

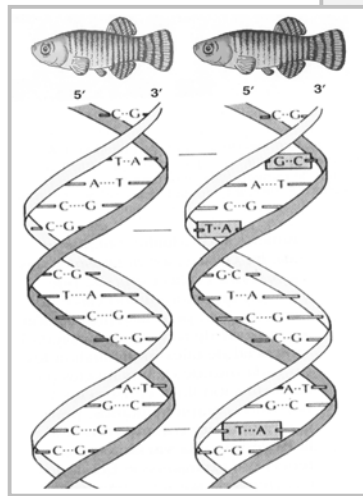
# Capítulo

# 5.

## Variabilidad Genética de *Aphanius iberus*: Unidades de Conservación Operacionales.

*The sights (of a conservation programme) often are set for the short term, although perpetuity is its ultimate objective. Genetic wildlife conservation makes sense only in terms of an evolutionary time scale. Its sights must reach into the distant future.*

OTTO H. FRANKEL 1974



1. Variabilidad Genética y Biología de la Conservación:	
<i>Pensamiento Poblacional</i>	135
<i>Uso de la Conservación Genética en</i>	
<i>Biología de la Conservación</i>	137
2. Variabilidad genética de las poblaciones de	
<i>Aphanius iberus</i> en la Región de Murcia	140
2.1. Antecedentes y Objetivos	140
2.2. Material y Métodos	141
<i>Material examinado</i>	141
<i>Selección de la Técnica de Análisis</i>	143
<i>Tratamiento de Datos</i>	144
2.3. Resultados y Discusión	146
<i>Patrones Electroforéticos</i>	146
<i>Frecuencias Alélicas</i>	146
<i>Variabilidad, Flujo y Distancia Genética</i>	148
<i>Relaciones fenéticas</i>	153
2.4. Conclusiones y Unidades de Conservación	
Operacionales	154
<i>Unidades de Conservación Operacionales</i>	155
3. Gestión de Ciprinodóntidos en Peligro de Extinción:	
Aproximación desde la Genética de la Conservación	156
<i>Guías cualitativas para la Conservación</i>	
<i>Genética en especies de Ciprinodóntidos</i>	158
4. Gestión de la Variabilidad Genética de	
<i>Aphanius iberus</i> en Murcia: Primera Aproximación.	160
<i>Referencias Bibliográficas</i>	161



Biología y Conservación de *Aphanius iberus* (Valenciennes, 1846)  
en la Región de Murcia

## 1. Variabilidad Genética y Biología de la Conservación:

### *Pensamiento Poblacional.*

La extinción de especies en fechas recientes, así como el riesgo actual de desaparición de muchas otras, han convertido a la *Biología de la Conservación* en una disciplina de gran importancia para el nuevo siglo (Meffe & Carroll 1997). Aunque parámetros ecológicos, políticos o económicos, entre otros, juegan un papel principal en el intento de evitar la extinción de la mayoría de especies en peligro, la genética de poblaciones y aspectos relacionados conforman uno de los focos de atención para asegurar la continuidad, a una escala temporal extensa, de dichas especies (Bowles & Whelan 1994, Landweber & Dobson 1999, Hedrick 2001, entre otros).

En las últimas dos décadas, los estudios genéticos enfocados a la conservación de especies han aumentado de forma considerable (Machordom & Perdices 2002, Moyle et al. 2003). De este modo, y únicamente citando algunos autores con peso específico notable en el campo de la ictiología (de Ciprinodóntidos o taxones cercanos), podemos mencionar los trabajos publicados por Anthony A. Echelle, Paul L. Leberg, Gary K. Meffe, o Richard C. Vrijenhoek desde mediados de los años ochenta e inicios de los noventa (Vrijenhoek et al. 1985, Meffe 1986 y 1987, Meffe & Vrijenhoek 1988, Leberg 1990, 1991 y 1993, Echelle 1991, Echelle & Dowling 1992, entre otros).

La influencia de la literatura sobre conservación genética en los planes de recuperación de especies es evidente, siendo mucho más notoria en los últimos diez años (Clarck et al. 2002, Stinchcombe et al. 2002). No obstante, todavía existe cierto debate sobre la necesidad y/o aplicabilidad en planes de recuperación de los datos genéticos, básicamente en comparación con datos demográficos (Caughley 1994, Frankham 1995, Hedrick & Kalinowski 2000). Las acciones a realizar en un plan de recuperación deben ser siempre priorizadas en función de su necesidad para solventar los problemas de la especie objeto. En este sentido, Peakall & Sydes (1996) sugieren una serie de contextos específicos en los que la obtención de datos genéticos sería de gran utilidad a la hora de priorizar sobre las unidades a gestionar: (1) Especies en las que no es posible conservar la totalidad de sus poblaciones; (2) Especies en las que los programas de reconstitución o de conservación *ex situ* han fracasado; (3) Especies que han sido clonadas o criadas en cautividad; (4) Especies que presentan problemas taxonómicas.

A pesar de la controversia, está demostrada la importancia del deterioro genético en el declive de un elevado número de especies. Así, por ejemplo, el 22 % de los *Planes de Recuperación* de especies en peligro realizados en Estados Unidos durante el periodo 1977-1998, muestran amenazas a nivel genético para la supervivencia de las especies objetivo (Moyle et al. 2003).

#### **The Central Problem**

*The central problem in conservation genetics is loss of genetic variation resulting in erosion of evolutionary flexibility. This potentially leads to a poorer match of organism to environment, increasing the probability of extinction.*

GEORGE G. SIMPSON (1953)  
The major features of Evolution

Existen, al menos, tres importantes razones biológicas para comprender que la *Conservación Genética* (= *Genética de la Conservación*) debe ser un foco de atención (*critical area*) en la *Biología de la Conservación* (Meffe & Carroll 1997). La primera es el Teorema Fundamental de la Selección Natural: *La tasa con que incrementa la eficacia biológica de la población en un momento dado es igual a su variabilidad genética respecto a la eficacia biológica en ese momento* (*The Genetical Theory of Natural Selection*, Fisher 1930 en: Dobzhansky et al. 1980). Es decir, la pérdida de variabilidad genética de una especie reduce sus opciones evolutivas futuras, la capacidad de respuesta o potencial evolutivo según Hunter (1996).

En segundo lugar, existe un consenso entre los genetistas poblacionales sobre la correlación positiva existente entre la heterocigosidad, o una alta variación

**1** *Fitness* (salud, aptitud), *Something everyone understand but no one can define precisely* (Stearns 1976).

En términos evolutivos es una medida de la capacidad de una población o individuo para responder a las presiones de la selección natural; puede también encontrarse como la contribución esperada de un alelo, fenotipo o genotipo a las siguientes generaciones (Stearns 1992); y, en términos ecológicos, suele presentarse referenciado a la competencia dentro de una comunidad que nos va a determinar la supervivencia (Morris 1992).

genética entre poblaciones, y el *fitness*<sup>1</sup> individual y/o poblacional (Meffe 1986, Quattro & Vrijenhoek 1989, Leberg 1991 y 1992; ejemplos de trabajos primigenios en demostrar la correlación mencionada).

Finalmente, la reserva o acervo global de diversidad genética representa la información existente para la totalidad de procesos biológicos del planeta (Meffe & Carroll 1997). La pérdida o deterioro de esta reserva disminuye la capacidad de los organismos para

adaptarse a un ambiente cambiante (Primack & Ros 2002). Por ejemplo, se ha observado que determinados procesos de rarificación de especies coinciden con disminuciones de variabilidad genética en sus poblaciones, esto las convierte en especies más vulnerables a la extinción ante cambios del medio (Rojas 1992, Pullin 2002). A su vez, con dicha pérdida desaparece toda información biológica potencialmente útil para el uso humano, es el denominado valor utilitario de la diversidad genética (Hunter 1996). En resumen, se pierden los *anteproyectos* de la vida (*Blueprints sensu* Meffe & Carroll 1994).

Las razones que justifican el uso de la *Conservación Genética* en la gestión de fauna, se multiplican cuando tratamos con especies en peligro que presentan poblaciones pequeñas (Meffe & Carroll 1997). Las poblaciones pequeñas tienden a disminuir rápidamente en abundancia y extinguirse localmente (Primack 1998). Entre las razones principales que explican estos procesos se pueden encontrar los problemas genéticos derivados de la pérdida de variabilidad, la endogamia y la deriva genética (Fig. 5.1) (Meffe 1986, Frankham 1996, Brook et al. 2002). Estos problemas se traducen en disminución del *fitness* y cambios en la distribución de la diversidad genética entre las poblaciones, que ponen en riesgo adaptaciones locales básicas (Templeton 1994).

En relación con los efectos comentados anteriormente, surge un concepto de alto interés en el contexto de la conservación de especies: *Tamaño Poblacional Genéticamente Efectivo* ( $N_e$ ) (*Genetically effective population size*, Meffe 1986), que se define como el tamaño de una población *ideal* con la misma cantidad de endogamia, o una frecuencia aleatoria de deriva genética similar, a la población considerada (Kimura & Crow 1963 en: Meffe 1986). Una población *ideal* es aquella en la que cada individuo tiene la misma probabilidad de aporte genético a la próxima generación. Así por ejemplo, el conocimiento de  $N_e$  permite predecir el tiempo necesario para que la reducción en la variabilidad genética sea una amenaza real sobre la continuidad de la población (ejemplo de su aplicación en Allendorf 1994).

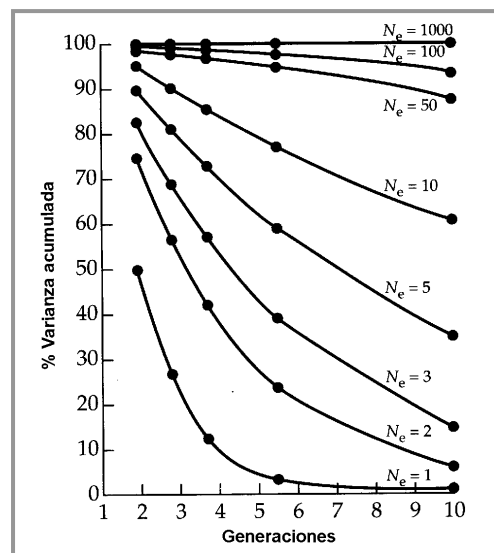
### **Uso de la Conservación Genética en Biología de la Conservación**

El objetivo principal de la *Conservación Genética*, de la gestión y manejo de la diversidad genética, debe ser asegurar la continuidad de los procesos evolutivos de las especies en su entorno natural (Moritz 1995, Hurt & Hedrick 2004).

En este contexto, cualquier actuación para conservar la variabilidad genética de una especie ha de ser compatible con la consecución de tres objetivos (Soulé & Wilcox 1980): (1) Mantenimiento de poblaciones viables (= evitar la extinción); (2) Conservación de la capacidad de los individuos en estas poblaciones para adaptarse a los cambios ambientales; (3) No disminuir la capacidad de especiación. Los dos últimos objetivos deben ser la finalidad a largo plazo de cualquier programa de gestión y, normalmente, son el enfoque prioritario de la genética aplicada a la conservación (García-Marin & Plá 1999).

Debido a la importancia de los objetivos mencionados, la dificultad práctica, para gestores y científicos inmersos en el campo de la conservación de especies, radica en determinar las poblaciones y unidades genéticas a proteger (*¿Qué poblaciones de la especie hay que proteger?, ¿Qué unidades genéticas?, ¿Qué debo proteger?, etc.*). *La agonía de la elección* (*The agony of choice*), dificultad que fue expuesta por Crozier (1992), que ha sido presentada en numerosos trabajos (Ryder 1986, Rojas 1992, entre otros).

