

EVIDENCIAS DE UN NUEVO COMPLEJO HÍBRIDO UNISEXUADO DEL GÉNERO *SQUALIUS* (TELEOSTEI, CYPRINIDAE) EN EL RÍO ESTENA (PARQUE NACIONAL DE CABAÑEROS): UNA APROXIMACIÓN FILOGENÉTICA

CARINA CUNHA¹ E IGNACIO DOADRIO¹

RESUMEN

Existen más de 90 ejemplos de vertebrados asexuados. En la Península Ibérica hasta ahora se habían registrado dos complejos asexuados híbridos en peces de agua dulce: *Iberocypris palaciosi* y *Squalius alburnoides*. A través del uso de citometría de flujo para determinar la ploidía y del análisis filogenético basado en marcadores mitocondriales y nucleares se descubrió un nuevo complejo híbrido unisexuado constituido por diferentes ploidías en el Río Estena, Parque Nacional de Cabañeros. Además este nuevo complejo vive en simpatria con el complejo *S. alburnoides* y puede reproducirse con los machos diploides de *S. alburnoides* cuyo genoma nuclear denominamos AA. El origen de este complejo parece ser unidireccional y debió de producirse entre hembras de *S. pyrenaicus* y machos de una especie ancestral del género *Squalius* nunca antes reportada.

Palabras clave: hibridación, poliploidía, complejo *S. alburnoides*, marcadores genéticos, especiación alopoliploide, cuenca del Guadiana.

SUMMARY

There are worldwide more than 90 examples of asexual vertebrates. In the Iberian Peninsula, until present, two asexual hybrid complexes of freshwater fishes have been described: *Iberocypris palaciosi* and *Squalius alburnoides*. Through flow cytometry to determine the ploidy level, and through phylogenetics analysis based in mitochondrial and nuclear markers, a new unisexual hybrid complex, composed by different ploidies, has been discovered at the Estena River, Parque Nacional de Cabañeros. Moreover, this new complex lives in sympatry with *S. alburnoides* parasiting the AA males of *S. alburnoides*. The origin of the complex could be unidirectional and arised from crosses between *S. pyrenaicus* females and males of an ancestral species belonging to the *Squalius* genera, a species never reported before.

Key words: hybridization, poliploidy, *S. alburnoides* complex, genetic markers, allopolyploid speciation, Guadiana basin.

¹ Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, C/ José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, España; mcnj676@mncn.csic.es, mcnd147@mncn.csic.es.

INTRODUCCIÓN

Los diferentes procesos que están en el origen de la formación de nuevas especies han merecido, desde hace mucho, una atención muy especial en los estudios evolutivos. Siendo la especiación alopátrica y la simpátrica los mecanismos más citados para la formación de nuevos taxones (MAYR 1963). Sin embargo, a pesar de ser un fenómeno extendido tanto por el mundo vegetal como por el animal, el papel de la hibridación en la formación de nuevas especies es uno de los tópicos más polémicos en el contexto de la evolución (ARNOLD 1997; DOWLING & SECOR 1997). Hace poco, la hibridación era considerada como un fenómeno raro y deletéreo sin embargo con la aparición de los marcadores moleculares capaces de detectarlos, el número de casos encontrados de individuos/poblaciones/especies híbridas ha aumentado considerablemente. Hoy se sabe que la hibridación interespecífica puede ser muy importante en plantas y animales. La hibridación puede originar nuevos taxa por poliploidización del genoma (alopoliploidia) y por el surgimiento de líneas asexuadas con reproducción clonal (revisado por DOWLING & SECOR 1997).

En los peces de agua dulce, la hibridación es un fenómeno bastante común (SCHWARTZ 1972; SMITH 1992), pero la mayoría de los híbridos son estériles (Hubbs 1955). La gran incidencia de híbridos en los peces, en especial en la familia Cyprinidae (COLLARES-PEREIRA 1989), seguramente se debe al hecho de la reproducción, la cual en muchas de estas especies es externa. Sin embargo, diversos estudios indican que determinadas poblaciones híbridas persisten en la naturaleza utilizando mecanismos reproductores que les permiten mantener estas poblaciones estables y viables conociéndose ya más de 90 complejos asexuados en vertebrados inferiores (VRIJENHOEK *et al.* 1989; ALVES *et al.* 2001). El complejo *Squalius alburnoides* es uno de estos ejemplos, donde existe una fuerte correlación entre la hibridación, asexualidad y poliploidia.

El calandino (*Squalius alburnoides*) es un ciprínido endémico de la Península Ibérica, de origen hí-

brido, que contiene formas diploides ($2n=50$), triploides ($3n=75$) y tetraploides ($4n=100$) y una gran desviación en el sex-ratio a favor de las hembras (COLLARES-PEREIRA 1983, 1984; ALVES *et al.* 1997a,b, CARMONA *et al.* 1997; ALVES *et al.* 2001). Este complejo híbrido comprende diferentes ploidias ($2n$, $3n$ y $4n$) y es capaz de ultrapasar las barreras de la asexualidad siendo un ejemplo extraordinario de como estos "hopeful-monsters" pueden retomar la bisexualidad dando lugar a nuevas especies (ALVES *et al.* 2002; CRESPO-LÓPEZ *et al.* 2007; CUNHA *et al.* 2008).

Estudios biométricos (COLLARES-PEREIRA 1985) revelaron la existencia de dos morfotipos distintos en el calandino (*Squalius alburnoides*): una forma I, la más frecuente, de distribución más extendida, de mayores dimensiones y constituida mayoritariamente por hembras triploides (A— o AA-, siendo A una especie ancestral extinta y evolutivamente dentro del clado de los Alburninae y - una cualquiera de las especies del género *Squalius* endémicas del oeste peninsular); y la forma II de distribución más localizada y menos frecuente siendo la mayoría machos diploides no híbridos (machos AA).

Contrariamente a lo que suele pasar en los otros complejos asexuados, los machos diploides híbridos (A-) producen esperma no reducido y fértil. Las poblaciones del sur de la Península Ibérica son capaces de reconstituir y mantener la especie paterna extinta a través de las hembras triploides, pero la mayoría son machos (machos AA).

La distribución del calandino (*S. alburnoides*) es bastante amplia y estudios previos realizados por nosotros descubrieron la existencia de ciertos morfotipos en la cuenca del Guadiana, y en particular en el Parque Nacional de Cabañeros que podrían constituir un nuevo complejo híbrido, en simpatria con el complejo *S. alburnoides*. Estos individuos presentan efectivamente un morfotipo bastante diferente de las especies descritas del género *Squalius* y de las formas típicas de *S. alburnoides* por su pequeño tamaño y un reducido número de escamas lo que nos llevó a pensar que estábamos en presencia de

algo desconocido. Para comprender si se trata de plasticidad fenotípica de *S. alburnoides*, o un nuevo complejo híbrido, o una especie no descrita analizamos un gen mitocondrial y otro nuclear. A lo largo de este estudio los individuos que presentan un morfotipo distinto son denominados como "Raros" ya que esta fue la denominación que se utilizó al capturarlos. Si se tratara de simple plasticidad fenotípica los genotipos encontrados deberían ser los mismos que aparecen en el complejo *S. alburnoides*. Si se tratara de una nueva especie sólo un genotipo mitocondrial y nuclear debería ser encontrado. Si se tratara de un nuevo complejo híbrido nuestro análisis debería encontrar diversos genotipos alguno de ellos diferentes a los encontrados en *S. alburnoides*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Este estudio abarcó diversas localidades de toda la distribución del complejo *S. alburnoides*, con particular enfoque en la cuenca del Guadiana (fig. 1). Representantes de todas las especies de Leuciscinae ibéricos fueron también muestreados. Se realizaron extracciones de ADN en un total de 324 individuos, 264 individuos de *S. alburnoides*, 48 presentaban un morfotipo "Raro", y 60 representantes de las diferentes especies de Leuciscinae ibéricos (Tabla 1). Todo el ADN genómico de los peces se aisló y purificó utilizando los métodos descritos por SAMBROOK *et al.* (1989).

