



Universitat de Girona

**FILOGEOGRAFIA DE LA TRUITA COMUNA
(SALMO TRUTTA) BASADA EN LA
DIVERSITAT MOLECULAR DEL DNA
MITOCONDRIAL**

Martí CORTEY MARQUÈS

ISBN: 84-689-3913-7

Dipòsit legal: GI-I 168-2005



Universitat de Girona
Laboratori d'Ictiologia Genètica

**Filogeografia de la truita comuna (*Salmo
trutta*) basada en la diversitat molecular del
DNA mitocondrial**

Memòria de la tesi doctoral

Martí Cortey i Marquès

Primera edició: maig 2005
Edita: Publicacions de la UdG

© Martí Cortey i Marquès

Universitat de Girona. Publicacions
Ed. Les Àligues – Pl. Sant Domènec, 3. 17071 Girona
Tel. 972 41 80 99 – Fax 972 41 80 31
<http://www.udg.edu/publicacions>

JOSÉ LUÍS GARCÍA MARÍN, PROFESSOR TITULAR DE GENÈTICA, I
CARLES PLA ZANUY, CATEDRÀTIC DE GENÈTICA, AMBDÓS DEL
DEPARTAMENT DE BIOLÒGIA DE LA UNIVERSITAT DE GIRONA

CERTIFIQUEN

Que el treball titulat **Filogeografia de la truita comuna (*Salmo trutta*)
basada en la diversitat molecular del DNA mitocondrial**, presentat per
Martí Cortey i Marquès per a obtenir el grau de Doctor, ha estat realitzat
sota la seva direcció al Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat
de Girona, el consideren acabat i autoritzen la seva presentació al tribunal
qualificador

Girona, 14 d'Abril de 2005

José Luís García Marín

Carles Pla Zanuy

Aquesta tesi doctoral s'emmarca parcialment dins dels objectius del projecte de recerca AGF 98-0636 de la CICYT i els resultats metodològics han estat incorporats en el projecte del MCYT (REN2000-0740-C02-01). Durant el període de formació pre-doctoral M. Cortey ha gaudit d'una beca FPU del MECD de l'Estat Espanyol.

A totes aquelles persones que
sempre heu cregut en mi

Durbitum matea elegitans

Agraïments

Avant la lettre voldria donar les gràcies al Dr. José Luís García Marín per la paciència que ha tingut, pel seu suport constant i per l'extraordinària motivació que m'ha sabut inculcar durant la realització d'aquesta tesi doctoral. Així mateix, voldria expressar el meu agraïment al Dr. Carles Pla Zanuy, com a cap del laboratori, tant per l'oportunitat que em donà de continuar treballant en el camp de la Biologia, com per haver-me fet confiança durant tot aquest temps. Sempre tindrè un deute amb el Dr. Jordi Viñas pel temps que va invertir perquè aquest que escriu adquirís un *modus operandi* amb cara i ulls al laboratori, però sobretot li vull agrair la seva qualitat humana i la seva generositat vital, *chapeau tet!!!*

A totes les companyes i companys, doctors, doctorands, estudiants i tècnics, que són o han passat en aquests anys pel L.I.G., voldria agrair-los els bons moments que hem viscut compartint aquesta part del camí. Les vivències d'aquest període m'han deixat una empremta molt fonda i han aconseguit que, gràcies a vosaltres, segueixi creient en les persones.

A tots els investigadors que han cedit mostres per a aquesta tesi en el marc de l'Acció concertada EU FAIR CT97-3882 de la Unió Europea, *Identification, Management and Exploitation of Genetic Resources in the Brown trout (Salmo trutta)*: Patrick Berrebi, del laboratori *Genome & Populations* de la *Université Montpellier II*, França; Anna K. Danielsdottir, del *Marine Research Institute* de Reykjavik, Islàndia; Alistair Duguid i Andy Fergusson, de la *School of Biology and Biochemistry* de la *Queen's University of Belfast*, Ulster; Bill Jordan, de la *Zoological Society of London*, Anglaterra; Carlo Largiadèr, del *Institute of Zoology*, de la *Université de Berne*, Suïssa; Paulino Martínez, de la *Facultad de Veterinaria* de la *Universidad de Santiago de Compostela*, campus de Lugo; Michael Møller-Hansen, del *Danish Institute for Fisheries Research*, Silkeborg, Dinamarca; Alexander Osinov, de la *Moscow State University*, Rússia, Østein Skaala, del *Institute of Marine Research*, Bergen, Noruega i Costas Triantaphyllidis, del *Department of Genetics* de la *Aristotle University of Thessaloniki*, Grècia.

A José María Blasco i Carolina Monclús, del *Servicio de Investigación Agraria* de la *Diputación General de Aragón*, Saragossa, per cedir part de les mostres aragoneses de truita que s'han analitzat en el treball, en el marc del projecte ITT-CTP 2001-3 de la Comunitat de Treball dels Pirineus, *Avaluació de la diversitat poblacional de la truita comuna, Salmo trutta, en el Massís Pirinenc*.

D'una manera molt especial voldria agrair a un grapat de persones cada cop més ampli el seu estímul i l'escalf que m'ha suposat la seva dimensió humana. Gràcies per ser-hi durant tantes i tantes estones: a taula, al llit, a bosc, a mar, de festa, fent cafès, fent fum, fent esport, al bar, al basc, a casa, al pis, a la pista, als congressos,... fins i tot treballant! Sense vosaltres mai hauria arribat fins aquí.

Sempre que la incongruència ha fet acte de presència m'han injectat grans dosis de coherència i m'han apuntalat d'una manera extraordinària. Gràcies per les lliçons de tolerància aplicada: Laia – doncs sí, sembla que ens n'hem sortit tots dos -, Joan, Kp, Raquel, Àlex, Xevi, Ponç i *at last but not the least* Pep.

A la meua família per haver-hi estat sempre, per recolzar-me en tot i amb tot i per haver compensat esplèndidament les mancances morals – que no legals - del sistema universitari i gran part de la seva classe dirigent en relació al concepte de sou DIGNE.

I finalment al MECD de l'Estat Espanyol per haver finançat la meua formació pre-doctoral durant 42 mensualitats per un import total de 32,303.20 €. Aquesta quantitat correspon al 0.0001% del deute que l'Estat Espanyol ha contret amb el meu poble durant aquest període.

Moltes gràcies a tothom

Calella – Girona, Febrer de 2005

Índex

Resum	3
Resumen	4
Summary	5
Índex de Taules i Figures	7
1. Introducció	9
1.1. Aspectes generals	9
1.1.1. L'espai físic: Europa	9
1.1.2. Variacions climàtiques del Quaternari	11
1.1.3. Marcadors moleculars i mètodes de detecció de la variabilitat genètica	13
1.1.4. Filogeografia	15
1.2. Biogeografia dels peixos continentals europeus	16
1.2.1. Origen i hipòtesis biogeogràfiques	16
1.2.2. Efecte de les glaciacions en la ictiofauna	18
1.3. La truita comuna	21
1.3.1. Estudis morfològics	23
1.3.2. Anàlisis genètiques	25
1.3.3. Efecte de les glaciacions sobre la distribució de la truita comuna	26
1.4. Objectius del treball	28
2. Material i Mètodes	29
2.1. Material	29
2.2. Metodologia	34
2.2.1. Antecedents	34
2.2.2. Procediments de laboratori	35
2.2.3 Anàlisi de les dades	37
3. Resultats	47
3.1. Filogeografia de la truita comuna a les vessants atlàntica i mediterrània	48
Article I: Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout	51
Article II: Phylogeography of Atlantic brown trout based on Mitochondrial DNA control region	59

Article III: Historical Biogeography of Mediterranean Trout	95
3.2. Comparació entre marcadors moleculars	111
Article IV: Novel and ancient hybridization between brown trout lineages in South Iberia indicated by complementary Allozymes and mtDNA markers	113
3.3. Filogènia molecular de la truita comuna	145
Article V: Phylogenetic Relationships in the Brown Trout complex (<i>Salmo trutta</i> L.) based on Molecular Evolution of the Mitochondrial Control Region	147
4. Discussió general	185
4.1. Estructura genètica de les poblacions de truita comuna a la península Ibèrica. Comparació amb la tècnica alozímica	185
4.1.1. La vessant atlàntica ibèrica	193
4.1.3. La vessant mediterrània ibèrica	195
4.1.4. Patrons d'evolució de la truita comuna a la península Ibèrica	197
4.2. Patrons filogeogràfics en peixos d'aigua dolça a Europa	199
4.2.1. Diversitat molecular a <i>Salmo trutta</i>	199
4.2.2. Patrons filogenètics dels llinatges atlàntics i mediterranis	201
4.2.3. Filogènia comparada en peixos d'aigua dolça	202
4.2.4. Distribució actual de la diversitat molecular, el paper de les glaciacions	203
5. Conclusions	209
6. Referències	213

Resum

Les anàlisis realitzades en cent deu poblacions de truita comuna (*Salmo trutta*) que abarquen el seu rang natural de distribució indiquen que el patró filogenètic es relaciona amb les tres grans vessants on es troba distribuïda l'espècie: ponto-càspera, atlàntica i mediterrània. Aquesta diferenciació estaria associada a l'aïllament de les vessants durant el Quaternari. L'origen de l'espècie es relaciona amb la vessant ponto-càspera, d'acord amb els models biogeogràfics que postulen l'origen asiàtic de la ictiofauna europea. S'ha detectat també un segon nivell de divergència dins de cada vessant que dona com a resultat l'existència de sis llinatges evolutius: Atlàntic i Duero a la vessant atlàntica, els llinatges Adriàtic, Mediterrani i Marmoratus als rius mediterranis, i el llinatge Danubi a la zona ponto-càspera.

Les glaciacions del Pleistocè han modificat profundament el rang de distribució de la truita comuna, especialment a la vessant atlàntica, on s'han proposat quatre grans refugis glacials: a l'est de la capa de gel, a Europa central, a l'entorn del canal de la Mànega i a l'entorn del golf de Biscaia; tot i que només els tres primers haurien participat en la recolonització del nord d'Europa al final de l'última glaciació. El quart refugi, que inclou el sud de França i el Cantàbric hauria estat l'origen de l'expansió cap al sud durant el Pleistocè Superior d'un grup de poblacions distribuïdes actualment a la vessant atlàntica ibèrica, i també hauria servit de base per a l'expansió cap al nord d'altres grups de truita durant interglacials anteriors.

A la vessant atlàntica de la península Ibèrica, l'estructura poblacional es troba associada a la xarxa hidrogràfica i es determinen fins a cinc unitats poblacionals: les truites dels rius Cantàbrics, les del Miño, les del Duero, les del Tajo i les del Guadalquivir. Les poblacions del Guadalquivir pertanyerien a un grup d'influència mediterrània. Els marcadors d'al·lozims i de DNA mitocondrial es troben fortament correlacionats en aquesta vessant, on apunten cap als mateixos grups de poblacions. Per contra, els rius de la vessant mediterrània haurien estat colonitzats pels llinatges Adriàtic i Mediterrani i s'hauria produït una intensa intergradació secundària entre aquests llinatges durant els períodes glacials a partir de l'expansió de les poblacions retingudes a les capçaleres durant els interglacials. Els grups d'hibridació, l'aïllament i la deriva en els períodes interglacials fan que els grups de poblacions identificats pels marcadors d'al·lozims i de DNA mitocondrial no coincideixin.

Resumen

Los análisis realizados en ciento diez poblaciones de trucha común (*Salmo trutta*) que abarcan todo el rango natural de distribución de la especie indican que el patrón filogenético está relacionado con las tres grandes vertientes donde se distribuye: ponto-caspia, atlántica y mediterránea. Esta diferenciación estaría asociada al aislamiento de las vertientes durante el Cuaternario. El origen de la especie se relaciona con la zona ponto-caspia, de acuerdo con los modelos biogeográficos que postulan el origen asiático de la ictiofauna europea. También se ha detectado un segundo nivel de divergencia dentro de cada vertiente, que da como resultado la existencia de seis linajes evolutivos: Atlántico y Duero en la vertiente atlántica, Adriático, Mediterráneo y Marmoratus en los ríos mediterráneos, y el linaje Danubio en la zona ponto-caspia.

Las glaciaciones del Pleistoceno han modificado profundamente el rango de distribución de la trucha común, especialmente en la vertiente atlántica, donde se han propuesto cuatro grandes refugios glaciares: al este de la capa de hielo, en Europa central, alrededor del canal de la Mancha y alrededor del golfo de Vizcaya; aunque sólo los tres primeros habrían participado en la recolonización del norte de Europa al final de la última glaciación. En el cuarto refugio, que incluye el sur de Francia y el Cantábrico, se habría originado la expansión hacia el sur durante el Pleistoceno Superior de un grupo de poblaciones distribuidas actualmente en la vertiente atlántica ibérica. Este refugio también habría servido como base para la expansión hacia el norte de otros grupos de trucha durante periodos interglaciares anteriores.

En la vertiente atlántica ibérica, la estructura poblacional se encuentra asociada a la red hidrográfica, y se determinan hasta cinco grupos de poblaciones: las truchas de los ríos Cantábricos, las del Miño, las del Duero, las del Tajo y las del Guadalquivir. Las poblaciones del Guadalquivir pertenecerían a un grupo de influencia mediterránea. Los marcadores de alozimas i de DNA mitocondrial se encuentran fuertemente correlacionados en esta vertiente, dónde detectan los mismos grupos de poblaciones. En cambio, los ríos de la vertiente mediterránea habrían sido colonizados por los linajes Adriático y Mediterráneo y se habría producido una intensa intergradación secundaria entre estos linajes durante los periodos glaciares a partir de la expansión de las poblaciones retenidas en las áreas de refugio durante los interglaciares. La intensidad de la hibridación, el aislamiento y la magnitud de la deriva en los periodos interglaciales provocan que los grupos de poblaciones identificadas por los marcadores de alozimas y de DNA mitocondrial no coincidan.

Summary

The analyses performed in one hundred and ten brown trout (*Salmo trutta*) populations that cover its native European distribution, shows that the phylogenetic pattern is associated with the three major basins occupied by the species: Ponto-Caspian, Atlantic and Mediterranean. This differentiation is related with basin isolations during the Quaternary. The origin of the species is placed in the Ponto-Caspian region, in clear agreement with biogeographic models that postulates the Asian origin of European ichthyofauna. Further divergence occurred in the mid-lower Pleistocene generated the actual lineages: Atlantic and Duero in the Atlantic basin, Adriatic, Mediterranean and Marmoratus lineages in the Mediterranean rivers and the Danubian lineage in the Ponto-Caspian area.

Pleistocene glacial periods have deeply modified the distribution range of brown trout, mainly in the Atlantic basin, where four major glacial refugia have been proposed: (i), at the East side of the ice sheet, (ii), in Central Europe, (iii), around the English Channel and (iv), around the Bay of Biscay. Only the three first seem to be involved in the recolonization of North Europe at the end of the last glacial period. The fourth glacial refugia, placed in Southern France and the Cantabrian Sea area, would have been the origin of a southern expansion during Late Pleistocene. Nowadays, those trout populations are distributed in the Atlantic basin of the Iberian Peninsula. This glacial refugia could also be involved in older recolonizations of North-Europe previous to last glacial process.

Brown trout population structure in areas at the Atlantic basin of the Iberian Peninsula is associated with river network. Thus, five trout population groups could be determined: trout from the Cantabrian Rivers, from the Miño River, from the Duero River, from the Tajo River and trout populations from the Guadalquivir basin. These last populations show a strong Mediterranean influence. In this basin, comparisons involving allozyme and mitochondrial DNA data are strongly correlated and points towards the same population groups. The rivers in the Mediterranean basin have been colonized by Adriatic and Mediterranean lineages, and strong secondary intergradations are reported among them during glacial periods. Population groups identified by allozyme and mitochondrial DNA do not agree as a consequence of this intergradation, as well as isolation and genetic drift during interglacial periods.

Índex de Taules i Figures

Índex de Taules

Taula 1. Mostres analitzades de truita comuna	32
Taula 2. Freqüència dels llinatges mitocondrials de truita en les mostres utilitzades en la comparació amb la tècnica al·lozimica	187

Índex de Figures

Figura 1. Temps geològics durant el Cenozoic i períodes glacials i interglacials durant el Pleistocè	12
Figura 2. Principals rutes de colonització postglacial i zones de sutura a Europa	13
Figura 3. Distribució biogeogràfica i filogènia simplificada del barb (<i>Barbus barbus</i>)	19
Figura 4. Distribució biogeogràfica i filogènia simplificada del cavil-lat (<i>Cottus gobio</i>)	19
Figura 5. Distribució biogeogràfica i filogènia simplificada de la perca (<i>Perca fluviatilis</i>)	20
Figura 6. Distribució biogeogràfica i filogènia simplificada del timal (<i>Thymallus thymallus</i>)	20
Figura 7. Distribució biogeogràfica i filogènia simplificada de la bagra (<i>Squalius cephalus</i>)	21
Figura 8. Localització geogràfica de les mostres de truita comuna de la península Ibèrica analitzades	30
Figura 9. Localització geogràfica de les mostres europees de truita comuna analitzades	31
Figura 10. Projecció de les 46 mostres de truita comuna sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies de Nei (1972)	189
Figura 11. Projecció de les 46 mostres de truita comuna sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies gamma Tamura-Nei (1993)	190
Figura 12. Correlació de les estimacions de distància a partir de dades d'al·lozims i mitocondrials	191
Figura 13. Projecció de les 46 mostres de truita comuna sobre el pla format per la 1a i la 3a coordenades principals de la matriu de distàncies de Nei (1972)	192
Figura 14. Projecció de les 46 mostres de truita comuna sobre el pla format per la 1a i la 3a coordenades principals de la matriu de distàncies gamma Tamura-Nei (1993)	192
Figura 15. Projecció de les 27 mostres atlàntiques sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies de Nei (1972)	193
Figura 16. Projecció de les 27 mostres atlàntiques sobre el pla format per les 1a i la 3a coordenades principals de la matriu de distàncies de Nei (1972)	194
Figura 17. Projecció de les 19 mostres mediterrànies sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies de Nei (1972)	195
Figura 18. Projecció de les 19 mostres mediterrànies sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies gamma Tamura-Nei (1993)	196
Figura 19. Distribució dels llinatges evolutius de truita comuna a la península Ibèrica	199
Figura 20. Distribució dels grans grups i dels llinatges evolutius de truita comuna	200
Figura 21. Models biogeogràfics de recolonització post-glacial segons els model tradicional (Taberlet <i>et al.</i> 1998, Hewitt, 1999, 2000), i segons el model proposat per a petits mamífers (Bilton <i>et al.</i> 1998)	204
Figura 22. Patrons de recolonització per a la truita comuna durant l'últim període glacial	206

1. Introducció

1.1. Aspectes generals

Els processos de distribució geogràfica i especiació de la ictiofauna europea són el resultat dels canvis geològics i les fluctuacions climàtiques (Lelek 1980). La història evolutiva d'aquestes espècies ha estat marcada per l'existència de muntanyes i mars, que representen barreres infranquejables per a la majoria d'espècies d'aigua dolça; pels canvis de cursos fluvials, que n'han permès l'expansió; i pels canvis de rangs de distribució associats als canvis climàtics del Quaternari (Banarescu 1989, 1992, Bianco 1990).

1.1.1. L'espai físic: Europa

Des d'un punt de vista geogràfic, Europa és una gran península connectada amb Àsia i presenta unes característiques peculiars. Moltes grans serralades es troben al sud del continent i s'orienten en un eix est-oest: la Cantàbrica, els Pirineus, els Alps, els Càrpats, la Transilvania, el Càucas. Més al nord de les serralades s'hi extén una plana que, des de

França, Bèlgica i Holanda, abarca fins els Urals passant per Europa central, les Repúbliques bàltiques, Bielorússia, Ucraïna i Rússia. Al sud del continent hi trobem les penínsules Ibèrica, Itàlica i Balcànica, totes elles força muntanyoses. Més al sud, també en una orientació est-oest, hi trobem el Mar Mediterrani i el Mar Negre.

Aquesta geografia particular ha influenciat sobremanera el moviment de les espècies al continent europeu en resposta a les fluctuacions del clima, limitant els desplaçaments cap al sud dels organismes durant els períodes freds (Taberlet *et al.* 1998). Les serralades com els mars són barreres formidables per a molts organismes i les muntanyes cobertes de gel ho devien ser encara més durant les glaciacions. De les restes de plantes i animals es dedueix que molts organismes que actualment es distribueixen arreu d'Europa es trobaven refugiats al sud de la capa de gel durant les glaciacions; principalment a les penínsules Ibèrica i Itàlica, als Balcans i possiblement al Càucàs i al voltant del Mar Caspi (Lelek, 1980, Hewitt 1999). Durant el Quaternari, les espècies van patir diversos processos de constriccions i expansions de rang en les seves poblacions septentrionals, com a resultat de les extincions degudes al descens de la temperatura, i expansions cap al nord de les poblacions dels refugis glacials durant els períodes interglacials. En moltes espècies, les expansions postglacials es van produir ràpidament al final dels períodes glacials perquè les poblacions podien expandirse cap a grans àrees buides de territori habitable. L'anàlisi de les rutes de colonització i dispersió post-glacial ha fet que es proposessin per a organismes terrestres tres gran patrons de colonització, anomenats, segons l'espècie que els representava: llagosta (*grasshopper*), eriçó (*hedgehog*) i ós (*bear*) (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 1999, 2000). Bilton *et al.* (1998) suggereixen, però, que la pròpia Europa central i el ponto-caspi han estat refugis glacials de diverses espècies de petits mamífers, i que les penínsules sudeuropees representarien, per aquestes espècies, zones amb abundància d'endemismes, més que no pas refugis glacials.