Para obtener respuesta a las cuestiones mencionadas, debemos volver a recordar que una de las premisas en *Conservación Genética* es el mantenimiento del potencial evolutivo. Consecuentemente, la población como unidad parece ser el nivel adecuado de actuación (Meffe & Carroll 1994). Las



**Figura 5.1.** La deriva genética es causa de pérdida de variabilidad genética. El gráfico muestra el porcentaje medio de variabilidad tras 10 generaciones en poblaciones teóricas con diferentes tamaños efectivos ( $N_e$ ). Después de 10 generaciones la pérdida es de aproximadamente un 40 % para una  $N_e = 10$ , del 65 % para una  $N_e = 5$ , y del 95 % para una  $N_e = 2$ . (Gráfica original en Meffe 1986)

poblaciones son las unidades funcionales desde un punto de vista ecológico y evolutivo (Pullin 2002).

Es posible obtener consenso y aceptar que las poblaciones son unidades adecuadas para gestionar, pero ¿qué es una población? El término *población* presenta cierta variedad de significados incluso en el lenguaje científico (Dobzhansky et al. 1980), desde las poblaciones locales o *demos* para genetistas, hasta el concepto de población uniespecífica con sus propiedades extensivas e intensivas y su cinemática de la ecología demográfica que presenta Margalef (1990). En este contexto, la solución está en identificar unidades que muestren ese significado ecológico y evolutivo, de este modo, asegurando la continuidad de la diversidad biológica de la especie.

No obstante, para la identificación de unidades de conservación (*Conservation Units*, ejemplos en Moritz 1994, Waples 1995, entre otros) por debajo del nivel de especie, potencialmente existen varios criterios. En este sentido, en el Capítulo 4 de la presente memoria, la distancia y aislamiento geográfico han sido utilizados como criterio para el establecimiento de dos *Unidades Ecogeográficas* de gestión de la especie en la Región. Los análisis jerárquicos de la diversidad genética destacan entre los criterios para el establecimiento de unidades de gestión (Meffe & Carroll 1997), aunque la identificación de éstos puede ser complicada (O'Brien & Mayr 1991).

En resumen, el argumento propuesto es que la utilidad de datos genéticos para el establecimiento de unidades de conservación es notable. Debido a la prioridad de recuperar y mantener procesos dentro de la propia especie, en vez de conservar únicamente fenotipos distintivos, la utilidad de datos genéticos se magnifica (Erwin 1991). Este argumento se basa en la premisa de que el funcionamiento de los procesos microevolutivos necesita de la variabilidad genética intraespecífica. Si bien, no es una perspectiva en conservación innovadora, fue expuesta en los años setenta (Frankel 1974) y afianzada desde entonces por biólogos especialistas en evolución (Templeton 1986, entre otros).

Otra serie de usos de la información genética en la gestión y conservación de especies, se discutirán en otros capítulos de la presente memoria de Tesis Doctoral, y pueden encontrarse en bibliografía especializada, por ejemplo los trabajos de Meffe (1986, 1987 y 1990) y Vrijenhoek (1998). Entre otros, la identificación de acervos genéticos exclusivos es de gran utilidad para la protección específica de poblaciones con atributos genéticos únicos (ejemplos en Deacon & Minckley 1991). Los datos genéticos también pueden ser de gran utilidad para solucionar problemas taxonómicos (Bernardi et al. 1995), y la necesidad de caracterizar genéticamente a las poblaciones es obligada para el desarrollo programas de cría en cautividad (Philippart 1995) y/o reconstitución de poblaciones (Minckley 1995, Moritz 1999, Storfer 1999).



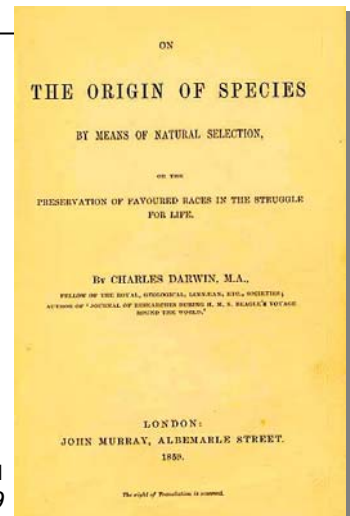
Cuadro 5.1.

## **Pensamiento Poblacional: La ruptura con el concepto tipológico**



*Hay tanta grandeza en esta concepción de la vida,... que mientras este planeta ha ido girando según la constante ley de la gravitación, se han desarrollado y se están desarrollando, a partir de un comienzo tan sencillo, infinidad de formas cada vez más bellas y maravillosas.*

CHARLES DARWIN  
*THE ORIGIN OF THE SPECIES 1859*



Una de las historias fundamentales de la biología evolutiva, como muchas otras, presenta a un señor llamado Charles Darwin como el héroe que venció a los prejuicios filosóficos existencialistas de sus contemporáneos, asociados a la interpretación creacionista de las especies. Una de sus grandes contribuciones consistió en promover un cambio paradigmático: el entendimiento del origen de las especies en el contexto evolucionista requiere centrarse en las diferencias individuales, no en sus similitudes. La selección natural actúa sobre la variación de los individuos, modificando la composición de las poblaciones y, en consecuencia, produciendo cambios en su constitución que podrían llevar a la generación de nuevas especies. Para Darwin, la variación en el seno de las especies, lejos de ser trivial, es la piedra angular del cambio evolutivo, la materia prima de la evolución. La ruptura con el *Pensamiento Tipológico* y su sustitución por el *Pensamiento Poblacional* (Mayr 1982) enfatiza la importancia de este proceso denominado evolución.

En nuestro enfoque conservacionista, las especies deben ser reconocidas como unidades evolutivas, evitando el concepto tipológico bajo el cual la diversidad intraespecífica es ignorada y, por tanto, no se asegura un mantenimiento de esa diversidad que, como consecuencia, puede provocar la privación de la capacidad de respuesta al cambio ambiental por la propia especie (Rojas 1992). Esta visión morfológica de los individuos ha provocado que programas de recuperación y/o conservación traten a la especie como la unidad indivisible de gestión, lo que involuntariamente permite la pérdida de patrimonios genéticos presentes en subespecies y poblaciones singulares (Ryder 1986).



E. Mayr

*En biología nada tiene sentido si no se considera bajo el prisma de la evolución.*

THEODOSIUS G. DOBZHANSKY  
*THE AMERICAN BIOLOGY TEACHER 1973*



T.H. Dobzhansky

## 2. Variabilidad Genética de las Poblaciones de *Aphanius iberus* en la Región de Murcia.

El análisis referente a la variabilidad genética de las poblaciones de *Aphanius iberus* establecidas en la Región de Murcia ha sido abordado con el objetivo principal de establecer *Unidades de Conservación Genéticas*, herramienta indispensable para la gestión de la variabilidad de la especie. Este estudio se ha realizado en colaboración y bajo la supervisión del Grupo de Investigación especializado en conservación de peces autóctonos del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC).

### 2.1. Antecedentes y Objetivos.

Los estudios genéticos realizados con la especie hasta la fecha (García-Marín et al. 1990, Fernández-Pedrosa et al. 1995, Doadrio et al. 1996, Fernández-Pedrosa 1997, García-Marín & Plá 1997 y 1999, Maltagliati 1998a, Perdices et al. 2001) demuestran la aplicación de los aspectos genéticos a la conservación de la especie, y nos indican que el conjunto de poblaciones de *Aphanius iberus* existentes en la Península no puede ser considerado como una única unidad poblacional, sino varias evolutivamente diferenciadas que presentan un cierto grado de aislamiento. Este patrón advierte que la extinción de una población aislada, representaría la pérdida del patrimonio genético y de la historia evolutiva de la especie en el área y, por tanto, su posible adaptación genotipo-ambiente (García-Marín & Plá 1997). En estos casos, la recuperación puede ser mucho más difícil, ya que podría tratarse de un caso único e irremplazable.

En este contexto, de forma adicional a las *Unidades ecogeográficas* establecidas (Capítulo 4), en la Región de Murcia se hace obligada la necesidad del establecimiento de *Unidades de Manejo o Gestión* que reflejen la variabilidad genética de la especie. En este capítulo se presenta la aproximación realizada sobre la caracterización y variabilidad genética de poblaciones de *Aphanius iberus* en dicho ámbito de estudio. Esta aproximación al componente genético se ha realizado mediante el análisis de electroforesis de proteínas con los siguientes objetivos principales:

- (1) Determinar la variabilidad genética de las distintas poblaciones de la especie en la Región y contrastarla con los valores de variabilidad obtenidos en trabajos previos en los que se incluían algunas de las poblaciones (Doadrio et al. 1996).
- (2) Establecer el grado de diferenciación y de flujo genético existente entre las mismas.



(3) Identificar las *Unidades Operativas de Conservación* (OCUs, *Operational Conservation Units sensu* Doadrio et al. 1996) de la especie en la Región. Bajo este concepto se pretende identificar las poblaciones o grupos de poblaciones que muestran el mismo patrón genético, definido por la presencia de alelos exclusivos y por agrupamientos basados en las frecuencias alélicas.

(4) Aportar información sobre la estructura genética de la especie en la Región que pueda resultar básica en el desarrollo de directrices para su recuperación.

## 2.2. Material y Métodos.

### *Material examinado*

En el presente estudio se han analizado, mediante aloenzimas, 125 ejemplares. Se seleccionaron cinco localidades con poblaciones estables de *Aphanius iberus* incluidas en las unidades ecogeográficas establecidas (Capítulo 4). Detalles acerca de las poblaciones estudiadas, fecha de captura y localización se aportan en la Tabla 5.1 y Figura 5.2.

Los ejemplares fueron capturados en febrero de 1999 mediante la utilización de salabres y/o *minnow-traps* (Harrison et al. 1986) (detalle sobre la metodología de captura en Cuadros 4.1 y 4.4, Capítulo 4). En todas las poblaciones, se seleccionaron ejemplares con tamaños superiores a 20 mm (LT) que fueron procesados *in situ* y conservados por congelación en nitrógeno líquido (-80 °C) (Figura 5.2). Limitaciones legales conllevaron que el estudio se realizara con un máximo de 25 ejemplares por población.

**Tabla 5.1.** Poblaciones analizadas para el estudio de la variabilidad genética. Se indica el número de ejemplares, fecha de captura y características genéricas del hábitat.

Población	Ejemplares	Fecha de Captura	Hábitat
P-1 Salinas de San Pedro del Pinatar	25	17/02/1999	Permanente y estable Salinas costeras en explotación Salinidad > 40-45 ‰
P-2 Playa de La Hita	25	18/02/1999	Permanente y variable Charcas y Marina del Mar Menor Salinidad = 40-45 ‰
P-3 Punta Lengua de Vaca	25	17/02/1999	Permanente y variable Desembocadura de Rambla y Marina del Mar Menor; Salinidad = 35-40 ‰
P-4 Salinas de Marchamalo	25	17/02/1999	Permanente y estable Salinas costeras en explotación Salinidad > 40-45 ‰
P-5 Río Chícamo	25	18/02/1999	Permanente y Variable o temporal Zona de cabecera (< 2 Km), pequeño arroyo; Salinidad < 5-10 ‰



Figura 5.2. Localización geográfica e imágenes de los puntos de muestreo. Se muestra también el procesado *in situ* de los ejemplares utilizados en los análisis genéticos.  
(Fotografías: F.J. Oliva)

### Selección de la Técnica de Análisis

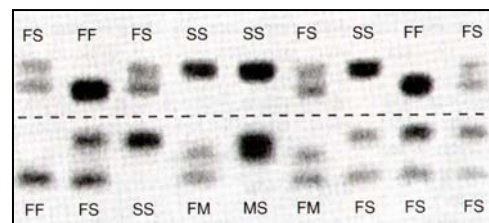
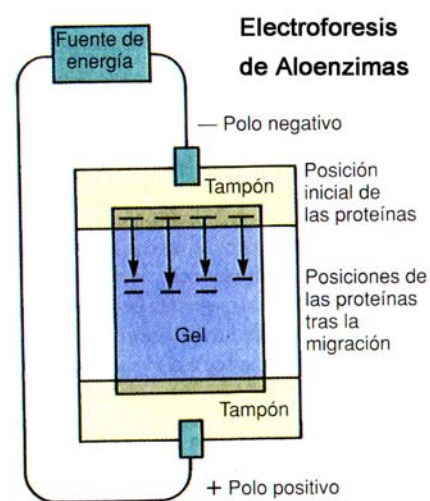
El estudio de la variación genética intraespecífica puede llevarse a cabo a través de distintas técnicas moleculares (Awise & Hamrick 1996, Landweber & Dobson 1999, Moran 2002). En el caso de poblaciones de peces, la electroforesis de proteínas (= *Electroforesis Aloenzimática*) se ha mostrado como una de las herramientas más eficaces en el estudio de la variabilidad genética (Shaffer & Breden 1989, Packer et al. 1991, revisión de trabajos peninsulares en Doadrio 2002). A su vez, en la relación coste-beneficio, esta técnica que está entre los mejores métodos de investigación de variación genética a nivel molecular (Ferguson et al. 1995).