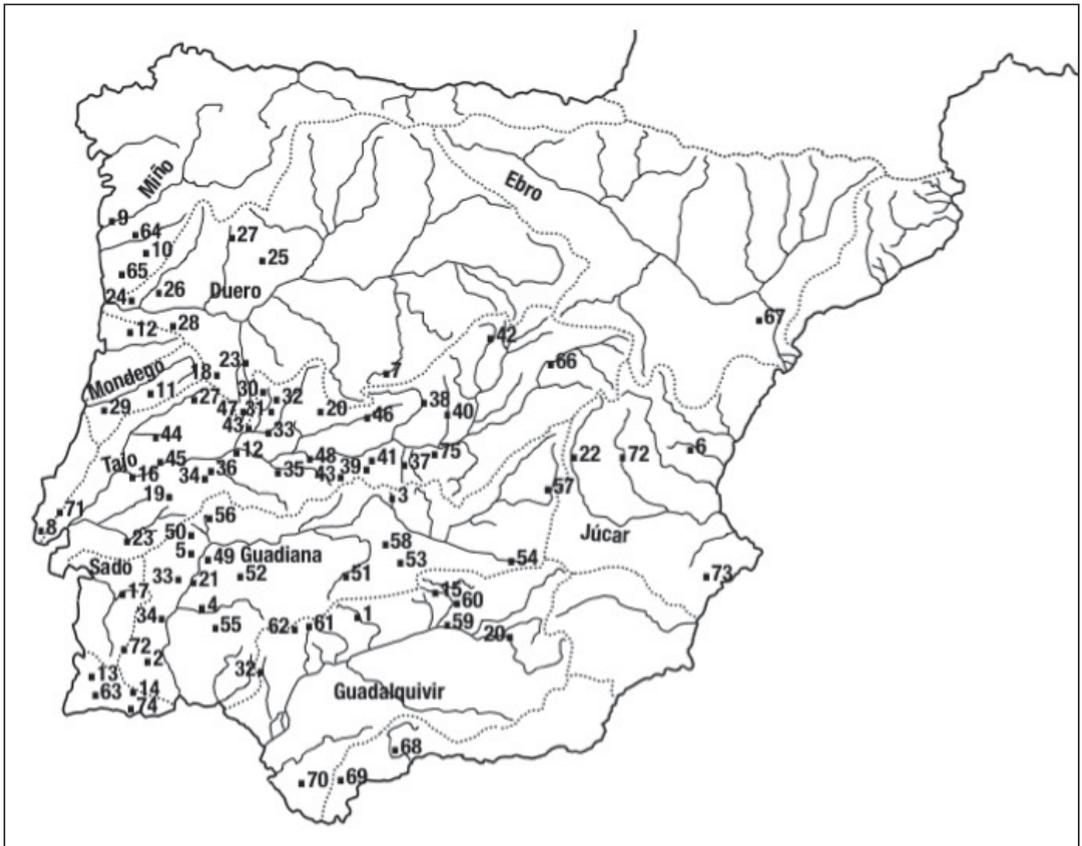


Figura 1. Mapa de la Península Ibérica. Los puntos corresponden a las localidades de muestreo.

Figure 1. Map of the Iberian Peninsula showing collection sites of the sampled specimens.

Especie	Genero	Rio	Cuenca	No. Figura 1
<i>A. hispanica 1</i>	<i>Anaocypris</i>	Bembezar	Guadalquivir	1
<i>A. hispanica 2</i>	<i>Anaocypris</i>	Degebe	Guadiana	2
<i>A. hispanica 3</i>	<i>Anaocypris</i>	Estena	Guadiana	3
<i>A. hispanica 4</i>	<i>Anaocypris</i>	Ardila	Guadiana	4
<i>A. hispanica 5</i>	<i>Anaocypris</i>	Caia	Guadiana	5
<i>Ach. arcasii 1</i>	<i>Achondrostoma</i>	Palancia	Palancia	6
<i>Ach. arcasii 2</i>	<i>Achondrostoma</i>	Palancia	Palancia	6
<i>Ach. arcasii 3</i>	<i>Achondrostoma</i>	Adaja	Duero	7
<i>Ach. occidental 1</i>	<i>Achondrostoma</i>	Sizandro	Sizandro	8
<i>Ach. occidental 2</i>	<i>Achondrostoma</i>	Sizandro	Sizandro	8
<i>Ach. oligolepis 1</i>	<i>Achondrostoma</i>	Miño	Miño	9
<i>Ach. oligolepis 2</i>	<i>Achondrostoma</i>	Roldes	Ave	10
<i>Ach. oligolepis 3</i>	<i>Achondrostoma</i>	Ceira	Mondego	11
<i>Ach. oligolepis 4</i>	<i>Achondrostoma</i>	Sul	Vouga	12
<i>I. almacai 1</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Mira	Mira	13
<i>I. almacai 2</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Bensafrim	Bensafrim	14
<i>I. almacai 3</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Bensafrim	Bensafrim	14
<i>I. lemmingii 1</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Estena	Guadiana	3
<i>I. lemmingii 2</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Estena	Guadiana	3
<i>I. lemmingii 3</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Tajo	Tajo	16
<i>I. lusitanicum 1</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Odivelas	Sado	17
<i>I. lusitanicum 2</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Tajo	Tajo	16
<i>I. lusitanicum 3</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Odivelas	Sado	17
<i>I. oretanum 1</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Robledillo	Guadalquivir	15
<i>I. oretanum 2</i>	<i>Iberochondrostoma</i>	Robledillo	Guadalquivir	15
<i>P. duriensis 1</i>	<i>Pseudochondrostoma</i>	Miño	Miño	9
<i>P. duriensis 2</i>	<i>Pseudochondrostoma</i>	Rabaçal	Duero	18
<i>P. duriensis 3</i>	<i>Pseudochondrostoma</i>	Sul	Vouga	12
<i>P. polylepis 1</i>	<i>Pseudochondrostoma</i>	Ceira	Mondego	11
<i>P. polylepis 2</i>	<i>Pseudochondrostoma</i>	Sorraia	Tajo	19
<i>P. polylepis 3</i>	<i>Pseudochondrostoma</i>	Odivelas	Sado	17
<i>P. wilkommii 1</i>	<i>Pseudochondrostoma</i>	Guadalquivir	Guadalquivir	20
<i>P. wilkommii 2</i>	<i>Pseudochondrostoma</i>	Guadiana	Guadiana	21
<i>Pch. arrigonis 1</i>	<i>Parachondrostoma</i>	Júcar	Júcar	22
<i>Pch. arrigonis 2</i>	<i>Parachondrostoma</i>	Júcar	Júcar	22
Raro 1	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 10	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 11	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 12	«Raro»	Estena	Guadiana	3

Especie	Genero	Rio	Cuenca	No. Figura 1
Raro 13	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 14	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 15	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 16	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 17	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 18	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 19	<i>Estena</i>	Estena	Guadiana	3
Raro 2	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 3	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 4	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 5	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 6	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 7	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 8	«Raro»	Estena	Guadiana	3
Raro 9	«Raro»	Estena	Guadiana	3
<i>S. alburnoides 1</i>	<i>Squalius</i>	Águeda	Duero	23
<i>S. alburnoides 10</i>	<i>Squalius</i>	Sousa	Duero	24
<i>S. alburnoides 11</i>	<i>Squalius</i>	Manzanas	Duero	25
<i>S. alburnoides 12</i>	<i>Squalius</i>	Ovelha	Duero	26
<i>S. alburnoides 13</i>	<i>Squalius</i>	Ovelha	Duero	26
<i>S. alburnoides 14</i>	<i>Squalius</i>	Ovelha	Duero	26
<i>S. alburnoides 15</i>	<i>Squalius</i>	Ovelha	Duero	26
<i>S. alburnoides 16</i>	<i>Squalius</i>	Támega	Duero	27
<i>S. alburnoides 17</i>	<i>Squalius</i>	Manzanas	Duero	25
<i>S. alburnoides 18</i>	<i>Squalius</i>	Manzanas	Duero	25
<i>S. alburnoides 19</i>	<i>Squalius</i>	Manzanas	Duero	25
<i>S. alburnoides 2</i>	<i>Squalius</i>	Paiva	Duero	28
<i>S. alburnoides 20</i>	<i>Squalius</i>	Manzanas	Duero	25
<i>S. alburnoides 21</i>	<i>Squalius</i>	Rabaçal	Duero	18
<i>S. alburnoides 22</i>	<i>Squalius</i>	Rabaçal	Duero	18
<i>S. alburnoides 23</i>	<i>Squalius</i>	Rabaçal	Duero	18
<i>S. alburnoides 24</i>	<i>Squalius</i>	Rabaçal	Duero	18
<i>S. alburnoides 25</i>	<i>Squalius</i>	Ceira	Mondego	11
<i>S. alburnoides 26</i>	<i>Squalius</i>	Ceira	Mondego	11
<i>S. alburnoides 27</i>	<i>Squalius</i>	Alva	Mondego	29
<i>S. alburnoides 28</i>	<i>Squalius</i>	Alva	Mondego	29
<i>S. alburnoides 29</i>	<i>Squalius</i>	Acebo	Tajo Alagon	30
<i>S. alburnoides 3</i>	<i>Squalius</i>	Paiva	Duero	28
<i>S. alburnoides 30</i>	<i>Squalius</i>	Arrago	Tajo Alagon	31

(Continúa)

(Continuación)

