de Evanno, resultó ser  $K = 4$ . Con este valor, se observa que las localidades del río Noguera Pallaresa (RI y SO) podrían considerarse una única unidad poblacional. Lo mismo sucede con las localidades de la cuenca del río Noguera Ribagorzana (CA y TO). Sin embargo, las localidades OD y FR, pertenecientes al río Ter, aparecieron como dos unidades poblacionales diferenciadas (*Figura 4*). Esta situación puede deberse a que exista aislamiento entre estas dos localidades debido, por ejemplo, a barreras físicas, además de, como se ha comentado anteriormente, la localidad FR se encuentra altamente introgresada, lo cual dispara la diferenciación entre estas dos localidades pertenecientes a la misma cuenca fluvial.

Desde el valor  $K = 2$  se observan dos unidades poblacionales diferenciadas. Una de ellas se relaciona con un componente nativo (color azul) y la otra comprende el componente de piscifactoría (color naranja, ver *Figura 4*). Se puede observar que las poblaciones FR y CA se encuentran introgresadas, tal y como había sugerido también el locus LDH-C\*, ya que se encontró componente genético perteneciente a la población de piscifactoría. Hasta  $K = 4$ , este componente nativo es mayoritario en el río Noguera Pallaresa y en la población OD, perteneciente al río Ter. Sin embargo, en FR este componente desaparece a partir del valor de  $K = 4$ , lo que sugiere que la población OD se asemeja más genéticamente a otras poblaciones nativas, pertenecientes a otras cuencas fluviales, que a la población FR. Esta situación es compatible con la premisa de que esta última población se encuentra altamente introgresada, por lo tanto, genéticamente difiere del resto

de las poblaciones nativas. Cuando el valor de K es de 7 o superior, se observa que las poblaciones de los ríos Noguera Pallaresa y Noguera Ribagorzana comparten componente genético (rojo, azul y azul oscuro). Por otra parte, las poblaciones OD y FR siguen estando completamente diferenciadas pese a pertenecer a la misma cuenca.

Los valores de diferenciación genética obtenidos en este estudio resultaron ser muy similares a los obtenidos en otros estudios en ríos que desembocan al Mediterráneo (Vera *et al.*, 2013; Araguas *et al.*, 2017). En estudios realizados previamente en la zona de los Pirineos, se constató que en algunas cuencas se podían distinguir hasta tres poblaciones genéticamente diferenciadas en el mismo río (Araguas *et al.*, 2017), lo cual contrasta con el presente trabajo, en el cual, se puede afirmar que, salvo el caso del río Ter, en las otras dos cuencas estudiadas los individuos analizados podrían tratarse como una única población. Otra diferencia importante entre el estudio realizado por Araguas *et al.* (2017) y el presente trabajo es que, en el anterior estudio se observa que la proporción de genoma proveniente de truchas de repoblación era nulo en el río Ter, sin embargo, en el trabajo actual, se observa componente genético de piscifactoría (color naranja) en la población FR, perteneciente a esta cuenca.

Como era de esperar, estos valores fueron menores a los obtenidos en ríos atlánticos (Vera *et al.*, 2018). Una de las diferencias entre las truchas pertenecientes a poblaciones mediterráneas y las pertenecientes a poblaciones atlánticas es que, en las primeras, es muy infrecuente o prácticamente inexistente el comportamiento anádromo (Bouza *et al.*, 1999), lo cual, por lo general, lleva a un mayor aislamiento de las poblaciones y a una mayor diferenciación. Sin embargo, en Galicia, algunos estudios demuestran que cada localidad de recogida se corresponde con una población diferente, debido a la deriva genética producida por el aislamiento y el “homing” (Vilas *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2018). Ciertos estudios muestran, además, en esta zona, la existencia de una población endémica (Vilas *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2015, Vera *et al.*, 2018).



*Figura 4. Estructura poblacional representada gráficamente mediante el programa CLUMPAK. Cada espacio entre bandas corresponde a una localización, representadas mediante sus códigos en la parte superior. En el lateral se exponen los diferentes valores de K analizados. Cada barra vertical representa un individuo y su proporción de color indica su probabilidad posterior de asignación a los diferentes grupos (K) inferidos por el programa.*

### 4.3. Estrategias de gestión y conservación

Aunque, en el status de conservación global, la trucha común está catalogada como de preocupación menor o ‘*Least Concern*’ (IUCN, 2016), en España, está considerada como una especie Vulnerable (Doadrio, 2002), por lo que se deben implementar una serie de medidas para proteger la diversidad genética de esta especie y disminuir la introgresión causada por la repoblación reiterada con truchas de piscifactoría, de origen centroeuropeo.