La asunción básica de la técnica radica en que los cambios en la movilidad enzimática dentro de un campo eléctrico (Fig. 5.3), reflejan cambios en sus secuencias de ADN. Es decir, la movilidad electroforética de proteínas provee una información indirecta acerca de la estructura del ADN (Perdices 1997). La técnica permite, además, el análisis de un elevado número de proteínas de un mismo organismo, con lo que resulta extremadamente útil para establecer relaciones sistemáticas a bajos niveles taxonómicos y, por tanto, permite comparar poblaciones dentro de una misma especie (Leberg 1992, Maltagliati 1998a y 1998b).

De esta forma, la caracterización genética de las poblaciones ha sido realizada mediante un estudio de electroforesis de proteínas (electroforesis horizontal de aloenzimas) con soporte en geles de almidón (SIGMA al 12%) (Selander et al. 1971, Pasteur et al. 1987). Para este análisis se usaron muestras de músculo esquelético dorsal y órganos internos (hígado y bazo) de cada uno de los ejemplares. Los sistemas de tampones utilizados en el homogeneizado de las muestras fueron Tris-Maleato EDTA, Tris-Citrato (pH 6,7) y Poulik (pH 8,7) (Pasteur et al. 1987).

La variabilidad genética ha sido estudiada en 14 sistemas enzimáticos (Tabla 5.2) que codificaron para 23 *loci* en las muestras de las 5 localidades. Cada sistema enzimático viene identificado por su nombre según la *Comisión Internacional de Bioquímica* (IUB 1992).

**1 Locus, Loci.** Posición ocupada por un gen particular, o por uno de los alelos o formas de un gen dado concernientes a un mismo carácter, en todos los cromosomas homólogos. Los genes de un locus génico determinado pueden existir en cierta variedad de formas alélicas. La descripción del acervo génico para un locus determinado exige que se especifiquen los tipos de alelos presentes, así como sus frecuencias (Dobzhansky et al. 1980).



**Figura 5.3.** Esquema de la separación de las variantes alélicas diferenciadas por sus cargas. Fotografía de un Zimograma con los resultados correspondientes a nueve individuos.

(Modificado de Hickman et al. 2002)

**Tabla 5.2.** Sistemas enzimáticos analizados, *loci* estudiados, tejidos y tampones empleados.

Enzima	Locus	Tejido	Tampón
Aspartato aminotransferasa	<i>mAAT-1</i>	H,M	Tris citrato (pH = 6,7)
	<i>sAAT-1</i>	M	Tris citrato (pH = 6,7)
	<i>sAAT-2</i>	H	Tris citrato (pH = 6,7)
Adenilato kinasa	<i>AK</i>	M	Tris citrato (pH = 6,7)
Creatin kinasa	<i>CK</i>	M	Tris citrato (pH = 6,7)
Esterasa	<i>EST-1*</i>	M	Tris maleato EDTA (pH=6,9)
	<i>EST-2*</i>	M	Tris maleato EDTA (pH=6,9)
	<i>EST-3*</i>	M	Tris maleato EDTA (pH=6,9)
	<i>EST-4*</i>	M	Tris maleato EDTA (pH=6,9)
Fumarato hidratasa	<i>FH</i>	M	Tris maleato EDTA (pH=6,9)
Glucosa-6-fosfato isomerasa	<i>GPI-1</i>	H	Poulik
	<i>GPI-2</i>	M	Poulik
Isocitrato deshidrogenasa	<i>IDH-1</i>	M	Tris citrato (pH = 6,7)
L-Lactato deshidrogenasa	<i>LDH-1</i>	M	Poulik
	<i>LDH-2</i>	M	Poulik
Malato deshidrogenasa	<i>mMDH-1</i>	H,M	Tris citrato (pH = 6,7)
	<i>sMDH-1</i>	H,M	Tris citrato (pH = 6,7)
	<i>sMDH-2</i>	H	Tris citrato (pH = 6,7)
Manosa-6-fosfato isomerasa	<i>MPI</i>	M	Tris citrato (pH = 6,7)
Fosfogluconato deshidrogenasa	<i>PGDH</i>	H	Tris citrato (pH = 6,7)
Fosfoglucomutasa	<i>PGM-1</i>	M	Poulik
Peptidasa-B (Leucil-glicil-glicina)	<i>PEP-B</i>	H	Tris citrato (pH = 6,7)
Superóxido dismutasa	<i>SOD</i>	H	Poulik

(\*): Est-1 y Est-2 con sustrato alfa y beta naftil propionato 1% en acetona; Est-3 y Est-4 con sustrato 4-Metil-umbeliferil-acetato 0,5% en acetona. Tejidos: M = músculo; H = hígado

### Tratamiento de Datos

Los resultados obtenidos de la lectura de zimogramas, se analizaron con ayuda del programa informático BIOSYS-2 (Swofford & Selander 1989, modificado por Black 1997). Mediante el mismo se calculó la variabilidad genética de las poblaciones de la especie en función de las frecuencias alélicas observadas.

Para el cálculo de la variabilidad genética se utilizaron diferentes parámetros tales como: el número medio de alelos por *locus* (A), el porcentaje de *loci* polimórficos (P) (= Polimorfismo; considerando un *locus* como polimórfico cuando presenta más de un alelo), heterocigosidad media observada (Ho) y heterocigosidad media esperada (He) en condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg.

Estos parámetros son comunes en estudios de análisis de variabilidad genética en peces (Doadrio et al. 1996, Perdices et al. 1996, Perdices 1997). Mediante



trabajos comparativos de estos parámetros, se ha llegado a la opinión extendida de que los valores de heterocigosidad son los que mejor reflejan la la variabilidad genética total presente en una población (Vrijenhoek et al. 1985, Leberg 1991).

A su vez, se calcularon los parámetros *F de Wright* (Wright 1965) que se utilizan en la comparación de la diferenciación genética entre poblaciones y su posible estructuración (Perdices 1997, Fernández-Delgado et al. 1998), evaluando también el flujo genético entre ellas. El valor de  $F_{st}$  o *Índice de fijación* mide la diferenciación entre dos poblaciones y, si se considera que no existen subdivisiones dentro de la población total, se calcula según la siguiente fórmula:

$$F_{st} = H_t - H_s / H_t$$

Donde  $H_t$  = Heterocigosis esperada de la población total,  $H_s$  = Heterocigosis esperada de un individuo de esa población. Si el valor de  $F_{st}$  difiere significativamente de 0 es indicativo de un decremento en el flujo génico, y si el valor se aproxima a 1 sería indicativo de una interrupción total del flujo (Excoffier et al. 1992). La significación de los valores  $F_{st}$  se analizó mediante análisis multivariante de la varianza (AMOVA; programa ARLEQUIN ver 1.1).

También se ha estimado el *Coefficiente de endogamia* ( $F_{is}$ ) que calcula la probabilidad de que dos gametos formadores de un cigoto lleven, debido a su parentesco, copias idénticas de un gen (Caballero 1994). Cuando  $F_{is}$  es positivo indica un déficit de heterocigotos y viene determinado por la siguiente relación:

$$F_{is} = H_s - H_i / H_s$$

Donde  $H_i$  = Heterocigosis media de un individuo de una población,  $H_s$  = Heterocigosis de un individuo de una población donde los cruces se producen al azar.

El último de los parámetros estudiados,  $F_{it}$ , mide el incremento o la reducción de la heterocigosis en los individuos, en relación con la población total:

$$F_{it} = H_t - H_i / H_t$$

Donde  $H_t$  = Heterocigosis esperada de la población total,  $H_i$  = Heterocigosis media de un individuo de una población.

Las distancias genéticas entre las poblaciones estudiadas se evaluaron siguiendo el método de las *Distancias de Nei* (Nei 1972) empleado por varios autores (ej. Crozier & Kusmierski 1994) y, por ello, apropiado para comparar los resultados obtenidos en este estudio, con los existentes en la literatura.

Finalmente, las relaciones fenéticas entre las poblaciones se estudiaron mediante dendrogramas UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic distances*) con distancias de Cavalli-Sforza & Edwards (1972). La utilización de estas distancias de cuerda de Cavalli-Sforza & Edwards (1972), tiene la ventaja sobre otros dendrogramas en que las distancias expresadas pueden interpretarse como los cambios evolutivos en los grupos (Farris 1972). Los valores *bootstrap* de los nodos del UPGMA se calcularon mediante el uso de la opción *Neibourg* del programa PHYLIP 3.5.5 (Felsenstein 1993).

## 2. 3. Resultados y Discusión.

### *Patrones Electroforéticos*

De los 23 *loci* analizados, 13 fueron monomórficos: *sAAT-1*, *sAAT-2*, *mAAT-1*, *CK*, *EST-3*, *IDH-1*, *LDH-1*, *LDH-2*, *sMDH-1*, *mMDH-1*, *MPI*, *PGI-1* y *SOD*.

### *Frecuencias Alélicas*

En la Tabla 5.3 se indican las frecuencias alélicas de cada uno de los *loci* analizados en las 5 poblaciones. Se puede observar que han sido detectadas diferentes frecuencias alélicas para cada uno de los *loci*.

Cabe resaltar la existencia de dos alelos únicos para las poblaciones de Punta Lengua de Vaca (P-3) y Río Chícamo (P-5), y un alelo único para la población de las Salinas de Marchamalo (P-4) (Tabla 5.3). No obstante, todos estos alelos, con excepción de los presentes en la población del Río Chícamo, se muestran en frecuencias bajas. Además, se han encontrado dos alelos (*AK* y *FH*) que comparten con frecuencias altas todas las poblaciones del Mar Menor, pero que no aparecen en la del río Chícamo. Por otro lado, la población de Marchamalo carece de dos alelos (*sMDH-2* y *PEP-B*) presentes en las demás. En conjunto, estos resultados contribuyen a diferenciar tanto a la población del Río Chícamo (P-5) como a la de las Salinas de Marchamalo (P-4) del resto de poblaciones analizadas.

La idea de evaluar con fines conservacionistas la diferenciación genética entre poblaciones, valorando de forma cualitativa las diferencias en las frecuencias alélicas, ha sido expuesta por autores como Cronin (1993). No obstante, resulta conveniente profundizar mediante el contraste de parámetros de carácter cuantitativo (Leberg 1991).