Especie	Genero	Rio	Cuenca	No. Figura 1
<i>S. alburnoides 31</i>	<i>Squalius</i>	Arrago	Tajo Alagon	31
<i>S. alburnoides 32</i>	<i>Squalius</i>	Caparro	Tajo Alagon	32
<i>S. alburnoides 33</i>	<i>Squalius</i>	Jerte	Tajo Alagon	33
<i>S. alburnoides 34</i>	<i>Squalius</i>	Alburrel	Tajo	34
<i>S. alburnoides 35</i>	<i>Squalius</i>	Almonte	Tajo	35
<i>S. alburnoides 36</i>	<i>Squalius</i>	Almonte	Tajo	35
<i>S. alburnoides 37</i>	<i>Squalius</i>	Almonte	Tajo	35
<i>S. alburnoides 38</i>	<i>Squalius</i>	Almonte	Tajo	35
<i>S. alburnoides 39</i>	<i>Squalius</i>	Almonte	Tajo	35
<i>S. alburnoides 4</i>	<i>Squalius</i>	Paiva	Duero	28
<i>S. alburnoides 40</i>	<i>Squalius</i>	Aurela	Tajo	36
<i>S. alburnoides 41</i>	<i>Squalius</i>	Aurela	Tajo	36
<i>S. alburnoides 42</i>	<i>Squalius</i>	Cedena	Tajo	37
<i>S. alburnoides 43</i>	<i>Squalius</i>	Cofio	Tajo	38
<i>S. alburnoides 44</i>	<i>Squalius</i>	Gévalo	Tajo	39
<i>S. alburnoides 45</i>	<i>Squalius</i>	Gévalo	Tajo	39
<i>S. alburnoides 46</i>	<i>Squalius</i>	Guadarrama	Tajo	40
<i>S. alburnoides 47</i>	<i>Squalius</i>	Huso	Tajo	41
<i>S. alburnoides 48</i>	<i>Squalius</i>	Jarama	Tajo	42
<i>S. alburnoides 49</i>	<i>Squalius</i>	Pesquero	Tajo	43
<i>S. alburnoides 5</i>	<i>Squalius</i>	Paiva	Duero	28
<i>S. alburnoides 50</i>	<i>Squalius</i>	Sertã	Tajo	44
<i>S. alburnoides 51</i>	<i>Squalius</i>	Sever	Tajo	45
<i>S. alburnoides 52</i>	<i>Squalius</i>	Sorraia	Tajo	19
<i>S. alburnoides 53</i>	<i>Squalius</i>	Sorraia	Tajo	19
<i>S. alburnoides 54</i>	<i>Squalius</i>	Tiétar	Tajo	46
<i>S. alburnoides 55</i>	<i>Squalius</i>	Tiétar	Tajo	46
<i>S. alburnoides 56</i>	<i>Squalius</i>	Trevijana	Tajo	47
<i>S. alburnoides 57</i>	<i>Squalius</i>	Vid	Tajo	48
<i>S. alburnoides 58</i>	<i>Squalius</i>	Odivelas	Sado	17
<i>S. alburnoides 59</i>	<i>Squalius</i>	Odivelas	Sado	17
<i>S. alburnoides 6</i>	<i>Squalius</i>	Paiva	Duero	28
<i>S. alburnoides 60</i>	<i>Squalius</i>	Albuera	Guadiana	49
<i>S. alburnoides 61</i>	<i>Squalius</i>	Arronches	Guadiana	50
<i>S. alburnoides 62</i>	<i>Squalius</i>	Degebe	Guadiana	2
<i>S. alburnoides 63</i>	<i>Squalius</i>	Estena	Guadiana	3
<i>S. alburnoides 64</i>	<i>Squalius</i>	Estena	Guadiana	3
<i>S. alburnoides 65</i>	<i>Squalius</i>	Estena	Guadiana	3
<i>S. alburnoides 66</i>	<i>Squalius</i>	Estena	Guadiana	3

Especie	Genero	Rio	Cuenca	No. Figura 1
<i>S. alburnoides 67</i>	<i>Squalius</i>	Estena	Guadiana	3
<i>S. alburnoides 68</i>	<i>Squalius</i>	Zújar	Guadiana	51
<i>S. alburnoides 69</i>	<i>Squalius</i>	Zújar	Guadiana	51
<i>S. alburnoides 7</i>	<i>Squalius</i>	Paiva	Duero	28
<i>S. alburnoides 70</i>	<i>Squalius</i>	Zújar	Guadiana	51
<i>S. alburnoides 71</i>	<i>Squalius</i>	Zújar	Guadiana	51
<i>S. alburnoides 72</i>	<i>Squalius</i>	Estena	Guadiana	3
<i>S. alburnoides 73</i>	<i>Squalius</i>	Matachel	Guadiana	52
<i>S. alburnoides 74</i>	<i>Squalius</i>	Quejigares	Guadiana	53
<i>S. alburnoides 75</i>	<i>Squalius</i>	Ruidera	Guadiana	54
<i>S. alburnoides 76</i>	<i>Squalius</i>	Sillo	Guadiana	55
<i>S. alburnoides 77</i>	<i>Squalius</i>	Gévora	Guadiana	56
<i>S. alburnoides 78</i>	<i>Squalius</i>	Gévora	Guadiana	56
<i>S. alburnoides 79</i>	<i>Squalius</i>	Gévora	Guadiana	56
<i>S. alburnoides 8</i>	<i>Squalius</i>	Paiva	Duero	28
<i>S. alburnoides 80</i>	<i>Squalius</i>	Záncara	Guadiana	57
<i>S. alburnoides 81</i>	<i>Squalius</i>	Záncara	Guadiana	57
<i>S. alburnoides 82</i>	<i>Squalius</i>	Zújar	Guadiana	51
<i>S. alburnoides 83</i>	<i>Squalius</i>	Esteras	Guadiana	58
<i>S. alburnoides 84</i>	<i>Squalius</i>	Esteras	Guadiana	58
<i>S. alburnoides 85</i>	<i>Squalius</i>	Esteras	Guadiana	58
<i>S. alburnoides 86</i>	<i>Squalius</i>	Esteras	Guadiana	58
<i>S. alburnoides 87</i>	<i>Squalius</i>	Esteras	Guadiana	58
<i>S. alburnoides 88</i>	<i>Squalius</i>	Quarteira	Sudoeste	74
<i>S. alburnoides 89</i>	<i>Squalius</i>	Gévora	Guadiana	56
<i>S. alburnoides 9</i>	<i>Squalius</i>	Paiva	Duero	28
<i>S. alburnoides 90</i>	<i>Squalius</i>	Gévora	Guadiana	56
<i>S. alburnoides 91</i>	<i>Squalius</i>	Guadiana	Guadiana	21
<i>S. alburnoides 92</i>	<i>Squalius</i>	Guadiel	Guadalquivir	59
<i>S. alburnoides 93</i>	<i>Squalius</i>	Jándula	Guadalquivir	60
<i>S. alburnoides 94</i>	<i>Squalius</i>	Manzano	Guadalquivir	61
<i>S. alburnoides 95</i>	<i>Squalius</i>	Montemayor	Guadalquivir	62
<i>S. aradensis 1</i>	<i>Squalius</i>	Arade	Arade	63
<i>S. aradensis 2</i>	<i>Squalius</i>	Arade	Arade	63
<i>S. aradensis 3</i>	<i>Squalius</i>	Arade	Arade	63
<i>S. carolitertii 1</i>	<i>Squalius</i>	Miño	Miño	9
<i>S. carolitertii 2</i>	<i>Squalius</i>	Vez	Lima	64
<i>S. carolitertii 3</i>	<i>Squalius</i>	Homem	Cavado	65
<i>S. carolitertii 4</i>	<i>Squalius</i>	Rabalçal	Duero	18

(Continúa)

(Continuación)

Especie	Genero	Rio	Cuenca	No. Figura 1
<i>S. carolitertii</i> 5	<i>Squalius</i>	Sul	Vouga	11
<i>S. carolitertii</i> 6	<i>Squalius</i>	Alva	Mondego	29
<i>S. castellanus</i>	<i>Squalius</i>	Gallo	Tajo	66
<i>S. laietanus</i> 1	<i>Squalius</i>	Matarraña	Ebro	67
<i>S. laietanus</i> 2	<i>Squalius</i>	Matarraña	Ebro	67
<i>S. malacitanus</i> 1	<i>Squalius</i>	Guadalhorce	Guadalhorce	68
<i>S. malacitanus</i> 2	<i>Squalius</i>	Guadiaro	Guadiaro	69
<i>S. malacitanus</i> 3	<i>Squalius</i>	Celemin	Barbate	70
<i>S. pyrenaicus</i> 1	<i>Squalius</i>	Sorraia	Tagus	19
<i>S. pyrenaicus</i> 2	<i>Squalius</i>	Samarra	Samarra	71
<i>S. pyrenaicus</i> 3	<i>Squalius</i>	Estena	Guadiana	40
<i>S. pyrenaicus</i> 4	<i>Squalius</i>	Guadalquivir	Guadalquivir	20
<i>S. pyrenaicus</i> 5	<i>Squalius</i>	Guadalhorce	Guadalhorce	68
<i>S. pyrenaicus</i> 6	<i>Squalius</i>	Odivelas	Sado	17
<i>S. torgalensis</i> 1	<i>Squalius</i>	Mira	Mira	13
<i>S. torgalensis</i> 2	<i>Squalius</i>	Mira	Mira	13
<i>S. valentinus</i> 1	<i>Squalius</i>	Cabriel	Cabriel	72
<i>S. valentinus</i> 2	<i>Squalius</i>	Algar	Algar	73

Tabla 1. Lista de los individuos analizados en este estudio.

Table 1. Specimens list and sampling locations from Iberian Peninsula analysed in the present study.

Determinación de la ploidía y del sexo

Se determinó la ploidía de todos individuos analizados en este estudio (fig. 2). Los peces se anestesiaron con una solución de MS222, se cogieron unas gotas de sangre periférica de la vena hemal, que fueron criopreservadas en una solución tampón de pH 7,6 (40 mM sal trisódica de ácido cítrico, 0,25 M sacarosa y 5% DMSO) y fueron inmediatamente congeladas a -80°C. Se ha seguido el protocolo de DAWLEY & GODDARD (1988) para determinación de la ploidía. El contenido de ADN de los eritrocitos, para cada pez, fue estimado calculando el índice entre la fluorescencia media de las células de los peces y la fluorescencia media de las células de la gallina multiplicándose por 2,5 pg (valor standard del contenido de ADN de los eritrocitos de gallina, TIERSH *et al.* 1989). El sexo de todos los individuos de *S. alburnoides* y de los "Raros" fue identificado a través de la observación de las gónadas.