En los Pirineos, la legislación para la conservación de la biodiversidad (Artículo 52.2, Ley 42/2007 del Patrimonio Natural y la Biodiversidad) prohíbe la repoblación con truchas de piscifactoría. Esta legislación previene la introducción de genes foráneos, pero no disminuye la introgresión ya existente, la cual podría suponer una amenaza para las poblaciones adyacentes, por ejemplo, en el caso de la población FR, la cual se encuentra altamente introgresada, pudiendo diseminar sus genes a otras poblaciones en el río Ter. Además, se sospecha la existencia de

translocaciones ilegales en algunas localidades pirenaicas (Araguas *et al.*, 2009). Por ello son necesarias otras medidas complementarias para recuperar el componente genético nativo en estas áreas protegidas (Araguas *et al.*, 2008,2009; Caudron *et al.*, 2012). Algunas de estas medidas son la pesca selectiva y la suplementación con individuos pertenecientes a poblaciones nativas.

La pesca selectiva de individuos híbridos o de piscifactoría podría ayudar a recuperar el acervo genético en poblaciones como FR, disminuyendo la introgresión. Esta pesca selectiva puede realizarse a nivel de campo, ya que existen diferencias fenotípicas entre las truchas nativas y las híbridas o completamente foráneas (Lascaux, 1996; Mezzera *et al.*, 1997; Aparicio *et al.*, 2005). Se ha propuesto una clasificación en árbol, teniendo en cuenta variables como la coloración y el patrón de punteado, que permiten distinguir entre poblaciones mediterráneas, atlánticas e híbridas o introgresadas (Aparicio *et al.*, 2005). Además, existe una mayor vulnerabilidad de las truchas de stock a la pesca, en comparación con las truchas nativas (García-Marín *et al.*, 1999b; Mezzera & Largiader., 2001).

La suplementación puede realizarse mediante el cultivo y reproducción de poblaciones nativas o mediante translocaciones de individuos pertenecientes a otras poblaciones salvajes. La translocación es útil en casos en que la población se considere una población de stock naturalizada, reemplazando estos individuos de piscifactoría por individuos procedentes de poblaciones cercanas. Sin embargo, en poblaciones con cierto grado de introgresión no se recomienda este método ya que podría llevar a la total extinción del componente nativo de esa población (Vera *et al.*, 2013). Algunos autores sugieren que se realice la repoblación con individuos estériles, como, por ejemplo, triploides (Piferrer *et al.*, 2009). Esto ayudaría a alcanzar un equilibrio entre las actividades de pesca y la conservación genética, pero tiene algunas limitaciones, por ejemplo, que no todos los individuos triploides resultan ser estériles (Normand *et al.*, 2008).

Finalmente, sería necesario realizar estudios más extensos, en los cuales se monitorice un mayor número de localidades, ya que existen muchas limitaciones a la hora de monitorizar sólo unas pocas localidades para predecir la situación global en los ríos, dado que estos estudios no informan de cambios a nivel local (Fernandez- Cebrián *et al.*, 2014). Por ejemplo, en estudios anteriores no se había demostrado la presencia de introgresión en el río Ter (Araguas *et al.*, 2017). Sin embargo, en este trabajo se ha encontrado una población altamente introgresada. Situaciones como esta pueden darse muy a menudo, ya que los ríos en esta zona son muy extensos y es muy difícil abarcar toda su longitud. Estos estudios son importantes a la hora de definir estrategias para evitar situaciones como la del río Ter, en el cual, una población altamente introgresada (FR) podría poner en peligro la integridad genética de poblaciones adyacentes (García- Marín *et al.*, 1998; Hitt *et al.*, 2003; Araguas *et al.*, 2009).

## 5. Conclusiones

Las conclusiones del presente Trabajo Final de Grado son las siguientes:

1. La diversidad genética encontrada en el presente trabajo se asemeja a la encontrada en trabajos previos en la misma zona y en otros ríos mediterráneos, sin embargo, todos ellos son menores a la diversidad genética encontrada en poblaciones estables de ríos atlánticos, exceptuando poblaciones aisladas con muy baja diversidad.
2. La introgresión por repoblación con stocks centroeuropeos domesticados, estimada mediante la frecuencia del alelo LDH-C90\* y loci microsatélites, en este estudio resultó similar a la encontrada en otros ríos pirenaicos y mediterráneos, pero mayor a la obtenida en estudios realizados en ríos atlánticos. Destaca la situación en el río Ter, en el cual, estudios anteriores no habían demostrado la presencia de este alelo, sin embargo, en el presente trabajo se encuentra una frecuencia del 30%.
3. El mayor porcentaje de diferenciación se encontró entre cuencas, por lo tanto, la gestión para la conservación de la diversidad genética de las poblaciones de trucha en los Pirineos debe hacerse por cuencas, preservando así los recursos genéticos de las diferentes poblaciones.
4. Se definen tres estrategias para la gestión y conservación de las truchas en los refugios genéticos de los pirineos, los cuales son: la pesca selectiva de ejemplares de origen centroeuropeo, la suplementación con individuos de poblaciones nativas y la necesidad que realizar estudios más extensos, que abarquen un mayor número de localidades por cuenca.

## 6. Bibliografía

Almodóvar, A., Nicola, C.C., Elvira, B. & García-Marín, J.L. (2006). Introgression variability among Iberian brown trout Evolutionary Significant Units, the influence of local management and environmental features. *Freshwater Biology*, **51**, 1175–1187.