1.1.2. Variacions climàtiques del Quaternari

Els minerals i fòssils dels registre geològic ens ofereixen evidències de canvis climàtics globals durant gran part de la història de la Terra (Bennett i Glasser 1996). El paisatge actual és conseqüència dels períodes glacials que van ocórrer durant el Cenozoic en què el clima de la Terra va canviar dràsticament. Un gran episodi fred que es va produir al límit entre l'Eocè i l'Oligocè va significar l'aparició de gel a l'Antàrtida. A l'Hemisferi nord, l'absència de terra al pol i la distribució dels corrents oceànics retardaren el refredament. Fins que es produí el tancament del braç d'aigua entre Amèrica del Nord i del Sud fa uns 3 Ma, durant el Pliocè, les condicions no foren prou fredes per permetre el desenvolupament de gel a Groenlàndia, l'Àrtic i Sibèria. Fa uns 2.4 Ma la capa àrtica de gel va començar a expandir-se i les latituds mitjanes van veure el creixement i retrocés regular de les capes de gel i els glaciers. De fet, les condicions glacials han dominat - pràcticament un 80% del temps - a la Terra en els últims dos milions d'anys (Willis i Whitakker 2000). Durant les etapes fredes, conegudes com a períodes glacials, les capes de gel assoliren el seu màxim i cobriren la majoria de latituds mitjanes septentrionals. Aquests períodes freds són interromputs per excursions càlides, anomenats períodes interglacials, on la distribució dels gels seria similar a l'actual. Durant el Pleistocè aquestes "edats de gel" foren especialment severes (Figura 1). Més en concret, els últims 700.000 anys han estat dominats per grans períodes glacials amb un cicle aproximat de 100.000 anys interromputs per interglacials curts i càlids com l'actual (Hewitt 1996, 1999, 2000).

El 1924 el geofísic serbi Milankovitch enunciava la seva teoria, on proposava que la temperatura de la superfície terrestre hauria variat en resposta a canvis regulars i previsibles de l'òrbita i l'eix de la Terra, i que aquest procés hauria estat regulat per la combinació de tres factors: i) *l'exentricitat de l'òrbita terrestre*, que canvia d'aproximadament circular cap a el·líptica amb un període de 96.000 anys; ii) la inclinació de l'eix de la terra - *la obliqüitat de l'eclipse* – que varia de 21°39' a 24°36' en un eix

temporal d'aproximadament 41.000 anys; iii) la oscil·lació en 23°30' de la Terra en el seu eix vertical, en un període que dura 10.500 anys, produïda per la variació del pol gravitacional exercit pel Sol i la Lluna. La teoria no fou plenament acceptada i reconeguda fins als anys 70 del segle passat (Hays *et al.* 1976).

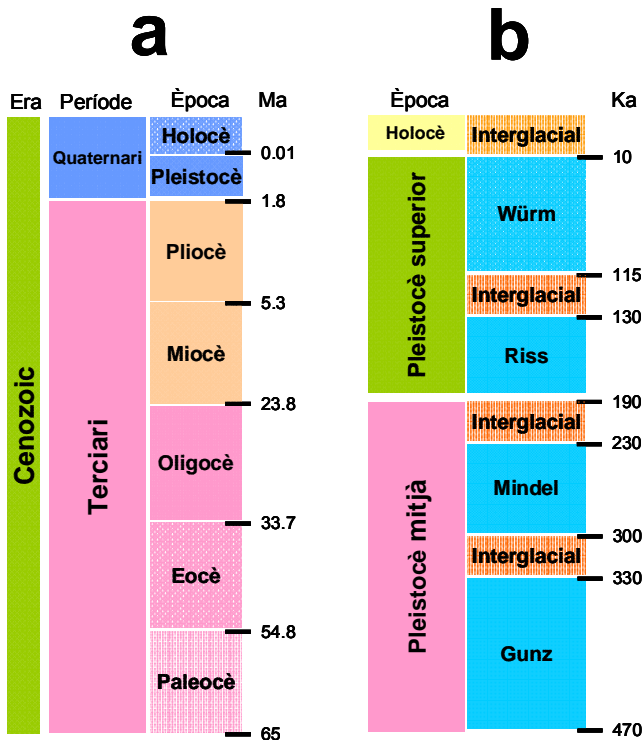


Figura 1. **a** Temps geològics durant l'era Cenozoica i **b** períodes glacials i interglacials durant el Pleistocè (terminologia alpina).

La interacció entre aquests tres factors ha produït un seguit de variacions climàtiques amb efectes molt importants en les temperatures globals. Aquests canvis climàtics han afectat la distribució mundial dels biomes i dels ecosistemes i, per tant, també dels nínxols ecològics i els rangs de distribució de les espècies. Repetidament doncs, algunes espècies s'han

extingit en grans parts del seu rang, altres s'han dispersat cap a noves localitats i altres han sobreviscut en refugis glacials i s'han expandit novament (Hewitt 2000, 2001).

Una de les conseqüències de les expansions a partir dels refugis glacials és la formació de zones de sutura en aquelles àrees on es troben llinatges provinents de diferents refugis. Aquestes zones sovint es troben concentrades en àrees molt concretes (Figura 2). A Europa se n'han definit quatre de principals pel que fa a organismes terrestres: una als Alps, una altre als Pirineus, la tercera al límit entre França i Alemanya i la quarta al centre d'Escandinàvia (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 1999).

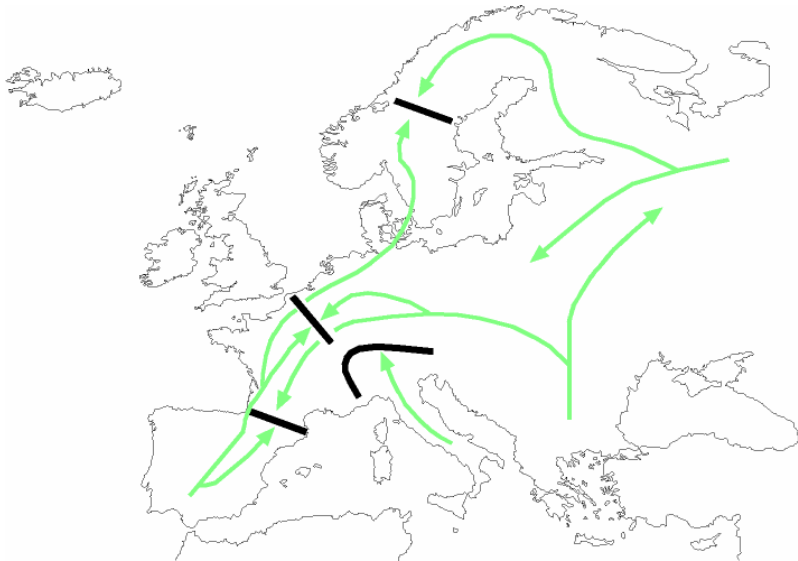


Figura 2. Principals rutes de colonització postglacial (verd) i zones de sutura (negre) a Europa proposades per organismes terrestres (Taberlet *et al.* 1998).

1.1.3. Marcadors moleculars i mètodes de detecció de la variabilitat genètica

Entre les tècniques que s'han utilitzat per a l'estudi de les relacions evolutives i l'estructura genètica de les poblacions naturals, hi trobem

l'electroforesi de proteïnes, les anàlisis dels polimorfismes de longitud basats en els fragments de restricció del DNA (RFLPs), la seqüenciació gènica i l'estudi de microsatèl·lits. L'electroforesi de proteïnes va ser el principal mètode per descriure l'estructura genètica de les poblacions naturals fins a l'aparició i popularització de les tecnologies de DNA (Lewontin 1991). Els primers es van aplicar al DNA mitocondrial al voltant del 1980, però s'han popularitzat durant l'última dècada del segle XX degut al desenvolupament de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), que permeten l'amplificació *in vitro* de fragments específics de DNA pel seu anàlisi posterior (Avice 1994, 2000). Aquest desenvolupament de la PCR ha afavorit també l'extensió de les tècniques de seqüenciació i dels microsatèl·lits.

Les dades al·lozimiques són interpretables en termes de genotips mendelians en un locus particular, a més de ser una tècnica relativament senzilla, barata i ràpida, el que permet la ràpida acumulació de dades genotípiques, fins a 40 ó 50 loci nuclears per individu, en grans mostres poblacionals. Tot i això, aquestes dades tenen una limitació inherent per alguns propòsits filogenètics, ja que les relacions històriques dels al·lells en una anàlisi filogenètica de dades electroforètiques no poden ser conegudes directament a partir de l'anàlisi. Aquest fet ha suposat un desplaçament, quan no un abandonament, de la tècnica al·lozimica. En aquest sentit, les aproximacions basades en RFLPs o seqüenciació dels gens permeten l'accés directe a la informació filogenètica continguda en els fragments de DNA amplificats per PCR, tant per a gens nuclears com mitocondrials. A diferència dels al·lells detectats mitjançant la tècnica electroforètica, les relacions històriques en una anàlisi filogenètica de seqüències de DNA sí que es poden conèixer. Les publicacions relatives a les relacions evolutives i la distribució geogràfica de la variabilitat genètica se centraren en l'anàlisi del DNA mitocondrial (mtDNA), a causa de l'absència de recombinació intermolecular i la seva alta variació intraespecífica. Tot i això, i a causa de l'herència materna de la molècula, s'ha posat de manifest que l'ús exclusiu del mtDNA per definir unitats

evolutives esbiaixa la interpretació dels resultats envers els llinatges matriarcals, que poden no recollir tots els processos evolutius que ha sofert una espècie (Antunes *et al.* 2002). Per tant, sembla necessari l'ús de diversos marcadors moleculars per respondre la majoria de qüestions relatives a la filogènia i l'estructura poblacional dels organismes (vegeu Ballard i Whitlock 2004). Diferents processos evolutius, ecològics i de comportament han estat demostrats a partir dels resultats combinats dels dos tipus de marcadors (Awise 1994, Allendorf i Seeb 2000). Així doncs, l'ús combinat de mtDNA (heretat via materna) i loci nuclears mendelians millora significativament les anàlisis evolutives.

1.1.4. Filogeografia

La comprensió dels processos passats i presents que han generat i generen els patrons de distribució dels organismes, necessita de les reconstruccions històriques basades en patrons filogenètics i geogràfics (McDowall 2004). Amb el desenvolupament dels mètodes moleculars d'estudi de la variació genètica, primer els al·lozims, posteriorment els RFLPs i més recentment la seqüenciació de fragments de DNA mitocondrial i nuclear, és possible investigar la variació genètica en el rang de distribució d'una espècie. La filogeografia és una disciplina que estudia la distribució geogràfica dels llinatges genealògics, emfatitzant els processos històrics que han sofert les poblacions, a partir de les empremtes evolutives en les distribucions geogràfiques contemporànies dels marcadors moleculars (Awise 1996, 1998). El mot fou emprat per primer cop el 1987 per Awise *et al.*, i a partir de llavors el seu ús en genètica evolutiva ha crescut exponencialment (Awise 2000). Com que la disciplina arrela en la biogeografia històrica i la genètica de poblacions, va ser anunciada com un pont d'unió de l'estudi de processos micro i macroevolutius (Bermingham i Moritz 1998). La filogeografia es considera una disciplina integradora perquè l'anàlisi i interpretació de la distribució dels llinatges genealògics sol necessitar de la genètica molecular, la

genètica de poblacions, la filogènia, la demografia, l'etologia i la demografia històrica (Avice 2000).

Com que el DNA mitocondrial evoluciona ràpidament en poblacions d'animals superiors i normalment presenta herència materna sense recombinació intermolecular, ha estat el cavall de batalla de molts estudis filogeogràfics (Avice 2000, Ballard i Whitlock 2004). En les últimes dècades ha estat utilitzat extensament com a eina per inferir el passat evolutiu i demogràfic, tant de poblacions com d'espècies, i s'ha demostrat impagable per als nous camps de l'ecologia molecular i la filogeografia (Ballard i Whitlock 2004). El DNA mitocondrial ha estat utilitzat per tractar qüestions en una escala filogenètica àmplia, que abarca des de temes relatius a estructures poblacionals fins a filogènies a nivell de gènere.

1.2. Biogeografia dels peixos continentals europeus

1.2.1. Origen i hipòtesis biogeogràfiques

Al continent europeu hi trobem nombroses espècies i sub-espècies endèmiques de peixos d'aigua dolça. Vint-i-tres famílies i 196 espècies natives europees foren identificades per Lelek (1980), incrementades a 358 per Kottelat (1997), tot i que aquest autor admet que fins a 1931 noms diferents han estat aplicats a aquestes espècies. El patró de distribució dels endemismes és interessant, ja que molts es troben a les penínsules Ibèrica, Itàlica i al sud de Grècia, en tant que Europa central ofereix una ictiofauna relativament uniforme (Zardoya i Doadrio 1999, Durand *et al.* 2003). Aquesta distribució tan inusual ha fet que es proposessin diferents escenaris biogeogràfics per a explicar la història evolutiva de la ictiofauna europea.

Tradicionalment s'ha cregut que els peixos d'aigua dolça de la regió paleàrtica es van originar a l'Àsia i es van expandir cap a Sibèria durant l'Eocè (Banarescu 1989, 1992). Tot i això, com que Europa estava separada de Sibèria pel Mar d'Ob, la seva ulterior dispersió estava impedita. Durant l'Oligocè, els peixos d'aigua dolça van poder expandir-

se cap a Europa a conseqüència de l'elevació dels Urals i la desaparició del Mar d'Ob. Aquesta dispersió a través d'Europa durant el Terciari ha provocat, i encara provoca, controvèrsia a causa de l'existència de dues hipòtesis alternatives. La primera, proposada per Banarescu (1989, 1992), considera que els peixos d'aigua dolça es van estendre per Europa central via connexions fluvials cap a la part sud del continent i el nord d'Àfrica, en una successió de dispersions graduals en l'espai i el temps que podria haver començat fa uns 35 Ma i durar fins el Pliocè superior (fa uns 2 Ma). L'aïllament subseqüent de les penínsules Ibèrica, Itàlica i el sud de Grècia de la resta de continent, seria el responsable de la seva riquesa en fauna endèmica. Les glaciacions del Quaternari haurien delmat seriosament el poblament íctic d'Europa central, que hauria estat substituït amb peixos del Danubi durant els períodes interglacials, donant lloc a la uniformitat de la ictiofauna centreuropea. D'altra banda, els rius mediterranis haurien estat colonitzats mitjançant captures fluvials des de Europa central per antics llinatges siberians durant el Terciari; en canvi, les actuals poblacions de peixos d'Europa central s'haurien originat a partir d'esdeveniments de dispersió durant el Quaternari.

Front d'aquesta visió, Bianco (1990) assenyala que durant el Miocè gran part de la ictiofauna actual d'aigua dolça ja estava establerta a Europa central però es trobava absent de les penínsules sud-europees i nord d'Àfrica, on no hi aparegué fins a la crisi salina del Messinià (5.96-5.33 Ma), quan la dessecació del Mediterrani va afavorir la gran dispersió d'ictiofauna al voltant de la regió circum-mediterrània. Amb l'obertura de l'estret de Gibraltar i l'entrada d'aigües atlàntiques es va acabar la dispersió i va començar l'aïllament entre les poblacions que ha produït el gran nivell d'endemismes a les penínsules Ibèrica, Itàlica i el sud de Grècia. Per tant, aquesta teoria proposa una dispersió circum-mediterrània en comptes d'una dispersió per captures fluvials des del nord i des del sud d'Europa. Segons Bianco (1990), aquesta dispersió s'hauria produït només durant la fase Lago Mare de la crisi salina del Messinià i no d'una manera gradual durant el període Terciari (Oligocè-Miocè-Pliocè).

Un gran esdeveniment vicariant seria el responsable del gran nombre d'endemismes a l'Europa sud-peninsular, segons aquest autor.

1.2.2. Efecte de les glaciacions en la ictiofauna

Tot i que la divergència i dispersió de molts gèneres de peixos continentals estan datats al Terciari, bàsicament durant el Pliocè-Miocè, les severes oscil·lacions climàtiques del Quaternari produïren grans canvis en els rangs de distribució de la ictiofauna europea, comprimint-los i expandint-los repetidament durant els cicles glacials-interglacials (Hewitt 2000). En aquest sentit, la gran antiguitat de la majoria de famílies de peixos d'aigua dolça – el primer fòssil està datat a l'Oligocè – i la presència de sistemes muntanyosos antics (Pirineus, Alps) o moderadament antics (Dinàrics) que han separat les penínsules del sud d'Europa de la resta del continent des del Miocè, han col·locat les glaciacions del Pleistocè com a explicacions secundàries en les hipòtesis biogeogràfiques europees (Perdices *et al.* 2003). Estudis recents amb tècniques moleculars han obert noves perspectives en l'anàlisi filogeogràfica dels peixos d'aigua dolça, remarcant la importància de les glaciacions del Pleistocè en l'origen, estructura i distribució actual de la ictiofauna europea. Cada vegada, més evidències reconeixen onades de colonització durant el Pleistocè en gèneres de peixos d'aigua dolça (*Sabanejewia*, *Squalius*, *Chondrostoma*) associades a les oscil·lacions climàtiques. Més encara, en moltes espècies de peixos d'aigua dolça les glaciacions del Quaternari han tingut un paper central en la modelació de l'estructura poblacional i distribució actual de la variabilitat genètica, determinant-se àrees de refugi glacial i zones d'expansió postglacial. Per exemple en el barb (*Barbus barbus*), una espècie d'àmplia distribució en els rius de Europa central, Kotlík i Berrebi (2001) han observat que la zona ponto-càspera, incloent-hi la conca del Danubi, ha estat utilitzada com a refugi glacial i centre de dispersió de successives onades de colonització del sud i centre d'Europa seguint la retirada dels gels al final de les glaciacions. Aquests autors suggereixen també que la regió del sud

de França hauria pogut ser utilitzada com a refugi durant l'últim període glacial (Figura 3).

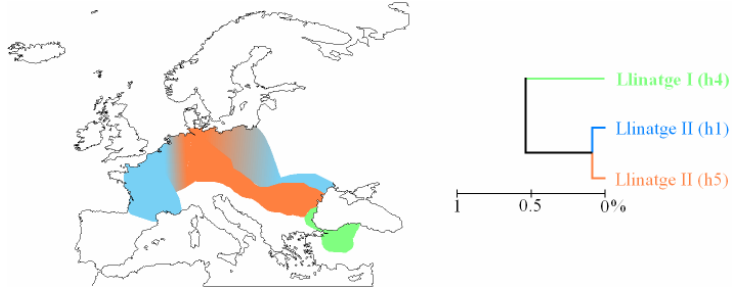


Figura 3. Distribució biogeogràfica i filogènia simplificada del barb (*Barbus barbatus*).

L'existència d'aquest refugi glacial a l'oest d'Europa durant l'últim període glacial és molt més clara en les anàlisis filogeogràfiques realitzades amb el cavil·lat (*Cottus gobio*). En aquesta espècie, tot i que les principals zones refugi per a les actuals poblacions del nord d'Europa van situar-se a l'est i al centre d'Europa (Kontula i Väinölä 2001) durant l'últim glacial (Würm), sembla que haurien sobreviscut poblacions al sud de les Illes Britàniques i a la costa Atlàntica francesa (Figura 4) (Volckaert *et al.* 2002).

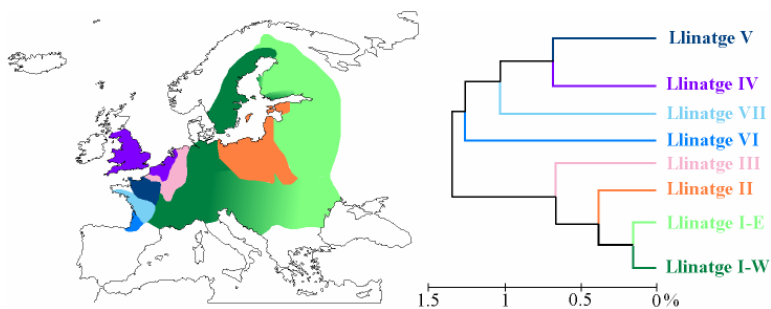


Figura 4. Distribució biogeogràfica i filogènia simplificada del cavil·lat (*Cottus gobio*).

De manera semblant, la distribució dels llinatges de la perca (*Perca fluviatilis*) al nord d'Europa (Figura 5) va suggerir a Nesbo *et al.* (1999) que la recolonització després de l'última glaciació es va fer des de tres refugis situats al nord-est, sud-est i oest d'Europa. En aquesta espècie, un llinatge Meridional ha sobreviscut a la zona del Danubi sense participar en la recolonització post-glacial del nord d'Europa.

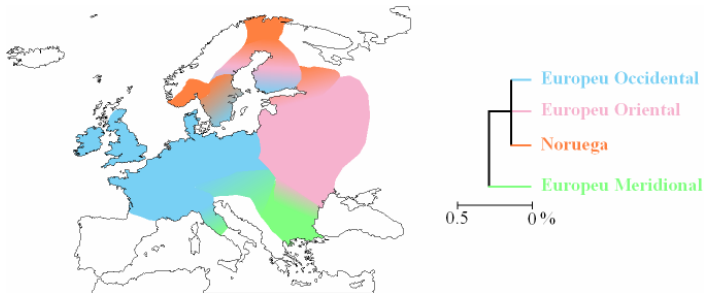


Figura 5. Distribució biogeogràfica i filogènia simplificada de la perca (*Perca fluviatilis*).

Un patró molt semblant s'ha descrit pel timal (*Thymallus thymallus*), on la recolonització post-glacial d'Escandinàvia es va produir a partir de refugis situats a l'est i al sud de la capa de gel, però sense la participació directa dels llinatges meridionals situats al Danubi i l'Adriàtic (Koskinen *et al.* 2000, Weiss *et al.* 2002) (Figura 6).

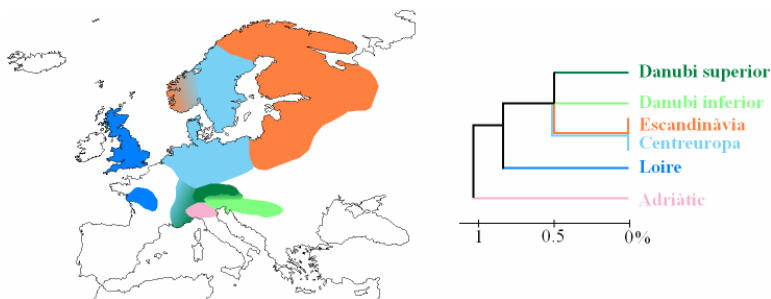


Figura 6. Distribució biogeogràfica i filogènia simplificada del timal (*Thymallus thymallus*).

Els treballs anteriors fan referència a espècies actualment distribuïdes pel centre i nord d'Europa, essent molt pocs els que fins ara s'han ocupat d'espècies distribuïdes també en les penínsules del sud. Una excepció notable són els treballs realitzats amb la bagra (*Squalius cephalus*). Aquesta espècie té una àmplia distribució a Europa, tot i que la seva presència a la península Ibèrica es troba restringida al nord-est (Durand *et al.* 1999a). En aquesta espècie la recolonització post-glacial hauria implicat expansions tant a la part septentrional com a la part meridional del rang de distribució (Figura 7). Pel que fa a la recolonització del nord d'Europa, les zones de refugi glacial es troben a la zona ponto-càspera, incloent la conca del Danubi, i el sud de França (Durand *et al.* 1999b), com en el cas del barb, des d'on s'hauria produït l'expansió cap al nord. A més a més per a la bagra s'ha proposat una expansió postglacial al sud d'Europa, al final del Pleistocè des del Danubi cap a Grècia (Durand *et al.* 1999c).