Determinación de los biotipos de *S. alburnoides*

Con la finalidad de determinar los diferentes biotipos híbridos de los individuos de *S. alburnoides* se utilizaron ocho loci de microsatélites, cuatro loci descritos para *Luxilius* (TURNER *et al.* 2004) y otros cuatro descritos para *Squalius* (MESQUITA *et al.* 2003; PALA & COELHO 2005), de acuerdo con el procedimiento descrito en CUNHA *et al.* (2008). La metodología utilizada para identificar el número de copias del complejo híbrido inter-genérico (e.g. PA, PAA) consiste en la identificación de los alelos específicos de los genomas A (ancestro perteneciente a la familia Alburninae, y considerado extinto) y P (*Squalius pyrenaicus*, especie endémica del centro y suroeste del Península Ibérica) añadiendo la información de la citometría del flujo. Trabajos anteriores validarán la eficacia de la metodología para *S. alburnoides* (PALA & COELHO 2005; CRESPO-

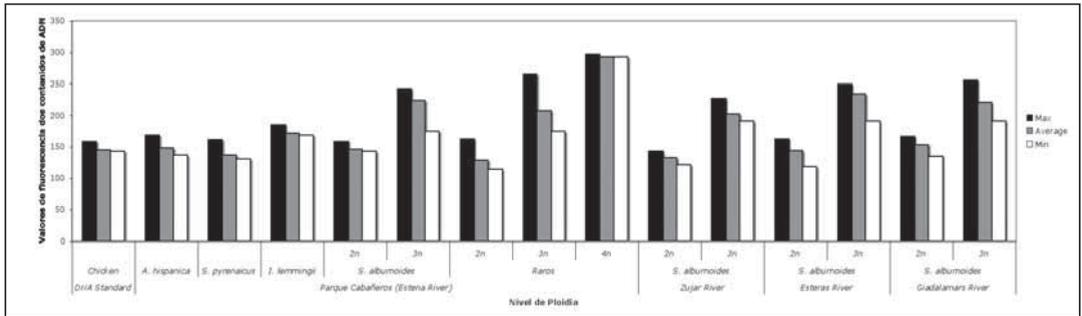


Figura 2. Determinación de la ploidía de los individuos de las poblaciones de la cuenca del Guadiana.

Figure 2. Ploidy level determination of specimens from Guadiana Basin populations.

LÓPEZ *et al.* 2006, 2007; CUNHA *et al.* 2008, 2009), así como para otros complejos asexuados (CHRISTIANSEN 2005; LAMPERT *et al.* 2006; RAMSDEN *et al.* 2006).

Amplificación de PCR y secuenciación

Por PCR se amplificó el gen mitocondrial citocromo b (cytb), 1140 bp, y el gen nuclear S7, 1017 bp, para un total de 176 individuos.

Los cebadores y las condiciones de amplificación para el gen cytb y S7 fueron las descritas en PALUMBI (1996) y CHOW & HAZAMA (1998), respectivamente.

Para un volumen de 50 ml de la reacción de PCR se usaron las siguientes concentraciones finales: 1x de tampón de Taq Polimerasa, 0,2-0,4 mM del mix de dNTPs, 1,5-2,0 mM de MgCl₂, 0,2-0,5 mM de cada cebador y 1-1,5 unidad de Taq. La amplificación por PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización a 95°C durante 5 min seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, templado a 50°C durante 1 min, extensión a 72°C por 2 min, y una extensión por 7 min. El producto de PCR de S7 para los individuos de *S. alburnoides* y de los "Raros" fueron incluidos en un vector pGEM-T e introducidos en células competentes de *Escherichia coli* JM109. Los transformadores fueron seleccionados en placas con ampicilina. Se seleccionaron cinco colonias positivas y el ADN plasmídico fue aislado por una versión modificada del protocolo miniprep de

lisis alcalina del plásmido (KRAFT *et al.* 1988). Para la obtención de las secuencias consenso a partir de las dos secuencias complementarias, se empleó el programa AutoAssembler vers. 1.40 (Applied Biosystems).

Análisis estadísticos

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con los programas Sequencher 4.2 (Gene Codes Corporation, Inc.) y verificadas manualmente. Los "gaps" resultantes de los alineamientos fueron excluidos de los análisis filogenéticos. La composición de nucleótidos fue analizada con el programa PAUP* ver. 4b2 (SWOFFORD 1998), para todas las posiciones. Las relaciones filogenéticas fueron reconstruidas con los programas PAUP* y MR.BAYES 2.1 (RONQUIST & HUELSENBECK 2003) utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB). Para el análisis de MP se realizó una búsqueda heurística de 10 repeticiones con adición aleatoria de taxones (random sequence addition) y con intercambio de ramas (branch-swapping) de tipo TBR (tree bisection reconnection); se ha dejado la opción Multrees por defecto (PAUP* guarda todos los árboles mínimos que encuentra durante el intercambio de ramas) y se han colapsado las ramas con longitud máxima igual a cero. A parte del número de pasos, en los análisis se ha obtenido el índice de consistencia (CI), el índice de retención (RI) y el índice de homoplasia (HI).

Para los análisis de NJ e IB se incluyó el modelo evolutivo que mejor se ajustó a nuestros datos, el cual fue obtenido mediante el programa MO-DELTEST 3.04 (POSADA & CRANDALL 1998).

La medida de confianza o fiabilidad de las ramas de los árboles se realizó por análisis de bootstrap de 1000 réplicas y probabilidades posteriores según el método de inferencia filogenética.

RESULTADOS

Composición de especies y de los biotipos en la cuenca del Guadiana

En la actualidad en el tramo del río Estena estudiado fueron colectadas las siguientes especies autóctonas: *Pseudochondrostoma willkommii*, *Squalius alburnoides*, *Squalius pyrenaicus*, *Iberochondros-*

toma lemmingii, *Anaocypris hispanica*, "Raros", *Luciobarbus microcephalus*, *Luciobarbus comizo*, *Tinca tinca* y *Cobitis paludica* y las alóctonas *Lepomis gibbosus*, *Alburnus alburnus*, *Esox lucius* y *Micropterus salmoides*.

A través de la determinación de la ploidía y de ocho loci de microsatélites fue posible caracterizar la composición de los híbridos en términos de biotipo. Los microsatélites que más ayudaron en la determinación del genotipo fueron: LCO1, LCO4, LCO3 y E1G6. Se analizaron un total de 149 *S. alburnoides* y 48 "Raros". La mayoría de las poblaciones de *S. alburnoides* del Guadiana presentan una gran proporción de hembras triploides (30-80%, fig. 3), con genotipo PAA pero no han sido encontrados hasta el momento, en ningún estudio previo, individuos de *S. alburnoides* tetraploides o machos híbridos diploides en esta cuenca.

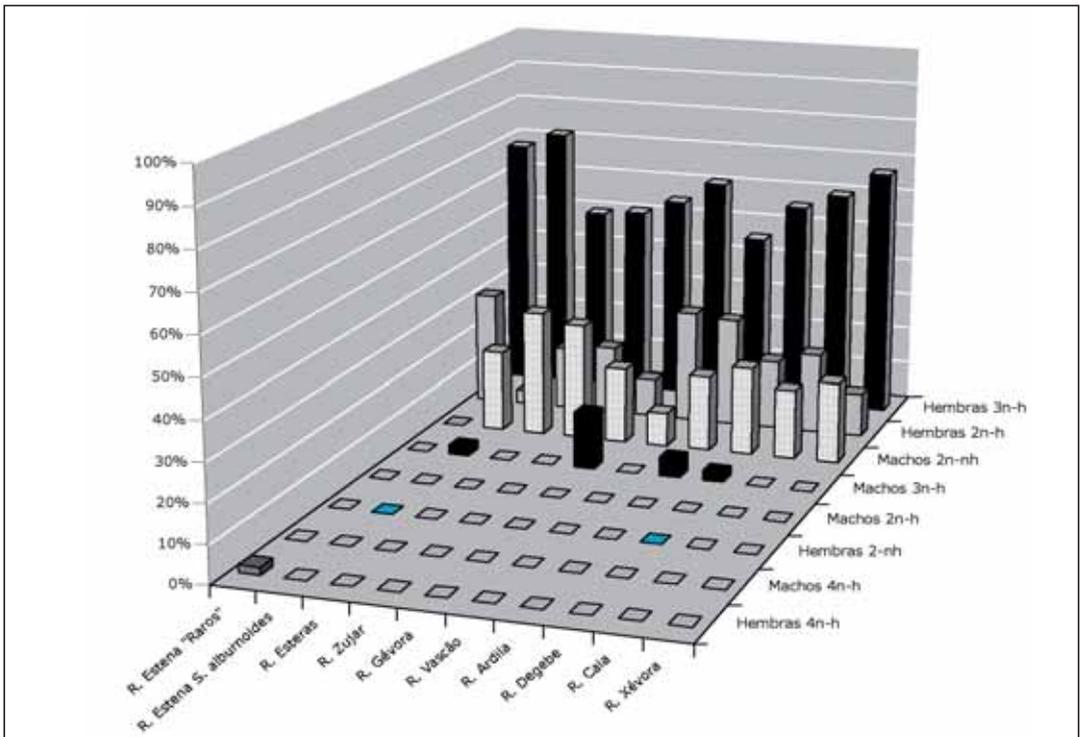


Figura 3. Porcentaje de las diferentes ploidías por sexo en la cuenca del Guadiana para el complejo *S. alburnoides* y "Raros". 2-nh- individuos diploides nuclearmente no híbridos, 2n-h, 3-nh y 4-nh- individuos diploides, triploides y tetraploides híbridos.

Figure 3. Percentage of the ploidy forms of *S. alburnoides* and "Raros" by sex. 2-nh- diploid nuclear non-hybrid individuals, 2n-h, 3-nh y 4-nh- diploid, triploid and tetraploid hybrids.