Almodóvar, A., Nicola, G. G., Ayllón, D. & Elvira, B. (2012). Global warming threatens the persistence of Mediterranean brown trout. *Global Change Biology*, **18**(5), 1549–1560.

Alonso, C., Gortazar, J., & Garcia de Jalon, D. (2010). Trucha común – *Salmo trutta*, Linnaeus, 1758. Pág. 2, 13.

Antunes, A., Templeton, A. R., Guyomard, R. & Alexandrino, P. (2002). The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the transferring gene in the brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 1272–1287.

Aparicio, E., García-Berthou, E., Araguas, R.M., Marínez, P. & García-Marín, J.L. (2005). Body pigmentation pattern to assess introgression by hatchery stocks in native brown trout (*Salmo trutta*) from Mediterranean streams. *Journal of Fish Biology*, **67**, 931–949.

Araguas, R.M., Sanz, N., Fernández, R., Utter, F.M., Pla, C. & García-Marín, J.L. (2008). Genetic refuges for a self-sustained fishery, experience in wild brown trout populations in the Eastern Pyrenees. *Ecology of Freshwater Fish*, **17**, 610–616.

Araguas, R.M., Sanz, N., Fernandez, R., Utter, F.M., Pla, C. & Garcia-Marín, J.L. (2009). Role of genetic refuges in the restoration of native gene pools of brown trout. *Conservation Biology*, **23**, 871–878.

Araguas, R.M., Sanz, N., Pla, C. & García-Marín, J.L. (2004). Breakdown of the brown trout evolutionary history due to hybridization between native and cultivated fish. *Journal of Fish Biology*, **65**, 28–37.

Araguas, R.M., Vera, M., Aparicio, E., Sanz, N., Fernández-Cebrián, R., Marchante, C. & García-Marín, J.L. (2017). Current status of the brown trout (*Salmo trutta*) populations within eastern Pyrenees genetic refuges. *Ecology of Freshwater Fish*, **26**, 120–132.

Bernatchez, L. (2001). The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, **55**(2), 351–379.

- Bouza, C., Arias, J., Castro, J., Sanchez, L. & Martinez, P. (1999). Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L., at the southern limit of the distribution range of the anadromous form. *Molecular Ecology*, **8**, 1991–2001.
- Bouza, C., J. Castro, L. Sanchez & P. Martinez (2001). Allozymic evidence of parapatric differentiation of brown trout (*Salmo trutta* L.) within an Atlantic river basin of the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, **10**, 1455–1469.
- Berg, O.K., Berg, M. (1987). Migrations of sea trout, *Salmo trutta* L., from the Vardnes River in northern Norway. *Journal of Fish Biology*, **31**, 113–121.
- Caudron, A., Champigneulle, A., Vigier, L., Hamelet, V. & Guyomard, R. (2012). Early effects of the strategies of creating a genetic refuge and direct translocation for conserving and restoring populations of native brown trout. *Freshwater Biology*, **57**, 1702–1715.
- Cortey, M., Pla, C. & García-Marín, J.-L. (2004). Historical biogeography of Mediterranean trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**, 831–844.
- Cortey, M., Vera, M., Pla, C. & Garcia-Marin, J.L. (2009). Northern and Southern expansions of Atlantic brown trout (*Salmo trutta*) populations during the Pleistocene. *Biological Journal of the Linnean Society*, **97**, 904–917.
- Doadrio, I. (2002). *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España* (2nd ed.). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- Earl, D.A. & vonHoldt, B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 359–361.
- Elliot, J.M. (1989). Wild brown trout, *Salmo trutta*: an important national and international resource. *Freshwater Biology*, **21**, 1-5.
- Eschmeyer, W. N. (ed.) (2010). *Catalog of Fishes electronic version* (6 May 2010). <http://research.calacademy.org/>
- Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D., Guyomard, R. (1993). (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, **71**, 488-496.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–2620.

Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, **1**, 47–50.

Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 574–578.

Fernández-Cebrián, R., Araguas, R.M., Sanz, N. & García-Marín, J.L. (2014). Genetic risks of supplementing trout populations with native stocks, a simulation case study from current Pyrenean populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **71**, 1243–1255.

García-Marín, J.L., Sanz, N. & Pla, C. (1998). Proportions of native and introduced brown trout in adjacent fished and unfished Spanish rivers. *Conservation Biology*, **2**, 313–319.

García-Marín, J.L., Sanz, N. & Pla, C. (1999b). Erosion of the native genetic resources of brown trout in Spain. *Ecology of Freshwater Fish*, **8**, 151–158.

Gibson, R.J. (1993). The Atlantic salmon in fresh water: spawning, rearing and production. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **3**, 39–73.

Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). //www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm [15 November 2016].

Hansen, M.M., Nielsen, E.E., Ruzzante, D.E., Bouza, C. & Mensberg, K.-L.D. (2000). Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta* L.), using microsatellites DNA markers. *Canadian Journal of Aquatic Science*, **57**, 2130–2139.

Hansen, M. M. (2002). Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology*, **11**, 1003–1015.

Hindar, K., Jonsson, N., Ryman, N., Stahl F.M.G. (1991). Genetics relationship among landlocked, resident and anadromous brown trout, *Salmo trutta* L. *Heredity*, **66**, 83-91.