**Tabla 5.3.** Frecuencias alélicas de cada uno de los *loci* analizados en las 5 poblaciones de estudio.

<b>Locus</b>		<b>P-1</b>	<b>P-2</b>	<b>P-3</b>	<b>P-4</b>	<b>P-5</b>	<b>Locus</b>		<b>P-1</b>	<b>P-2</b>	<b>P-3</b>	<b>P-4</b>	<b>P-5</b>
<i>mAAT-1*</i>	n	24	24	24	24	24	<i>GPI-2</i>	n	24	24	24	24	24
	A	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		A	0,938	1,000	0,958	0,813	1,000
<i>sAAT-1*</i>	n	24	24	24	24	24		B	0,021	0,000	0,000	0,083	0,000
	A	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		C	0,021	0,000	0,000	0,083	0,000
<i>sAAT-2*</i>	n	24	24	23	24	24		D	0,000	0,000	<b>0,042**</b>	0,000	0,000
	A	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		E	0,021	0,000	0,000	0,021	0,000
<i>AK</i>	n	23	23	22	24	24	<i>IDH-1*</i>	n	24	24	24	24	24
	A	0,630	0,696	0,818	0,875	1,000			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	B	0,370	0,304	0,182	0,125	0,000	<i>LDH-1*</i>	n	24	24	23	23	24
<i>CK*</i>	n	24	24	24	24	24			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	<i>LDH-2*</i>	n	24	24	24	24	24
<i>EST-1</i>	n	22	21	22	18	24			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	A	1,000	1,000	0,955	1,000	1,000	<i>mMDH-1*</i>	n	24	24	24	23	24
	B	0,000	0,000	<b>0,045**</b>	0,000	0,000			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>EST-2</i>	n	22	24	17	24	24	<i>sMDH-1*</i>	n	24	24	24	24	24
	A	0,409	0,563	0,412	0,250	0,542			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	B	0,591	0,438	0,588	0,750	0,458	<i>sMDH-2</i>	n	23	24	24	24	17
<i>EST-3*</i>	n	24	24	24	24	24		A	0,565	0,375	0,625	1,000	0,059
		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		B	0,435	0,625	0,375	0,000	0,941
<i>EST-4</i>	n	24	23	23	24	24	<i>MPI*</i>	n	16	17	24	24	24
	A	0,354	0,565	0,348	0,313	0,542			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	B	0,646	0,435	0,652	0,688	0,458	<i>PGDH</i>	n	22	24	23	23	18
<i>FH</i>	n	21	24	24	23	20		A	0,864	1,000	1,000	0,957	0,833
	A	0,548	0,354	0,625	0,435	0,200		B	0,136	0,000	0,000	0,043	0,167
	B	0,000	0,000	0,000	<b>0,043**</b>	0,000	<i>PGM-1</i>	n	24	24	24	24	24
	C	0,238	0,500	0,188	0,283	0,800		A	1,000	1,000	1,000	1,000	0,708
	D	0,048	0,000	0,083	0,000	0,000		B	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,292**</b>
	E	0,119	0,146	0,021	0,239	0,000	<i>PEP-B</i>	n	22	24	23	24	19
	F	0,048	0,000	0,083	0,000	0,000		A	0,705	0,875	0,826	0,958	0,500
<i>GPI-1*</i>	n	24	24	24	24	24		B	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,158**</b>
		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		C	0,068	0,125	0,043	0,000	0,079
								D	0,205	0,000	0,130	0,042	0,053
								E	0,023	0,000	0,000	0,000	0,211
							<i>SOD*</i>	n	24	24	24	24	24
									1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

(P-1) Salinas de San Pedro del Pinatar, (P-2) Playa de La Hita, (P-3) Punta Lengua de Vaca, (P-4) Salinas de Marchamalo, (P-5) Río Chicamo. (n): número de ejemplares analizados por *loci*. A-F *locus* para las enzimas;

(\*): *Locí* monomórficos; (\*\*): Presencia de alelos exclusivos.

### Variabilidad, Flujo y Distancia Genética

En la Tabla 5.4 se presentan los valores de variabilidad genética obtenidos para los 23 *loci* examinados en las 5 poblaciones analizadas.

**Tabla 5.4.** Valores de los parámetros utilizados para el análisis de la variabilidad genética en las 5 poblaciones de *Aphanius iberus* estudiadas en la Región de Murcia (error estándar entre paréntesis).

Localidades	Tamaño muestral	Heterocigosidad media			
		(A)	(P)	(Ho)	(He)
San Pedro del Pinatar	23,1	1,7	34,8	0,085	0,148
<b>P-1</b>	(0,4)	(0,2)		(0,039)	(0,047)
Playa de la Hita	23,5	1,3	26,1	0,102	0,120
<b>P-2</b>	(0,3)	(0,1)		(0,042)	(0,045)
Punta Lengua de Vaca	23,3	1,5	34,8	0,071	0,121
<b>P-3</b>	(0,3)	(0,2)		(0,028)	(0,042)
Marchamalo	23,6	1,5	30,4	0,051	0,097
<b>P-4</b>	(0,3)	(0,2)		(0,025)	(0,039)
Río Chícamo	23,0	1,4	30,4	0,119	0,124
<b>P-5</b>	(0,5)	(0,2)		(0,055)	(0,045)

(A) nº medio de alelos por *locus*; (P) % de *loci* polimórficos, considerando a un *locus* polimórfico cuando presenta más de un alelo; (Ho) heterocigosidad media observada y (He) heterocigosidad media esperada en condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg.

El rango de alelos por *locus* (A) para las poblaciones analizadas de *Aphanius iberus* en la Región de Murcia osciló entre 1,3 y 1,7 (Tabla 5.4). El valor mínimo se observó en la población de La Hita (P-2;  $A = 1,3 \pm 0,1$ ) y el valor máximo en la población de San Pedro del Pinatar (P-1;  $A = 1,7 \pm 0,2$ ) (Tabla 5.4).

Por otro lado, los valores de polimorfismo (P) variaron entre 0,261 (26,1 % de *loci* polimórficos) para la población de la Hita (P-2) y 0,348 en las poblaciones de San Pedro del Pinatar (P-1) y Punta Lengua de Vaca (P-3) (Tabla 5.4). Estos valores se encuentran dentro del rango encontrado para las poblaciones mediterráneas de *Aphanius iberus* ( $P = 0,125 - 0,542$ ) (Doadrio et al. 1996, Planelles 1999) y observado en otras especies de Ciprinodóntidos estudiadas en hábitats con salinidades y temperaturas elevadas (Nevo 1978, Perdices et al. 1996, García-Marin & Plá 1997, Maltagliati 1998a y 1998c, Schönhuth et al. 2003). No obstante, los valores obtenidos son mayores que los considerados con anterioridad por Doadrio et al. (1996) para poblaciones del Mar Menor ( $P = 0,125 - 0,250$ ).

El patrón observado en el polimorfismo se repite con los resultados obtenidos para la heterocigosidad esperada bajo condiciones de Hardy-Weinberg (He), siendo el rango de variación obtenido en estos análisis ( $He = 0,097 - 0,148$ ) mayor que el expuesto previamente para poblaciones del Mar Menor ( $He = 0,046 - 0,078$ ) (Doadrio et al. 1996). El valor medio de  $He = 0,112$  resulta algo





mayor que el descrito para los peces en general ( $H_e = 0,05$ ; Nevo 1978, Ward et al. 1992), pero dentro del rango descrito en Ciprinodóntidos ( $H_e = 0,027 - 0,180$ ; Nevo 1978, Maltagliati 1998a y 1998b, Schönhuth et al. 2003). En términos generales, esta mayor variabilidad genética puede ser consecuencia de la fortaleza del análisis consecuencia del mayor número de individuos utilizados en esta ocasión. Sin embargo, también debe tenerse en cuenta que algunos de los sistemas analizados no fueron idénticos a los utilizados por Doadrio et al. (1996). La heterocigosidad esperada bajo condiciones de Hardy-Weinberg presenta el valor mínimo indicado en la población de las Salinas de Marchamalo (P-4;  $H_e = 0,097 \pm 0,039$ ) y el valor máximo en la población de las Salinas de San Pedro del Pinatar (P-1;  $H_e = 0,148 \pm 0,047$ ) (Tabla 5.4).

La población de San Pedro del Pinatar (P-1) es la única que muestra valores de variabilidad genética ligeramente más altos al resto de poblaciones (Tabla 5.4), lo cual podría estar correlacionado con el mayor tamaño poblacional y el área más extensa de distribución que diferencia a la misma del resto de poblaciones de estudio. En éstas, los valores de variabilidad son similares con independencia del hábitat ocupado: Salinas, Marinas propias del Mar Menor o ambientes lóticos de agua dulce como el Río Chicamo.

El análisis estadístico de comparación (test  $\chi^2$ ) entre las frecuencias alélicas observadas con respecto a las esperadas bajo condiciones de Hardy-Weinberg, mostró diferencias significativas en 10 de los casos, aspecto que se traduce en un déficit significativo de heterocigotos en éstos: *EST-2*, *FH*, *MDH-H* y *PGDH* en la población de San Pedro del Pinatar (P-1); *Mdh-H* en la población de la Playa de La Hita (P-2); *FH* y *MDH-H* en la población de Punta Lengua de Vaca (P-3); *AK* y *FH* en la población de las Salinas de Marchamalo (P-4); *FH* en la población del Río Chicamo (P-5). Este déficit de heterocigotos se ha mostrado también en otras poblaciones mediterráneas (García-Marín et al. 1990, Doadrio et al. 1996).

El déficit de heterocigotos obtenido puede ser consecuencia de la propia técnica de análisis, ya que en determinadas ocasiones deben ser excluidos algunos genotipos dudosos (sesgos en los tamaños muestrales, *loci* con dificultad de detección de heterocigotos en los zimogramas, etc.). No obstante, este déficit también puede ser consecuencia de reducciones en el tamaño poblacional por procesos relativamente recientes en el tiempo, como los *cuellos de botella* (*Population Bottlenecks*, Leberg 1992). Este aspecto ya ha sido puesto de manifiesto mediante análisis genéticos para poblaciones mediterráneas de la especie (Fernández-Pedrosa 1997). No obstante, el número de *loci* polimórficos analizados ( $n = 10$ ) en nuestro trabajo, sobrepasa el valor mínimo muestral que podría sugerir una subestima de la heterocigosis poblacional (Nevo et al. 1984, Leberg 1992).

La población del Río Chicamo (P-5) muestra valores similares entre la Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ). Este aspecto podría estar indicando que dicha población es la menos afectada por procesos recientes

de reducción poblacional y podría decirse que el estatus genético de la misma es viable. Esta población es la que presenta abundancias más bajas y una menor disponibilidad de hábitat de las analizadas, no obstante, la ausencia de relación entre estas características y los resultados puede interpretarse en el prisma de los supuestos de la teoría *selección-equilibrio* apoyada por los trabajos de Van Valen (1965) y Nevo & Beiles (1991). Esta teoría sugiere que las poblaciones presentes en hábitats heterogéneos (temporal y/o espacial), como es el caso del Río Chicamo, muestran los valores más altos de variabilidad genética que favorecen un incremento del *fitness* poblacional. Otras explicaciones a la alta variabilidad presentada por esta población estarían relacionadas con su elevado grado de aislamiento geográfico y alta temporalidad poblacional que, en otras especies de Ciprinodóntidos, han sido expuestas como las causas de un elevado estatus genético poblacional (Dunham & Minckley 1998, Stockwell et al. 1998).

Los resultados del test de comparación de tablas de contingencia (test  $\chi^2$ ) realizadas con las frecuencias alélicas de *loci* polimórficos de las cinco poblaciones, mostraron diferencias significativas en todos los *loci* polimórficos, con excepción del *EST-1* (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5.** Valores de los parámetros del test de comparación en las tablas de contingencia realizadas con las frecuencias alélicas de los *loci* polimórficos. (\*) Diferencias significativas; gl: Grados de libertad.