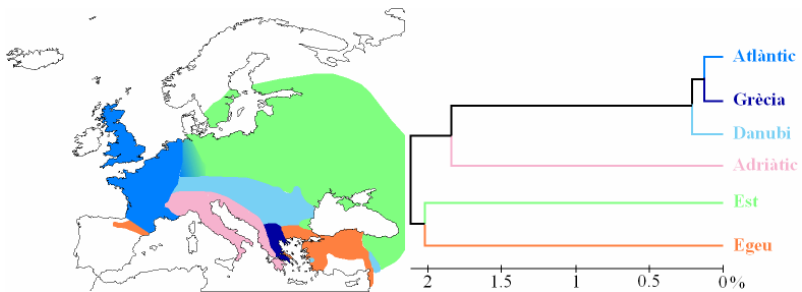


Figura 7. Distribució biogeogràfica i filogenia simplificada de la bagra (*Squalius cephalus*).

1.3. La truita comuna

La truita comuna (*Salmo trutta*) pertany a la família dels Salmònids. Presenta un rang natural de distribució immens a Europa i l'oest d'Àsia, des de les costes atlàntiques fins els tributaris del Mar d'Aral. Al sud s'extén fins les muntanyes de l'Atlas, al nord d'Àfrica (Berg 1948, Lelek

1980). La truita comuna ha estat introduïda fora d'Europa almenys a 24 estats de l'Àfrica, Amèrica del nord, Amèrica del sud, Àsia i Oceania (Elliott 1994). La majoria d'aquestes introduccions es feren a finals del segle XIX i principis del XX, abans que els riscos biològics de la introducció d'espècies al·lòctones fossin reconeguts. Actualment representa l'espècie més important en la pesca esportiva, i tot i ser poc important per a la pesca comercial, el seu pes socio-econòmic és considerable en molts països d'Europa (Laikre 1999, Moller-Hansen 2003). Apart d'aquest aspecte, la truita en particular i els salmònids en general estan guanyant pes específic com a sistemes model per testar un ampli rang de qüestions ecològiques i evolutives (Groot i Margolis 1991, Elliot 1994, Hendry i Stearns 2003, Crespi i Fulton 2004).

A la truita comuna s'ha detectat una considerable variabilitat ecològica i morfològica, tant dins com entre poblacions; essent una de les espècies de vertebrats amb una subestructuració genètica més acusada (Behnke 1986, Fergusson 1989, Bernatchez *et al.* 1992). Aquest fet s'ha traduït en la identificació de més d'un centenar de taxons diferents de truita comuna. Alguns autors (Kottelat 1997) defensen que aquests grups haurien de rebre el tractament d'espècie, tot i que algunes d'aquestes classificacions reflexen només plasticitat fenotípica i ambiental (Bernatchez *et al.* 1992, Giuffra *et al.* 1994, Susnik *et al.* 2004). Per exemple, les dades publicades indiquen que les poblacions classificades com a subespècies en base a l'estil de vida: *S.t.trutta* (forma anàdroma), *S.t.fario* (forma resident de riu) i *S.t.lacustris* (forma lacustre) no representen necessàriament grups monofilètics (Ryman 1983, Hyndar *et al.* 1991, Cross *et al.* 1992). Existeix doncs una considerable confusió en relació a la seva taxonomia (vegeu Elliott 1994, Kottelat 1997), que neix de la inacabada discussió sobre com classificar els diferents grups morfològics i/o genètics que s'han identificat. Tot i que la tendència és considerar la truita com una única espècie altament variable (revisat per Fergusson 1989), alguns taxonomistes prefereixen considerar-la com un complex d'espècies enlloc d'una única

espècie (p.e. Kottelat 1997), ja que així podria reflectir-se millor l'extensa variabilitat interpoblacional que s'observa.

1.3.1. Estudis morfològics

A la publicació del seu *Systema naturae* el 1758, Linné ja distingia els tres estils de vida de la truita comuna – anàdroma (*S.trutta*), resident (*S.fario*) i lacustre (*S.lacustris*) – descrivint a cada un dels seus representants com a espècies diferents. Tot i això, a partir de segle XIX aquesta classificació fou reiteradament criticada (vegeu Kottelat 1997). Durant la segona meitat del segle XX es feu evident que la classificació en tres espècies, subespècies o formes de truita donava una explicació inadequada de la evolució de l'espècie per causa de l'origen polifilètic dels estocs de truita lacustre, que en molts casos derivaven de diferents estocs de truita resident (Nümann 1967, Balon 1968). Aquest extrem ja havia estat proposat per Berg (1948) que, a partir de dades morfomètriques, diferencià fins a 14 tipus de truita: 4 d'anàdromes, 5 de residents i 5 de lacustres. La classificació de Berg considerava com a subespècies diferents les poblacions anàdromes de truita de les vessants atlàntica (*S.trutta*), Mar Negre (*S.t.labrax*), Mar Càspi (*S.t.caspius*) i Mar d'Aral (*S.t.aralensis*). Tot i que la classificació conservava l'estil de vida com un factor diferenciador, prevalien els criteris geogràfics i així algunes formes residents es consideraven morpha dins les anteriors subespècies anàdromes: a l'Atlàntic, *S.trutta morpha fario*, al Mar Negre, *S.t.labrax morpha fario*, al Mar Caspi, *S.t.caspius morpha fario*. Només les truites residents del Mar d'Aral (*S.t.oxianus*) i de la vessant mediterrània (*S.t.macrostigma*), on no s'hi dóna la forma anàdroma es consideraven també com a subespècies. Conclusions similars s'aplicaven a la classificació de les formes lacustres de les varietats: atlàntiques (*S.trutta morpha lacustris*), Mar Negre (*S.t.labrax morpha lacustris*) i Caspi (*S.t.caspius morpha lacustris*) que es consideraven *morpha*, mentre que

tan sols *S.ischchan* del llac Sevan (Armènia) i *S.t.ezenami* del llac Ezenam (Daguestán) eren considerades en un nivell taxonòmic superior.

Uns anys més tard, Lelek (1980), a partir d'un estudi morfològic, diferencià entre set tipus de truita: 2 anàdromes, 4 residents i una lacustre. A partir de l'assumpció que la forma anàdroma atlàntica (*S.trutta trutta*) va donar lloc a la resta de tipus, l'autor descriu la forma resident atlàntica (*S.t. morpha fario*) i una única forma lacustre per a tot el rang europeu de distribució de l'espècie (*S.t. morpha lacustris*). D'altra banda, les formes anàdromes dels mars Negre i Caspi són agrupades en el tipus *S.t. labrax*, i es defineixen tres formes residents més, una per a la vessant mediterrània (*S.t.macrostigma*), una al Mar Negre (*S.t. labrax morpha fario*) i una al Caspi (*S.t. caspius*). Les poblacions del Mar d'Aral no foren analitzades en aquest estudi.

Darrerament, una revisió de Kottelat (1997) elevà fins a vint-i-set el nombre d'espècies reconegudes, totes dins del gènere *Salmo*. Però si afegim el calaix de sastre on s'hi encabiren totes les formes dels mars Caspi i d'Aral, el nombre d'espècies per a la truita comuna s'enfila fins a trenta-nou. Aquest increment espectacular del nombre d'espècies es fonamenta en la relaxació del concepte d'espècie a partir de l'aplicació dels següents criteris. Primer, si les diferents formes són genèticament diferents i es troben aïllades reproductivament, són espècies diferents. Segon, si les diferents formes no són diferenciables genèticament – les tècniques moleculars utilitzades no han detectat diferències – però es troben aïllades reproductivament també es consideren espècies diferents. Tercer i últim, només si les diferents formes no són diferenciables a nivell genètic i no es troben aïllades reproductivament, poden considerar-se una única espècie. Per exemple, l'autor reuneix en una única espècie les tres formes de vida de la truita atlàntica (*S.trutta*), però defineix quatre espècies simpàtriques al llacs Ohrid, tres espècies al llac Melvin i dues espècies al llac Neagh.

Un estudi posterior basat també en dades morfològiques (Dorofeeva 2000), qüestiona l'estatus taxonòmic de moltes d'aquestes espècies i només considera l'existència de cinc espècies de truita comuna. Una àmpliament distribuïda a les vessants atlàntica, mediterrània i a la zona ponto-càspera (*S.trutta*), i quatre d'endèmiques amb una distribució geogràfica molt reduïda: *S.ischchan* (llac Sevan, Armènia), *S.letnica* (llac Ohrid, ex-república iugoslava de Macedònia), *S.carpio* (llac Garda, Itàlia) i *S.marmoratus* (costa adriàtica).

1.3.2. Anàlisis genètiques

A nivell molecular la truita comuna ha estat una espècie bastant estudiada. Els primers treballs sobre l'estructura genètica de la truita comuna realitzats en poblacions atlàntiques (Allendorf *et al.* 1976, Ryman *et al.* 1979, Fergusson i Mason 1981), indicaven una elevada diversitat genètica que es relacionava tant amb paràmetres ecològics com amb raons històriques. Treballs posteriors han descrit diferents grups de poblacions en el rang de distribució de l'espècie. A partir de la divergència en les seqüències parcials de la regió de la control de mtDNA, Bernatchez *et al.* (1992) proposaren cinc llinatges evolutius: Adriàtic (AD), Atlàntic (AT), Danubi (DA), Mediterrani (ME) i Marmoratus (MA), amb una distribució bàsicament al·lopàtrica a la Mediterrània oriental, la vessant atlàntica, la regió ponto-càspera, la Mediterrània occidental i l'Adriàtic nord, respectivament. Aquests cinc llinatges foren confirmats posteriorment amb anàlisis combinades de seqüència i RFLPs de mtDNA (Bernatchez 2001), amb el llinatge Atlàntic com a ancestral (Giuffra *et al.* 1994). D'altra banda, anàlisis filogenètiques amb el gen nuclear de la transferrina, mostraven coincidència a grans trets amb la del mtDNA en la definició dels grups evolutius de truita, tot i que assenyalaven les poblacions de la zona ponto-càspera, en el rang de distribució del llinatge Danubi, com a més antigues (Antunes *et al.* 2002). Les anàlisis morfològiques més recents consideren

el llinatge MA com el més divergent i el col·loquen a l'arrel del grup (Dorofeeva 2000).

La baixa diversitat detectada amb els marcadors de mtDNA dins del llinatge matriarcal de l'Atlàntic contrasta amb l'elevada diversitat detectada amb anàlisis al·lozimiques al nord d'Europa (Hamilton *et al.* 1989, García-Marín *et al.* 1999a, Makhrov *et al.* 2002) i especialment a la península Ibèrica, on s'han detectat importants graus d'estructuració poblacional amb marcadors d'al·lozims (Sanz *et al.* 2000, Bouza *et al.* 2001), RFLPs (Machordom *et al.* 2000), i seqüències de mtDNA (Weiss *et al.* 2000, Antunes *et al.* 2001). La magnitud d'aquesta diferenciació per a les poblacions de truita comuna a la conca del Duero ha fet que es proposés l'existència d'un llinatge endèmic per a aquesta àrea (Suárez *et al.* 2001).

La distribució al·lopàtrica dels llinatges a la Mediterrània també és objecte de controvèrsia, ja que s'han detectat barreges entre grups de poblacions a la península Ibèrica (Sanz *et al.* 2002), el nord d'Itàlia (Giuffra *et al.* 1996), Eslovènia (Berrebi *et al.* 2000) i Grècia (Apostolidis *et al.* 1997). En canvi, altres anàlisis donen suport a la distribució al·lopàtrica dels llinatges als rius mediterranis de la península Ibèrica (Machordom *et al.* 2000).

A la regió ponto-càspera, l'estatus de la diferenciació entre les conques dels mars Negre, Caspi i d'Aral no ha pogut ser confirmada per les anàlisis al·lozimiques i de mtDNA (Osinov i Bernatchez 1996, Bernatchez 2001), tot i que es reconeix un grau de diferenciació enorme entre les poblacions, i no es descarta que les poblacions de cada vessant constitueixin un llinatge propi (Bernatchez 2001) com havia proposat Berg (1948) a partir de dades morfològiques.

1.3.3. Efecte de les glaciacions sobre la distribució de la truita comuna

Al nord-est de l'Atlàntic, les poblacions de truita comuna van ser molt afectades per les glaciacions del Pleistocè, de manera que les poblacions actuals provenen dels episodis de recolonització que ocorregueren després del retrocés del gel en l'últim període glacial. L'existència de

refugis glacials, i la identificació dels diferents grups que haurien evolucionat en aïllament durant els períodes glacials i haurien participat en el procés de recolonització, han focalitzat part de l'atenció en la literatura relativa a la truita comuna. Hamilton *et al.* (1989) definiren l'existència de dos races de truita atlàntica a partir de la variabilitat present en el locus *LDH-C** (antic *LDH-5**), una d'ancestral caracteritzada per l'al·lel *LDH-C*100*, i una de moderna que presentava l'al·lel *LDH-C *90*. Aquesta variant moderna hauria aparegut en un refugi a l'est de la capa de gel durant l'última glaciació i s'hauria estès a tota la zona recolonitzada. Osinov i Bernatchez (1996) coincideixen amb Hamilton *et al.* (1989) en proposar un refugi a l'est de la capa de gel per a la truita durant el Würmià. El locus *sAAT-1,2** també s'ha utilitzat com a marcador en les rutes de colonització postglacial i la diferent freqüència dels al·lells **100* i **116* ha permès definir un model binari amb un refugi al Bàltic i un a l'Atlàntic durant l'últim període glacial (Makhrov *et al.* 2002). Tot i així, el patró de colonització dels dos grups no concorda amb l'obtingut a partir de les anàlisis del mtDNA, que assenyalen cap a un patró més complex de distribució i filogènia dels haplotips (Hynes *et al.* 1996). Basant-se en la variació en els loci *LDH-C** i *CK-A1**, García-Marín *et al.* (1999a) van descriure quatre llinatges de truita, tres dels quals estaven implicats en la recolonització del nord d'Europa, i haurien sobreviscut en refugis glacials situats: i) a l'entorn del canal de la Mànega ii) a la vessant atlàntica Ibèrica i el sud de França i iii) a la zona ponto-càspera. Segons Bernatchez (2001) el llinatge de la regió ponto-càspera no hauria participat en la recolonització post-glacial però sí els dos primers. Weiss *et al.* (2000) consideren dubtosa la participació de les poblacions ibèriques en la recolonització postglacial, i proposen que els refugis des dels que s'expandiren les poblacions es trobarien més al nord.

1.4. Objectius del treball

La idea inicial d'aquest treball de tesi es plantejà a partir de la concessió per part de la CICYT del projecte *Recursos genéticos nativos de la trucha común, Salmo trutta, en España: Biogeografía y gestión* (Referència AGF 98-0636). Els objectius específics d'aquest projecte incloïen aconseguir marcadors de mtDNA per a les poblacions ibèriques autòctones de truita i dels estocs exògens que es fan servir als centres piscícoles i descriure els patrons biogeogràfics d'aquesta diferenciació a la península Ibèrica. L'aparició dels treballs de Machordom *et al.* (2000) i Suárez *et al.* (2001), que a grans trets van aportar aquesta informació, van fer revisar aquest objectiu inicial en els següents tres objectius:

1. *Descripció dels patrons filogeogràfics de la truita comuna a Europa*

El primer objectiu d'aquest treball de tesi ha estat reconstruir la història evolutiva de la truita comuna a les vessants mediterrània i atlàntica, utilitzant com a marcador molecular la regió de control del mtDNA.

2. *Comparació entre marcadors moleculars*

El segon objectiu del treball ha estat comparar la utilitat dels gens nuclears (al·lozims en el nostre cas) i mitocondrials per reconstruir la història evolutiva de la truita comuna.

3. *Revisió de les relacions filogenètiques a la truita comuna*

El tercer objectiu d'aquesta tesi ha estat una revisió de les relacions evolutives entre els llinatges matriarcal descrits a la truita comuna.

2. Material i Mètodes

2.1. Material

En aquesta tesi s'ha utilitzat com a material mostres de truita comuna que abracen una gran part del rang natural de distribució de l'espècie (Figures 8 i 9). Les mostres obtingudes ho han estat a partir de captures realitzades pel propi laboratori i per mostres cedides per altres laboratoris en funció de la participació en projectes de col·laboració. En el moment en què es concedí el projecte motiu de l'inici d'aquesta tesi, el Laboratori d'Ictiologia Genètica (LIG) disposava d'un centenar de mostres de truita, tant provinents de poblacions naturals com de centres piscícoles. Moltes d'aquestes mostres havien estat analitzades prèviament amb la tècnica d'electroforesi de proteïnes en l'àmbit d'altres projectes del laboratori. A partir de la informació continguda en aquests treballs inicialment es van triar quaranta-nou mostres – després ampliades a cinquanta-dues - de poblacions potencialment informatives del patró biogeogràfic de l'espècie a la península Ibèrica. Un criteri restrictiu per a la selecció d'aquestes mostres va ser que fossin poc influenciades per les repoblacions. D'aquestes mostres, 27 provenien de la vessant atlàntica, 22 de la

vessant mediterrània i 3 eren estocs de centres piscícoles utilitzats en la repoblació (Taula 1, Figura 8). Posteriorment, dins del projecte REN2000-0740-CO2-01 del MCYT, *Incidencia de la repoblación y la pesca deportiva sobre los recursos genéticos nativos de la trucha común en España*, es van incorporar quatre mostres Mediterrànies més al mostratge (Taula 1, Figura 8).

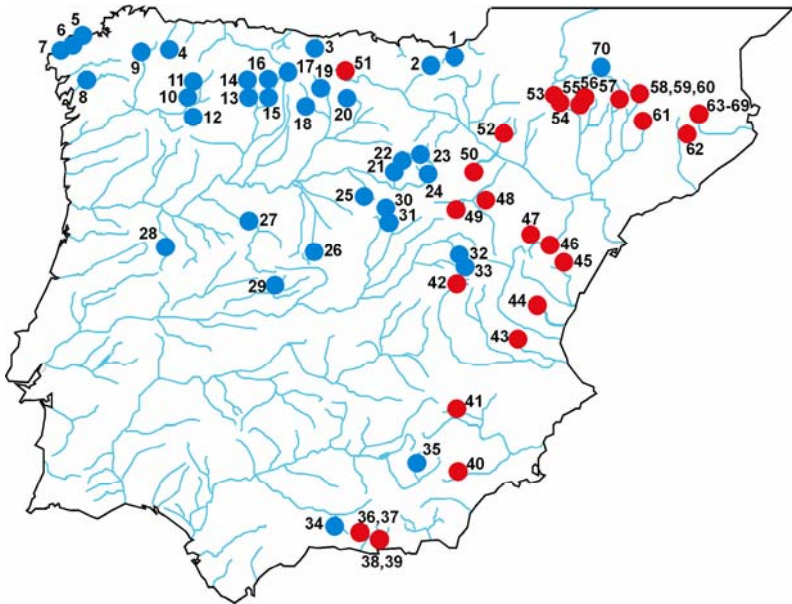


Figura 8. Localització geogràfica de les mostres de truita comuna de la península Ibèrica analitzades. Els números corresponen a la Taula 1. ● vessant Atlàntica, ● vessant Mediterrània.

Paral·lelament, i en el marc de l'acció concertada EU FAIR CT97-3882 de la Unió Europea, *Identification, Management and Exploitation of Genetic Resources in the Brown trout (Salmo trutta)* i del projecte ITT-CTP 2001-3 de la Comunitat de Treball dels Pirineus, *Avaluació de la diversitat poblacional de la truita comuna, Salmo trutta, en el Massís Pirinenc*, fou possible aconseguir mostres de truita de tot el rang de distribució de l'espècie; en total es van rebre 54 mostres (Taula 1, Figures 8 i 9), 6

provinents de la vessant Ponto-Càsquia, 34 de l'Atlàntica, 13 de la Mediterrània i un quart estoc de centre piscícola. En conjunt 1442 exemplars de truita comuna procedents de 110 localitats (Taula 1).

Com s'ha indicat anteriorment, el segon objectiu d'aquesta tesi s'ha proposat realitzar una comparació entre marcadors moleculars, entre seqüències de mtDNA i al-lozims (capítol 1). Per això, i com ja s'ha dit més amunt, es van triar inicialment 49 localitats analitzades prèviament amb la tècnica electroforètica al laboratori per a les anàlisis de seqüències. D'aquestes, 46 mostres provinents de localitats ibèriques d'origen tant Atlàntic com Mediterrani van ser les utilitzades per avaluar la utilitat relativa dels marcadors mitocondrials en relació als al-lozims (Taula 1). Les tres mostres que no s'han utilitzat corresponen als estocs de centre piscícola.

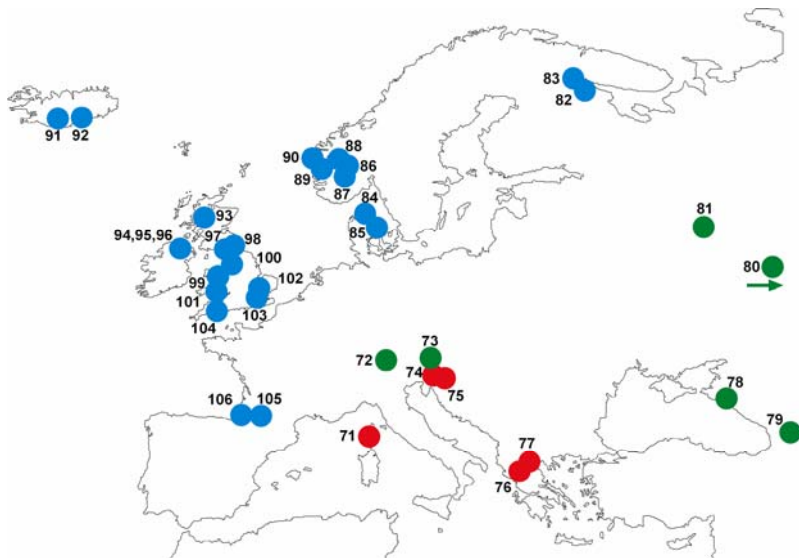


Figura 9. Localització geogràfica de les mostres europees de truita comuna analitzades. Els números corresponen a la Taula 1. ● vessant ponto-càsquia, ● vessant atlàntica, ● vessant mediterrània.