Hitt, N.P., Frisell, C.A., Muhlfeld, C.C. & Allendorf, F.W. (2003). Spread of hybridization between native westslope cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki lewisi*, and nonnative rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **60**, 1440–1451

- Hunter, C.J., Palmer, T., Meloy, E. (1991). Better trout hábitat: a guide to stream restoration and management. *Island Press. USA*.
- Hyatt, K. D. (1979). Feeding strategy. En: Fish Physiology. Hoar, W. S., Randall, D. J., Brett, J. R. Eds. *Academic Press. New York*.
- IUCN. (2016). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. [//www.iucnredlist.org/](http://www.iucnredlist.org/) [31 March 2017].
- Jonsson, B. (1989). Life history and habitat use of Norwegian brown trout (*Salmo trutta*). *Freshwater Biology*, **21**, 71-86.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.A., Depson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M.F., Mortensen, E. (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., Brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* L.: a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish*, **12**, 1-59.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, *15*(5), 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007). *Handbook of European Freshwater Fishes*. Publications Kottelat, P.O. Box 57, CH-2952 Cornol, Switzerland.
- Lascaux, J.M. (1996). Analyse de la variabilité morphologique de la truite commune (*Salmo trutta* L.) dans les cours d'eau du bassin pyrénéen méditerranéen. Toulouse, France: PhD thesis, *Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse*.
- Marco-Rius, F., Sotelo, G., Caballero, P., & Morán, P. (2013). Insights for planning an effective stocking program in anadromous brown trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **70**, 1092–1100.
- Martínez, P., Arias, J., Castro, J. & Sánchez, L. (1993). Differential stocking incidence in brown trout (*Salmo trutta*) populations from Northwestern Spain. *Aquaculture*, **114**, 203–216.
- McMeel, O. M., Hoey, E. M., & Ferguson, A. (2001). Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1\*90 and\*100 alleles. *Molecular Ecology*, **10**, 29–34.

Mezzera, M., Largiader, C.R. & Scholl, A. (1997). Discrimination of native and introduced brown trout in the River Doubs (Rh<sup>one</sup> drainage) by number and shape of par marks. *Journal of Fish Biology*, **50**, 672–677.

Mezzera, M. & Largiader, C.R. (2001). Evidence for selective angling of introduced trout and their hybrids in a stocked brown trout population. *Journal of Fish Biology*, **59**, 287–301.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings Academy of Natural Sciences of the USA*, **70**, 3321–3323.

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.

Nicola, G. G. & A. Almodovar (2002). Reproductive traits of stream-dwelling brown trout *Salmo trutta* in contrasting neighbouring rivers of central Spain. *Freshwater Biology*, **47**, 1353–1365.

Normand, J., Le Pennec, M. & Boudry, P. (2008). Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture*, **282**, 124–129.

O'Reilly, P.T., Hamilton, L.C., McConnell, S.K., Wright, J.M. (1996). Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**, 2292–2298.

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguiere, J.C., Flajshans, M., Haffray, P. & Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, **293**, 125–156.

Presá, P., Guyomard, R. (1996). Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *Journal of Fish Biology*, **49**, 1326–1329.

Preston, A.C., Taylor, J.F., Craig, B., Bozzolla, P., Penman, D.J. & Migaud, H. (2013). Optimisation of triploidy induction in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, **414**, 160–166.

Rousset, F. (2008). GENEPOP '007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–106.

Sanz, N., Cortey, M., Pla, C. & García-Marín, J.L. (2006). Hatchery introgression blurs ancient hybridization between brown trout (*Salmo trutta*) lineages as indicated by complementary allozymes and mtDNA markers. *Biological Conservation*, **130**, 278–289.

Sanz, N., Garcia-Marin, J.L. & Pla, C. (2000). Divergence of brown trout (*Salmo trutta*) within glacial refugia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**, 2201–2210.

Sanz, N., Garcia-Marin, J.L. & Pla, C. (2002). Managing fish populations under mosaic relationships. The case of brown trout (*Salmo trutta*) in peripheral Mediterranean populations. *Conservation Genetics*, **3**, 385–400.

Slettan, A., Olsaker, I., Lie, Ø. (1996). Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL439 and SSOSL444 loci. *Animal Genetics*, **27**, 57–64.

Snoj, A., Bogut, I. & Susnik, S. (2008). Evidence of genetically distinct population of Vrljika softmouth trout *Salmo obtusirostris* Heckel evolved by vicariance. *Journal of Fish Biology*, **72**, 1945–1959.

Suárez, J., Bautista, J.M., Almodóvar, A. & Machordom, A. (2001). Evolution of the mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity*, **87**, 198–206.

Susnik, S., Schoffmann, J., & Weiss, S. (2005). Genetic verification of native brown trout from the Persian Gulf (Catak Cay River, Tigris basin). *Journal of Fish Biology*, **67**, 879–884.

Trigo, R.M., Pozo-Vázquez, D., Osborn, T.J., Castro-Díez, Y., Gámiz-Fortis, S. & Esteban-Parra, M.J. (2004). North Atlantic oscillation influence on precipitation, river flow and water resources in the Iberian Peninsula. *International Journal of Climatology*, **24**, 925–944.