<i>Locus</i>	n	$\chi^2$	gl	P
AK	2	25,71	4	< 0,001*
EST-1	2	10,97	4	0,027*
EST-2	2	7,80	4	0,099
EST-3	2	12,26	4	0,015*
FH	6	81,93	20	< 0,001*
MDH-2	2	79,59	4	< 0,001*
PEP-B	5	90,18	16	< 0,001*
PGDH	2	17,02	4	0,002*
PGI-2	5	36,21	16	0,003*
PGM-1	2	59,47	4	< 0,001*
Total		426,72	88	< 0,001*

El parámetro  $F_{st}$  mide el flujo genético entre poblaciones (Wright 1965). Sus valores oscilan entre 0 y 1, correspondiendo el primer valor a poblaciones no diferenciadas, y el segundo a una diferenciación máxima (ningún alelo en común), es decir, la interrupción del flujo genético entre las poblaciones. El valor medio de  $F_{st}$  empleando *loci* polimórficos para las cinco poblaciones analizadas fue 0,3793 y los *loci* más fijados *EST-1*, *MDH-2* y *PGDH* (Tabla 5.6). En términos generales, estos valores de  $F_{st}$  indican una ruptura del flujo poco acusada, evidente si se atiende únicamente a la distancia geográfica entre las mismas. No obstante, la desconexión geográfica entre la población del Río Chicamo (P-5) y el resto ubicadas en el Mar Menor y su entorno, podrían apuntar hacia una



interrupción del flujo genético. El valor promedio de  $F_{st}$  queda inmerso en la pauta mostrada por la especie ( $F_{st} = 0,330$ ) y *Aphanius baeticus* ( $F_{st} = 0,410$ ) en un análisis realizado con poblaciones de la totalidad de sus rangos de distribución (Perdices et al. 2001), y algo superior al expuesto para *Aphanius fasciatus* ( $F_{st} = 0,302$ ) (Maltagliati 1998b).

**Tabla 5.6.** Tabla sumario de los parámetros *F de Wright* para los *loci* polimórficos en las poblaciones de *Aphanius iberus* analizadas en el presente estudio.

<i>Locus</i>	$F_{st}$	$F_{is}$	$F_{it}$
AK	-0,0201	-0,1472	0,1108
EST-3	0,1324	0,0900	0,0465
EST-1	1,0000	1,0000	0,0365
EST-2	0,1395	0,0892	0,0552
FH	0,5684	0,5071	0,1243
MDH-2	1,0000	1,0000	0,3553
PEP-B	0,0327	-0,0856	0,1090
PGDH	0,8474	0,8346	0,0774
PGI-2	0,3319	0,2860	0,0643
PGM-1	0,3932	0,1933	0,2478
Promedio	0,3793	0,2829	0,1344

El coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) calcula la probabilidad de que dos gametos que se unen para dar un cigoto, lleven copias idénticas de un gen debido a su parentesco. Cuando este parámetro presenta valores positivos, indica un déficit de heterocigotos. El valor medio resultado de la comparación de las poblaciones analizadas fue 0,2829 (Tabla 5.6), por tanto, se muestra también un ligero déficit de heterocigosis.

Finalmente, el parámetro  $F_{it}$  mide el incremento o reducción de heterocigosis en los individuos en relación con la población total. El valor medio obtenido en nuestro análisis fue 0,134 (Tabla 5.6).

El cálculo de estos estadísticos únicamente para las poblaciones del Mar Menor (excluyendo P-5), detecta un aumento en el valor medio de  $F_{is} = 0,35$  ( $F_{is} = 0,28$  con el total de poblaciones) y de  $F_{it} = 0,40$  ( $F_{it} = 0,134$  con el total de poblaciones). Esto se traduce en un déficit de heterocigosis significativo en estas poblaciones ubicadas en salinas y en la propia marina del Mar Menor. Por el contrario, el valor promedio de  $F_{st}$  disminuye, siendo  $F_{st} = 0,078$  ( $F_{st} = 0,3793$  con el total de poblaciones). Este último aspecto nos está indicando que las poblaciones del Mar Menor y su entorno (P-1, P-2, P-3 y P-4) están poco diferenciadas entre sí y, consecuentemente, el flujo genético existente entre las mismas es elevado.

En la Tabla 5.7 se representan los valores de  $F_{st}$  resultantes de la comparación

entre pares de poblaciones analizadas. Se puede comprobar que existe, o ha existido, flujo genético entre las poblaciones del Mar Menor (P-1; P-2; P-3 y P-4), siendo considerablemente menor entre éstas y la población del Río Chicamo (P-5). A su vez, se detecta una similitud máxima entre la población de las Salinas de San Pedro del Pinatar (P-1) y la Punta Lengua de Vaca (P-3).

**Tabla 5.7.** Valores de flujo génico ( $F_{st}$ ) entre las poblaciones analizadas y significación del test (Análisis multivariante de la varianza, AMOVA) (Schneider et al. 1997). (\*) Test significativo ( $p < 0,05$ ).

<b>Población</b>		(P-1)	(P-2)	(P-3)	(P-4)
San Pedro del Pinatar	(P-1)				
La Hita	(P-2)	0,052*			
Punta Lengua de Vaca	(P-3)	0,002	0,063*		
Marchamalo	(P-4)	0,100*	0,189*	0,074*	
Río Chicamo	(P-5)	0,177*	0,136*	0,215*	0,330*

Las distancias genéticas (Nei 1972) encontradas para las poblaciones de *Aphanius iberus* en la Región de Murcia (Tabla 5.8), muestran de nuevo la proximidad génica existente entre las poblaciones analizadas del Mar Menor. Se presentan las poblaciones de San Pedro del Pinatar (P-1) y la Punta Lengua de Vaca (P-3) como las más próximas. A su vez, la población con un mayor grado de diferenciación genética ha resultado ser la del Río Chicamo (P-5), con una distancia promedio con el resto de 0,131 (Tabla 5.8). Aplicando la misma calibración que Doadrio et al. (1996) para poblaciones de *Aphanius iberus* y *Aphanius baeticus* (La unidad de distancia de Nei equivale a 20 m.a.), la separación promedio entre la población del Río Chicamo y el resto de poblaciones del Mar Menor sería de 2,62 m.a.

**Tabla 5.8.** Distancias genéticas (Nei 1972) obtenidas entre las poblaciones analizadas en el presente estudio.

<b>Población</b>		(P-1)	(P-2)	(P-3)	(P-4)
San Pedro del Pinatar	(P-1)				
La Hita	(P-2)	0,011			
Punta Lengua de Vaca	(P-3)	0,004	0,013		
Marchamalo	(P-4)	0,018	0,032	0,013	
Río Chicamo	(P-5)	0,042	0,024	0,046	0,076



### Relaciones fenéticas

El agrupamiento fenético realizado con las distancias de Cavalli-Sforza & Edwards (1972) (Dendrograma UPGMA en Fig. 5.4) muestra un grupo bien definido (74% de valor de *bootstrap*) formado por las poblaciones de San Pedro del Pinatar (P-1), La Hita (P-2) y Punta Lengua de Vaca (P-3), siendo la P-1 y P-3 las más similares con un valor *bootstrap* altamente significativo (82 %). Estas tres poblaciones muestran cierta concordancia entre su ubicación geográfica y su distancia geográfica, ya que presentan una conexión clara entre ellas a través de la propia laguna del Mar Menor. La población de las Salinas de Marchamalo (P-4) es una población localizada en el entorno del Mar Menor, pero con un flujo de conexión con la laguna mayoritariamente unidireccional. Estas salinas de pequeño tamaño únicamente presentan un canal de entrada de agua, mediante impulso mecánico a través de una bomba, no existiendo ninguna otra conexión con la laguna. Esto provoca que el posible flujo entre las subpoblaciones de la propia laguna y de las salinas sea unidireccional, no existiendo migración de individuos de las salinas hacia la laguna, salvo en procesos puntuales de inundación. Este aspecto podría haber provocado la diferenciación genética que esta población muestra respecto al resto del Mar Menor y su entorno.

Finalmente, la población del Río Chícamo (P-5) queda de forma significativa como la más diferenciada de las cinco poblaciones analizadas (Fig. 5.4).

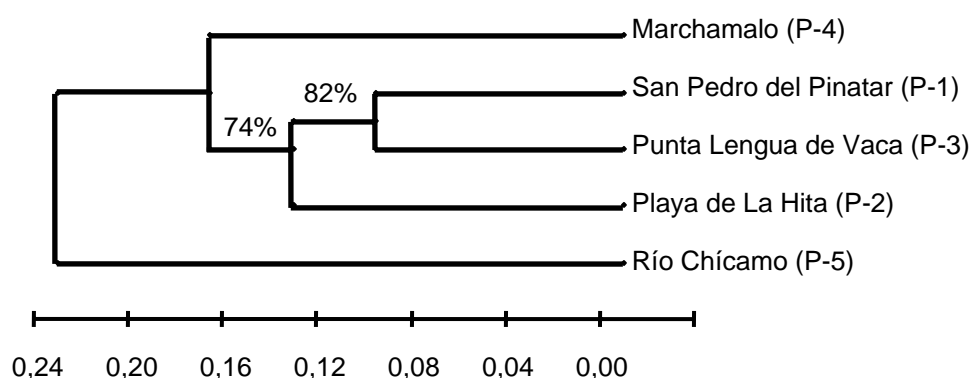


Figura 5.4. Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Cavalli-Sforza & Edwards (1972) de las poblaciones, indicando los valores de *bootstrap*.

## 2.4. Conclusiones y *Unidades de Conservación Operacionales*.

Las conclusiones obtenidas en el estudio realizado sobre la caracterización y variabilidad genética de las poblaciones de *Aphanius iberus* presentes en la Región de Murcia son las siguientes:

- (1) Las cinco poblaciones de *Aphanius iberus* analizadas en la Región muestran una alta variabilidad genética, y en especial las poblaciones de las Salinas de San Pedro del Pinatar y del Río Chicamo. La población que parece presentar una menor variabilidad genética es la localizada en la Playa de La Hita.
- (2) Las poblaciones analizadas del Mar Menor y su entorno [Salinas de San Pedro del Pinatar; Playa de La Hita; Punta Lengua de Vaca y Salinas de Marchamalo] presentaron un déficit de heterocigotos, lo que puede indicar que se esté produciendo un fenómeno de  *cuello de botella*.
- (3) El análisis muestra la existencia de un flujo genético, especialmente entre las poblaciones del Mar Menor y su entorno [Salinas de San Pedro del Pinatar; Playa de La Hita; Punta Lengua de Vaca y Salinas de Marchamalo], o una interrupción relativamente reciente del mismo incorporando la población del Río Chicamo (P-5) al análisis.
- (4) La población establecida en el Río Chicamo se muestra como la más diferenciada de todas con mayor distancia genética.
- (5) Dentro de las poblaciones del Mar Menor y su entorno [Salinas de San Pedro del Pinatar; Playa de La Hita; Punta Lengua de Vaca y Salinas de Marchamalo], la población establecida en las Salinas de Marchamalo resultó ser la más diferenciada de todas (mayor distancia genética).
- (6) En conjunto, se definen 3 *Unidades de Conservación Operacionales* (OCUs: *Operational Conservation Units* sensu Doadrio et al. 1996): OCU-1 (Río Chicamo); OCU-2 (Salinas de Marchamalo) y OCU-3 (Mar Menor).

## ***Unidades de Conservación Operacionales***

En el presente trabajo se establecen 3 *Unidades de Conservación Operacionales*, denominadas *OCUs* (*Operational Conservation Units*, Doadrio et al. 1996), de utilización recomendada en la gestión de *Aphanius iberus* en la Región. Bajo este término se incluyen poblaciones o conjunto de poblaciones que ocupan áreas geográficas continuas y que muestran el mismo patrón genético. De acuerdo con Doadrio et al. (1996), una protección efectiva de las *OCUs* garantizaría la conservación de poblaciones viables de la especie junto con la preservación de su acervo genético.