Taula 1. Mostres analitzades, amb especificació del nombre d'individus seqüenciats, origen, vessant, utilització en la comparació entre tècniques i projecte al que pertanyen.

Localitat	n	Origen	Vessant	Comparació Al-lozims	Projecte
1 Oria-Santolatz	23	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
2 Oria-Gorrotola	26	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
3 Nansa-Vendúl	18	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
4 Navia-Lamas	10	P. Ibèrica	Atlàntica	No	2
5 Camariñas	3	P. Ibèrica	Atlàntica	No	3
6 Rudrón	3	P. Ibèrica	Atlàntica	No	3
7 Lires	5	P. Ibèrica	Atlàntica	No	3
8 Umia-Bermaña	10	P. Ibèrica	Atlàntica	No	2
9 Miño-Labrada	10	P. Ibèrica	Atlàntica	No	2
10 Miño-Sil	20	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
11 Miño-Palacios	20	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
12 Miño-Boeza	20	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
13 Duero-Millar	18	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
14 Duero-Bernesga	20	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
15 Duero-Esla	16	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
16 Duero-Villomar	19	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
17 Duero-Riaño	14	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
18 Duero-Pisuerga	27	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
19 Duero-Carrión	28	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
20 Duero-Pedroso	3	P. Ibèrica	Atlàntica	No	3
21 Duero-Abián	23	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
22 Duero-Duruelo	24	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
23 Duero-Tera	20	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
24 Duero-Mazo	18	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
25 Duero-Aguisejo	19	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
26 Duero-Moros	25	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
27 Duero-Tormes	15	P. Ibèrica	Atlàntica	No	2
28 Duero-Águeda	15	P. Ibèrica	Atlàntica	No	2
29 Tajo-Arenal	30	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
30 Tajo-Bornova	17	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
31 Tajo-Dulce	20	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
32 Tajo-Hoceseca	19	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
33 Tajo-Pelagallinas	17	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
34 Guadalquivir-Dílar	16	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
35 Guadalquivir-Castril	20	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
36 Guadalfeo-Lanjarón	10	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
37 Guadalfeo-Chico	10	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
38 Guadalfeo-Trévez	10	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
39 Guadalfeo-Poqueira	10	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
40 Segura-Madera	27	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
41 Segura-Endrinales	35	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
42 Túrria-Noguera	24	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
43 Túrria-Vallauca	20	P. Ibèrica	Mediterrània	No	1
44 Palancia	21	P. Ibèrica	Mediterrània	No	1
45 Millars-Villahermosa	27	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
46 Ebre-Pitarque	5	P. Ibèrica	Mediterrània	No	3
47 Ebre-Guadalope	5	P. Ibèrica	Mediterrània	No	3
48 Ebre-Pancrudo	3	P. Ibèrica	Mediterrània	No	3
49 Ebre-Mesa	5	P. Ibèrica	Mediterrània	No	3

1, AGF98-0636; 2, EU FAIR CT97-3882; 3, ITT-CTP 2001-3; 4, REN2000-0740-CO2-01

Taula 1. Continuació.

Localitat	n	Origen	Vessant	Comparació Al-lozims	Projecte
50 Ebre-Huecha	5	P. Ibèrica	Mediterrània	No	3
51 Ebre-Guares	30	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
52 Ebre-Lubierre	5	P. Ibèrica	Mediterrània	No	3
53 Ebre-Alto Ara	5	P. Ibèrica	Mediterrània	No	3
54 Ebre-Ordisa	15	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
55 Ebre-Otal	18	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
56 Ebre-Acirón	5	P. Ibèrica	Mediterrània	No	3
57 Ebre-Conangles	22	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
58 Ebre-Contraig	21	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
59 Ebre-Cardós	25	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
60 Ebre-Manyanet	23	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
61 Ebre-La Llosa	11	P. Ibèrica	Mediterrània	No	1
62 Llobregat-Riutort- II	21	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
63 Ter-Pla de la Molina	19	P. Ibèrica	Mediterrània	No	4
64 Ter-I	15	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
65 Ter-II	16	P. Ibèrica	Mediterrània	No	4
66 Ter-Núria-I	16	P. Ibèrica	Mediterrània	No	4
67 Ter-Núria-II	16	P. Ibèrica	Mediterrània	No	4
68 Ter-Querlals	28	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
69 Ter-Massanes	10	P. Ibèrica	Mediterrània	Sí	1
70 Garona-Ruda	25	P. Ibèrica	Atlàntica	Sí	1
71 Corsica	10	França	Mediterrània	No	2
72 Llac Sils	2	Suïssa	Ponto-Càspia	No	2
73 Danubi-Bistrica	10	Eslovènia	Ponto-Càspia	No	2
74 Soca-Zadlascica	10	Eslovènia	Mediterrània	No	2
75 Soca-Trebuscica	10	Eslovènia	Mediterrània	No	2
76 Tripotamos	2	Grècia	Mediterrània	No	2
77 Alfios	2	Grècia	Mediterrània	No	2
78 Kodori	5	Rússia	Ponto-Càspia	No	2
79 Llac Sevan	5	Armènia	Ponto-Càspia	No	2
80 Oxus	6	Afganistan	Ponto-Càspia	No	2
81 Apshak	3	Rússia	Ponto-Càspia	No	2
82 Nilima	4	Rússia	Atlàntica	No	2
83 Vorobiev	2	Rússia	Atlàntica	No	2
84 Karup	10	Dinamarca	Atlàntica	No	2
85 Skals	10	Dinamarca	Atlàntica	No	2
86 Llac Bjornes	5	Noruega	Atlàntica	No	2
87 Jakta	10	Noruega	Atlàntica	No	2
88 Sima	10	Noruega	Atlàntica	No	2
89 Guddal resident	10	Noruega	Atlàntica	No	2
90 Guddal anàdroma	9	Noruega	Atlàntica	No	2
91 Island	1	Islàndia	Atlàntica	No	2
92 Skorradalvatn	6	Islàndia	Atlàntica	No	2
93 Loch Romoch	1	Escòcia	Atlàntica	No	2
94 Melvin-Ferox	1	Irlanda	Atlàntica	No	2
95 Melvin-Sonaghem	1	Irlanda	Atlàntica	No	2
96 Melvin-Gillaroo	1	Irlanda	Atlàntica	No	2
97 Coquet	4	Anglaterra	Atlàntica	No	2
98 Wear	4	Anglaterra	Atlàntica	No	2
99 Conwy	4	Gal·les	Atlàntica	No	2

1, AGF98-0636; 2, EU FAIR CT97-3882; 3, ITT-CTP 2001-3; 4, REN2000-0740-CO2-01

Taula 1. Continuació.

Localitat	n	Origen	Vessant	Comparació Al·lozims	Projecte
100 Lune	4	Anglaterra	Atlàntica	No	2
101 Teifi	4	Gal·les	Atlàntica	No	2
102 Stour	4	Anglaterra	Atlàntica	No	2
103 Rother	4	Anglaterra	Atlàntica	No	2
104 Fowey	4	Anglaterra	Atlàntica	No	2
105 Beherobentako	10	França	Atlàntica	No	2
106 Adour-Luz	9	França	Atlàntica	No	2
107 Estoc Bagà	23	Centreeuropa	Atlàntica	No	1
108 Estoc Planduiar	5	Centreeuropa	Atlàntica	No	3
109 Estoc Uña	29	Centreeuropa	Atlàntica	No	1
110 Estoc Carballedo	14	Centreeuropa	Atlàntica	No	1

1, AGF98-0636; 2, EU FAIR CT97-3882; 3, ITT-CTP 2001-3; 4, REN2000-0740-CO2-01

2.2. Metodologia

2.2.1. Antecedents

Bernatchez *et al.* (1992), es basaren en la variació de 310 pb de l'extrem 5' de la regió de control del mtDNA a l'hora de definir els cinc llinatges mitocondrials que s'accepten actualment per a la truita de riu, i només seqüenciaren 330 pb de l'extrem 3' per a un representant de cadascun dels haplotips identificats per l'extrem 5'. D'aquesta manera, es tipificaren 26 posicions variables en ambdós extrems de la regió de control, pels 12 primers haplotips utilitzats per a la definició dels llinatges AT, DA, ME, AD i MA. Posteriorment, altres estudis filogenètics sobre la truita de riu que utilitzaven el mateix marcador molecular es basaren exclusivament en la variabilitat del domini esquerre (extrem 5') i obviaren el domini dret en les seves anàlisis (Giuffra *et al.* 1994, Osinov i Bernatchez 1996, Apostolidis *et al.* 1997). La variabilitat detectada a partir de l'ús exclusiu de l'extrem 5' de la regió de control podia representar una infraestimació de la variació total present en la molècula. En conseqüència, com a primer pas d'aquest treball es va procedir a la seqüenciació de tota la regió de control del mtDNA per obtenir estimes de la diversitat poblacional i valorar el seu potencial filogenètic (vegeu Article I).

2.2.2. Procediments de laboratori

Extracció del DNA

Excepte les mostres de les que es va rebre directament DNA (76 individus corresponents a 22 localitats), de la resta es va procedir a l'extracció de DNA total a partir de múscul esquelètic, seguint el protocol descrit a Sambroock *et al.* (1989) amb lleugeres modificacions. La majoria de mostres analitzades del LIG havien estat conservades en congeladors a 20 °C sota zero fins al moment de l'anàlisi. En canvi, gran part de la resta de mostres van arribar en forma de petits fragments de múscul esquelètic conservats en etanol. Una petita porció de teixit triturat (aproximadament 500 mg) de cada individu s'incubà tota la nit a 37°C amb 600 µl de tampó TENS i 40 µl de proteïnasa K (20 mg/ml). A continuació el DNA s'extreia amb un volum de fenol i posteriorment amb un volum de fenol-cloroform-alcohol isoamílic (25:24:1). El DNA de cada mostra era precipitat amb etanol, posteriorment decantat i evaporat, resuspenent-se finalment el "pellet" amb 60-100 µl d'aigua deionitzada de manera que s'obtenia una concentració final aproximada de DNA de 50 ng/µl.

Amplificació del DNA

Les reaccions d'amplificació amb la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es van fer en volums de treball de 50 µl que contenien 2 µl de l'extracció de DNA, 0.25 unitats de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Biotaq™, Cultek o Amplitaq™, Applied Biosystems), 5 µl del tampó de reacció (subministrat pel proveïdor), 20 pmol de cadascun dels primers, 2mM MgCl₂, 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Farmacia o Applied Biosystems) i aigua deionitzada fins a completar el volum de treball. La reacció d'amplificació es composava d'un pas inicial de desnaturalització de 5' a 95°C, seguit de 30 cicles de 1 minut de desnaturalització de la cadena a 95°C, 1 minut per a la hibridació dels primers a 52°C i 1 minut d'extensió a 72°C, amb una extensió de 5 minuts al final de la reacció. La totalitat de la regió de control del mtDNA de truita comuna es va amplificar utilitzant primers específics que hibriden amb les

regions immediatament adjacents. Aquests *primers* són per a la cadena lleugera el PST (5'CCCAAAGCTAAAATTCTAAAT3'), i per a la cadena pesada el FST (5'GCTTTAGTTAAGCTACGC3').

El PST es va obtenir a partir del *primer* t-pro (Sheclock *et al.* (1992), que hibrida amb el gen del RNA transferent (tRNA) de la prolina, localitzat per davant de l'extrem 5' de la regió de control. El FST fou obtingut a partir del *primer* M (Lee *et al.* 1995), que té la seqüència complementària localitzada en el gen del tRNA de la fenilalanina, que es troba darrera de l'extrem 3' de la regió de control. Els productes amplificats es van comprovar en una electroforesi en gel d'agarosa al 1% amb bromur d'etidi (0.5 mg/ml) al 0.1% i si l'amplificació era correcta es netejaven amb GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Quiagen).

Obtenció i alineament de les seqüències

Els primers intents de seqüenciació directa de tot el fragment amplificat van donar problemes com a conseqüència de la longitud de la regió de control (~1 kb), i de la presència d'un homopolímer format per uns tretze residus consecutius de timina que destorbava el procés de seqüenciació automàtica. Per això es van fer dues aliquotes de cada producte amplificat de PCR, i cadascuna d'aquestes aliquotes es va seqüenciar amb el *primer* corresponent des de cada extrem cap el bloc de pirimidines. Les reaccions de seqüenciació es van preparar amb dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit seguint les recomanacions del fabricant (Applied Biosystems). Els productes de la seqüenciació es van llegir al laboratori via electroforesi capil·lar utilitzant un seqüenciador automàtic ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Per a cada individu, la regió de control es va resoldre unint les dues seqüències obtingudes prenent el segment de poliT com a referència, i considerant una longitud fixa de 13 nucleòtids per aquest segment. Aquesta longitud de tretze nucleòtids era el valor mitjà descrit en les 6 úniques seqüències completes de la regió de control del mtDNA de truita comuna disponibles en el banc de dades de l'EMBL, quan es van iniciar els procediments de

laboratori (números d'accés U62283 a U62287 i X83596). Totes les seqüències es van alinear a ull, fent servir com a referència la seqüència del laboratori X83596, i editant-les amb el programa SEQED v.1.0.3.

2.2.3 Anàlisi de les dades

Obtenció dels haplotips i assignació de llinatges

Un cop es van tenir les seqüències alineades, els haplotips es definiren i s'assignaren a un llinatge evolutiu comparant les posicions variables trobades amb les definides per Bernatchez *et al.* (1992) i Bernatchez (2001). Per a l'assignació dels llinatges, hem aplicat els mateixos 5 codis utilitzats per Bernatchez *et al.* (1992), i considerant la singularitat dels haplotips del Duero tal i com descriuen Suárez *et al.* (2001): AT (Atlàntic), DA (Danubi), ME (Mediterrani), AD (Adriàtic), MA (Marmoratus) i DU (Duero). En el nostre cas, la nomenclatura haplotípica es completava amb l'assignació d'un número de seqüència pels grups anteriors precedit de les lletres *cs* com a acrònim de l'anglès *complete sequence* (seqüència completa). Per exemple ATcs1 voldria dir que l'haplotip en qüestió és el primer que hem tipificat per seqüència completa al llinatge AT de Bernatchez *et al.* (1992). La utilització d'aquesta nomenclatura permet diferenciar els nostres haplotips dels definits per altres autors a partir de la seqüenciació parcial dels extrems 5' o 3' de la regió de control (Bernatchez *et al.* 1992, Giuffra *et al.* 1994, Apostolidis *et al.* 1997, Weiss *et al.* 2000, Antunes *et al.* 2001, Weiss *et al.* 2001).

Estudi i modelització del procés de substitució nucleotídica

La mesura més simple de la distància evolutiva entre dues seqüències és la proporció de diferències nucleotídiques. Tot i així, aquesta mesura no és estrictament proporcional al temps de divergència de les dues seqüències a causa de la possibilitat de múltiples substitucions en un mateix lloc. Aquest procés, anomenat saturació de la substitució nucleotídica, provoca la pèrdua d'informació filogenètica i fa que es produeixi soroll. Avaluar la saturació del procés de substitució nucleotídica

i destriar el soroll del senyal filogenètic, ha de ser el prelude necessari a qualsevol inferència filogenètica, per evitar el risc de concloure un arbre erroni quan el procés de substitució nucleotídica en un determinat fragment de DNA està saturat. La saturació pot detectar-se gràficament representant les diferències detectades entre parells de taxons *versus* una estimació del temps de divergència dels taxons (Brown 1983, Moritz *et al.* 1987). Quan es treballa amb dades no saturades, a mesura que s'incrementa el temps de divergència entre taxons, les diferències entre parelles de seqüències també ho fan, donant lloc a una relació lineal. Per contra, quan els llocs nucleotídics estan saturats, el nombre de diferències entre parelles de seqüències assoleix un màxim, que gràficament observem com una corba assintòtica, que s'aplana (*plateau*) quan s'arriba al màxim de diferències. En aquest treball, a més de gràficament, la saturació del procés de substitució nucleotídica s'ha avaluat per mitjà del test de Xia (Xia *et al.* 2003). Tant l'anàlisi gràfica de la saturació com el test de Xia s'han fet amb el programa DAMBE (Xia i Xie 2001).

Per a l'estudi de l'evolució molecular també ens cal saber la taxa de substitució nucleotídica (r) per a cadascun dels llocs de la seqüència del marcador utilitzat. La taxa de substitució nucleotídica no és necessàriament la mateixa per a tots els llocs, ja que sol ser més alta en llocs funcionalment menys importants que en llocs funcionalment importants (Kimura 1983). Uzzell i Corbin (1971) van proposar que la taxa de substitució nucleotídica variava entre llocs en funció d'una distribució gamma, $\Gamma(r)$. El pendent d'aquesta distribució ve determinat pel paràmetre α . Se sap que la distribució gamma és molt flexible i pren varies formes en funció del paràmetre α del pendent. Quan $\alpha=\infty$, r és la mateixa per a tots els llocs nucleotídics. Quan $\alpha=1$, r segueix la distribució exponencial, indicant que r varia molt entre llocs. Quan $\alpha<1$, la distribució de r és encara més esbiaixada, i una proporció substancial de llocs tenen un valor de r proper a 0 i són pràcticament invariables. La calibració del paràmetre α de la distribució $\Gamma(r)$ de la regió de control de la truita comuna s'ha fet a partir del programa MODELTEST v.3.06 (Posada i Crandall 1998).

Molts mètodes filogenètics fan assumpcions, explícites o implícites, sobre el procés de substitució del DNA (Felsenstein 2004), i en conseqüència aquests mètodes d'inferència filogenètica depenen en una o altra mesura del model de substitució nucleotídica que apliquem. Els models de substitució que s'han desenvolupat intenten donar explicació al procés d'evolució molecular, a partir de la consideració de diferents paràmetres en el procés de substitució nucleotídica: la freqüència igual o desigual dels nucleòtids, la ràtio transicions/transversions, la taxa de mutació de purines i pirimidines, la taxa de retromutació, entre altres (vegeu Nei i Kumar 2000). En aquest treball s'ha analitzat quin dels models s'ajusta millor a les nostres dades amb el programa MODELTEST v.3.06, utilitzant el test estadístic de ràtio de versemblança (*likelihood ratio test statistic*).

Amb l'estudi combinat de la saturació, de la distribució de la taxa de substitució nucleotídica per lloc i del model de substitució nucleotídica hem pogut ajustar el patró d'evolució de la regió de control del mtDNA a l'hora de reconstruir les relacions filogenètiques entre els haplotips.

Relacions filogenètiques entre haplotips

Les relacions evolutives entre gens o organismes solen presentar-se en forma d'arbres filogenètics. La majoria de mètodes de reconstrucció filogenètica utilitzen algun criteri d'optimització per avaluar l'ajust d'un conjunt de dades a una topologia i després cerquen l'arbre que dona la millor puntuació en relació a aquest criteri (Kumar i Filipski 2001).

Hi ha diferents mètodes que es poden utilitzar per reconstruir un arbre filogenètic a partir de dades moleculars. En aquest treball s'ha aplicat l'anàlisi de màxima parsimònia (MP), l'anàlisi de màxima versemblança (ML, de l'anglès *Maximum Likelihood*) i el mètode de *neighbor-joining* (NJ) a partir de matrius de distància nucleotídica entre els haplotips.

El mètode de parsimònia és basa en la idea filosòfica de Guillem d'Ockham que la millor hipòtesi per explicar un procés és la que requereix el menor nombre d'assumpcions (Llei de la parsimònia o navalla d'Ockham). Sober (1988) sosté que quants menys paràmetres calgui

estimar per construir una filogènia més confiança podem tenir en les nostres conclusions. Amb aquest mètode busquem una filogènia que, quan reconstruïm els esdeveniments evolutius que generen les nostres dades, inclogui el menor nombre de passos mutacionals possible. El procediment obvi per buscar l'arbre més parsimoniós és considerar tots els arbres possibles, un darrera l'altre, i avaluar-los tots comptant el nombre de passos mutacionals que calen per explicar tot el procés evolutiu de la topologia. Al final es tria com a arbre més parsimoniós la topologia que requereix el menor nombre de passos mutacionals. El nombre de topologies a avaluar però, creix ràpidament a mesura que ho fa el nombre de seqüències (15 per 4 seqüències, $3.4 \cdot 10^7$ per 10 seqüències, $3.5 \cdot 10^{14}$ per 20 seqüències). Això fa pràcticament impossible avaluar totes les topologies (algoritme de cerca exhaustiva) quan el nombre de seqüències és elevat. Quan no es possible utilitzar un algoritme de cerca exhaustiva, podem imaginar la cerca en un espai d'arbres possible (cerca heurística). Les tècniques de cerca heurística construeixen un arbre provisional de MP fent servir un algoritme d'addició de seqüències anomenat *stepwise addition algorithm*. El mètode comença construint un arbre nucli de tres haplotips triats a l'atzar. A continuació un quart haplotip es connecta alternativament a cadascuna de les tres branques de l'arbre nucli i es calculen les longituds dels tres arbres resultants. L'arbre amb el menor nombre de passos mutacionals es pren per al següent pas d'addició d'haplotips i es descarten els altres dos. Aquí recomença el procés i un cinquè haplotip és connectat a cadascuna de les cinc branques de l'arbre de quatre, recalculant-se de nou les longituds dels arbres i triant-se l'arbre de cinc haplotips que s'explica amb menys canvis nucleotídics. Aquest procés continua fins a obtenir un arbre amb tots els haplotips, l'arbre provisional de MP. Aquest arbre sol presentar un nombre de passos mutacionals més gran que l'arbre real i se sotmet a una reordenació de branques (*branch swapping*) per tal de trobar un arbre més parsimoniós. En aquest treball s'ha utilitzat un algoritme de reordenació de branques anomenat *tree bisection-reconnection* (TBR),

que es considera el més efectiu dels proposats (Nei i Kumar 2000, Swofford 1998). El procediment d'aquest algoritme pren l'arbre provisional de MP i el talla en 2 subarbres per a una determinada branca interior. A continuació els dos subarbres es reconnecten unint dues branques, una de cada subarbre, per tal de generar una topologia diferent. Aquest procés de reconexió es prova per a tots els possibles parells de branques dels dos subarbres, per tal de generar moltes topologies diferents que són avaluades per tal de triar aquell/s arbre/s amb el menor nombre de mutacions. L'aplicació d'un seguit de rondes de reordenació de branques sol produir arbres amb un nombre de passos considerablement menor que l'arbre provisional de MP, que es consideraran arbres finals de MP. Quan el nombre d'haplotips és elevat, els mètodes de parsimònia sovint produeixen vàries topologies igualment parsimonioses. Una manera de presentar un sol arbre és construir-ne un de compost que els representi a tots, el que s'anomena un arbre consens. En aquest arbre consens la confiança de cada branca interior es representa mitjançant el percentatge de cops en què es troba cada patró de branques - cada conjunt de seqüències - en relació al conjunt d'arbres finals de MP.