Los "Raros" presentaron diferentes ploidias lo que puede indicar que estos individuos pueden pertenecer a un nuevo complejo. A pesar de la composición de ploidias de "Raros" y *S. alburnoides* fue semejante se registró un individuo tetraploide siendo el primer registro de tetraploides en la cuenca del Guadiana. Todas las formas de "Raros" encontradas hasta al momento eran hembras. Las diferencias morfológicas más significativas entre el morfotipo de los "Raros" con respecto a *S. alburnoides* es que son de talla más pequeña, tienen menos escamas, menos dientes faríngeos y su coloración es distinta siendo más parecida a otras especies del género *Squalius* que al calandino (*S. alburnoides*).

Análisis filogenéticos

La divergencia entre las secuencias se calculó utilizando la distancia genética no corregida (*p-value*). En la matriz del gen mitocondrial citocromo *b* los valores del "ingroup" oscilan entre 0% y 16,5%. El valor de divergencia más alto se observa entre *Anaecypris hispanica* y *Squalius torgalensis*. Los valores más bajos corresponden a los individuos de una misma población. Si consideramos sólo las especies del género *Squalius*, la divergencia es ligeramente menor y varía entre 0% y 12%. Los valores más altos se observaron entre el grupo *S. aradensis* / *S. torgalensis* con los demás. La divergencia genética dentro de *S. alburnoides* es de 0 y 3,25%. Los valores más altos se observan entre los "Raros" y los *S. alburnoides* del Sado. Si excluimos los "Raros" los valores máximos son ligeramente más bajos (2,11%-2,9%) y se registran de nuevo entre los *S. alburnoides* del Sado con los demás. El valor más alto observado entre los *S. alburnoides* de las restantes localidades es de 1,85%. Los valores entre los "Raros" oscilaron entre 0,09% y 2,54% y los valores más altos se observaron entre individuos del río Estena y del río Sillo.

En la matriz de S7 los valores de divergencia genética oscilan en el "ingroup" entre el 0% y 9,13%. El valor de divergencia más alto se observa entre las dos copias de ADN de los "Raros" divergiendo en media 6% las dos cadenas. Los valores más bajos corresponden a los individuos de un mismo río. Si consideramos sólo *S. alburnoides*

la divergencia media dentro del genoma P es de 1,4% y del genoma A es de 1,2%. La divergencia media observada para el genoma A de los "Raros" es de 1,1% y para la otra cadena de ADN (R) es de 0,7%. La divergencia media observada entre el genoma A de los *S. alburnoides* y de los "Raros" es muy baja (0,2%). La divergencia media observada entre el genoma P y A fue de 4,3%. La divergencia media observada entre el genoma P y *S. torgalensis*, *S. aradensis* y del genoma R fue de 1,6%, 1,4% y 6,5%, respectivamente. El genoma R de los "Raros" diverge en media entre *S. torgalensis*, *S. aradensis* en 2,6% y 2,1%.

La tasa de transiciones (Ti)/transversiones (Tv) calculada para el gen *cytb* fue de 3,8 este sesgo se corrigió en el análisis dándole el peso a las transversiones de 4:1. Para el gen S7 no se observó ningún sesgo (Ti/Tv=1,1%). El modelo de evolución seleccionado por el programa Modeltest utilizando el criterio Akaike (AKAIKE 1974) fue para los datos de *cytb*: GTR + I + G, I=0,3993 y G=0,8716, y para los datos de S7 fue GTR + G, G=1,9183. Posteriormente estos valores fueron aplicados en los análisis filogenéticos (e.g IB). Se calcularon las curvas de saturación total separando las transiciones y transversiones para el "ingroup" no estando saturadas, por lo que se incluyeron todas las posiciones.

De 1140 caracteres analizados para el gen *cytb*, 603 caracteres fueron constantes y 418 fueron parsimoniosamente informativos. El análisis de MP del citocromo *b* resultó en 165 árboles más parsimoniosos con una longitud (L) de 1693 pasos (CI=0,416, RI=0,856, HI=0,356).

De 990 caracteres analizados para el gen S7, 423 caracteres fueron constantes y 281 fueron parsimoniosamente informativos. El análisis de MP de lo S7 resultó en 596 árboles más parsimoniosos con una longitud (L) de 406 pasos (CI=0,783, RI=0,957, HI=0,343).

Para los diferentes métodos de inferencia filogenética se consideró *Labeo parvus*, *Codoma ornata* y *Notropis calientis* como grupo externo. Las topologías obtenidas basadas en las secuencias del gen mitocondrial citocromo *b* y el gen ribosomal S7 fueron congruentes entre los diferentes métodos.

La reconstrucción filogenética basada en el marcador mitocondrial mostró una buena resolución y los principales clados están bien sopor-tados. En la reconstrucción filogenética del gen del cytb observamos que tal como los indivi-

duos de *S. alburnoides*, los individuos “Raros” del Estena, independientemente de su ploidia, comparten el mismo linaje mitocondrial que *S. pyrenaicus* (fig. 4). Para obtener mayor resolu-ción del clado de los calandinos (*S. alburnoides*)

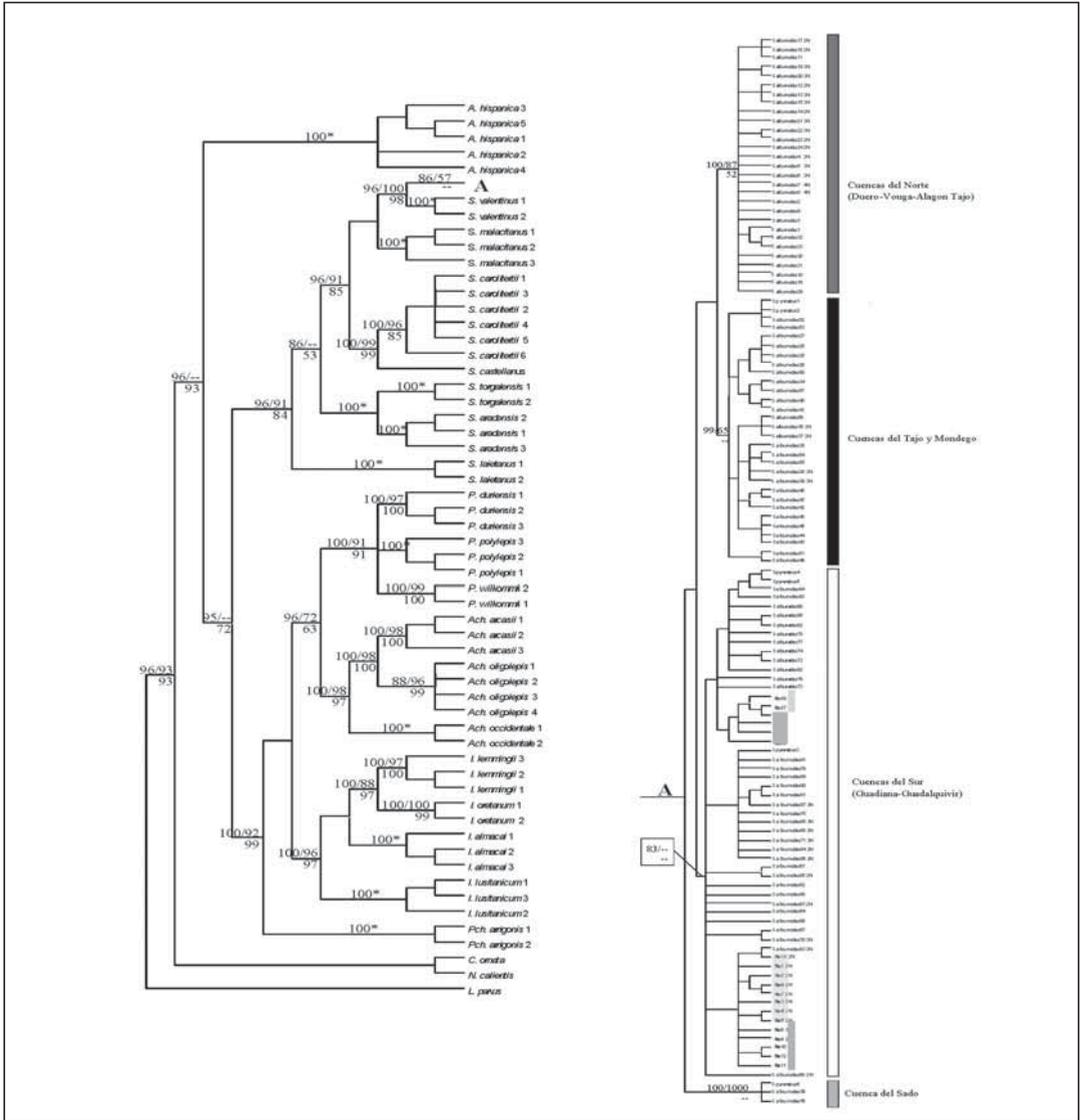


Figura 4. Árbol de Inferencia Bayesiana (IB) de los Leuciscinae ibéricos basado en el gen cytb. Los valores sobre las ramas > 50% indican los valores de soporte de los diferentes métodos (IB, NJ, MP). * valor soportado por todos los análisis, 2N, 3N y 4N - ploidia

Figure 4. Phylogenetic tree recovered from cytb sequence data of Leuciscinae from Iberian Peninsula using Bayesian methods. The posterior probabilities to IB and percentage bootstrap supports obtained from the NJ (GTR distance), MP analyses are presented above and below the branches, respectively. The bootstrap values lower than 50% are not shown. * value supported by all analyses, 2N, 3N and 4N - ploidy level.

se utilizó una network basada en máxima parsimonia que fue construida usando el método de "Reduced Median Network" (BANDELT *et al.* 1995) y "Median-Joining Network" (BANDELT *et al.* 1999) implementado en el programa NETWORK 4.5 (disponible en <http://www.fluxusengineering.com>). Se observaron cuatro grupos (fig. 5) que corresponden a una estructura geográfica: 1) los *S. alburnoides* del Duero y Vouga más los del Alagón comparten el mismo

linaje mitocondrial; 2) los *S. alburnoides* y *S. pyrenaicus* del Tajo y Mondego comparten el mismo linaje mitocondrial; 3) los *S. pyrenaicus* y los *S. alburnoides* del Sado son un linaje independiente; y 4) las poblaciones de *S. pyrenaicus* y *S. alburnoides* del sur (Guadiana y Guadalquivir) comparten el mismo linaje junto con los "Raros" (fig. 3). Los "Raros" no forman un grupo monofilético ni tampoco se agrupan por ploidía.