Vera, M., Cortey, M., Sanz, N. & Garcia-Marin, J.L. (2010a). Maintenance of an endemic lineage of brown trout (*Salmo trutta*) within the Duero river basin. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **48**, 181–187.

Vera, M., Garcia-Marin, J. L., Martinez, P., Araguas, R.M. & Bouza, C. (2013). Identification and conservation of remnant genetic resources of brown trout in relict populations from Western Mediterranean streams. *Hydrobiologia*, **707**, 29–45.

Vera, M., García-Marín, J. L., Martínez, P. & Bouza, C. (2015). Phylogenetic diversity within the endemic brown trout Duero lineage: implications for conservation and management. *Marine and Freshwater Research*, **66**, 1066–1071.

Vera, M., Martínez, P., Bouza, C. (2018) Stocking impact, population structure and conservation of wild brown trout populations in inner Galicia (NW Spain), an unstable hydrologic region. *Aquatic Conserv: Mar Freshw Ecosyst*, **28**, 435–443.

Vera, M., Sanz, N., Hansen, M.M., Almodóvar, A. & García-Marín, J.-L. (2010b). Population and family structure of brown trout, *Salmo trutta*, in a Mediterranean stream. *Marine and Freshwater Research*, **61**, 676–685.

Vilas, R., Bouza, C., Castro, J., López, A., & Martínez, P. (2010). Management units of brown trout from Galicia (NW: Spain) based on spatial genetic structure analysis. *Conservation Genetics*, **11**, 897–906.

Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, **10**, 506–513.

*Anexo 1. Genotipado de los 5 loci microsatélites y el locus LDH-C\* para cada uno de los individuos analizados en este Trabajo de Fin de Grado (TFG). En la primera columna se muestra el código de cada individuo. La segunda, muestra la población a la que pertenecen (OD = 1, FR = 2, RI = 3, SO = 4, CA = 5, TO = 6 Y BA = 7). En las siguientes columnas, cada par representa los alelos encontrados en cada individuo para cada locus, siendo homocigoto para ese locus cuando ambos valores son iguales y heterocigoto, cuando sus valores son diferentes.*

<b>Código</b>	<b>POP</b>	<b>SsHaeIII14.20</b>		<b>Ssa85</b>		<b>SsoSL438</b>		<b>Str591INRA</b>		<b>Str73INRA</b>		<b>LDH-C*</b>	
OD_01	1	298	298	106	106	95	99	182	182	142	142	100	100
OD_02	1	298	298	108	108	97	103	166	166	142	142	100	100
OD_03	1	298	298	108	108	97	97	166	166	142	142	100	100
OD_04	1	298	298	106	106	99	101	162	182	142	142	100	100
OD_05	1	298	298	102	106	99	101	166	182	142	142	100	100
OD_06	1	298	298	108	112	97	103	166	166	142	142	100	100
OD_07	1	298	298	106	106	99	101	162	162	142	142	100	100
OD_08	1	298	298	108	108	97	97	166	166	142	142	100	100
OD_09	1	298	298	108	112	97	103	166	182	142	142	100	100
OD_10	1	298	298	108	108	97	103	166	166	142	142	100	100
OD_11	1	298	298	108	108	97	97	166	166	142	142	100	100
OD_12	1	298	298	108	108	97	97	166	166	142	142	100	100
OD_13	1	298	298	106	106	99	101	162	166	142	142	100	100
OD_14	1	298	298	104	108	97	103	166	182	142	142	100	100
OD_15	1	298	298	108	108	97	103	166	182	142	142	100	100
OD_16	1	298	298	106	106	99	101	162	162	142	142	100	100
OD_17	1	298	298	108	108	103	103	162	162	142	142	100	100
OD_18	1	298	298	102	106	99	101	166	166	142	142	100	100
OD_19	1	298	298	106	106	99	101	162	162	142	142	100	100
OD_20	1	298	298	108	108	97	103	166	182	142	142	100	100
OD_21	1	298	298	106	106	99	101	162	182	142	142	100	100
OD_22	1	298	298	100	102	99	101	166	182	142	142	100	100
OD_23	1	298	298	104	108	97	103	166	166	142	142	100	100
OD_24	1	298	298	102	106	99	101	166	182	142	142	100	100
OD_25	1	298	298	102	106	99	101	166	182	142	142	100	100
OD_26	1	298	312	102	110	95	99	176	180	142	146	100	100
OD_27	1	298	300	110	112	99	103	176	182	140	142	100	100
OD_28	1	308	324	108	112	103	103	162	180	142	144	90	100
OD_29	1	308	308	104	110	103	103	150	176	142	144	100	100
OD_30	1	298	298	102	110	99	101	180	182	140	142	100	100
FR_01	2	298	300	106	110	97	99	148	182	140	142	100	100
FR_02	2	298	300	110	112	99	99	182	188	140	140	90	100
FR_03	2	298	298	108	108	95	99	182	186	140	146	100	100
FR_04	2	300	322	108	110	99	99	148	182	140	146	90	90
FR_05	2	300	312	110	110	101	101	186	192	142	146	90	100
FR_06	2	300	324	108	112	99	99	182	182	140	140	100	100
FR_07	2	300	300	106	108	89	99	148	182	140	140	90	100
FR_08	2	298	300	108	112	95	99	186	188	142	142	100	100
FR_09	2	298	300	108	110	95	99	148	182	140	146	90	100
FR_10	2	298	298	102	108	95	99	148	188	142	142	100	100
FR_11	2	298	336	110	112	99	99	182	182	140	146	90	100