Els mètodes de màxima versemblança (ML) busquen la hipòtesi que maximitza la probabilitat d'observar les dades que hem obtingut. Per a calcular aquesta probabilitat ens cal un model de canvi evolutiu; és a dir, avaluem la probabilitat de les dades sota un model de substitució nucleotídica. Les filogènies després s'infereixen buscant aquells arbres que donen les versemblances més elevades. Suposem que tenim n seqüències nucleotídiques de longitud N . Sota l'assumpció que els llocs nucleotídics evolucionen independentment, podem calcular la versemblança per a cada lloc separatament, i obtenir un valor total de versemblança al final. Per a calcular la versemblança per a un lloc cal considerar tots els escenaris possibles a partir dels quals les seqüències podrien haver aparegut. Així, cada escenari té una probabilitat de generar el patró de nucleòtids observat. Un cop hem calculat la versemblança a cada lloc, la probabilitat conjunta del model i l'arbre per al conjunt de llocs

es calcula com el producte de les versemblances individuals per lloc. En aquest treball s'ha utilitzat el *quartet puzzling* com a mètode de màxima versemblança, que fou proposat per Strimmer i von Haesler (1996). Aquest mètode fa servir quartets (quatre grups terminals units per una branca interna) per inferir un nombre d'estimacions de l'arbre final, i després tria entre les diferents opcions amb un criteri de versemblança. L'algoritme d'anàlisi procedeix en tres passos. En el pas de màxima versemblança són reconstruïts tots els arbres basats en quartets per a trobar la relació més plausible per a cadascun dels grups de quatre o més seqüències. En el pas de *puzzling* aquests arbres de quartets es combinen en un arbre intermedi global afegint-hi seqüències una a una. Com que el resultat d'aquest pas és altament dependent de l'ordre de les seqüències, es construeixen molts arbres intermedis amb inputs d'ordres diferents. En un tercer pas es construeix un arbre consens a partir dels arbres intermedis.

En els mètodes de distància o mètodes de matrius de distàncies, es calcula la diferenciació per a tots els parells d'haplotips a partir de la taxa de substitució nucleotídica considerada i es construeix un arbre filogenètic considerant les relacions entre els valors de distància. El mètode de *neighbor-joining* (NJ) es basa en el principi de mínima evolució; en aquest mètode es calcula la suma de totes les longituds de les branques (S) per a cada topologia, i la topologia amb el menor valor de S es tria com el millor arbre. A diferència del mètode de mínima evolució (ME), el de NJ no examina totes les topologies possibles, però a cada pas d'agrupació de taxons fa servir el principi de mínima evolució. El mètode de NJ és vist com una versió simplificada del de ME, on és possible definir la topologia d'un arbre unint veïns (*joining neighbors*) successivament i produint nous parells de veïns. La construcció d'un arbre pel mètode de NJ comença amb un arbre en forma d'estrella, produït a partir de l'assumpció que no hi ha agrupació dels taxons. A la pràctica, tot i que no sabem quin parell de taxons són veïns veritables, considerem tots els parells de taxons com a potencials parells de veïns i calculem la suma de branques (S_{ij}) per als

veïns i, j . Després triem els taxons i, j que presenten el menor valor S_{ij} . Una vegada hem identificat un parell de veïns, es combinen en un taxó compost, recalculuem les distàncies entre aquest taxó compost i la resta, i repetim el procediment fins que obtenim un arbre final.

Un cop obtinguts els arbres filogenètics a partir de qualsevol dels mètodes definits més amunt, podem avaluar la confiança de les seves branques, mitjançant els mètodes de remostratge. Dels diferents mètodes disponibles hem triat el *bootstrap* perquè és el que està implementat en la majoria del programari que s'ha fet servir. El *bootstrap* és una tècnica estadística que estima empíricament la variança d'una estimació. Implica un determinat nombre (k) de remostratges amb reemplaçament a partir de la mostra original, construint k mostres fictícies de la mateixa grandària. Per a cada rèplica de *bootstrap*, el resultat és una matriu de dades amb el mateix nombre d'haplotips i el mateix nombre de nucleòtids que les dades originals. A aquest conjunt de k matrius se l'analitza amb la mateixa metodologia que l'arbre original. Per a cada rèplica de *bootstrap* es comparen totes les branques interiors de l'arbre original amb les de la rèplica. Cada branca interior de l'arbre original que presenta la mateixa partició que una branca interior de l'arbre *bootstrap* se li dona un valor de 1 (valor d'identitat), en tant que les branques sense correspondència reben un valor de 0. Així es calcula el percentatge de vegades que una branca interior de l'arbre original es troba a les k rèpliques. Anomenem a aquest valor el valor de confiança de *bootstrap* o simplement el valor *bootstrap*.

Diversitat intra i interpoblacional

El nivell de variabilitat genètica per a cadascuna de les mostres s'ha estimat en base a la diversitat haplotípica (h) i la diversitat nucleotídica (d) (Nei i Tajima 1981). La primera d'aquestes mesures és semblant a la diversitat gènica calculada per a gens nuclears en estudis clàssics de polimorfisme proteic, ja que només considera la freqüència en que es

troba cadascun dels haplotips en la mostra. La segona considera tant la freqüència dels haplotips com les diferències nucleotídiques entre ells.

La distribució de la diversitat haplotípica i nucleotídica dins i entre les poblacions en diversos models jeràrquics que s'han definit *a priori*, s'ha estimat mitjançant l'anàlisi de la variància molecular, AMOVA (Excoffier *et al.* 1992). En tots els models s'han calculat tres components de la diversitat: "dins de localitats", "entre localitats dins de grups" i "entre grups". Totes aquestes anàlisis de diversitat s'han fet amb el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

Anàlisis filogeogràfiques

A partir dels models de distribució geogràfica de la diversitat genètica calculats amb l'AMOVA, no podem discernir entre la importància de processos històrics (fragmentacions i expansions de rang), de potencial interès biogeogràfic, dels processos actuals de flux genètic perquè les anàlisis de AMOVA no utilitzen la informació temporal disponible en la filogènia dels haplotips. Templeton *et al.* (1987) han proposat l'anàlisi de clades encaixats (NCA, de l'anglès *Nested Clade Analysis*) amb el que s'intenta estudiar els patrons espacials i temporals de la diversitat genètica. En aquesta anàlisi es necessita un arbre filogenètic dels haplotips, i les distàncies geogràfiques entre les mostres analitzades. Els arbres filogenètics utilitzats pel NCA s'han estimat mitjançant l'algoritme de parsimònia estadística amb el programa TCS (Clement *et al.* 2000). L'encaix dels clades comença a partir dels nodes terminals de l'arbre (*tips*), que es consideren clades de nivell 0. Aquests haplotips terminals s'encaixen en clades de nivell 1, agrupant-se amb l'haplotip interior situat a un pas mutacional (un canvi nucleotídic), fent servir les normes proposades per Templeton *et al.* (1987) i Templeton i Sing (1993). Un cop encaixats tots els nodes terminals en clades de nivell 1, poden afegir-se a aquests clades de nivell 1 la resta d'haplotips interiors de l'arbre, respectant la norma bàsica d'encaix de situar-se a un únic pas mutacional del clade de nivell 1 més proper. Dos haplotips interiors consecutius i

separats de la resta d'haplotips per diversos passos mutacionals, poden agrupar-se i constituir un clade propi de nivell 1. Un cop tots els haplotips s'inclouen en un clade de nivell 1, recomença el procés d'encaix, ara els clades de nivell 1 s'encaixen en clades de nivell 2 seguint les mateixes normes. El procés es repeteix fins a tenir tots els clades de nivell n-1 en un únic clade de nivell n.

Un cop obtingut el disseny de clades es comprova la seva relació amb la distribució geogràfica de les mostres estudiades. Per això es quantifiquen dos paràmetres relatius al rang geogràfic dels clades: la distància de clade (D_c) i la distància del clade d'encaix (D_n). La primera ens indica la distància mitjana que els individus portadors d'un determinat clade de nivell n-1 se separen del centre geogràfic d'aquest clade, en tant que la segona mesura la distància mitjana dels individus portadors del clade de nivell n, on s'encaixa l'anterior, al centre geogràfic d'aquest clade de nivell n. La significació de la diferència entre els valors d'ambdues distàncies entre els clades interiors i terminals es calcula mitjançant permutacions aleatòries dels clades entre les mostres, mantenint tots els valors marginals, amb el programa GEODIS (Posada *et al.* 2000). La hipòtesi nul·la considera la distribució aleatòria dels clades de nivell n-1 en el clade d'encaix de nivell n. El seu rebuig suggereix la no distribució aleatòria dels clades dins d'un determinat nivell d'encaix. La causa d'aquesta significació pot inferir-se a partir de les claus subministrades amb el manual del programa GEODIS, que actualitzen les de Templeton (1998).

En els dissenys de NCA de les localitats atlàntiques (Article II) i mediterrànies (Article III) hi hem incorporat, sempre que ha estat possible, mostres d'altres autors: Antunes *et al.* (2001), Aurelle i Berrebi (2001), Bernatchez (2001), Duftner *et al.* (2003), Hansen i Mensberg (1998), Laikre *et al.* (2002) i Osinov i Bernatchez (1996). La incorporació d'aquestes mostres s'ha fet a partir de les coincidències en l'extrem 5' de la regió de control (Antunes *et al.* 2001, Bernatchez 2001, Osinov i Bernatchez 1996), els dos extrems (600 pb) de la regió de control per Aurelle i Berrebi (2001), del conjunt de la regió de control (Duftner *et al.*

2003), i també a partir de l'anàlisi per seqüència de mostres de referència publicades a Hansen i Mensberg (1998) i Laikre *et al.* (2002). D'aquesta manera hem pogut estendre les anàlisis filogeogràfiques en la vessant mediterrània a 86 localitats i a 157 localitats en la vessant atlàntica.

Demografia històrica

Els episodis de creixement i estabilitat poblacional deixen senyals característiques en la distribució de les diferències nucleotídiques entre parelles de seqüències (distribució *Mismatch*, Slatkin i Hudson 1991, Rogers i Harpending 1992). Aquestes senyals es poden observar en la distribució de l'abundància de les comparacions que difereixin en i llocs, essent $i = 1, 2 \dots$. És possible fer servir aquesta distribució *Mismatch* per analitzar la història recent de les poblacions, i conèixer, per exemple, si provenen d'una població panmíctica de grandària constant o bé d'una població que ha estat creixent exponencialment durant un període de temps llarg. Si una població roman en una grandària constant, el nombre esperat de diferències aparellades segueix una distribució que convergeix cap a una corba d'equilibri. D'altra banda, en una població amb creixement exponencial la distribució *Mismatch* serà molt semblant a una distribució de Poisson (Rogers i Harpending 1992). Podem datar aproximadament els episodis d'expansió poblacionals, ja que sota un model d'expansió poblacional el pic de la distribució (estimat com a τ) és igual a $2/\mu t$ després de t generacions, on μ és la taxa de mutació per al conjunt de nucleòtids del fragment de DNA analitzat. S'ha fet servir el programa ARLEQUIN 2.0 per a aquestes anàlisis.

3. Resultats

La totalitat dels resultats obtinguts en el decurs del treball de tesi es presenten en forma de cinc articles científics, dos dels quals estan publicats (Articles I i III), un està enviat (Article IV) i dos estan en fase de preparació (Articles II i V). Aquests articles formen el nucli d'aquesta memòria de tesi i estan ordenats en tres apartats corresponents als tres objectius del treball descrits a la introducció. Així, la filogeografia de la truita comuna al Paleàrtic occidental es desenvolupa en els tres articles que formen l'apartat 3.1. Respecte al segon objectiu, relacionat amb la complementarietat dels gens nuclears (al·lozims en el nostre cas) i mitocondrials per reconstruir la història evolutiva de la truita comuna, hem fet l'estudi al sud de la península Ibèrica, una zona de contacte entre llinatges atlàntics i mediterranis on actualment és també habitual la presència de gens de repoblació centreeuropeus (Article IV, Apartat 3.2.). Finalment el treball inclòs en l'apartat 3.3 tracta sobre les relacions filogenètiques entre els llinatges de truita comuna. Els apartats 3.2 i 3.3 són la base per a la discussió general que es presenta al final d'aquesta memòria.

3.1. Filogeografia de la truita comuna a les vessants atlàntica (Articles I i II) i mediterrània (Article III)

Quan es va iniciar aquest treball, estava àmpliament acceptada la hipòtesi que un únic llinatge matriarcal de truita comuna es trobava distribuït al conjunt de la vessant atlàntica, del Marroc fins al Mar Blanc (Bernatchez *et al.* 1992). Però en base a la variació en els loci *LDH-C** i *CK-A1**, García-Marín *et al.* (1999a) havien proposat que les poblacions atlàntiques de la península ibèrica podrien pertànyer a un llinatge diferent dels de la resta de l'Atlàntic europeu. Aquests resultats van ser corroborats amb treballs de mtDNA a la península Ibèrica (Machordom *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001) que indicaven l'existència de tres grups de poblacions de truita a l'Atlàntic. Aquests autors definien un llinatge ibèric natiu a la conca del Duero i la divisió del llinatge Atlàntic en dos grups; el Nord abarcaria del Mar Blanc fins al Cantàbric, i el Sud distribuït del Cantàbric cap al sud. A la vessant mediterrània s'ha proposat que els llinatges AD, MA i ME estarien bàsicament distribuïts en alopatria a la Mediterrània oriental, al nord de l'Adriàtic i a la Mediterrània occidental, respectivament (Bernatchez *et al.* 1992). A nivell de la península Ibèrica les anàlisis de mtDNA han donat suport a la distribució al·lopàtrica dels llinatges AD i ME, (Machordom *et al.* 2000). Però per altra banda s'ha constatat la intergradació entre diferents grups de poblacions en diversos punts de la conca mediterrània: a la península Ibèrica (Sanz *et al.* 2002), al nord d'Itàlia (Giuffra *et al.* 1996), a Eslovènia (Berrebi *et al.* 2000) i a Grècia (Apostolidis *et al.* 1997).

Els treballs que es presenten en aquest apartat se centren en la distribució de la variabilitat genètica de la truita comuna a la península Ibèrica, d'on provenen una part important de les mostres analitzades. Tanmateix, i degut a l'obtenció de mostres de referència d'altres laboratoris europeus i la integració de la informació publicada en altres treballs, també aprofundeixen en la història evolutiva de l'espècie a les vessants atlàntica i mediterrània, descriuen les relacions filogenètiques

dins d'aquestes vessants i avaluen l'impacte de les glaciacions del Quaternari en l'actual estructura poblacional.

Article I. Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout. *Journal of Fish Biology* 60, 1058-1063

Article II. Phylogeography of Atlantic brown trout based on
Mitochondrial DNA control region. *En preparació*

Article III. Historical Biogeography of Mediterranean Trout.

Molecular Phylogenetics and Evolution 33, 831-844

3.2. Comparació entre marcadors moleculars (Article IV)

En aquest segon apartat de resultats, s'ha avaluat la importància relativa dels marcadors d'al·lozims i mitocondrials per detectar senyals d'intergradació secundària entre llinatges, comparant els escenaris evolutius que reconstrueixen ambdues tècniques. L'estudi s'ha realitzat en poblacions del sud de la península Ibèrica, una zona de contacte entre llinatges Atlàntics i Mediterranis, on ja s'han detectat barreges entre grups en altres espècies de peixos (Doadrio 1998), i on les poblacions salvatges de truita comuna han estat repoblades amb exemplars al·lòctons d'origen centreeuropeu (García-Marín *et al.* 1999b).

Article IV. Novel and ancient hybridization between brown trout lineages in South Iberia indicated by complementary Allozymes and mtDNA markers. Enviat a *Conservation Genetics* (2^a revisió)

3.3. Filogènia molecular de la truita comuna (Article V)

Per a la truita comuna s'ha publicat un gran nombre d'estudis filogenètics basats en diferents marcadors moleculars. El gran nombre de marcadors moleculars assajats en els treballs publicats, tot i que ha fet augmentar el coneixement que tenim de l'espècie, no s'ha traduït necessàriament en resultats concordants sinó en punts de vista enfrontats en relació a la història evolutiva de la truita comuna, al temps i la manera en què van ocórrer els processos evolutius i al nivell de divergència intraespecífica existent. Bernatchez *et al.* (1992) van proposar l'existència de cinc llinatges evolutius per a la truita comuna: AT, AD, ME, DA i MA, i el 2001 Suárez *et al.* van proposar un sisè llinatge endèmic a la conca del Duero. Giuffra *et al.* (1994) van proposar que el llinatge AT era el més ancestral, però les anàlisis morfomètriques (Dorofeeva 2000) i de DNA nuclear (Antunes *et al.* 2002) proposen els llinatges MA i DA com a ancestrals, respectivament. En general, les relacions evolutives entre els llinatges matriarcals tampoc estan resoltes, tot i que la monofília d'aquests llinatges està àmpliament acceptada. Per altra banda, alguns autors han relacionat la divergència entre els llinatges amb la crisi salina del Messinià, durant el Pliocè (Apostolidis *et al.* 1997, Machordom *et al.* 2000), mentre que d'altres consideren el Pleistocè com l'origen de la divergència per a la truita comuna (Bernatchez 2001, Osinov i Bernatchez 1996, Suárez *et al.* 2001).

En aquest apartat s'ha reconstruït les relacions evolutives entre els llinatges matriarcals de truita de riu i s'ha testat escenaris filogeogràfics alternatius proposats a partir de dades morfomètriques i marcadors de DNA nuclear i mitocondrial. També s'ha avaluat l'ajust de la truita comuna als models de biogeografia històrica basats en els conceptes de dispersió (Banarescu 1992) i vicariància (Bianco 1990), així com el paper del Pliocè i el Pleistocè en la història evolutiva de la truita comuna. L'estudi s'ha abordat a partir d'un conjunt de dades que cobreix el rang natural de distribució de l'espècie.

Article V. Phylogenetic Relationships in the Brown Trout complex (*Salmo trutta* L.) based on Molecular Evolution of the Mitochondrial Control Region. *En preparació*

4. Discussió general

4.1. Estructura genètica de les poblacions de truita comuna a la península Ibèrica. Comparació amb els patrons al·lozímics

L'anàlisi de les poblacions del sud de la península Ibèrica de l'Article IV indica que ni la tècnica al·lozímica ni les seqüències de mtDNA per separat permeten determinar l'origen dels *pools* gènics nadius. En aquest treball s'ha pogut constatar que el procés d'hibridació entre les poblacions natives i els exemplars de repoblació d'origen centreeuropeu criats en els centres piscícoles no han repercutit d'igual manera en els genomes nuclears i mitocondrials a totes les poblacions. Tanmateix, tampoc són idèntiques les senyals obtingudes pels processos evolutius antics d'aquestes poblacions. Així, la manca d'haplotips AT (o DU) a la conca del Guadalquivir (Article III) diferencia clarament aquest riu de la resta de rius atlàntics, confirmant els resultats de Machordom *et al.* (2000). Al contrari, els al·lozims, i bàsicament la fixació de l'al·lel *CK-A1*115* sí que relacionen aquestes poblacions de truita del Guadalquivir amb les altres

poblacions atlàntiques. En aquestes poblacions del sud peninsular, sembla que la raó de les diferències entre els al·lozims i el mtDNA seria el diferent grau d'intensitat amb què actua la deriva genètica sobre el genoma nuclear i mitocondrial, com a conseqüència de la menor grandària efectiva (N_e) que tenen les poblacions pel genoma mitocondrial. Els processos de deriva, però, no necessàriament han de ser generals a tota la península Ibèrica. De fet, les poblacions del sud són segurament les que es troben en hàbitats més precaris per a la truita, en tant que més al nord les condicions climàtiques fan augmentar els trams de riu amb condicions adequades per a la supervivència de les truites i les poblacions poden ser, per tant, més grans.

Per tal de comprovar si els patrons biogeogràfics de la truita comuna obtinguts a la península Ibèrica mitjançant les anàlisis al·lozímiques (García-Marín i Pla 1996, Bouza *et al.* 1999, Sanz *et al.* 2000, Bouza *et al.* 2001, Sanz *et al.* 2002), concorden amb els observats en aquest treball pel mtDNA (Articles I, II i III), s'han comparat els patrons obtinguts per al conjunt de quaranta-sis poblacions del laboratori analitzades per ambdues tècniques. Les dades al·lozímiques corresponen a un treball previ del LIG i utilitzen informació per a 41 loci, 33 dels quals són polimòrfics (Sanz 2000). Els patrons de diferenciació entre aquestes mostres s'han analitzat mitjançant l'anàlisi de coordenades principals (PCO), a partir de les matrius de distància entre mostres calculades per les dades al·lozímiques i mitocondrials. Aquestes matrius s'han construït amb l'índex de distància de Nei (1972) per a les dades al·lozímiques i utilitzant la taxa de substitució nucleotídica gamma Tamura-Nei (1993) per a les dades de mtDNA. El grau de correspondència entre les matrius s'ha calculat amb un test de Mantel (Mantel 1967), a partir de l'estadístic Z de Mantel que mesura el grau de relació entre dues matrius. La correspondència de les dades al·lozímiques i mitocondrials també s'ha analitzat amb l'índex de correlació (r) entre les tres primeres coordenades respectives dels PCO. Les anàlisis s'han realitzat inicialment al conjunt de localitats i

posteriorment s'han considerat per separat les poblacions atlàntiques i les mediterrànies.

Les localitats analitzades (Taula 2) s'han representat en les PCO considerant un número per a cada mostra, un símbol per a cada vessant principal (una rodona per a la mediterrània i un quadrat per a l'atlàntica), i un color per a cada grup considerat: els llinatges DU, AD, ME i AT. L'anàlisi encaixada de clades (NCA) del llinatge AT ha permès definir els subclades AT3-1, AT3-2 i AT3-3 (Article II, Figura 3, p.91).

Taula 2. Freqüència dels llinatges mitocondrials a les mostres de truita utilitzades en la comparació amb la tècnica al·lozimica. Codi de colors de llinatge: AD, negre; ME, blanc; DU, vermell i AT, blau. * freqüència d'haplotips de repoblació.