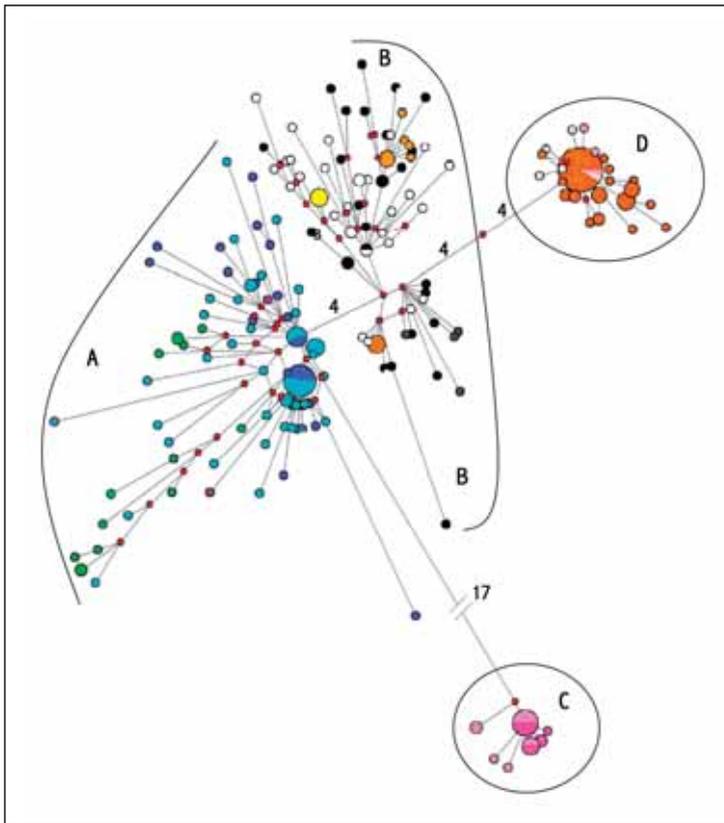


Figura 5. Red de haplotipos del citocromo b de "Median Joining" construida con máxima parsimonia (MP). Los círculos son proporcionales a la frecuencia de cada haplotipo. *S. alburnoides*: ● Duero, ● Vouga, ● Mondego, ● Alagón Tajo, ○ Tajo, ● Sado, ● Guadiana (incluyendo los "Raros"), ● Guadalquivir, ● Quarteira; *S. pyrenaicus*: ● Ebro, ● Tagus-Alagon, ● Tagus, ● Samarra ● Sado, ● Guadiana, ● Guadalquivir, ● Quarteira; *S. carolitertii*: ● Duero, ● Vouga, ● Mondego. Cada grupo está designado por una letra: A - Quarteira-Guadiana-Guadalquivir, B - Ebro-Samarra-Tajo (+*S. pyrenaicus* del Alagón Tajo y *S. alburnoides* del Mondego), C - Sado, D - *S. alburnoides* del Duero-Vouga y Alagón Tajo, E - *S. carolitertii* del Mondego.

Figure 5. Median Joining network. The number of times each haplotype is present in the sample is proportional to the area of the circle. *S. alburnoides*: ● Duero, ● Vouga, ● Mondego, ● Tagus-Alagon, ○ Tagus, ● Sado, ● Guadiana (including "Raros"), ● Guadalquivir, ● Quarteira; *S. pyrenaicus*: ● Ebro, ● Tagus-Alagon, ● Tagus, ● Samarra ● Sado, ● Guadiana, ● Guadalquivir, ● Quarteira; *S. carolitertii*: ● Duero, ● Vouga, ● Mondego. Each group is designated by a capital letter: A - Quarteira-Guadiana-Guadalquivir, B - Ebro-Samarra-Tagus (+*S. pyrenaicus* from Tagus-Alagon and *S. alburnoides* from Mondego), C - Sado, D - *S. alburnoides* from Duero-Vouga and Tagus-Alagon, E - *S. carolitertii* from Mondego.

La reconstrucción filogenética basada en el gen nuclear S7 mostró menor resolución que el citocromo *b* pero los principales clados en general están bien soportados (fig. 6). Sin embargo, para algunas especies como *S. carolitertii* y *S. pyrenaicus* no tienen suficiente poder de resolución. Los individuos de *S. alburnoides* y los "Raros" comparten una de las copias del genoma que pertenece a la especie ancestral paterna extinta de *S. alburnoides* (genoma A) que es un Alburninae y grupo hermano de *A. hispanica*. Sin embargo, la otra copia del genoma nuclear de los "Raros" es distinta a la de *S. pyrenaicus* / *S. carolitertii* (P o C) perteneciendo a una especie ancestral (R) evolutivamente grupo hermano de los endemismos portugueses, *Squalius torgalensis* y *S. aradensis* (inexistentes en el Guadiana) y nunca antes reportada. No siempre fue posible obtener las dos copias del genoma de los híbridos pero todos los individuos "Raros" poseían una copia del nueva linaje ancestral de *Squalius*.

DISCUSIÓN

Los complejos asexuados han sido considerados como líneas muertas incapaces de generar variabilidad genética para responder a los cambios ambientales que se producen. Sin embargo, la hibridación es muy común en los peces, en particular en los ciprínidos lo que puede ser una importante fuente de variabilidad (COLLARES-PEREIRA 1989; COSTEDOAT *et al.* 2007). La gran incidencia de híbridos en la cuenca del Guadiana, en particular de complejos híbridos poliploides, puede estar relacionada con el hecho de que estos ríos sufren una fuerte variación estacional o de fenómenos históricos de configuración de la cuenca. Debido a su origen híbrido, estos complejos suelen estar caracterizados por tener una mayor plasticidad fenotípica adaptativa pudiendo poseer una mayor tolerancia ambiental que sus parentales. Además, la ploidía les permite funcionar como tampón hacia las mutaciones deletéreas y la heterozigosis fijada proporcionándoles una gran reserva de nuevos alelos para selección, mutación y evolución génica (ADAMS 2007) que les permite exhibir nuevos fenotipos, diversificación ecológica e invasión de nuevos nichos ecológicos. La reproducción ase-

xuada les permite colonizar rápidamente un nuevo hábitat y el crecimiento poblacional es dos veces más rápido que con reproducción sexual. Todas estas características permiten que estos complejos se establezcan con gran éxito en estos sistemas.

De acuerdo con los análisis filogenéticos basados en el gen mitocondrial del citocromo *b* (Fig. 5) se concluye que *S. alburnoides* y los "Raros" comparten el mismo ancestro materno: *Squalius pyrenaicus* (genoma P). Este resultado podría llevarnos a pensar que estamos ante un nuevo morfotipo del complejo *S. alburnoides* como consecuencia de la hibridación, ploidía y constitución geonómica en respuesta al ambiente. Pero los resultados del gen nuclear no soportan esta hipótesis indicando que estamos ante un nuevo complejo híbrido unisexuado, que denominaremos "complejo *Squalius* indeterminado del Guadiana", en el que están involucradas al menos tres especies: *S. pyrenaicus*, una nueva especie ancestral de *Squalius* muy divergente de las demás y la especie paterna extinta de *S. alburnoides*, o los machos AA de *S. alburnoides*. A semejanza de *S. alburnoides* y de la mayoría de los vertebrados unisexuales (VRIJENHOEK *et al.* 1989; ALVES *et al.* 1997b; CUNHA *et al.* 2004) el complejo "*Squalius* indeterminado del Guadiana" parece resultar de eventos de hibridación unidireccionales, esto es, los híbridos resultan de cruces de hembras de una especie con machos de otra pero estos no son recíprocos. La hipótesis de que la especie ancestral materna del nuevo complejo sean hembras de *S. alburnoides* en vez de *S. pyrenaicus* con la especie paterna es igualmente plausible una vez que las hembras triploides PAA producen oocitos haploides A pero con ADN mitocondrial de P, pero este tendría que vivir en simpatría con la especie ancestral de *Squalius*.