## ANEXO I

FR_12	2	300	300	108	108	99	103	182	188	140	140	90	90
FR_13	2	298	312	108	110	89	89	148	182	142	146	100	100
FR_14	2	298	300	108	108	99	99	148	182	140	140	90	90
FR_15	2	300	336	106	108	99	99	186	188	142	142	100	100
FR_16	2	298	298	110	110	99	99	182	186	140	142	90	100
FR_17	2	298	300	104	110	99	99	182	182	140	140	100	100
FR_18	2	298	322	102	108	95	99	182	188	140	142	100	100
FR_19	2	298	300	108	108	99	99	186	192	142	146	90	90
FR_20	2	300	322	102	112	95	99	188	188	140	142	100	100
FR_21	2	298	300	106	108	95	99	182	182	142	144	90	100
FR_22	2	298	298	110	110	89	97	148	188	140	142	100	100
FR_23	2	298	300	110	112	97	99	182	188	140	140	100	100
FR_24	2	298	300	112	112	97	99	188	188	142	144	100	100
FR_25	2	298	300	108	108	99	99	150	182	140	142	100	100
FR_26	2	298	322	106	108	97	99	150	188	142	144	90	90
FR_27	2	300	300	110	110	89	97	182	182	140	142	100	100
FR_28	2	298	300	108	108	99	99	148	148	140	142	90	100
FR_29	2	298	298	108	110	89	97	182	182	140	140	100	100
FR_30	2	300	324	102	108	97	99	150	188	140	142	100	100
RI_01	3	298	300	110	112	101	103	180	180	140	142	100	100
RI_02	3	300	312	102	108	99	99	166	170	140	142	100	100
RI_03	3	300	300	108	110	101	103	148	170	140	140	100	100
RI_04	3	298	302	110	110	101	103	170	172	140	142	100	100
RI_05	3	300	300	110	112	97	97	172	172	140	140	100	100
RI_06	3	298	302	106	112	103	103	162	180	140	140	100	100
RI_07	3	302	302	108	110	99	99	166	170	140	140	100	100
RI_08	3	302	302	108	110	99	99	170	180	142	142	100	100
RI_09	3	298	302	108	108	99	99	176	180	140	140	100	100
RI_10	3	298	302	108	112	97	99	162	166	140	142	100	100
RI_11	3	294	300	110	110	99	99	170	172	140	140	100	100
RI_12	3	300	300	106	112	99	101	166	180	140	140	100	100
RI_13	3	298	298	102	102	99	99	170	180	140	142	100	100
RI_14	3	300	300	104	106	101	103	162	170	140	142	100	100
RI_15	3	298	300	108	112	97	101	162	166	140	142	100	100
RI_16	3	298	300	108	110	97	101	162	180	140	140	100	100
RI_17	3	298	300	108	110	97	103	162	162	140	140	100	100
RI_18	3	300	300	108	112	101	103	166	184	140	142	100	100
RI_19	3	298	300	106	110	99	99	166	170	140	140	100	100
RI_20	3	298	300	110	110	99	99	178	180	140	142	100	100
RI_21	3	298	300	112	112	99	101	162	166	140	140	100	100
RI_22	3	298	300	108	110	97	101	170	176	140	140	100	100
RI_23	3	300	302	106	108	101	103	172	176	142	142	100	100
RI_24	3	298	302	106	112	101	103	162	170	140	140	100	100
RI_25	3	298	300	102	108	99	99	166	170	140	142	100	100
RI_26	3	298	298	108	110	99	99	170	174	142	142	100	100
RI_27	3	300	302	110	112	97	101	180	180	140	142	100	100
RI_28	3	298	308	112	112	99	101	166	170	140	142	100	100