Dichos autores describen 4 *OCUs* para la especie en toda su área de distribución. Estas *OCUs* se muestran en relativa concordancia con las diferentes regiones de distribución (Doadrio 2002) y acordes con los modelos genéticos presentados por la especie, y son: la Región Catalana, Levantina y Murciana, quedando la Población de Villena como una unidad diferenciada. La presencia de alelos exclusivos junto con la localización aislada de la población de Villena, fue lo que llevó a considerarla como *OCU* diferenciada (Doadrio et al. 1996, Perdices et al. 2001).

Por otro lado, Fernández-Pedrosa (1997) nos introduce sobre dos nuevos términos para la gestión de *Aphanius iberus* en la Península: *Unidades Evolutivas Significativas* o *Unidades Prioritarias de Conservación* (*ESUs: Evolutionary Significant Units*, Ryder 1986) y *Unidades de Manejo* (*MUs: Management Units*, Moritz 1994).

Bajo el nombre de *ESU* se engloba aquella población o conjunto de poblaciones que presentan una historia evolutiva independiente y con características genéticas únicas, que contribuyen de forma sustancial a la diversidad genética total de la especie (Waples 1991). El establecimiento de las *ESUs* en una especie, no sólo tiene importancia para el establecimiento de prioridades en la conservación de sus poblaciones, sino que es importante desde la perspectiva de designación de áreas protegidas. De esta forma, la *ESU* coincidiría con el término operacional que debe ser la unidad mínima de conservación (Meffe & Carroll 1997).

Los estudios llevados a cabo por Fernández-Pedrosa (1997) determinan, dentro de las poblaciones valencianas de *Aphanius iberus*, dos *ESUs*: (1) la población de Villena y (2) el grupo de poblaciones de la costa (Peñíscola, Albuixech y Santa Pola). Aunque el criterio genético para la designación de *ESUs* y *OCUs* no coincide exactamente, en el caso de la población de Villena, los marcadores genéticos analizados por Fernández-Pedrosa (1997) refuerzan la idea de que ésta debe ser una población prioritaria en la gestión. Sin embargo, los resultados obtenidos para las poblaciones costeras no concuerdan con los obtenidos por Doadrio et al. (1996), ya que estos autores situaban la población de Santa Pola en una *OCU* diferente a las poblaciones de Peñíscola y Albuixech.

De acuerdo con Moritz (1994 y 1995), las poblaciones que no presentan una separación filogenética completa, pero sí diferencias alélicas significativas, son importantes para la conservación de una especie, ya que representan poblaciones conectadas por un flujo genético bajo y, por tanto, demográficamente tienen cierta independencia. Son las denominadas *MUs*, *poblaciones con divergencia genética significativa en las frecuencias alélicas mitocondriales y nucleares independientes de su distinción filogenético* (Fernández-Pedrosa 1997). En definitiva, las *MUs* reconocen diferencias genéticas que el criterio para el establecimiento de *ESUs* no diferencia, teniendo éstas una gran importancia para el mantenimiento de la variabilidad genética total de la especie.

Fernández-Pedrosa (1997) asigna la categoría de *MU* a cada una de las poblaciones costeras que estudia en su trabajo (Peñíscola, Albuixech y Santa Pola), debido a la composición haplotípica significativamente diferente que presentaron. Esto podría explicar, en cierta medida, la falta de coincidencia con el trabajo de Doadrio et al. (1996).

De esta forma, si bien cabe mencionar la necesidad de los análisis con ADN mitocondrial y nuclear pertinentes en la Región de Murcia para el establecimiento de *ESUs* (Fernández-Pedrosa 1997), la lógica impone considerar, al menos, la presencia de dos hipotéticas *ESUs* en las poblaciones de la Región. Una de ellas sería coincidente con las 2 *OCUs* establecidas en el Mar Menor y su entorno, mientras que la otra correspondería con la *OCU* del Río Chicamo.

En lo concerniente a las *MUs*, la situación se hace algo más simple, por un lado no cabe duda en pensar que la población del Río Chicamo se puede considerar como una *MU* diferenciada. A su vez, los estudios genéticos mostrados en esta memoria nos permiten el establecimiento de, al menos, 2 *MUs* en el Mar Menor y entorno: Mar Menor y Salinas de Marchamalo (coincidentes con las *OCUs* establecidas).

### **3. Gestión de Ciprinodóntidos en Peligro de Extinción: Aproximación desde la Genética de la Conservación.**

A lo largo de este capítulo, se ha puesto en evidencia los problemas genéticos que pueden presentar los planes de gestión, conservación o recuperación de especies. La utilización de la genética en la obtención de *Unidades de Conservación* viene siendo frecuente en el grupo de los Ciprinodóntidos (Quattro et al. 1996, Parker et al. 1999, Hedrick et al. 2001, entre otros). Las normativas que regulan y afectan a la conservación de fauna amenazada han favorecido el aumento del uso de técnicas moleculares aplicadas a la gestión (Machordom & Perdices 2002). La obligada necesidad de redactar *Planes de Recuperación* para las especies de Ciprinodóntidos presentes en nuestra geografía, ha conllevado la realización de estudios sobre la variación genética





de las poblaciones de *Aphanius iberus*, *Aphanius baeticus* y *Valencia hispanica* (García-Marín et al. 1990, Fernández-Pedrosa et al. 1995, Fernández-Pedrosa 1997, Doadrio et al. 1996 y 2002, Perdices et al. 1996 y 2001, Fernández-Delgado et al. 1998, Schönhuth et al. 2003). Estos estudios han sido de enorme valía para enfocar la recuperación de estas especies (Planelles 1999), ejemplo de ello lo encontramos en el único *Plan de Recuperación* aprobado hasta la fecha (Plan de Recuperación del Samaruc en la Comunidad Valenciana; Decreto 265/2004, 10 de diciembre, DOGV, nº 4902).

A una escala circunmediterránea, *Aphanius fasciatus* es otra especie de Ciprinodóntido en la que también, con fines aplicados a su conservación, se ha profundizado en su variabilidad genética intra e interpoblacional (Maltagliati 1998a, 1998b, 1999 y 2002).

Los estudios genéticos realizados a nivel peninsular también han llevado a la diferenciación y descripción de una nueva especie exclusiva de las costas atlánticas andaluzas, *Aphanius baeticus* (Doadrio et al. 2002). La gestión independiente de las dos especies es básica para que los *Planes de Recuperación* tengan utilidad a largo plazo. En el caso de *Valencia hispanica*, los estudios sobre variabilidad genética muestran particularidades en, prácticamente, todas sus poblaciones naturales (Fernández-Pedrosa et al. 1995, Perdices et al. 1996, Fernández-Pedrosa 1997, Planelles 1999). A su vez, estos estudios han revelado el mantenimiento de la variabilidad genética de la especie en la cría en cautividad, así como el origen híbrido de algunas de las poblaciones mantenidas en cautividad (González et al. 1999). El seguimiento genético de poblaciones en cautividad también ha sido abordado con *Aphanius baeticus* en el Parque Nacional de Doñana (Schönhuth et al. 2003), encontrando resultados satisfactorios respecto al mantenimiento de la variabilidad.

En términos generales, los Ciprinodóntidos pueden considerarse como un taxón crítico en lo referente a su estatus de conservación, calificativo que también puede ser aplicado al campo de su *Conservación Genética* (Meffe 1990). Minckley & Deacon (1991) muestran una excelente revisión de los trabajos realizados en la gestión de un gran número de Ciprinodóntidos y grupos afines amenazados. En ésta, se puede observar la enorme dificultad que conlleva trabajar con especies en ambientes áridos que muestran una distribución caracterizada por fragmentación y aislamiento de sus poblaciones (Stockwell et al. 1998).

La gestión y conservación de especies con patrones de distribución caracterizados por poblaciones aisladas con niveles de variabilidad genética baja pero con una diferenciación genética interpoblacional elevada, resulta compleja (Meffe & Vrijenhoek 1988). Estos autores enfatizaron sobre los riesgos de extinción de estas especies en *aislamiento zoogeográfico*, destacando los procesos de depresión endogámica causados por reducciones del tamaño

poblacional efectivo ( $N_e$ ). En resumen, Meffe & Vrijenhoek (1988) constatan que cada sistema zoogeográfico requiere de una gestión genética específica y la necesidad de reconocer el modelo geográfico (aspecto abordado en el Capítulo 4). Este aspecto aumenta en importancia en zonas áridas (Hurt & Hedrick 2004) como el ámbito de estudio en la presente Tesis. Por último, no debe olvidarse que la gestión genética debe tener en cuenta la dinámica y características demográficas de las poblaciones de trabajo (estructura poblacional, tasas de crecimiento, fecundidad, etc.) (Slatkin 1985 y 1987).

### ***Guías cualitativas para la Conservación Genética en especies de Ciprinodóntidos***

La necesidad de tener un conocimiento de las características biológicas y ecológicas de una especie para la toma de decisiones en su gestión, no es una noticia agradable para muchos gestores y técnicos con una precariedad notable de recursos destinados a investigación. No obstante, la complejidad de los sistemas biológicos obliga a que en casos concretos dicho conocimiento sea imprescindible (Ehrenfeld 1991). En este contexto, es conveniente escapar de las fórmulas estandarizadas y *recetas de cocina* (ej. Regla de 50/500) que ignoran consideraciones demográficas, ecológicas y etológicas (Meffe & Carroll 1997).

Existen, sin embargo, procedimientos lógicos en relación con la *Conservación Genética* muy asequibles para gestores y técnicos. Las *Reglas cualitativas* descritas por Meffe & Carroll (1994) y las *Acciones de gestión* extraídas de Meffe (1986) maximizan, a largo plazo, la salud genética de especies en peligro y conforman una herramienta de conservación asequible y, consecuentemente, útil en la gestión con criterios genéticos de especies en extinción (Cuadro 5.2).

No obstante, es obligado mencionar que siempre es recomendable realizar la mejor aproximación a las circunstancias individuales de gestión. Las reglas cualitativas (Meffe & Carroll 1994) y acciones de gestión (Meffe 1986) no deben considerarse absolutas o únicas, consecuentemente, un programa de recuperación de una especie no debe abandonarse aunque no puedan cumplirse de forma rigurosa dichas reglas y acciones.

Cuadro 5.2.

***Reglas cualitativas para la gestión de especies aplicando criterios de Conservación Genética (Meffe & Carroll 1994)***

- (1) Cuanto mayor sea el número de individuos tanto menor será la probabilidad de pérdida de variación genética (mayor facilidad de trabajar con tamaños poblacionales efectivos óptimos).
- (2) Los efectos negativos de la deriva genética y la endogamia son inversamente proporcionales al tamaño de la población. Evitar una gestión enfocada al mantenimiento de poblaciones no naturales y con pocos efectivos.
- (3) La gestión de las poblaciones naturales debe ser coherente con la historia de sus modelos y procesos genéticos. Es preciso un conocimiento mínimo de sus patrones zoogeográficos.
- (4) Una baja diversidad genética *per se* no es causa de alarma, determinadas especies pueden presentar este patrón de forma natural. Sin embargo, grandes y repentinas pérdidas de diversidad, tanto en poblaciones naturales como en poblaciones en cautividad, son indicadores de riesgos de extinción elevados.
- (5) Evitar la selección artificial en cautividad. El mantenimiento en cautividad debe realizarse con las siguientes premisas:
  - (5.1) Reducir al máximo el tiempo de permanencia en cautividad de las poblaciones, es decir, trabajar con el menor número de generaciones en cautividad posible.
  - (5.2) Las condiciones de cautividad deben ser lo más parecidas posibles a las naturales.
- (6) Después de un episodio de muerte en masa en una población, hay que favorecer el crecimiento rápido de la población para evitar problemas genéticos de cuello de botella.
- (7) Siempre que sea posible se debe evitar la posible depresión y/o disminución de la diversidad genética mediante el cruzamiento de poblaciones distantes.
- (8) Evitar las introducciones de alelos exóticos en la naturaleza o en las poblaciones cautivas.
- (9) La explotación de *stocks* silvestres (caza, pesca, acuicultura, etc.) puede afectar la evolución futura de la población o incluso de la especie.
- (10) El mantenimiento de la diversidad genética en *stocks* cautivos no es un sustituto de la diversidad genética existente en la naturaleza.