El hecho de que el complejo "*Squalius* indeterminado del Guadiana" no forme un grupo monofilético indica que los eventos de hibridación ciertamente se produjeron más de una vez y a lo largo del tiempo. Estos resultados fueron congruentes con los obtenidos en la red de haplotipos del linaje materno (cytb) para las poblaciones de los complejos *S. alburnoides* y "*Squalius* indeterminado del Guadiana" en que se observa

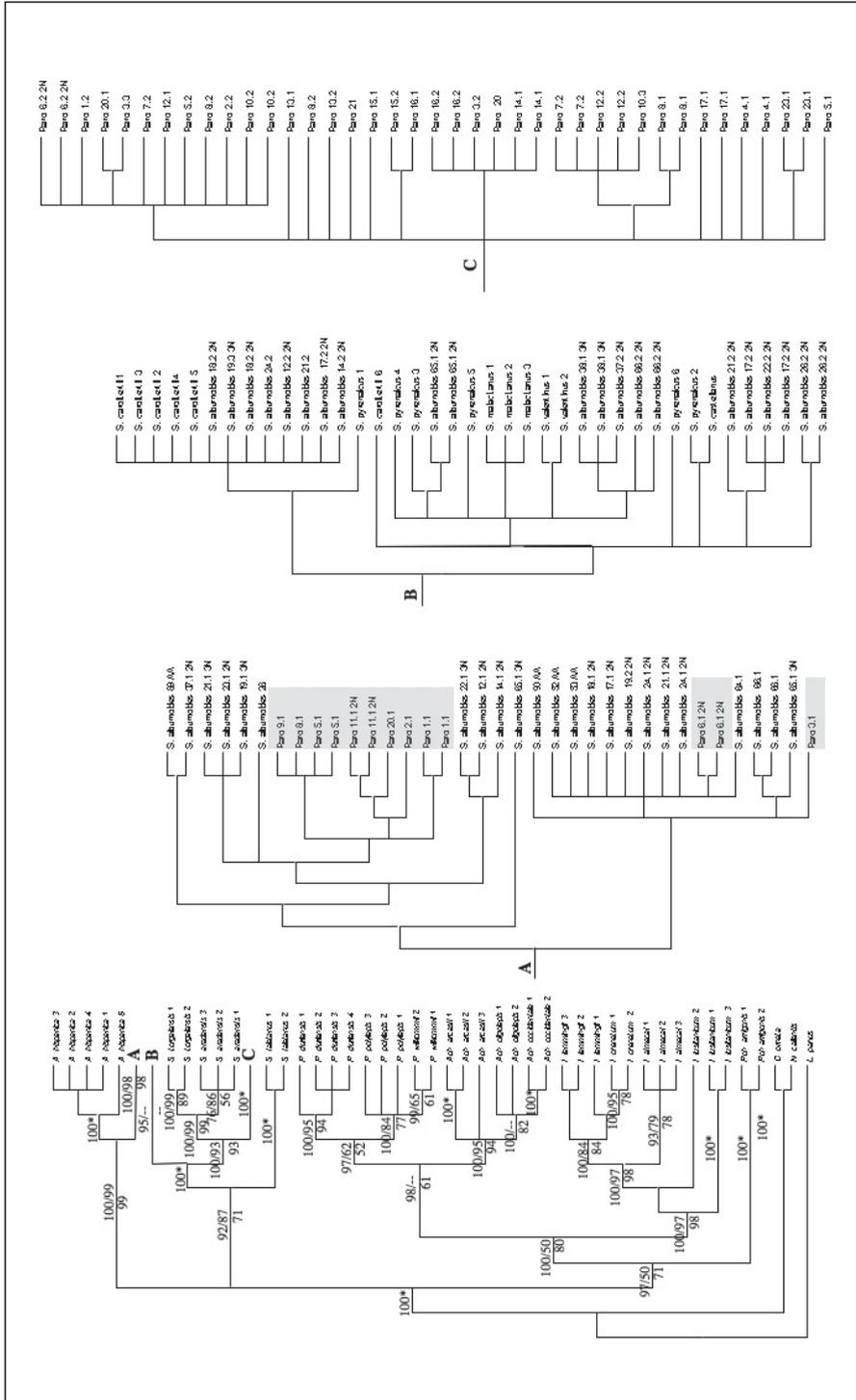


Figure 6. Árbol de Inferencia Bayesiana (IB) de los Leuciscinae ibérica basada el gen S7. La longitud de las ramas son proporcionales al número medio de sustituciones por sitio. Valores por encima de las ramas representan los valores de las probabilidades posteriores para BI y por debajo de las ramas los valores de Bootstrap para NJ (GTR) y MP. Los valores sobre las ramas > 50% indican los valores de soporte de los diferentes métodos (IB, NJ, MP). * valor soportado por todo los análisis. 2Ny 3N - ploidia

Figure 6. Phylogenetic tree recovered from S7 sequence data of Leuciscinae from Iberian Peninsula using Bayesian methods. Branch lengths are proportional to the expected mean number of substitutions per site. The posterior probabilities to IB and percentage bootstrap supports obtained from the NJ (GTR distance), MP analyses are presented above and below the branches, respectively. The bootstrap values lower than 50% are not shown. * value supported by all analyses, 2N and 3N - ploidy level.

una fuerte estructuración geográfica congruente con los resultados de estudios anteriores (CUNHA *et al.* 2004). Esta estructuración se corresponde con los cuatro potenciales orígenes independientes del complejo *S. alburnoides*. El complejo “*Squalius* indeterminado del Guadiana” comparte el mismo linaje mitocondrial del complejo *S. alburnoides* del sur de la Península Ibérica indicando que los eventos de hibridación estuvieron limitados a la cuenca del Guadiana.

Los resultados de los análisis con el marcador nuclear indican que están involucradas dos especies paternas en el origen de este nuevo complejo: la especie ancestral paterna de *S. alburnoides* / machos AA y una especie nueva de *Squalius* aparentemente ya extinta una vez que hasta ahora nunca se han encontrado representantes de la especie bisexual. Este resultado es bastante inesperado pues a pesar de compartir especies donantes de esperma estos dos complejos híbridos parecen tener estrategias que les permiten mantenerse en simpatria. Datos de microsatélites (no publicados de CUNHA, COELHO & DOADRIO) indican que en el genoma que comparten los dos complejos híbridos (genoma A) se observan distintas frecuencias alélicas sugiriendo que hay aislamiento reproductor de estos complejos pero que son necesarios más estudios.

Los resultados de citometría de flujo y determinación del sexo indican que estamos ante un complejo constituido por diferentes formas diploides y poliploides pero contrariamente a *S. alburnoides* sólo constituido por hembras necesitando parasitar esperma de otras especies. Ya que no se han encontrado individuos de la especie bisexual del nuevo linaje de *Squalius* se deduce que en la actualidad son los machos AA de *S. alburnoides* los que contribuyen en la dinámica de este complejo unisexuado, pero todavía no se sabe cuáles son los mecanismos reproductores involucrados en este nuevo complejo que ayuden a comprender su dinámica poblacional.

En el río Estena la composición de las formas del complejo *S. alburnoides* y del complejo “*Squalius* indeterminado del Guadiana” es bastante semejante, así como con otras poblaciones del Guadiana, siendo la mayoría hembras triploides aun-

que puede haber oscilaciones en su composición pues estos ríos están sometidos a una fuerte variación estacional, alternando largos períodos de sequía con riadas o avenidas de variable intensidad. En la época seca habrá una mayor mortalidad pues la falta de disponibilidad de hábitat, de alimento y una mayor predación por parte de las especies exóticas explican esas variaciones que se pueden verificar incluso en la misma estación de muestreo a lo largo del año.

La ausencia de machos diploides híbridos de *S. alburnoides* en la cuenca del Guadiana tiene implicaciones directas en su dinámica poblacional, así como en su existencia a largo plazo. El hecho de que no existan machos diploides híbridos dificulta el establecimiento de líneas tetraploides, una vez que los cruces de hembras diploides híbridas PA con los machos diploides híbridos PA resultaría en una progenie tetraploide (ALVES *et al.* 2001). Además cruces experimentales indican que esos tetraploides son fértiles y producen gametos reducidos (2n).

Los tetraploides de *S. alburnoides* en el Guadiana podrían obtenerse a través de hembras triploides que esporádicamente podrían producir oocitos no reducidos (PAA) que fecundados por esperma reducido (P o A) podrían obtener una progenie tetraploide (ALVES *et al.* 2004). Sin embargo, estudios de comportamiento indican que las hembras triploides tienen un comportamiento reproductor preferencial con los machos AA reduciéndose la posibilidad de obtener tetraploides simétricos (SOUSA-SANTOS *et al.* 2006). Esta reproducción preferencial también puede explicar la ausencia de híbridos con *Anaocypris hispanica*, especie hermana del ancestral paterno, una vez que el complejo es capaz de reconstruir la especie ancestral paterna (machos AA).

El reestablecimiento de la bisexualidad y de la diploidización del genoma a través de la tetraploidización en *S. alburnoides* es poco probable que ocurra en la cuenca del Guadiana por la composición de los biotipos, por sus modos de reproducción, y también por la falta de hábitat adecuado para que la línea tetraploide se pueda aislar de las otras formas del complejo. En la cuenca del Tajo, contrariamente a lo que pasa en

la cuenca del Duero, a pesar de la existencia de tetraploides simétricos estos no son capaces de aislarse de las otras formas no permitiendo una evolución por ploidia (CUNHA 2008; CUNHA *et al.* 2008, 2009). Sorprendentemente, en el complejo "*Squalius* indeterminado del Guadiana" tenemos un registro de un individuo tetraploide sugiriendo que la triploidia puede ser un paso intermedio para la tetraploidización. La triploidia es muchas veces vista como un paso intermedio para la obtención de ploidia par y restablecer de nuevo la bisexualidad y la diploidización del genoma. Sin embargo la tetraploidización no siempre conduce al reestablecimiento de la bisexualidad y la diploidización del genoma, como ocurre en las poblaciones de *S. alburnoides* del Tajo.