Localitat	Riu principal (afluent)	Composició (mtDNA)
● 1 Queralbs	Ter (Freser)	AD (18), ME (10)
○ 2 Ter	Ter	ME (14), AD (1)
● 3 Massanes	Ter (Freser)	AD (7), ME (3)
○ 4 Riutort	Llobregat	ME (20)
● 5 Otal	Ebre (Cinca)	AD (18)
● 6 Ordisa	Ebre (Cinca)	AD (15)
● 7 Guares	Ebre	AD (13) + AT(17)*
● 8 Contraig	Ebre (Segre)	AD (19), ME (2)
● 9 Conangles	Ebre (Segre)	AD (19)
○ 10 Cardós	Ebre (Segre)	ME (16), AD (9)
● 11 Manyanet	Ebre (Segre)	AD (17), ME (7)
○ 12 Villahermosa	Millars	ME (27)
○ 13 Noguera	Túria	ME (23)
● 14 Madera	Segura	AD (27)
○ 15 Endrinales	Segura (Mundo)	ME (35)
● 16 Poqueira	Guadalfeo	AD (4) + AT(7)*
○ 17 Chico	Guadalfeo	ME (5) + AT(5)*
● 18 Lanjarón	Guadalfeo	AD (10)
● 19 Trévez	Guadalfeo	AD (9)

Taula 2. Continuació.

Localitat	Riu principal (afluent)	Composició (mtDNA)
20 Dílar	Guadalquivir	AD (16)
21 Castriil	Guadalquivir	AD (15)
22 Hocesecca	Tajo (Tajo)	AT 3-3 (19)
23 Pelagallinas	Tajo (Henares)	AT 3-3 (17)
24 Bornova	Tajo (Henares)	AT 3-3 (17)
25 Dulce	Tajo (Henares)	AT 3-3 (8) + AD (6) AT (6)*
26 Arenal	Tajo (Tiétar)	DU (19), AT 3-3 (11)
27 Carrión	Duero (Pisuerga)	DU (28)
28 Pisuerga	Duero (Pisuerga)	DU (27)
29 Aguijejo	Duero (Riaza)	DU (19)
30 Mazo	Duero	DU (18)
31 Muriel	Duero (Abión)	DU (20)
32 Duruelo	Duero	DU (14), AT 3-2 (9)
33 Tera	Duero	DU (17)
34 Moros	Duero (Eresma)	DU (23), AT 3-3 (1)
35 Riaño	Duero (Esla)	DU (14)
36 Esla	Duero (Esla)	DU (12)
37 Villomar	Duero (Esla)	DU (2) + AT(17)*
38 Millar	Duero (Esla)	DU (17)
39 Bernesga	Duero (Esla)	DU (20)
40 Vega de Viejos	Miño (Sil)	DU (19), AT 3-2 (1)
41 Palacios del Sil	Miño (Sil)	DU (18), AT 3-3 (2)
42 Boeza	Miño (Sil)	DU (11), AT 3-3 (8), AT 3-2 (1)
43 Vendúl	Nansa	AT 3-2 (18)
44 Gorrotola	Oria (Leizarán)	AT 3-2 (26)
45 Santolatz	Oria (Leizarán)	AT 3-2 (20), AT 3-3 (3)
46 Vall de Ruda	Garona	AT 3-1 (25)

A les Figures 10 a 18 es presenten els PCO que correlacionen les dades al-lozímiques i els nous PCO per a les dades de mtDNA amb la simbologia de la Taula 2 i que permetrà veure de manera directa les concordances entre ambdues tècniques.

Els resultats obtinguts amb les dades al·lozímiques al conjunt de la península Ibèrica (Figura 10) lògicament repeteixen allò que ja és conegut: la diferenciació entre les poblacions mediterrànies i atlàntiques (García-Marín i Pla 1996), l'estructura hidrogràfica que segueixen les mostres del nord-oest de la península (Sanz *et al.* 2000), amb l'especial singularitat de les poblacions del Duero (Bouza *et al.* 2001), i la manca d'aquest patró entre els rius mediterranis (Sanz *et al.* 2002). Tanmateix es posa de manifest la separació de les truites del Guadalquivir (localitats 20 i 21) en relació a la resta de poblacions atlàntiques i les relacions que tenen amb algunes de les poblacions mediterrànies del sud peninsular, ja comentades a l'Article IV.

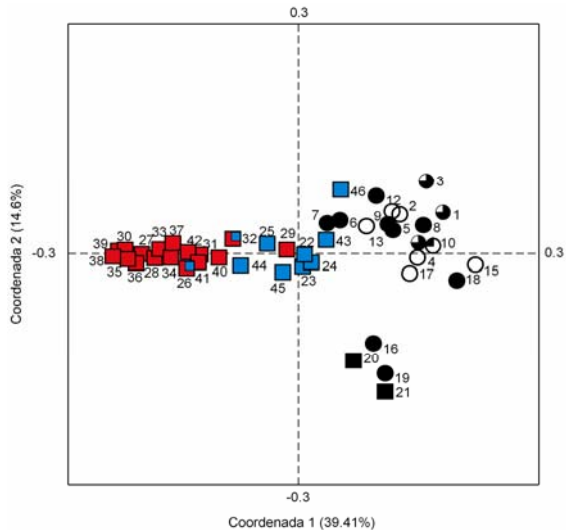


Figura 10. Projecció de les 46 mostres de truita comuna sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies de Nei (1972). Codi de colors dels haplotips definit a la Taula 2.

La correlació de les primeres coordenades dels PCO d'al·lozims i mitocondrials d'aquestes dues anàlisis és significativa ($r^2=0.7879$, $p=0.001$). Aquesta coordenada permet observar clarament, tant amb les dades al·lozímiques (Figura 10) com mitocondrials (Figura 11), les

diferències entre poblacions que contenen haplotips dels llinatges atlàntics i mediterranis, posant de relleu la important diferenciació que existeix entre les poblacions de truita comuna de les dues vessants de la península Ibèrica (García-Marín i Pla 1996) i una associació entre marcadors al·lozímics i mitocondrials.

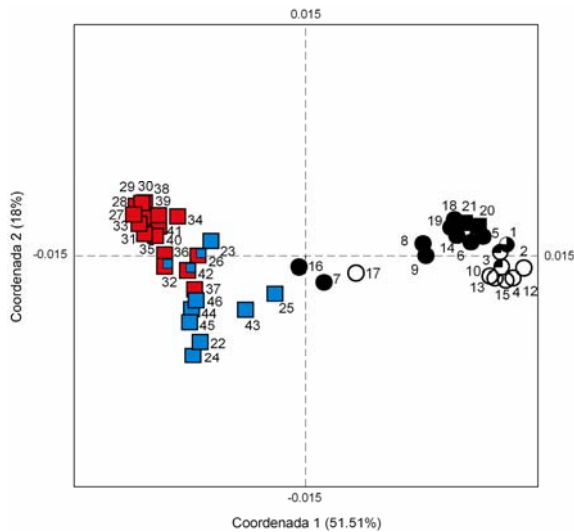


Figura 11. Projecció de les 46 mostres de truita comuna sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies gamma Tamura-Nei (1993). Codi de colors dels haplotips definit a la Taula 2.

A més a més s'observa una correlació significativa ($r=0.559$, $p=0.009$, Figura 12) en la comparació de les matrius de distàncies entre localitats obtingudes amb la tècnica al·lozímica i de mtDNA. Les tres primeres coordenades de les anàlisis al·lozímiques expliquen el 64.64% de la variabilitat present en la matriu de distàncies; en el cas de les dades mitocondrials, les tres primeres coordenades arriben a explicar el 82.56% de la variabilitat.

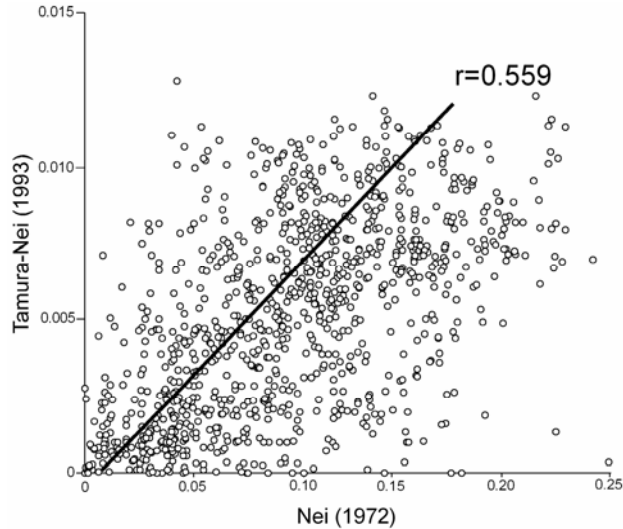


Figura 12. Correlació entre les distàncies Tamura-Nei (1993) i de la distància proteica de Nei (1972) per a les poblacions de la península Ibèrica..

En canvi, per a la 2a i 3a coordenades la correlació no és significativa ($r^2_{2a}=0.0071$, $p=0.577$, $r^2_{3a}=0.0119$, $p=0.471$), suggerint processos de diferenciació no coincidents. Així, la 2a coordenada en la PCO d'al·lozims separa les localitats del sud de la península, caracteritzades electroforèticament per la presència dels al·lels *LDH-A2*100QL*, *MEP-3*90* i *PEP-LGG*75* de la resta de localitats tant atlàntiques com mediterrànies (Figura 10), però la 2a coordenada de les projeccions obtingudes a partir de dades de mtDNA sembla distingir entre les localitats del llinatge DU, i les del llinatge AT (Figura 11). Les terceres coordenades també apunten cap a processos diferents. La 3a coordenada d'al·lozims assenyalava la diferenciació de les poblacions dins de les vessants (Figura 13), en tant que la 3a coordenada de mtDNA separa les localitats en funció de la seva composició segons els llinatges AD i ME (Figura 14).

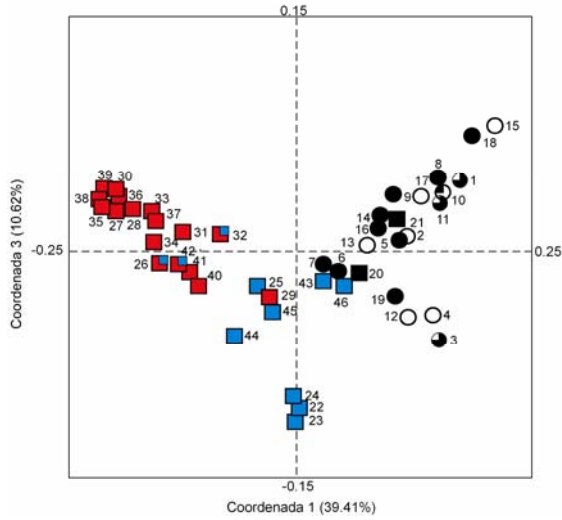


Figura 13. Projecció de les 46 mostres de truita comuna sobre el pla format per la 1a i la 3a coordenades principals de la matriu de distàncies Nei (1972). Codi de colors dels haplotips definit a la Taula 2.

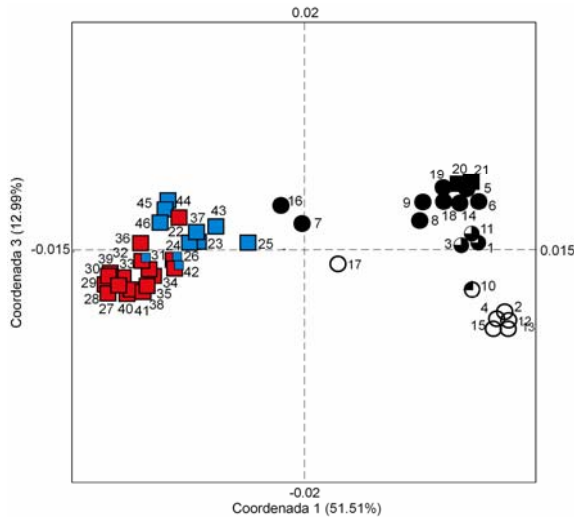


Figura 14. Projecció de les 46 mostres de truita comuna sobre el pla format per la 1a i la 3a coordenades principals de la matriu de distàncies gamma Tamura-Nei (1993). Codi de colors dels haplotips definit a la Taula 2.

4.1.1. La vessant atlàntica Ibèrica

Com s'ha dit, a la vessant atlàntica de la península Ibèrica els grups de poblacions de truita detectats amb la tècnica al·lozimica semblen relacionar-se amb el patró hidrogràfic. D'aquesta manera podem distingir les truites dels rius Cantàbrics, les del Miño, les del Duero, les del Tajo i les poblacions del Guadalquivir (Machordom *et al.* 2000, Sanz *et al.* 2000, Bouza *et al.* 2001). Aquestes últimes pertanyerien a un grup de poblacions d'influència mediterrània (García-Marín *et al.* 1996, Machordom *et al.* 2000, Article IV). Al comparar aquests resultats al·lozímics amb els trobats en aquesta tesi, veiem que tant el test de Mantel entre les matrius ($r=0.74462$, $p=0.0198$), com la correlació de les tres primeres coordenades de les anàlisis de PCO ($r^2_{1a}=0.5735$, $p=0.001$, $r^2_{2a}=0.4927$, $p=0.001$, $r^2_{3a}=0.2818$, $p=0.004$) donen resultats significatius, i en conseqüència podem considerar que ambdues metodologies detecten processos similars.

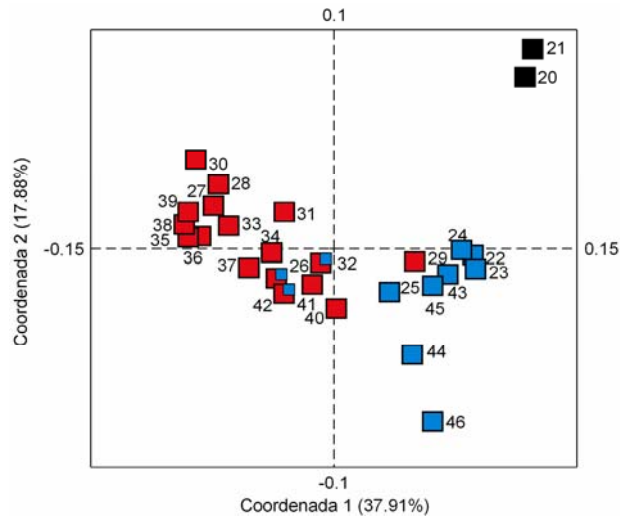


Figura 15. Projecció de les 27 mostres atlàntiques sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies de Nei (1972). Codi de colors dels haplotips definit a la Taula 2.

En concret, les anàlisis fetes en aquesta tesi assenyalen l'existència a la vessant atlàntica Ibèrica dels llinatges AD (bàsicament en el riu Guadalquivir), DU i AT. En relació a aquest últim llinatge, s'han observat tres clades de nivell 3 que estan descrits a l'article II, si bé el clade AT3-1 s'ha detectat només a la conca del Garona. D'altra banda, a la conca del Duero s'hi ha trobat el llinatge AT restringit a les localitats 32.Duruelo i 34.Moros (Taula 2), tot i que la presència d'aquest llinatge sembla més habitual en les poblacions més properes a la seva desembocadura (Antunes *et al.* 2001, Vera 2003).

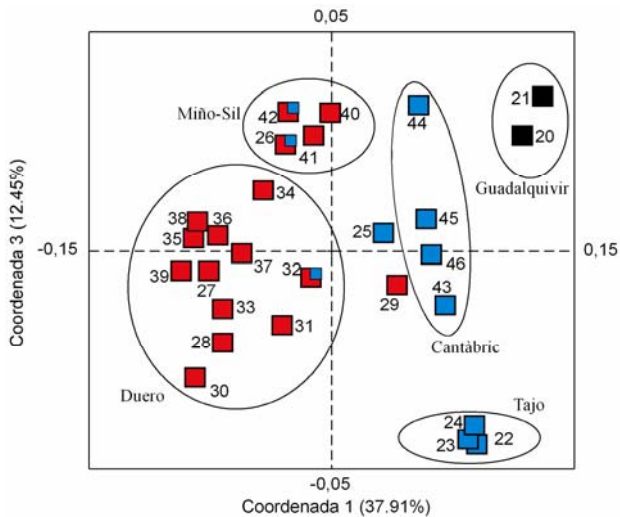


Figura 16. Projecció de les 27 mostres atlàntiques sobre el pla format per les 1a i la 3a coordenades principals de la matriu de distàncies de Nei (1972). Codi de colors dels haplotips definit a la Taula 2.

El clade 3-2 del llinatge AT és abundant en els rius cantàbrics i es relacionaria amb el grup Cantàbric de Sanz *et al.* (2000) que presenta els al·lels *GPI-B2*135* i *MPI*105*. A la conca del Miño-Sil, trobem poblacions que comparteixen els al·lels *SMDH-B1,2*75* i *PEPLT*70* amb el grup Duero, però es diferencien d'aquest per l'alta freqüència de l'al·lel

*ME*120*. A aquesta conca predominen els haplotips del llinatge DU, però s'observen haplotips propis d'aquest llinatge com ara DUCs7, 8 i 9 (Article II, Taula 1, p.81). Finalment, la conca del Tajo es caracteritza electroforèticament per la presència de l'al·lel α MAN*90 i es relaciona també amb el clade 3-3 del llinatge AT (Article II). Aquest clade és el més modern del llinatge AT i per tant semblaria que aquesta conca ha estat recolonitzada per aquest llinatge posteriorment a la colonització del Duero pel llinatge DU.

4.1.2. La vessant mediterrània Ibèrica

Ni la tècnica al·lozimica ni les seqüències de mtDNA detecten diferenciació associada a la xarxa hidrogràfica a la vessant mediterrània, les poblacions apareixen barrejades i disperses independentment del riu on provenen (Figures 17 i 18).

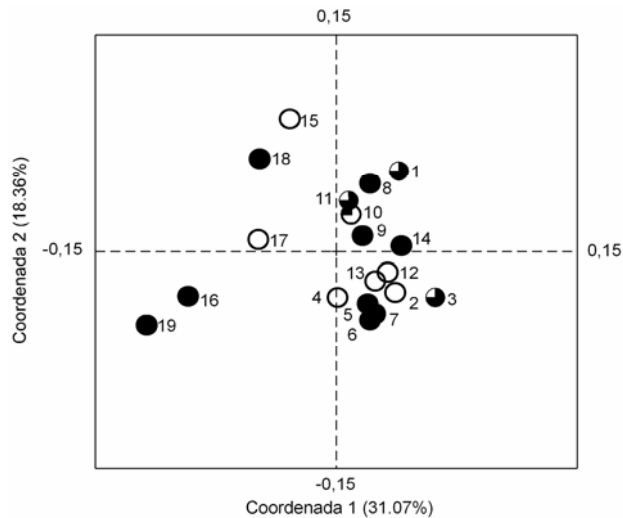


Figura 17. Projecció de les 19 mostres mediterrànies sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies de Nei (1972). Codi de colors dels haplotips definit a la Taula 2.

Així, i a diferència de la vessant atlàntica, no s'observa correlació entre les matrius d'ambdues anàlisis ($r=0.119$, $p=0.198$), ni entre les tres primeres coordenades principals de la PCO ($r^2_{1a}=0.0495$, $p=0.360$, $r^2_{2a}=0.066$, $p=0.288$, $r^2_{3a}=0.115$, $p=0.155$). Les coordenades de la PCO d'al·lozims assenyalen, apart de la diferenciació de dues mostres del riu Guadalfeo, l'absència de clars patrons geogràfics en la diferenciació de la resta de poblacions mediterrànies. Les nostres anàlisis (Figura 18, Articles III i IV) confirmen els resultats de Sanz *et al.* (2002), i recolzen la hipòtesi de colonització dels rius mediterranis per diversos llinatges de truita, seguits de contactes secundaris entre els diferents grups. Segons les dades mitocondrials aquests llinatges serien el AD i el ME.

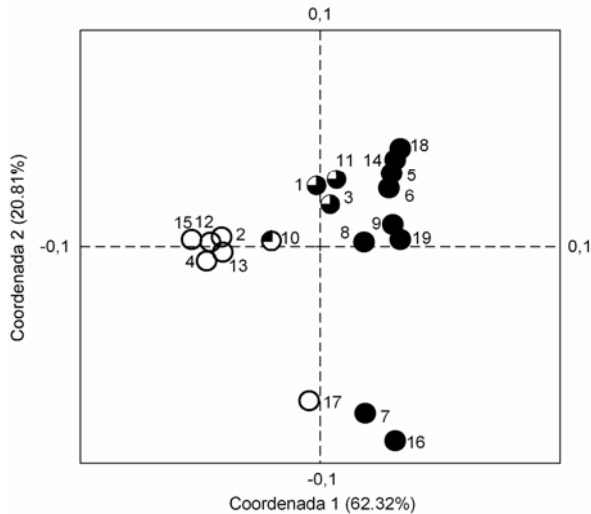


Figura 18. Projecció de les 19 mostres mediterrànies sobre el pla format per les dues primeres coordenades principals de la matriu de distàncies gamma Tamura-Nei (1993). Codi de colors dels haplotips definit a la Taula 2.

La 1a coordenada de la PCO de mtDNA per a les mostres mediterrànies (Figura 18) es relaciona amb la proporció d'haplotips dels llinatges AD i ME a les mostres, amb les localitats "pures" AD en els valors més positius

i les localitats "pures" ME en els valors més negatius. La 2a coordenada es relaciona amb la presència d'haplotips AT, segurament com a resultat de repoblacions. Les 3 localitats que presenten més de la meitat d'haplotips AT (7, 16, 17) se situen diferenciades en els valors més negatius, la resta se situen al llarg de l'eix en funció del nombre d'haplotips AT que presenten.

A la vessant mediterrània, d'una banda, la distribució desordenada d'haplotips i variants al·lozimiques confirmaria les oportunitats per el contacte secundari i la hibridació (Article III). Per altra banda, la falta de correlació entre matrius de dades al·lozimiques i mitocondrials, i de coordenades principals de la PCO, apuntarien que la deriva genètica ha estat molt intensa a tota aquesta vessant, tal i com s'explica a l'article IV.