***Acciones de Gestión recomendadas para maximizar a largo plazo la salud genética de Peces en Peligro de Extinción (Meffe 1986)***

- (1) Realizar seguimientos del estatus genético tanto de poblaciones naturales como de *stocks* en cautividad.
- (2) Los *stocks* en cautividad deben mantenerse con los mayores tamaños de población efectiva posibles. Los efectos positivos de esta Acción de Gestión se traducen en disminuir la erosión sobre la variabilidad genética en términos cuantitativos, reducir la posibilidad de pérdida de alelos exclusivos y reducir las posibilidades de sufrir procesos de endogamia, principalmente.
- (3) En *stocks* en cautividad de reducido tamaño hay que evitar la endogamia por cruzamientos selectivos. Evitar la selección artificial.
- (4) Es recomendable que los *stocks* en cautividad se mantengan el menor número de generaciones posible. El mantenimiento en cautividad debe entenderse prioritariamente como una herramienta de trabajo para la reconstitución de poblaciones. Los efectos positivos de esta Acción se traducen en disminuir la selección artificial, disminuir la domesticación y minimizar posibles efectos de deriva genética, procesos de endogamia, fenómenos de cuello de botella y mortandades masivas.
- (5) El mantenimiento de *stocks* en cautividad separados para cada una de las poblaciones establecidas es básico para la conservación de la variabilidad interpoblacional.

#### 4. Gestión de la Variabilidad Genética de *Aphanius iberus* en Murcia: Primera aproximación.

La información obtenida sobre la variabilidad genética de *Aphanius iberus* en la Región nos acerca al establecimiento de los requisitos genéticos que, cruzados con datos biológicos y demográficos, permitirán el establecimiento de criterios sólidos para la conservación de sus poblaciones.

Con estas premisas, a continuación se presenta una propuesta de actuaciones de gestión para mantener y/o elevar la salud genética de dichas poblaciones que, además, pueden sentar las bases genéticas para la recuperación y conservación de la especie en esta Región.

(1) Los programas y subprogramas de actuaciones (priorizar áreas de conservación, restauración y rehabilitación de espacios, reintroducciones, cría en cautividad, etc.) enmarcados en directrices del futuro *Plan de Recuperación*, e incluso fuera de este marco de actuaciones, deben realizarse teniendo en cuenta las tres *Unidades Operacionales de Conservación* establecidas: OCU-1 (Río Chícamo); OCU-2 (Salinas de Marchamalo) y OCU-3 (Mar Menor).

(2) Protección *in situ* de las *Unidades Operacionales de Conservación* establecidas: OCU-1 (Río Chícamo); OCU-2 (Salinas de Marchamalo) y OCU-3 (Mar Menor). El mejor método de conservar la diversidad genética es mantener poblaciones autosostenibles en hábitats naturales (FAO/PNUMA 1984). De esta forma, la conservación debe enfocarse en el mantenimiento de las unidades poblacionales con un tamaño efectivo que no provoque la pérdida de variabilidad genéticas (García-Marín & Plá 1999).

(3) Se aconseja un seguimiento, al menos cada tres años (de acuerdo con Schönhuth et al. 2003), de la variabilidad genética de las poblaciones de *Aphanius iberus* en la Región de Murcia.

(4) Es necesario la realización de análisis genéticos y morfológicos más detallados, de forma prioritaria para determinar el grado de diferenciación y origen de la población establecida en el río Chícamo (OCU-1).

(5) Es preciso aumentar el tamaño efectivo de la población establecida en el Río Chícamo (OCU-1). En este contexto, deben mantenerse *stocks* en cautividad de la misma, aplicando las pautas de gestión expuestas anteriormente. La utilización de *Refugios artificiales* (Turner 1984) para la especie, también puede ser una herramienta de gestión adecuada.



(6) El tamaño efectivo de la población establecida en las Salinas de Marchamalo (OCU-2) es, *a priori*, adecuado. No obstante, su exclusividad genética es un indicador del alto riesgo de desaparición, en consecuencia, obliga al mantenimiento de un *stock* en cautividad aplicando las pautas de gestión expuestas.

(7) También es recomendable la realización de análisis genéticos y morfológicos más detallados para determinar el grado de diferenciación y origen de la población establecida en las Salinas de Marchamalo (OCU-2).

(8) Es recomendable realizar un seguimiento genético de los *stocks* en cautividad establecidos, al menos, cada tres años. De acuerdo con Schönhuth et al. (2003) la gestión de los grupos en cautividad precisa de este seguimiento.

(9) Es aconsejable iniciar una línea de investigación específica sobre las posibles relaciones entre el estatus genético y el *fitness* de las poblaciones objeto de recuperación con la finalidad de predecir el éxito a largo plazo de las existentes y futuras. Los Ciprinodóntidos en general, incluido *Aphanius iberus*, nos proveen de oportunidades de investigación inexistentes en otras especies en peligro de extinción (Meffe & Vrijenhoek 1988), las cuales presentan dificultades enormes en su manipulación científica.

### **Referencias Bibliográficas**

- Allendorf FW. 1994. Genetically effective Sizes of Grizzly Bear Populations. En: *Principles of Conservation Biology*. Meffe GK & CR Carroll (Eds). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Avise JC & JL Hamrick. 1996. *Conservation Genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall (Eds). New York.
- Bernardi G, C Fernández-Delgado, M Gómez-Chiarri & DA Powers. 1995. Origin of a Spanish population of *Fundulus heteroclitus* inferred by cytochrome b sequence analysis. *Journal of Fish Biology* 47: 737-740.
- Bowles ML & CJ Whelan (Eds). 1994. *Restoration of endangered species. Conceptual issues, planning and implementation*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Brook BW, DW Tonkyn, JJ O'Grady & R Frankham. 2002. Contribution of Inbreeding to Extinction Risk in Threatened Species. *Conservation Ecology* 6(1): art. 16.
- Caballero A. 1994. Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* 73: 657-679.
- Caughley G. 1994. Directions in Conservation Biology. *Journal of Animal Ecology* 63: 215-244.
- Clarck JA, JM Hoekstra, PD Boersma & P Kareiva. 2002. Improving US Endangered Species Act Recovery Plans: Key Findings and Recommendations of the SCB Recovery Plan Projects. *Conservation Biology* 16(6): 1510-1519.

- Cronin MA. 1993.** Mitochondrial DNA in wildlife taxonomy and conservation biology: cautionary notes. *Wildlife Society Bulletin* 21: 339-348.
- Crozier RH. 1992.** Genetic diversity and the agony of choice. *Biological Conservation* 61: 11-15.
- Crozier RH & RMC Kusmierski. 1994.** Genetic distances and the setting of conservation priorities. En: *Conservation Genetics*. Loeschcke V & S Jain (Eds). Basel, Birkhauser.
- Darwin Ch. 1859.** *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. (6<sup>th</sup> Edition, 1972) Murray, London.
- Deacon JE & WL Minckley. 1991.** Western Fishes and the real world: The Enigma of *Endangered Species* Revisited. En: *Battle Against Extinction. Native Fish Management in the American West*. Minckley WL & JE Deacon (Eds). The University of Arizona Press. Arizona.
- Deacon JE & CD Williams. 1991.** Ash Meadows and the legacy of the Devil's Hole pupfish. 69-91. En: *Battle Against Extinction. Native Fish Management in the American West*. Minckley WL & JE Deacon (Eds). The University of Arizona Press. Arizona.
- Doadrio I (Ed). 2002.** *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza y Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.
- Doadrio I, JA Carmona & C Fernández-Delgado. 2002.** Morphometric study of the Iberian *Aphanius* (Actinopterygii, Cyprinodontiformes), with description of a new species. *Folia Zoologica* 51(1): 67-79.
- Doadrio I., A Perdices & A Machordom. 1996.** Allozymic variation of the endangered killifish *Aphanius iberus* and its application to conservation. *Environmental Biology of Fishes* 45: 259-271.
- Dobzhansky Th. 1973.** Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. *The American Biological Teacher* 35: 125-129.
- Dobzhansky Th, F Ayala, GL Stebbins & JM Valentine. 1980.** *Evolución*. Ediciones Omega SA (Eds). Barcelona.
- Dunham JB & WL Minckley. 1998.** Allozymic variation in desert pupfish from natural and artificial habitats: Genetic conservation in fluctuating populations. *Biological Conservation* 84: 7-15.
- Echelle AA. 1991.** Conservation genetics and genic diversity in freshwater fishes of North America. En: *Battle against Extinction. Native Fish Management in the American West*. Minckley WL & JE Deacon (Eds). The University of Arizona Press. Tucson, Arizona.
- Echelle AA & TE Dowling. 1992.** Mitochondrial DNA variation of the Death Valley pupfish (*Cyprinodon*, Cyprinodontidae). *Evolution* 46: 193-206.
- Ehrenfeld DW. 1991.** The management of Diversity: *A Conservation paradox*. En: *Ecology, Economics, Ethics: The broken Circle*. Bormann FH & SR Kellert (Eds). Yale University Press. New Haven.
- Erwin TL. 1991.** An evolutionary basis for conservation strategies. *Science* 253: 750-752.
- Excoffier L, P Smouse & J Quattro. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- FAO/PNUMA. 1984.** *Conservación de los recursos genéticos de los peces: problemas y recomendaciones. Informe de la consulta de expertos sobre recursos genéticos de los peces*. Documento Técnico de Pesca, Vol. 217. FAO, Roma.
- Felsenstein J. 1993.** PHYLIP (Phylogenetic inference package) Version 3.5.5. Seattle.
- Ferguson A, JB Taggart, PA Prodöhl, O McMeel, C Thompson, C Stone, P McGinnity & RA Hynes. 1995.** The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special referente to *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology* 47: 103-104.
- Fernández-Delgado C, I Doadrio, JA González-Carmona, M Torralva, C García-Utrilla, FJ Oliva-Paterna, JC Gutiérrez, R Martínez, C Arribas, D García, P Guarnizo, E Salvatierra,**