## ANEXO I

RI_29	3	298	298	112	112	101	103	162	162	140	142	100	100
RI_30	3	298	300	110	110	99	99	162	162	140	142	100	100
SO_01	4	298	300	110	112	99	101	164	178	140	140	100	100
SO_02	4	298	298	104	110	99	99	162	166	140	142	100	100
SO_03	4	298	298	108	112	97	101	162	170	140	142	100	100
SO_04	4	300	302	108	108	99	99	166	176	140	140	100	100
SO_05	4	298	300	102	106	99	99	176	180	140	140	100	100
SO_06	4	300	300	110	112	99	101	166	178	140	140	100	100
SO_07	4	298	302	108	110	97	99	170	180	140	140	100	100
SO_08	4	300	302	104	110	99	99	162	170	140	140	100	100
SO_09	4	298	300	108	108	99	99	164	172	140	140	100	100
SO_10	4	298	298	108	110	99	99	166	170	140	140	100	100
SO_11	4	298	300	102	110	99	99	162	172	140	142	100	100
SO_12	4	298	298	108	108	99	99	166	170	142	142	100	100
SO_13	4	298	300	110	112	101	103	166	170	142	142	100	100
SO_14	4	298	302	110	112	99	101	166	170	140	140	100	100
SO_15	4	300	302	104	104	97	97	180	196	140	142	100	100
SO_16	4	298	300	104	112	101	101	172	174	140	140	100	100
SO_17	4	298	300	104	110	101	103	170	170	140	140	100	100
SO_18	4	298	300	104	108	99	99	166	180	140	142	100	100
SO_19	4	300	302	108	110	101	103	166	176	140	142	100	100
SO_20	4	298	300	110	112	97	103	180	180	140	140	100	100
SO_21	4	300	308	104	104	97	101	164	170	140	140	100	100
SO_22	4	300	300	106	110	101	101	162	174	140	142	100	100
SO_23	4	300	302	110	112	97	101	166	180	140	140	100	100
SO_24	4	298	302	108	110	99	99	166	170	140	142	100	100
SO_25	4	298	300	106	112	101	103	166	180	140	142	100	100
SO_26	4	298	302	110	112	99	101	162	176	142	142	100	100
SO_27	4	298	300	110	112	97	101	162	176	140	140	100	100
SO_28	4	300	300	108	112	101	103	180	196	140	140	100	100
SO_29	4	298	298	110	110	99	101	162	166	140	140	100	100
SO_30	4	298	298	106	112	99	101	170	172	142	142	100	100
CA_01	5	298	326	112	114	97	97	166	176	140	140	90	100
CA_02	5	300	324	104	112	97	105	148	172	142	144	90	100
CA_03	5	298	300	114	114	101	101	148	172	138	138	100	100
CA_04	5	302	324	110	110	97	99	176	176	140	146	100	100
CA_05	5	308	324	110	114	97	101	166	166	140	146	100	100
CA_06	5	300	308	110	110	97	97	166	176	140	142	100	100
CA_07	5	298	300	108	110	101	103	150	166	140	140	100	100
CA_08	5	300	312	108	110	101	103	150	162	140	142	100	100
CA_09	5	298	308	110	112	97	101	172	176	140	144	100	100
CA_10	5	298	300	104	110	97	101	150	166	140	140	100	100
CA_11	5	298	298	110	110	97	101	166	176	140	146	100	100
CA_12	5	298	298	110	112	101	103	166	176	140	140	100	100
CA_13	5	298	298	108	114	97	103	176	176	140	140	100	100
CA_14	5	298	308	110	114	97	105	150	166	140	140	90	100
CA_15	5	298	308	104	110	97	101	166	176	138	140	100	100

## ANEXO I

CA_16	5	300	308	110	110	97	97	150	174	140	142	100	100
CA_17	5	298	308	104	110	97	101	162	172	140	140	100	100
CA_18	5	298	298	110	112	99	101	166	176	140	140	100	100
CA_19	5	298	298	110	112	101	103	150	176	140	140	100	100
CA_20	5	298	298	104	114	101	101	166	176	140	142	100	100
CA_21	5	298	298	104	112	101	101	176	176	140	142	90	100
CA_22	5	298	300	104	112	97	105	162	166	138	138	90	100
CA_23	5	300	308	104	110	101	101	148	176	138	140	90	100
CA_24	5	298	298	110	110	97	99	166	176	138	140	100	100
CA_25	5	298	312	104	116	97	97	148	162	138	146	90	100
CA_26	5	298	300	112	114	97	97	176	176	140	140	100	100
CA_27	5	322	330	110	110	97	101	150	166	140	144	100	100
CA_28	5	298	324	104	110	97	101	176	176	140	140	100	100
CA_29	5	298	308	104	110	97	101	162	178	140	142	100	100
CA_30	5	298	302	108	110	97	101	150	166	140	140	100	100
TO_01	6	298	298	108	114	97	99	176	176	140	140	90	100
TO_02	6	300	308	114	114	101	105	172	176	138	140	90	100
TO_03	6	298	298	112	118	97	97	166	196	140	142	100	100
TO_04	6	308	312	112	114	101	105	172	176	140	142	100	100
TO_05	6	298	308	110	110	101	105	176	176	140	140	100	100
TO_06	6	298	298	110	112	97	101	166	174	138	138	100	100
TO_07	6	298	298	110	112	97	101	176	180	138	140	100	100
TO_08	6	300	300	108	112	97	101	166	174	140	140	90	100
TO_09	6	300	308	108	112	101	105	148	176	138	140	100	100
TO_10	6	300	308	110	112	97	97	174	176	140	142	100	100
TO_11	6	298	298	104	108	97	97	166	172	138	140	100	100
TO_12	6	300	328	104	110	97	97	172	176	140	140	90	100
TO_13	6	300	300	108	110	97	103	176	176	140	140	100	100
TO_14	6	298	298	110	112	101	101	166	176	138	140	100	100
TO_15	6	298	308	110	114	97	103	166	174	138	146	100	100
TO_16	6	300	308	112	114	101	101	148	176	140	142	100	100
TO_17	6	298	302	104	110	97	105	148	176	140	140	100	100
TO_18	6	300	300	108	110	97	99	150	166	140	140	100	100
TO_19	6	298	300	104	104	97	97	148	176	140	140	90	100
TO_20	6	298	320	110	114	101	103	176	176	138	140	90	100
TO_21	6	300	300	110	110	101	101	166	176	140	140	100	100
TO_22	6	298	298	104	110	97	101	172	176	138	138	90	100
TO_23	6	298	302	108	110	97	97	148	176	138	138	100	100
TO_24	6	298	300	104	110	97	103	176	196	138	138	100	100
TO_25	6	298	300	108	110	97	101	166	176	140	140	100	100
TO_26	6	298	298	104	112	97	99	176	176	138	138	100	100
TO_27	6	300	308	108	110	101	105	172	176	138	140	100	100
TO_28	6	298	298	110	112	97	101	166	176	138	138	90	100
TO_29	6	300	300	110	114	97	97	166	176	138	138	100	100
TO_30	6	308	324	110	112	97	97	148	166	138	138	100	100
BA_01	7	312	324	112	116	103	103	148	148	144	146	90	90
BA_02	7	312	322	110	112	99	105	148	148	144	146	90	90