4.1.3. Patrons d'evolució de la truita comuna a la península Ibèrica

La península Ibèrica ha estat reconeguda com un refugi glacial on la flora i la fauna han pogut sobreviure les edats de gel del Pleistocè, i es considera l'origen de les rutes de recolonització post-glacial en moltes espècies d'animals i plantes (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 1999). Tot i això, les glaciacions del Quaternari no han afectat de la mateixa manera les poblacions de truita de les vessants atlàntica i mediterrània, com hem vist en parlar dels processos evolutius que han marcat la filogeografia de l'espècie. A la vessant atlàntica tant les anàlisis d'al·lozims com les de seqüències de mtDNA detecten una estreta relació entre l'estructura poblacional i l'estructura hidrogràfica, amb valors molt elevats de diferenciació (Article II, Sanz 2000). En general, no s'observen incongruències, i totes dues anàlisis coincideixen a l'hora d'assenyalar la distribució geogràfica dels grups. En canvi, a la vessant mediterrània el patró d'estructuració poblacional no està lligat a l'estructura hidrogràfica, com assenyalen tant les dades de mtDNA ($\phi_{ci}=0.15691^*$, Article III) com les d'al·lozims ($F_{LR}=0.316^{***}$, Sanz *et al.* 2002). Aquest patró indica que al conjunt de la vessant mediterrània de la península Ibèrica s'ha produït una

intensa intergradació secundària entre llinatges durant els períodes glacials a partir de l'expansió de les poblacions aïllades a les capçaleres durant els interglacials. La conseqüència és que els *pools* gènics de cada llinatge s'han barrejat, donant lloc al patró actual, on la diferenciació està associada a senyals filogenètiques, no pas a patrons hidrogràfics (Sanz *et al.* 2002, Article III).

D'altra banda, els treballs previs de Machordom *et al.* (2000) i Suárez *et al.* (2001), amb el mateix marcador mitocondrial, identificaren una estreta correlació entre grups filogenètics i distribució geogràfica a la península Ibèrica. Així, a la vessant mediterrània proposaren la distribució al·lopàtrica dels grups Mediterrani i Adriàtic-Andalús al nord i al sud, respectivament de la conca del Segura. Pel que fa a la vessant atlàntica, el grup Atlàntic sud-europeu es trobaria distribuït principalment a la conca del Tajo, un grup Duero a la conca del Duero i un grup nord Atlàntic es trobaria des del Cantàbric fins el Mar Blanc. La comparació d'aquest patró amb el d'aquest treball (Figura 19) assenyala que a la vessant mediterrània els grups Mediterrani i Adriàtic-Andalús es correspondrien als llinatges ME i AD, tot i que aquests llinatges presenten una distribució barrejada en tota la zona analitzada i en cap cas es podria parlar d'una distribució al·lopàtrica a la península Ibèrica (Article III). A la vessant atlàntica els grups Atlàntic sud-europeu i Duero correspondrien al clade AT3-3 i al llinatge DU, respectivament. En canvi, pel grup nord-Atlàntic la uniformitat descrita en gran part de la vessant Atlàntica (Suárez *et al.* 2001) no es correspon amb el patró descrit a l'Article II, on es proposa una àmplia distribució dels clades AT 3-1 i AT 3-2, des del golf de Biscaia fins al Mar Blanc, sense un patró geogràfic clar (Article II, Figura 1, p.89).

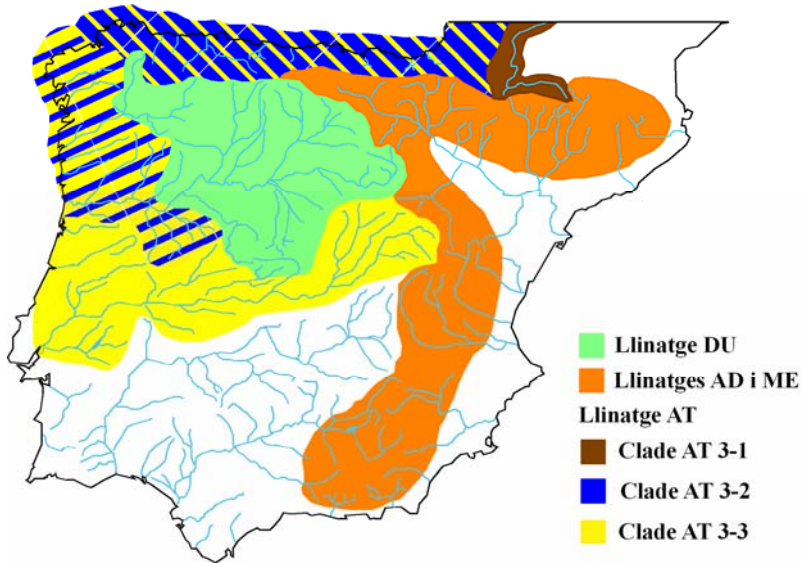


Figura 19. Distribució dels llinatges mitocondrials de truita comuna a la península Ibèrica.

4.2. Patrons filogeogràfics en peixos d'aigua dolça a Europa

4.2.1. Diversitat molecular a *Salmo trutta*

Els resultats presentats a l'Article V han permès confirmar la posició ancestral del llinatge DA en la filogènia de *S.trutta*, d'acord amb els models biogeogràfics que postulen l'origen asiàtic de la ictiofauna europea d'aigua dolça (Banarescu 1989, 1992, Bianco 1990). Posteriorment s'hauria produït la divergència entre les poblacions de les tres grans vessants que ocupa l'espècie: l'ancestral ponto-càspera i l'atlàntica i la mediterrània (Figura 20). Aquesta divergència seria conseqüència de l'aïllament entre vessants a causa dels períodes glacials durant el Quaternari. Les anàlisis no permeten determinar la ruta o rutes de colonització anteriors a aquesta divergència, tot i que Antunes *et al.* (2002) han proposat una dispersió de est a oest a través de la

Mediterrània seguida d'una dispersió de sud a nord des de la península Ibèrica fins a Escandinàvia. Com ja hem explicat s'ha detectat a la vegada un segon nivell de divergència dins de cada vessant que dona com a resultat l'existència de sis llinatges evolutius: AT i DU a la vessant atlàntica, AD, ME i MA als rius mediterranis, i DA a la zona del ponto-caspi (Figura 20).

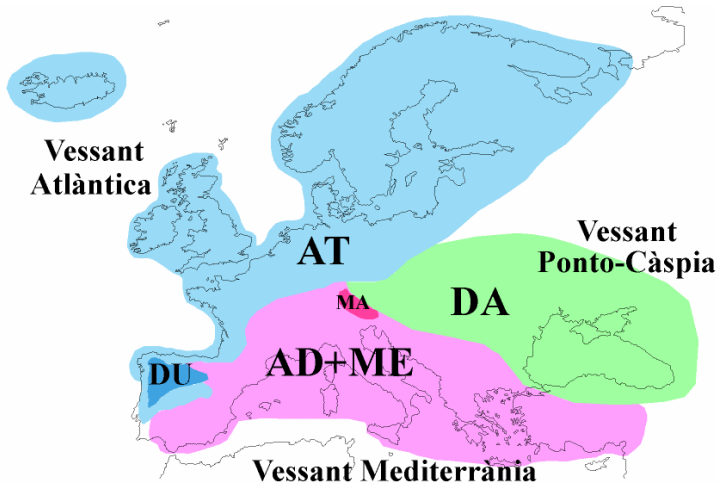


Figura 20. Distribució dels grans grups i dels llinatges evolutius de truita comuna.

La seqüenciació completa de la regió de control del mtDNA ha permès detectar nivells de diversitat per a la truita comuna que sobrepassen els que fins ara s'havien detectat amb seqüències parcials de la mateixa regió de control (Bernatchez 2001). La comparació de les distàncies evolutives dins i entre llinatges en els dos treballs permet constatar una major diversitat dels llinatges quan es treballa amb seqüències completes de la regió de control (Article V, Taula 2, p.172), tant en els llinatges mediterranis com en els atlàntics. Així, les anàlisis de Bernatchez (2001) havien detectat 8 seqüències del llinatge AT (distància mitjana entre

haplotips, $dmh=0,0020$), i 3 seqüències del llinatge ME ($dmh=0,0005$) que contrasten amb els 71 haplotips que s'han trobat en el conjunt de la vessant atlàntica pels llinatges DU (23, $dmh=0,013947 \pm 0,003218$) i AT (48, $dmh=0,004659 \pm 0,00112$), i els 22 que s'han detectat en el llinatge ME ($dmh=0,002843 \pm 0,000877$).

La determinació d'elements funcionals dins de la seqüència i la caracterització del patró de substitució de la regió de control del mtDNA han permès determinar un patró de mutació esbiaixat per a la molècula, amb una proporció important de llocs invariables i una taxa de substitució nucleotídica altament variable entre llocs nucleotídics. Tot i així, la molècula no presenta símptomes de saturació i pot utilitzar-se en l'anàlisi filogenètica. D'aquesta manera s'ha pogut utilitzar el rellotge molecular de la regió de control de truita per tal de determinar el temps de divergència de l'espècie. Aplicant una calibració molt àmplia ($0,75-2 \% \cdot Ma^{-1}$), les estimes de temps evolutiu assenyalen el Pleistocè com a l'origen de l'espècie (Articles III i V). En conseqüència, les grans subdivisions filogeogràfiques i l'origen dels llinatges evolutius apareixen lligades als canvis ambientals que ocorregueren durant el Quaternari, descartant la influència de la crisi salina del Messinià.

4.2.2. Patrons filogenètics dels llinatges atlàntics i mediterranis

El grau de divergència que s'observa entre els llinatges mediterranis (AD, ME i MA) és molt semblant a les diferències que existeixen entre els llinatges atlàntics (AT i DU), com assenyalen tant les estimes mitjanes de distància entre llinatges, 0,007475 a la vessant atlàntica i 0,006995 a la mediterrània, com el nombre mitjà de substitucions, 5,748 i 4,908 posicions variables, respectivament. Així mateix, la comparació de les topologies dels arbres filogenètics entre els llinatges atlàntics i mediterranis indiquen l'existència d'una certa relació entre els patrons que s'observen en ambdues vessants (Article V, Figura 6, p.181).

Segons Bernatchez i Wilson (1998) la diversitat genètica dels llinatges o espècies de peixos més afectades per les glaciacions es substancialment menor que la que s'observa en els llinatges o espècies que han habitat zones menys afectades per les glaciacions. Sorprenentment no sembla ser així en el cas de la truita comuna. La profunditat de les branques que generen els clades i la topologia dels haplotips atlàntics és més complexe que a la vessant mediterrània, assenyalant que la divergència a la vessant mediterrània és lleugerament posterior a la de l'atlàntic (Article V, Figura 6, p.181). Això confirmaria l'existència de refugis glacials on el llinatge AT va conservar abundants poblacions que mantingueren elevada la diversitat. Aquest fet s'observa clarament en els dissenys de l'anàlisi de clades encaixats, on un únic clade de nivell 3 engloba tots els haplotips dels llinatges AD i ME (Article III, Figura 3, p.104), i són necessaris fins a tres clades de nivell 3 per a englobar els haplotips només del llinatge AT (Article II, Figura 3, p.91). La diversitat d'aquests clades AT de 3r nivell és molt semblant – fins i tot superior – a la dels llinatges AD i ME. De la mateixa manera, la diversitat que presenta el llinatge DU, localitzat en el refugi glacial de la península Ibèrica, on se suposa que la intensitat de les glaciacions del Quaternari fou menor que en indrets localitzats més al nord, és només la meitat de la diversitat que presenta el conjunt del llinatge AT, que ha estat fortament afectat per les glaciacions (Article V, Taula 2, p.172).

4.2.3. Filogènia comparada en peixos d'aigua dolça

La topologia de l'arbre d'haplotips de *S.trutta* presenta, com ja s'ha dit anteriorment, tres branques principals (Article V, Figura 6, p.181), que es corresponen a cadascuna de les vessants on es troba distribuïda l'espècie: ponto-càspera, atlàntica i mediterrània. Un segon nivell de divergència dins de cada branca ens permet definir fins a sis llinatges evolutius dins de l'espècie. La diversitat mitjana entre els llinatges se situa entre 0,5 i 1 %. Estudis filogeogràfics realitzats en altres espècies de

peixos d'aigua dolça (vegeu Figures 3 a 7, p.19 a 21) assenyalen, com en el cas de la truita, que l'origen de la diversitat es troba a la vessant pontocàspera, molt sovint associada a la conca del Danubi. La única excepció seria el títal, on els llinatges més antics es troben actualment en la regió adriàtica.

El grau de divergència de la filogènia de truita (~0,75%) es troba entre el del títal (1%) i el del barb (0,5%), és superior al de la perca (0,25%) i és inferior al del cavil-lat (1,5%) i la bagra (>2%). Aquestes estimacions s'han fet amb diferents regions del mtDNA (regió de control, citocrom b, ND5) i els rangs de les calibracions dels rellotges moleculars varien molt: des del 0,72-0,76 %·Ma⁻¹ en barb fins el 2-6 %·Ma⁻¹ en perca. A pesar de la imprecisió inherent en la comparació d'aquests valors, diferents autors han proposat per a la família dels salmònids que la regió de control del mtDNA presentaria una taxa de substitució semblant a la de la resta del genoma mitocondrial (Shedlock *et al.* 1992, Churikov *et al.* 2001), i per tant és plantejable la comparació dels patrons filogeogràfics a nivell interespecífic.

4.2.4. Distribució actual de la diversitat molecular, el paper de les glaciacions

A nivell europeu, la comparació de patrons filogeogràfics interespecífics de diferents taxons, duta a terme per Taberlet *et al.* (1998), per tal de determinar pautes generals en els processos de recolonització, va posar de relleu un nombre limitat de coincidències. Tot i les diferències entre els taxons analitzats (mamífers, amfibis, insectes i plantes), es van localitzar tres refugis glacials potencials als Balcans i a les penínsules Ibèrica i Itàlica (Figura 21), i es van proposar tres grans patrons de colonització per a organismes terrestres (Hewitt 1999, 2000). Tot i això, Bilton *et al.* (1998) proposaren que els refugis glacials implicats en la recolonització de petits mamífers a Europa estarien situats a Europa central i a la zona pontocàspera (Figura 21). L'aïllament de les poblacions i l'existència d'un gran

nombre d'endemismes a l'Europa mediterrània, explicaria que les zones proposades per Taberlet *et al.* (1998) no es poguessin considerar, per aquestes espècies, com a refugis glacials ni l'origen de la colonització postglacial.

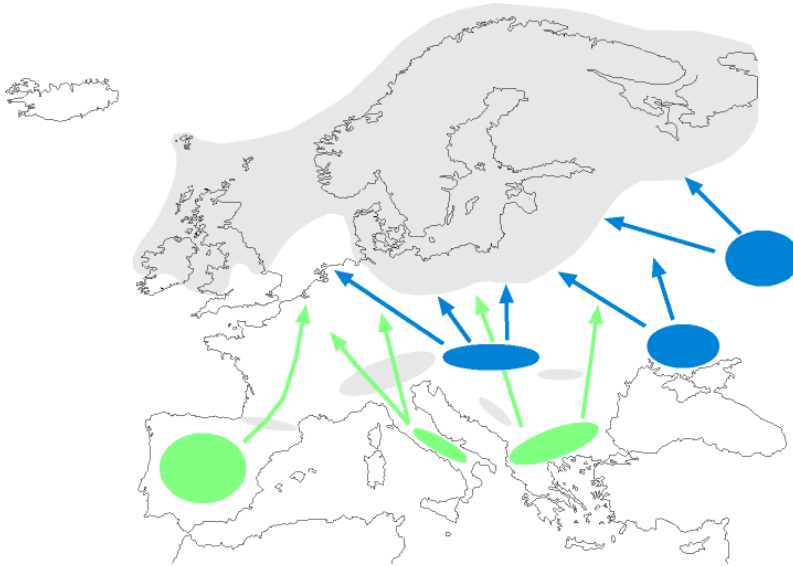


Figura 21. Models biogeogràfics de recolonització post-glacial segons el model tradicional, en verd (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt, 1999, 2000), i segons el model proposat per a petits mamífers, en blau (Bilton *et al.* 1998). En gris màxima extensió de la capa de gel durant el Würmià (18000 AP).

De la mateixa manera que en altres espècies de la ictiofauna europea d'aigua dolça, les glaciacions del Pleistocè han modificat profundament el rang de distribució de la truita comuna, especialment a la vessant atlàntica. Tal i com s'ha comentat, per a la truita comuna semblen existir diferents refugis pel llinatge AT, que han contribuït a la seva diversitat. Segons la bibliografia existent, es pot considerar la presència de fins a quatre refugis glacials durant el Pleistocè: als llacs periglacials situats a l'est de la capa de gel (Osinov i Bernatchez 1996, Makhrov *et al.* 2002), a

Europa central (Weiss *et al.* 2001, Duftner *et al.* 2003), a l'entorn del canal de la Mànega (García-Marín *et al.* 1999a, Bernatchez 2001) i a l'entorn del golf de Biscaia (García-Marín *et al.* 1999a, Bernatchez 2001); tot i que només els tres primers haurien participat en la última recolonització del nord d'Europa al final del Würmià (Bernatchez 2001). Segons les anàlisis presentades a l'Article II, la truita comuna a la vessant Atlàntica presenta tres clades de 3r nivell amb una marcada distribució geogràfica. Els clade AT3-1, el més antic, es distribueix a tota la vessant Atlàntica europea excepte a la península Ibèrica i a l'est del Mar Bàltic. El clade AT3-2 es troba a tot Europa excepte Islàndia, i és l'únic grup que s'ha detectat al refugi glacial proposat a l'est d'Europa. Tot i això, els clades de 2n nivell que formen aquest clade AT3-2 presenten una distribució geogràfica molt marcada (Article II, Fig. 1, p.89). Així, el clade AT2-4, té una presència molt limitada a la vessant atlàntica de la península Ibèrica, i es troba àmpliament distribuït més al nord; en canvi, els clades AT2-5 i AT2-6 es troben bàsicament distribuïts a la península Ibèrica i el nord d'Àfrica i són absents a les zones recolonitzades. Finalment el clade AT3-3, que segons les anàlisis filogenètiques fou l'últim d'aparèixer, només es troba a la península Ibèrica i al nord d'Àfrica, i també és absent de les zones recolonitzades. Les anàlisis de NCA suggereixen que l'origen d'aquests clades de 3r nivell seria l'aïllament (Article II, Taules 5 i 6, p.86), possiblement associat a un dels períodes glacials del Quaternari, tot i que els models temporals i l'actual distribució de la variabilitat genètica indiquen que la divergència seria anterior a l'últim període glacial. Tot i que actualment trobem distribuïts els clades AT3-1 i AT3-2 pràcticament a tot Europa, la distribució de la variabilitat genètica (Article II, Figura 1, p.89) suggereix que durant l'últim període glacial el refugi glacial del canal de la Mànega hauria estat ocupat principalment pel clade AT3-1 i al refugi situat als llacs periglacials de l'est d'Europa hi trobaríem el clade AT3-2 (bàsicament clade AT2-4). Les anàlisis dels estocs de centre piscícola, d'origen centreeuropeu, assenyalen la presència d'ambdós clades i la preeminència del clade AT3-1 (Article II, Taula 1, p.81), el que explicaria

que, probablement, ambdós grups s'haurien trobat en aquest refugi. El refugi del golf de Biscaia que inclou el sud de França i el Cantàbric hauria estat l'origen de l'expansió cap al sud del clade AT3-3 durant algun període glacial del Pleistocè Superior. Segurament també hauria servit de base per expansions cap al nord durant interglacials anteriors, però no durant el Würmià.

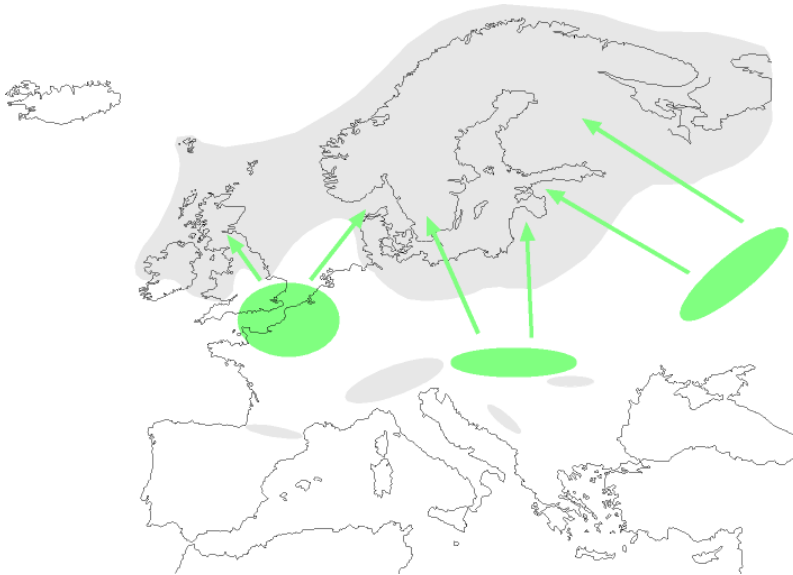


Figura 22. Patrons de recolonització per a la truita comuna: refugis glacials i línies principals recolonització després de l'últim període glacial.

A la vessant mediterrània de la península Ibèrica s'ha produït una intensa intergradació secundària entre llinatges durant els períodes glacials a partir de l'expansió durant els interglacials de les poblacions retingudes a les capçaleres (Article III). Així, els llinatges AD i ME es troben barrejats en aquesta vessant, amb poblacions "pures" per un o altre llinatge i poblacions amb presència d'ambdós llinatges, en tots els rius analitzats. Aquest patró s'ha observat també en d'altres punts de la conca

mediterrània, de manera que probablement sigui característic del seu conjunt (Article III, Figura 20). Això contrasta amb els resultats d'altres espècies de peixos com ara la bagra (Figura 7, p.21) on observem una separació geogràfica de cadascun dels llinatges matriarcal. La major capacitat de fluxe gènic de la truita comuna, com a conseqüència de la possibilitat de l'estil de vida anàdroma, segurament afavoreix en alguns períodes l'intercanvi d'individus entre poblacions dels diferents rius.