Muchas veces la hibridación está asociada a una amenaza para las especies parentales. Actualmente, el impacto de estos complejos en las especies parasitadas no parece ser significativo, ya que nunca se observó en las especies donantes de esperma señal de introgresión genética ni tampoco se observó recombinación de los genomas interespecíficos en los híbridos. Sin embargo, este tipo de complejos puede haber contribuido a la extinción de las especies ancestrales paternas re-

sultante de asimilación genética, debido al gran flujo entre híbridos y las especies ancestrales paternas ya extintas.

Para comprender mejor el potencial evolutivo de este nuevo complejo híbrido unisexuado son necesarios más estudios que ayuden a entender sus mecanismos reproductores, su dinámica poblacional y cuál es el mecanismo de determinación del sexo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de todo el personal del Parque Nacional de Cabañeros, especialmente de su director en ese momento José Jiménez. Los compañeros del Museo nos acompañaron en muchos muestreos, especialmente Silvia Perea, Lourdes Alcaraz, Carlos Pedraza, Patricia Ornelas, Rodolfo Pérez y Fernando Alda. El apoyo administrativo de Paloma Caudevilla fue esencial a la hora de la gestión del proyecto. Este proyecto fue financiado por el Organismo Autónomo Parques Nacionales 115/2003, sobre la dinámica de los complejos híbridos en los ríos Jándula y Estena.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS K.L. 2007. Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *Journal of Heredity* 98: 136-141.
- AKAIKE H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716-723.
- ALVES, M.J., COELHO, M.M. & COLLARES-PEREIRA, M.J. 2001. Evolution in action through hybridization and polyploidy in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica* 111: 375-385.
- ALVES, M.J., COELHO, M.M. & COLLARES-PEREIRA, M.J. 1997a. The *Rutilus alburnoides* complex (cyprinidae): evidence for hybrid origin. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 35: 1-10.
- ALVES, M.J., COELHO, M.M., COLLARES-PEREIRA, M.J. & DOWLING, T.E. 1997b. Maternal ancestry of the *Rutilus alburnoides* complex (Teleostei, Cyprinidae) as determined by analysis of cytochrome b sequences. *Evolution* 51: 1584-1592.
- ALVES, M.J., COLLARES-PEREIRA, M.J., DOWLING, T.E. & COELHO, M.M. 2002. The genetics of maintenance of an all-male lineage in the *Squalius alburnoides* complex. *Journal Fish Biology* 60: 649-662.
- ALVES, M.J., GROMICHO, M., COLLARES-PEREIRA, M., CRESPO-LÓPEZ, E. & COELHO, M.M. 2004. Simultaneous production of triploid and haploid eggs by triploid *Squalius alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Experimental Zoology* 280: 368-374.

- ARNOLD, M.L. 1997. *Natural hybridization and evolution*. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press, New Cork.
- BANDELT, H.J., FORSTER, P. & ROHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1): 37-48.
- BANDELT, H.J., FORSTER, P., SYKES, C. & RICHARDS, M.B. 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141: 743-753.
- CARMONA, J.A., SANJUR, O.I., DOADRIO, I., MACHORDOM, A. & VRIJENHOEK, R.C. 1997. Hybridogenetic reproduction and maternal ancestry of polyploid Iberian fish: the *Tropidophoxinellus alburnoides* complex. *Genetics* 146: 983-993.
- CHOW, S. & HAZAMA, K. 1998. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology* 7: 1255-1256.
- CHRISTIANSEN, D.G. 2005. A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex. *Molecular Ecology Notes* 5: 190-193.
- COLLARES-PEREIRA, M.J. 1983. Estudo sistemático e citogenético dos pequenos ciprinídeos ibéricos pertencentes aos géneros *Chondrostoma* Agassiz, 1835, *Rutilus* Rafinesque, 1820 e *Anaocypris* Collares-Pereira, 1983. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.
- COLLARES-PEREIRA, M.J. 1985. The «*Rutilus alburnoides*» (Steindachner, 1866) complex» (Pisces, Cyprinidae). I. Biometrical analysis of some Portuguese populations. *Arquivos Museu Bocage (Sér. A)* 2: 111-143.
- COLLARES-PEREIRA, M.J. 1989. Hybridization in European cyprinids: evolutionary potential of unisexual populations. En: R.M. Dawley & J.P. Bogart (eds.), *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. pp. 281-288. New York State.
- COSTEDOAT, C., PECH, N., CHAPPAZ, R. & GILLES, A. 2007. Novelty in Hybrid Zones: Crossroads between Population Genomic and Ecological Approaches. *PLoS ONE* 2(4): e357. doi:10.1371/journal.pone.0000357
- CRESPO-LÓPEZ, M.E., DUARTE, T., DOWLING, T. & COELHO, M.M. 2006. Modes of reproduction of the hybridogenetic fish *Squalius alburnoides* in the Tejo and Guadiana rivers: an approach with microsatellites. *Zoology* 109: 277-286.
- CRESPO-LÓPEZ, M.E., PALA, I., DUARTE, T.L., DOWLING, T.E. & COELHO, M.M. 2007. Genetic structure of the diploid-polyploid fish *Squalius alburnoides* in southern Iberian basins Tejo and Guadiana, based on microsatellites. *Journal of Fish Biology* 71: 423-436.
- CUNHA C. 2008. The evolution of *Squalius alburnoides* (Teleostei, Cyprinidae) populations in the northern Iberian Peninsula: a molecular genetics and morphological approach into the past and present dynamics of an hybrid complex. Tesis de doctorado, Universidad de Lisboa, Portugal.
- CUNHA, C., BASTIR M., COELHO, M.M. & DOADRIO, I. 2009. Body shape evolution among different ploidy levels of the *S. alburnoides* hybrid complex (Teleostei, Cyprinidae). *Journal Evolutionary Biology* 22: 718-728.
- CUNHA, C., COELHO, M.M., CARMONA, J.A & DOADRIO, I. 2004. Phylogeographic insights into the origins of the *Squalius alburnoides* complex via multiple hybridization events. *Molecular Ecology* 13: 2807-2817.
- CUNHA, C., DOADRIO, I. & COELHO, M.M. 2008. Speciation towards tetraploidisation after intermediate processes of non-sexual reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363 (1505): 2921-2929.
- DAWLEY, R.M. & GODDARD, K.A. 1988. Diploid-triploid mosaics among unisexual hybrids of the minnows *Phoxinus neogaeus*. *Evolution* 42: 649-659.
- DOWLING, T.E. & SECOR, C.L. 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 593-619.
- HUBBS, G.M. 1955. Hybridization between fish species in Nature. *Systematic Zoology* 4: 1-20.
- KRAFT, A.R., TEMPLIN, M.F. & HÖLTJE, J.V. 1998. Membrane-bound lytic endotransglycosylase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 180: 3441-3447.

- LAMPERT, K.P., LAMATSCH, D.K., SCHORIES, S., HOPF, A., GARCIA DE LEÓN, F.J. & SCHARTL, M. 2006. Microsatellites for the gynogenetic Amazon molly, *Poecilia formosa*: Useful tools for detection of mutation rate, ploidy determination and overall genetic diversity. *Journal of Genetics* 85: 67-71.
- MAYR, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- MESQUITA, N., CUNHA, C., HÄNFLING, B., CARVALHO, G. R., ZÉ-ZÉ, L., TENREIRO, R. & COELHO, M.M. 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the endemic Portuguese freshwater fish *Squalius aradensis* (Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes* 3: 572-574.
- PALA, I. & COELHO, M.M. 2005. Contrasting views over a hybrid complex: between speciation and evolutionary "dead - end". *Gene* 347: 283-294.
- PALUMBI, S.R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. En: D.M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable (eds.), *Molecular Systematics*, second ed. pp. 205-221. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA.
- POSADA, D. & CRANDALL, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- RAMSDEN, C., BÉRIAULT, K. & BOGART, J.P. 2006. A nonlethal method of identification of *Ambystoma laterale*, *A. jeffersonianum* and sympatric unisexuals. *Molecular Ecology Notes* 6: 261-264.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12): 1572-1574.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHWARTZ, F.J. 1972. *World literature to fish hybrids with an analysis by family, species, and hybrid*. Gulf Coast Research Laboratory, Ocean Springs.
- SMITH, G.R. 1992. Introgression in fishes: significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates. *Systematic Biology* 41(1): 41-57.
- SOUSA-SANTOS, C., COLLARES-PEREIRA, M.J. & ALMADA, V.C. 2006. Reproductive success of nuclear nonhybrid males of *Squalius alburnoides* hybridogenetic complex (Teleostei, Cyprinidae): an example of interplay between female choice and ecological pressures? *Acta Ethologica* 9: 31-36.
- SWOFFORD, D.L. 1998. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TIERSH, T.R., CHANDLER, R.W., WACHTEL, S.S. & ELIAS, S. 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry* 10: 706-710.
- TURNER, T.F., DOWLING, T.E., BROUGHTON, R.E. & GOLD, J.R. 2004. Variable microsatellite markers amplify across divergent lineages of cyprinid fishes (subfamily Leuciscinae). *Conservation Genetics* 5: 279-281.
- VRIJENHOEK, R.C., DAWLEY, R.M., COLE, C.J. & BOGART, J.P. 1989. A list of the known unisexual vertebrates. En: R. M. Dawley & J. P. Bogart (eds.), *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. pp. 19-23. New York State Museum, Albany.