## ANEXO I

BA_03	7	298	312	110	112	99	105	148	148	142	144	90	90
BA_04	7	322	324	110	112	99	105	148	148	140	146	90	90
BA_05	7	322	328	110	112	97	105	148	148	142	144	90	90
BA_06	7	312	324	110	112	99	99	148	148	142	146	90	90
BA_07	7	322	322	112	112	97	99	148	148	144	144	90	90
BA_08	7	312	312	110	112	99	105	148	148	146	146	90	90
BA_09	7	322	324	110	114	97	99	148	148	144	146	90	90
BA_10	7	322	328	110	114	99	105	148	148	144	146	90	90
BA_11	7	312	324	106	112	99	99	148	148	142	146	90	90
BA_12	7	322	328	110	112	97	105	148	148	140	142	90	90
BA_13	7	324	326	104	116	97	97	148	148	142	146	90	90
BA_14	7	312	312	110	112	99	105	148	148	146	146	90	90
BA_15	7	322	328	112	114	99	103	148	150	140	144	90	90
BA_16	7	322	322	112	112	99	99	148	148	140	144	90	90
BA_17	7	312	328	104	104	101	105	148	148	144	146	90	90
BA_18	7	312	324	104	112	99	105	148	148	144	146	90	90
BA_19	7	322	328	112	114	101	103	148	150	146	146	90	90
BA_20	7	312	328	112	112	99	105	148	148	144	144	90	90
BA_21	7	312	322	110	112	99	105	148	172	144	146	90	90
BA_22	7	312	324	112	112	101	103	148	148	144	146	90	90
BA_23	7	312	324	112	116	97	103	148	148	144	146	90	90
BA_24	7	312	328	110	112	99	105	148	148	144	144	90	90
BA_25	7	312	324	112	112	101	103	148	148	144	146	90	90
BA_26	7	322	322	112	114	97	99	148	168	144	144	90	90
BA_27	7	324	334	112	114	97	105	148	148	142	146	90	90
BA_28	7	312	324	112	116	97	101	148	148	142	146	90	90
BA_29	7	324	338	104	104	99	105	148	148	146	146	90	90
BA_30	7	322	330	112	112	99	105	148	148	144	146	90	90
BA_31	7	312	328	104	112	99	105	148	148	142	146	90	90
BA_32	7	322	324	112	114	99	103	148	148	140	146	90	90
BA_33	7	322	322	112	112	99	99	148	148	140	142	90	90
BA_34	7	312	324	110	112	97	101	148	148	144	146	90	90
BA_35	7	312	324	108	114	99	101	148	148	142	146	90	90
BA_36	7	312	328	112	114	97	105	148	148	146	146	90	90
BA_37	7	322	324	110	112	99	103	148	148	142	146	90	90
BA_38	7	298	312	112	112	99	99	148	148	140	142	90	90
BA_39	7	322	328	112	112	105	105	148	148	142	146	90	90
BA_40	7	322	334	110	114	97	105	148	150	146	146	90	90
BA_41	7	324	334	110	112	99	101	148	148	144	146	90	90
BA_42	7	298	312	112	112	99	99	148	148	144	144	90	90
BA_43	7	312	324	110	112	99	99	148	150	140	146	90	90
BA_44	7	312	324	112	116	103	103	148	148	142	146	90	90
BA_45	7	322	328	110	112	97	105	148	148	142	144	90	90
BA_46	7	312	324	106	108	99	99	148	148	142	146	90	90
BA_48	7	322	324	112	114	99	103	148	150	140	146	90	90
BA_49	7	322	322	112	114	99	105	148	168	144	146	90	90
BA_50	7	322	322	112	112	99	105	148	148	140	144	90	90