El model de recolonització postglacial proposat per a la truita comuna, amb tres refugis glacials principals durant el Würmià, presenta molts punts de coincidència amb els models que s'han proposat en altres espècies europees de peixos d'aigua dolça i, a diferència dels models proposats per Taberlet *et al.* (1998), les penínsules sud-europees no semblen estar implicades en el procés de recolonització post-glacial al final del Würmià. El refugi occidental a l'entorn del canal de la Mànega també ha estat proposat per al títal (Weiss *et al.* 2002), la perca (Nesbo *et al.* 1999) i la bagra (Durand *et al.* 1999a). En el cas del títal i la perca, els llinatges que haurien ocupat aquest refugi, Loire i Europeu occidental respectivament, no es troben a la part oriental del Mar Bàltic, com el clade AT3-1 de la truita comuna. El refugi glacial d'Europa central, que se sospita que podria haver contingut poblacions dels clades AT3-1 i AT3-2 de truita, també hauria contingut poblacions de títal (Koskinen *et al.* 2000, Weiss *et al.* 2002), cavil·lat (Kontula i Vainola 2001, Volckaert *et al.* 2002) i barb (Kotlík i Berrebi 2001). Per al cavil·lat, en aquest refugi hi trobaríem els llinatges I-W i II. A l'est de la capa de gel, a més de truites del clade AT3-1, el refugi glacial hauria estat ocupat pel títal (Koskinen *et al.* 2000), la perca (Nesbo *et al.* 1999) i el cavil·lat (Kontula i Vainola 2001). El títal i el cavil·lat presenten un únic llinatge distribuït en aquest refugi glacial, en canvi per a la perca hi trobem fins a tres grups de poblacions.

Tot i aquest gran nombre de coincidències també es dóna alguna desavinença. Per exemple, la zona ponto-càspera, que en el cas de la truita comuna no sembla haver participat en el procés de recolonització post-

glacial, sí que hauria contingut poblacions de peixos que s'haurien expandit cap al nord durant l'Holocè. Com a la bagra (Durand *et al.* 1999a) i la perca (Nesbo *et al.* 1999). L'expansió cap al sud des del refugi glacial del golf de Biscaia proposada per al clade AT3-3 de la truita comuna, no ha estat observada en cap altra espècie de peixos. Només en el cas de la bagra, Durand *et al.* (1999c) han proposat una expansió cap al sud – des de la conca del Danubi cap a Grècia – durant el Pleistocè.

5. Conclusions

L'anàlisi dels resultats obtinguts en aquest treball sobre la filogeografia de la truita comuna (*Salmo trutta*) mitjançant la seqüenciació directa del la totalitat de la regió de control del DNA mitocondrial, ens permet concloure que:

- La seqüenciació completa de la regió de control del mtDNA permet detectar nivells de diversitat per la truita comuna que sobrepassen els que fins ara s'havien detectat amb seqüències parcials de la mateixa regió de control.
- Per a la truita comuna s'han confirmat sis grans llinatges evolutius: Danubi (DA), Atlàntic (AT), Duero (DU), Adriàtic (AD), Mediterrani (ME) i Marmoratus (MA). Els resultats obtinguts han permès confirmar la posició ancestral del llinatge Danubi en la filogènia de *S.trutta*, d'acord amb els models biogeogràfics que postulen l'origen asiàtic de la ictiofauna europea d'aigua dolça. En un primera etapa es va produir la

divergència entre les vessants ponto-càsquia, atlàntica i mediterrània. Un segon nivell de divergència dins de cada vessant hauria originat els llinatges evolutius que s'observen actualment: un únic llinatge molt divers a la zona ponto-càsquia, els llinatges AT i DU a la vessant atlàntica i els llinatges AD, ME i MA a la vessant mediterrània.

- A la vessant atlàntica de la península Ibèrica, l'estructura poblacional es troba associada a la xarxa hidrogràfica i es determinen fins a cinc grups de poblacions. Les truites dels rius Cantàbrics, les del Miño, les del Duero i les del Tajo, es correlacionen amb els dissenys de clades dels llinatges AT i DU, i les poblacions del Guadalquivir que pertanyerien a un grup d'influència mediterrània. Els marcadors d'al·lozims i de mtDNA es troben fortament correlacionats a la vessant atlàntica, on bàsicament ens informen de la mateixa història evolutiva.
- Els rius de la vessant mediterrània haurien estat colonitzats pels llinatges AD i ME, i s'hauria produït una intensa intergradació secundària entre aquests llinatges durant els períodes glacials a partir de l'expansió en els interglacials de les poblacions retingudes a les àrees de refugi. En conseqüència els *pools* gènics de cada llinatge s'haurien barrejat donant lloc al patró actual, on la diferenciació està associada a senyals filogenètiques i no pas a patrons hidrogràfics. A conseqüència de la hibridació i la deriva, els grups de poblacions identificats pels marcadors d'al·lozims i de mtDNA no coincideixen.
- Les glaciacions del Pleistocè han modul·lat profundament la diversitat i el rang de distribució de la truita comuna a la vessant atlàntica. S'han definit pel llinatge AT tres clades de tercer nivell amb una marcada distribució geogràfica. El clade AT3-1 és absent a la península Ibèrica, però el trobem a la resta d'Europa, excepte al refugi glacial proposat a l'est de la capa de gel. El clade AT3-2 el trobem distribuït a tota la vessant atlàntica, tot i que els clades de nivell 2 d'aquest grup també presenten un patró geogràfic clar. Finalment, el clade AT3-3 no

s'observa en zones recolonitzades i es troba restringit a la península Ibèrica i el nord d'Àfrica.

- Dels quatre grans refugis glacials proposats per a la truita només tres haurien participat en la recolonització del Nord d'Europa al final de l'última glaciació (est., Europa central i canal de la Mànega). El quart refugi, que inclou el sud de França i el Cantàbric, hauria estat l'origen de l'expansió cap al sud del clade AT3-3 durant el Pleistocè Superior, i també hauria servit de base per expansions cap al nord durant interglacials anteriors.
- El model de recolonització per a la truita comuna presenta coincidències amb la resta d'ictiofauna europea d'aigua dolça. Les poblacions de truita haurien compartit els refugis glacials durant l'última glaciació amb poblacions d'altres espècies de peixos com ara el barb (*Barbus barbus*), el cavil·lat (*Cottus gobio*), la perca (*Perca fluviatilis*), el timal (*Thymallus thymallus*) i la bagra (*Squalius cephalus*).

6. Referències

- Allendorf, F. W. i L. W. Seeb. 2000. Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. *Evolution* 54, 640-651.
- Allendorf, F. W., Ryman, N., Stennek, A. i G. Stahl. 1976. Genetic variation in Scandinavian brown trout (*Salmo trutta* L.): evidence of distinct sympatric populations. *Hereditas* 83, 73-82.
- Antunes, A., Alexandrino, P. i N. Ferrand. 2001. Complex evolutionary history in the brown trout: Insights on the recognition of conservation units. *Conservation Genetics* 2, 237-247.
- Antunes, A., Templeton, A. R., Guyomard, R. i P. Alexandrino. 2002. The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the transferring gene in brown trout. *Molecular Biology and Evolution* 19, 1272-1287.
- Apostolidis, A. P., Triantaphyllidis, C., Kouvatsi, A. i P. S. Economidis. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology* 6, 531-542.
- Aurelle, D. i P. Berrebi. 2001. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta*, L.) populations from south-western France: data from mitochondrial control region variability. *Molecular Ecology* 10, 1551-1561.

- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, Nova York.
- Avise, J. C. 1996. Space and time as axes in intraspecific phylogeography. In: *Past and Future Rapid Environmental Changes: The spatial and Evolutionary Responses of Terrestrial Biota* (eds Huntley B., Cramer, W., Morgan, A. V., Prentice, H. C. Allen, J. R. M.) pp. 381-388. Springer-Verlag, New York, E.E.U.U.
- Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7, 371-379.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Anglaterra.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T. Neigel, J. E., Reeb, C. A. i N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *An. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522.
- Ballard, W. O. J. i M. C. Whitlock. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729-744.
- Balon, E. K. 1968. Notes to the origin and evolution of trouts and salmons with special reference to the Danubian trouts. *Vestn. Cekoslov. Spolec.* 32, 1-21.
- Banarescu, P. M. 1989. Vicariant patterns and dispersal in European freshwater fishes. *Spixiana* 12 (1), 91-103.
- Banarescu, P. M. 1992. *Zoogeography of freshwaters, vol 2: distribution and dispersal of freshwater animals in North America and Eurasia*. Aula Verlag, Wiesbaden, Alemanya.
- Behnke, R. J. 1986. Brown Trout. *Trout* 27, 42-47.
- Bennett, M. R. i N. F. Glasser. 1996. *Glacial geology. Ice sheets and Landforms*. John Wiley & Sons, West Sussex, Anglaterra.
- Berg, L. S. 1948. *Freshwater fishes of the U.S.S.R. and adjacent countries*. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, Israel.
- Bermingham E. i C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7, 367-369.
- Bernatchez, L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55, 351-379.
- Bernatchez, L. i C. Wilson. 1998. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* 7, 431-452.

- Bernatchez, L., Guyomard, R. i F. Bonhomme. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* 1, 161-173.
- Berrebi, P. 2000, Povz, M, Jesensek, D., Cattaneo-Berrebi, G. i A. J. Crivelli. 2000. The genetic native diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soca River, Slovenia. *Heredity* 85, 277-287.
- Bianco, P. G. 1990. Potential role of the palaeohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 1, 167-184.
- Bilton, D., Mirol, P. M., Mascheretti, S., Fredga, K., Zima, J. i J. B. Searle. 1998. Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 265, 1219-1226.
- Bouza, C., Arias, J., Castro, J., Sanchez, L. i P. Martínez. 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., Castro, J., Sánchez, L. i P. Martínez. 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.
- Brown, W. M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In *Evolution of Genes and Proteins*, M. Nei i R. K. Koehn (eds.). Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts, E.E.U.U.
- Churikov, D., Matsuoka, M., Luan, X., Gray, A. K., Brykov, V. A. i A. J. Gharret. 2001. Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*). *Molecular Ecology* 10, 2329-2339.
- Clement, M., Posada, D. i K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1660.
- Crespi, B. J. i M. J. Fulton. 2004. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31, 658-679.
- Cross, T. F., Mills, C. P. R. i M. de Courcy Williams. 1992. An intensive study of allozyme variation in freshwater resident and anadromous trout, *Salmo trutta* L., in Western Ireland. *Journal of Fish Biology* 40, 25-32.

- Doadrio I. 1988. Delimitation of areas in the Iberian Peninsula on the basis of freshwater fishes. *Bonner Zoologische Beiträge* 39, 113-118.
- Dorofeeva, E. A. 2000. Systematics and Distribution History of European Salmonid Fishes of the Genus *Salmo*. *Journal of Ichthyology* 6, 419-429.
- Duftner, N., Weiss, S., Medgyesy, N. i C. Sturmbauer. 2003. Enhanced phylogeographic information about Austrian brown trout populations derived from complete mitochondrial control region sequences. *Journal of Fish Biology* 62, 427-435.
- Durand, J. D., Persat, H. i Y. Bouvet. 1999a. Phylogeography and postglacial dispersion of the chub (*Leuciscus cephalus*) in Europe. *Molecular Ecology* 8, 989-997.
- Durand, J. D., Guinand, B. i Y. Bouvet. 1999b. Local and global multivariate analysis of geographical mitochondrial DNA variation in *Leuciscus cephalus* L. 1758 (Pisces: Cyprinidae) in the Balkan Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society* 67, 19-42.
- Durand, J. D., Templeton, A., Guinand, B., Imsiridou, A. i Y. Bouvet. 1999c. Nested Clade and Phylogeographic Analyses of the Chub, *Leuciscus cephalus* (Teleostei, Cyprinidae) in Greece: Implications for Balkan Peninsula Biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13, 566-580.
- Durand, J. D., Bianco, P. G., Laroche, J i A. Gilles. 2003. Insight into the origin of endemic Mediterranean Ichthyofauna: Phylogeography of *Chondrostoma* genus (Teleostei, Cyprinidae). *Journal of Heredity* 94, 315-328.
- Elliott, J. M. 1994. *Quantitative ecology and the brown trout*. *Oxford Series in Ecology and Evolution*. Oxford University Press, Oxford, Anglaterra.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. i J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, E.E.U.U.
- Fergusson, A. 1989. Genetic differences among brown trout (*Salmo trutta*) stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater Biology* 21, 35-46.
- Fergusson, A. i F. M. Mason. 1981. Allozyme evidence for reproductively isolated sympatric populations of brown trout *Salmo trutta* L. In Lough Melvin, Ireland. *Journal of Fish Biology* 18, 629-642.
- García-Marín, J.-L. i C. Pla. 1996. Origins and relationships of native populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Heredity* 77, 313-323.

- García-Marín, J.-L., Utter, F. M. Utter i C. Pla. 1999a. Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity* 82, 46-56.
- García-Marín, J.-L., Sanz, N., i C. Pla. 1999b. Erosion of the native genetic resources of brown trout in Spain. *Ecology of Freshwater Fish* 8, 151-158.
- Giuffra, E., Bernatchez, L. i R. Guyomard. 1994. Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology* 3, 1161-1171.
- Giuffra, E., Guyomard, R. i G. Forneris. 1996. Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Molecular Ecology* 5, 207-220.
- Groot, C. i L. Margolis. 1991. *Pacific Salmon Life Histories*. University of British Columbia Press, Vancouver, Colúmbia Britànica, Canada.
- Hamilton, K. E., A. Fergusson, J. B. Taggart i T. Tómasson. 1989. Post-glacial colonization of brown trout, *Salmo trutta* L.: *Ldh-5* as a phylogeographic marker locus. *Journal of Fish Biology* 35, 651-664.
- Hansen, M. M. i K.-L. Mensberg. 1998. Genetic differentiation and relationship between genetic and geographical distance in Danish sea trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Heredity* 81, 493-504.
- Hays, J. D., Imbrie, J. i N. J. Shackleton. 1976. Variations in the Earth's Orbit: Pacemaker of the Ice Ages. *Science*, 194, 1121-1132.
- Hendry, A. P. i S. C. Stearns. 2003. *Evolution Illuminated: Salmon and their Relatives*. Oxford University Press, Oxford, Anglaterra.
- Hewitt, H. G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58, 247-276.
- Hewitt, H. G. M. 1999. Post-glacial colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68, 87-112.
- Hewitt, H. G. M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- Hewitt, H. G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*. 10, 537-549.
- Hyndar, K., Jonsson, B., Ryman, N. i G. Stahl. 1991. Genetic relationships among landlocked, resident and anadromous brown trout, *Salmo trutta* L. *Heredity* 66, 83-91.

- Hynes, R. A., Fergusson, A. i M. A. McCann. 1996. Variation in mitochondrial DNA and postglacial colonization of northwestern Europe by brown trout. *Journal of Fish Biology* 49, 54-64.
- Kimura, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, Anglaterra.
- Kontula, T. i R. Vainola. 2001. Postglacial colonization of Northern Europe by distinct phylogeographic lineages of the bullhead, *Cottus gobio*. *Molecular Ecology* 10, 1983-2002.
- Koskinen, M. T., Ranta, E., Piironen, J., Veselov, A., Titov, S., Haugen, T. O., Nilsson, J., Carlstein, M. i C. R. Primmer. 2000. Genetic lineages and postglacial colonization of grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in Europe, as revealed by mitochondrial DNA analyses. *Molecular Ecology* 9, 1609-1624.
- Kotlík, P. i P. Berrebi. 2001. Phylogeography of the barbel (*Barbus barbus*) assessed by mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 10, 2177-2185.
- Kottelat, M. 1997. European Freshwater Fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes in Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. *Biologia, Section Zoology* 52, 1-271.
- Kumar, S. i A. J. Filipski. 2001. Molecular Phylogeny Reconstruction. In *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, www.els.net.
- Laikre, L. 1999. *Conservation Genetic Management of Brown Trout (Salmo trutta) in Europe*. Report by the Concerted Action on Identification, Management and Exploitation of Genetic Resources in the Brown Trout (*Salmo trutta*). "Trout Concert"; EU FAIR CT97-3882.
- Laikre, L., Järvi, T., Johansson, L., Palm, S., Rubin, J.-F., Glimsäter, C. E., Landergren, P. i N. Ryman. 2002. Spatial and temporal population structure of sea trout at the Island of Gotland, Sweden, delineated from mitochondrial DNA. *Journal of Fish Biology* 60, 49-71.
- Lee, W.-J., Conroy, J., Howell, W. H. i T. D. Kocher. 1995. Structure and Evolution of Teleost Mitochondrial Control Regions. *Journal of Molecular Evolution* 41, 54-66.
- Lelek, A. 1980. *Threatened freshwater fishes of Europe*. Nature and Environment Series nº 18, Consell d'Europa, Estrasburg, França.
- Lewontin, R. C. 1991. Twenty-five years ago in genetics, electrophoresis in the development of evolutionary genetics - millestone or millstone? *Genetics* 128, 657-662.

- Machordom, A., Suárez, J., Almodóvar, A. i J. M. Bautista. 2000. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations. *Molecular Ecology* 9, 1325-1338.
- Makhrov, A. A., Skaala i Y. P. Altukhov. 2002. Alleles of sAAT-1,2* isococi in brown trout: potential diagnostic marker for tracking routes of post-glacial colonization in northern Europe. *Journal of Fish Biology* 61, 842-846.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.
- McDowall, R. M. 2004. What biogeography is: a place for process. *Journal of Biogeography* 31, 345-351.
- Moller-Hansen, M. 2003. *Application of molecular markers in population and conservation genetics, with special emphasis on fishes*. DSc thesis, Danish Insitute for Fisheries Research, Silkeborg, Dinamarca.
- Moritz, C. C., Dowling, T. E. i W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 269-292.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106, 283-292.
- Nei, M. i F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97, 145-162.
- Nei, M. i S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press Inc. New York, NY.
- Nesbo, C. L., Fosshem, T., Vøllestad, A. i K. S. Jakobsen. 1999. Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology* 8, 1387-1404.
- Nümann, W. 1967. Markierungsveruche and Bach- und Regenbogenforellen in Bodensee als Beitrag zur systematischen Eingliederung von Forellen. *Schweiz. Ztschr. Hydrol.* 29, 269-283.
- Osinov, A., i L. Bernatchez. 1996. Atlantic and Danubean phylogenetic groupings of brown trout (*Salmo trutta* L.) complex: genetic divergence, evolution and conservation. *Journal of Ichthyology.* 36: 762-786.
- Perdices, A., Doadrio, I., Economidis, P. S., Bohlen, J. i P. Banareescu. 2003. Pleistocene effects on the European freshwater fish fauna: double origin of the cobitid genus *Sabanejewia* in the Danube basin (Osteichthyes: Cobitidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26, 289-299.

- Posada, D. i K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.
- Posada, D., Crandall, K. A. i A. R. Templeton. 2000. GEODIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9, 487-488.
- Presa, P., Pardo, B. G., Martínez, P. i L. Bernatchez. 2002. Phylogeographic Congruence Between mtDNA and rDNA ITS Markers in Brown Trout. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2161-2175.
- Rogers, A. R. i H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* , 9, 552-569.
- Ryman, N. 1983. Patterns of distribution of biochemical genetic variation in salmonids: differences between species. *Aquaculture* 33, 1-21.
- Ryman, N., Allendorf, F. W. i G. Stahl. 1979. Reproductive isolation with little genetic divergence in sympatric populations of brown trout (*Salmo trutta*). *Genetics* 92, 247-262.
- Sambroock, J., Fritsch, E. J., i T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 2a ed.
- Sanz, N. 2000. *Diversitat genètica de la truita comuna (Salmo trutta L.) a la Península Ibèrica: Biogeografia i Gestió*. Memòria de Tesi Doctoral, Universitat de Girona, Girona. 239 pp.
- Sanz, N., García-Marín, J.-L. i C. Pla. 2000. Divergence of brown trout within glacial refugia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 2201-2210.
- Sanz, N., García-Marín, J.-L. i C. Pla. 2002. Managing fish populations under mosaic relationships. The case of brown trout (*Salmo trutta*) in peripheral Mediterranean populations. *Conservation Genetics* 3, 385-400.
- Schneider, S., D. Roessli i L. Excoffier. 2000. *ARLEQUIN ver 2.000. A software for population genetic data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, Univ. of Geneva.
- Shedlock, A. M., Parker, J. D., Crispin, D. A., Pietsch, T. W. i G. C. Burner. 1992. Evolution of the Salmonid Mitochondrial Control Region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1, 179-192.
- Slatkin, M. i R. R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of Mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129, 555-562.

- Sober, E. 1988. *Reconstructing the past: Parsimony, evolution and inference*. MIT Press, Cambridge, MA.
- Strimmer, K. i A. von Haeseler. 1996. Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution* 13, 964-969.
- Suárez, J., Bautista, J. M., Almodóvar, A. i A. Machordom. 2001. Evolution of the mitochondrial control region in Palearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity* 87, 198-206.
- Susnik, S, Schoffmann, J. i A. Snoj. 2004. Phylogenetic position of *Salmo (Platysalmo) platycephalus* Behnke 1968 from south-central Turkey, evidenced by genetic data. *Journal of Fish Biology* 64, 947-960.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods.) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 128 pp.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.-N. i J.-F. Cosson. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7, 453-464.
- Tamura, K. i M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10, 512-526.
- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7, 381-397.
- Templeton, A. R. i C. F. Sing. 1993. A cladistic analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134, 659-669.
- Templeton, A. R., Boerwinkle, E. i C. F. Sing. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117, 343-351.
- Uzzell, T. i K. Corbin. 1971. Fitting discrete probability distributions to evolutionary events. *Science* 172, 1089-1096.
- Vera, M. 2003. *Variabilidad de la región de control del ADN mitocondrial en las poblaciones de trucha común (Salmo trutta) de la cuenca del río Duero*. Memòria del Treball de Recerca, Universitat de Girona.

- Volckaert, F. A. M., Hänfling, B., Hellemans, B. i G. R. Carvalho. 2002. Timing of the population dynamics of bullhead *Cottus gobio* (Teleostei: Cottidae) during the Pleistocene. *Journal of Evolutionary Biology* 15, 930-944.
- Weiss, S., Antunes, A, Schlötterer, C. i P. Alexandrino. 2000. Mitochondrial haplotype diversity of brown trout *Salmo trutta* L. in Portuguese rivers supports a simple broad-scale model of the Pleistocene recolonization of northern Europe. *Molecular Ecology* 9, 691-698.
- Weiss, S., C. Schlötterer, H. Waidbacher and M. Jungwirth. 2001. Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish – by man or nature? *Molecular Ecology* 10, 1241-1246.
- Weiss, S., Persat, H., Eppe, R., Schlötterer, C. i F. Uiblein. 2002. Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial control region. *Molecular Ecology* 11, 1393-1407.
- Willis, K. J. i R. J. Whitakker. 2000. Palaeoecology: The refugial debate. *Science* 287, 1406-1407.
- Xia, X. i Z. Xie. 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92, 371-373.
- Xia, X., Xie Z., Salemi, M., Chen, L., i Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26(1), 1-7.
- Zardoya R. i I. Doadrio. 1999. Molecular Evidence on the Evolutionary and Biogeographical Patterns of European Cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* 49, 227-237.