- MT Saldaña & A Gómez. 1998. *Localización, Estado de Conservación y Plan de Recuperación de las poblaciones de Lebias ibera en la Comunidad Autónoma Andaluza*. Documento Técnico final. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Fernández-Pedrosa V. 1997. *Estudio de la Variabilidad genética del Fartet, Aphanius iberus (Val. 1846), y del Samaruc Valencia hispanica (Val. 1846), en poblaciones de la Comunidad Valenciana*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Valencia.
- Fernández-Pedrosa V, A González, M Planelles, A Moya & A Latorres. 1995. Mitochondrial DNA variability in three Mediterranean populations of *Aphanius iberus*. *Biological Conservation* 72: 251-256.
- Frankel OH. 1974. Genetic Conservation: our evolutionary responsibility. *Genetics* 78: 53-65.
- Frankham R. 1995. Conservation Genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 305-327.
- Frankham R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 12: 665-675.
- García-Marín JL & C Plá. 1997. Bases genéticas para la conservación del fartet. *Trofeo Pesca* 53: 52-55.
- García-Marín JL & C Plá. 1999. Conservación de la Diversidad Genética en el Fartet, *Lebias ibera*. En: *Peces Ciprinodóntidos Ibéricos: Fartet y Samaruc. Monografía*. Planelles M (Coord). Generalitat Valenciana. Valencia.
- García-Marín JL, A Vila & C Plá. 1990. Genetic variation in the Iberian toothcarp, *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes). *Journal of Fish Biology* 37: 233-234.
- González A, V Fernández-Pedrosa & A Latorre. 1999. Estudio genético de las poblaciones del Samaruc (Valencia hispanica) basado en DNA mitocondrial. Propuesta de medidas para su conservación. En: *Peces Ciprinodóntidos Ibéricos: Fartet y Samaruc. Monografía*. Planelles M (Coord). Generalitat Valenciana. Valencia.
- Harrison TD, AEL Ramm & EC Cerff. 1986. A low-cost effective trap for use in sampling aquatic fauna. *Aquaculture* 58: 145-149.
- Hedrick PW. 2001. Conservation Genetics: Where are we now? *TRENDS in Ecology and Evolution* 16: 629-636.
- Hedrick PW & ST Kalinowski. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review in Ecology and Systematics* 31: 139-160
- Hedrick PW, RM Parker & RN Lee. 2001. Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and Mus in the endangered Sonoran topminnow. *Molecular Ecology* 10: 1399-1412.
- Hendrickson DA & JE Brooks. 1991. Transplanting Short-lived Fishes in North American Deserts: Review, Assessment and Recommendations. En: *Battle Against Extinction. Native Fish Management in the American West*. Minckley WL & JE Deacon (Eds). The University of Arizona Press. Arizona.
- Hickman CP, LS Roberts & A Larson. 2002. *Principios Integrales de Zoología*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. España.
- Hunter ML. 1996. *Fundamentals of Conservation Biology*. Blackwell Science. Cambridge, Massachusetts.
- Hurt C & PW Hedrick. 2004. Conservation genetics in aquatic species: General approaches and case studies in fishes and spongsnails of arid lands. *Aquatic Science* 66: 402-413.
- Landweber LF & AP Dobson. 1999. *Genetics and the extinction of species*. Princeton University Press (Ed). Princeton, New Jersey.
- Leberg PL. 1990. Genetic considerations in the design of the introduction programs. *Transaction of the North American Wildlife and natural Resources Conference* 55: 609-619.
- Leberg PL. 1991. Effects of genetic variation on the growth of fish populations: Conservation Implications. *Journal of Fish Biology* 37 (Suppl.A): 193-195.
- Leberg PL. 1992. Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* 46: 477-494.

- Leberg PL. 1993.** Strategies for Population Reintroduction: Effects of Genetic Variability on Population Growth and Size. *Conservation Biology* 7(1): 194-199.
- Machordom A & Al Perdices. 2002.** Genética de Conservación en los Peces Continentales Españoles. En: *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. Doadrio I (Ed). Dirección General de Conservación de la Naturaleza y Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.
- Maltagliati F. 1998a.** Allozyme differences between two endangered Mediterranean Killifishes, *Aphanius iberus* and *A. fasciatus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Italian Journal of Zoology* 65: 303-306.
- Maltagliati F. 1998b.** Does the Mediterranean Killifish *Aphanius fasciatus* (Teleostei: Cyprinodontidae) fit the one-dimensional stepping-stone model of gene flow? *Environmental Biology of Fishes* 53: 385-392.
- Maltagliati F. 1998c.** A preliminary investigation of allozyme genetic variation and population geographical structure in *Aphanius fasciatus* from Italian brackish-water habitats. *Journal of Fish Biology* 52: 1130-1140.
- Maltagliati F. 1999.** Genetic divergence in natural populations of the Mediterranean brackish-water killifish *Aphanius fasciatus*. *Marine Ecology Progress Series* 179: 155-162.
- Maltagliati F. 2002.** Genetic monitoring of brackish-water populations: the Mediterranean toothcarp *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) as a model. *Marine Ecology Progress Series* 235: 257-262.
- Margalef R. 1990.** *Ecología*. Ediciones Omega SA (Ed). Barcelona.
- Mayr E. 1982.** *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution and Inheritance*. Harvard University Press (Ed). Cambridge, Massachusetts.
- Meffe GK. 1986.** Conservation Genetics and the Management of Endangered Fishes. *Fisheries* 11(1): 14-23.
- Meffe GK. 1990.** Genetic approaches to conservation of rare fishes: examples from North American desert fishes. *Journal of Fish Biology* 37 (Suppl.A): 105-112.
- Meffe GK. 1987.** Conserving fish genomes: Philosophies and practices. *Environmental Biology of Fishes* 18: 3-9.
- Meffe GK & RC Vrijenhoek. 1988.** Conservation Genetics in the management of desert fishes. *Conservation Biology* 2: 157-169.
- Meffe GK & CR Carroll. 1994.** *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates, INC. Sunderland, Massachusetts.
- Meffe GK & CR Carroll. 1997.** *Principles of Conservation Biology* (2nd Edition). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Minckley WL. 1995.** Translocation as a tool for conserving imperiled fishes: Experiences in western United States. *Biological Conservation* 72: 297-309.
- Minckley WL & JE Deacon (Eds). 1991.** *Battle against Extinction. Native Fish Management in the American West*. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona.
- Moran P. 2002.** Current conservation genetics: building an ecological approach to the synthesis of molecular and quantitative genetic methods. *Ecology of Freshwater Fish* 11: 30-55.
- Moritz C. 1994.** Defining "Evolutionarily Significant Units" for Conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9 (10): 373-375.
- Moritz C. 1995.** Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philos. Transactions of the Royal Society of London* 349: 113-118.
- Moritz C. 1999.** Conservation Units and Translocation: strategies for conserving evolutionary process. *Hereditas* 130: 217-228.
- Morris C. 1992.** *Academic Press Dictionary of Science and Technology*. Academic Press (Ed). San Diego, California.
- Moyle LC, JR Stinchcombe, BR Hudgens & WF Morris. 2003.** Conservation Genetics in the recovery of endangered animal species: a review of US endangered species recovery plans (1977-1998). *Animal Biodiversity and Conservation* 26(2): 85-95.





- Nei M. 1972.** Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-292.
- Nevo E. 1978.** Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical in Population Biology* 13: 121-177.
- Nevo E & A Beiles. 1991.** Genetic diversity and ecological heterogeneity in amphibian evolution. *Copeia* 1991: 565-592.
- Nevo E, A Beiles & R Ben-Shlomo. 1984.** The evolutionary significance of genetic diversity: Ecological, demographic and life history correlates. *Lecture Notes in Biomathematics* 53: 13-213.
- O'Brien SJ & E Mayr. 1991.** Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies. *Science* 251: 1187-1188.
- Packer C, AE Pusey, H Rowely, DA Gilbert, J Martenson & SJ O'Brien. 1991.** Case study of a population bottleneck: Lions of the Ngorongoro Crater. *Conservation Biology* 5: 219-237.
- Parker KM, RJ Sheffer & PW Hedrick. 1999.** Molecular Variation and Evolutionarily Significant Units in the Endangered Gila Topminnow. *Conservation Biology* 13(1): 108-116.
- Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F. y J. Britton-Davidian. 1987.** *Manual technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Collection Technique et Documentation, Lavoisier. Paris.
- Peakall R & MA Sydes. 1996.** Defining priorities for achieving practical outcomes from the genetic studies of rare plants. En: *Back from the Brink: refining the threatened species recovery process*. Stephens S & S Maxwell (Eds). Surrey Beatty and Sons, Sydney.
- Perdices A. 1997.** *Filogenia y Evolución molecular de la familia Cobitidae en Europa*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Perdices A, A Machordom & I Doadrio. 1996.** Allozymic variation and relationships of the endangered cyprinodontid genus *Valencia* and its implications for conservation. *Journal of Fish Biology* 49: 1112-1127.
- Perdices A, JA Carmona, C Fernández-Delgado & I Doadrio. 2001.** Nuclear and mitochondrial data reveal high genetic divergence among Atlantic and Mediterranean populations of the Iberian killifish *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Heredity* 87: 314-324.
- Philippart JC. 1995.** Is captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? *Biological Conservation* 72: 281-295.
- Planelles M (Coord). 1999.** *Peces Ciprinodóntidos Ibéricos: Fartet y Samaruc*. Monografía. Generalitat Valenciana. Valencia.
- Primack RB. 1998.** *Essentials of Conservation Biology*. Sinauer Associates (Ed). Sunderland, Massachusetts.
- Primack RB & J Ros. 2002.** *Introducción a la biología de la Conservación*. Editorial Ariel SA (Ed). Barcelona.
- Pullin AS. 2002.** *Conservation Biology*. Cambridge University Press (Ed). Cambridge.
- Quattro JM & RC Vrijenhoek. 1989.** Fitness differences among remnant populations of the endangered Sonoran topminnow. *Science* 245: 976-978.
- Quattro JM, PL Leberg, ME Douglas & RC Vrijenhoek. 1996.** Molecular evidence for a unique evolutionary lineage of endangered Sonoran desert fish (Genus *Poeciliopsis*). *Conservation Biology* 10: 128-135.
- Rojas M. 1992.** The Species Problem and Conservation : What are we protecting? *Conservation Biology* 6: 170-178.
- Ryder OA. 1986.** Species Conservation and Systematics: the Dilemma of Subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* 1(1): 9-10.
- Schneider S, JM Kueffer, D Roesli & L Excoffier. 1997.** *Arlequin ver 1.1: a software for population genetic data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.

- Schönhuth S, J Domínguez & I Doadrio. 1999. *Variabilidad genética de cinco poblaciones de Fartet (*Aphanius iberus*) en la Comunidad Autónoma de Murcia*. Documento Técnico. Museo de Ciencias Naturales de Madrid. Madrid.
- Schönhuth S, G Luikart & I Doadrio. 2003. Effects of a founder event and supplementary introductions on genetic variation in a captive breeding population of the endangered Spanish killifish. *Journal of Fish Biology* 63: 1538-1551.
- Selander RK, MH Smith, SY Yang, WE Johnson & JB Gentry. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in genetics VI. University of Texas Publications* 7103: 49-90.
- Shaffer HB & F Breden. 1989. The relationship between allozyme variation and life history: Non-transforming salamanders are less variable. *Copeia* 1989: 1016-1023.
- Slatkin M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Soulé ME & BA Wilcox. 1980. *Conservation Biology. An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer Associates, Inc (Eds). Sunderland, Massachusetts.
- Stearns SC. 1976. Life-history tactics: a review of the ideas. *O. Review in Biology* 51(1): 3-47.
- Stearns SC. 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press. New York.
- Stinchcombe JR, LC Moyle, BR Hudgens, PL Bloch, S Chinnadural & WF Morris. 2002. The influence of the academic conservation biology literature on endangered species recovery planning. *Conservation Ecology* 6(2): art. 15.
- Stockwell CA, M Mulvey & AG Jones. 1998. Genetic evidence for two evolutionarily significant units of White Sands pupfish. *Animal Conservation* 1: 213-225.
- Storfer A. 1999. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biological Conservation* 87: 173-180.
- Swofford DL & RB Selander. 1989. *BIOSYS-1. A Computer Program for the analysis of allelic variation in population genetics*. Illinois Natural History Survey. Current release BYOSYS-2 modified by Black WC (1997).
- Templeton AR. 1986. Coadaptation and outbreeding depression. En: *Conservation Biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates Inc (Eds). Sunderland, Massachusetts.
- Templeton AR. 1994. Coadaptation, Local Adaptation and Outbreeding Depression. En: *Principles of Conservation Biology*. Meffe GK & CR Carroll (Eds). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Turner JT. 1984. Evolutionary genetics of artificial refugium populations of an endangered species, the Desert Pupfish. *Copeia* 1984: 364-369.
- Van Valen L. 1965. Morphological variation and width of ecological niche. *The American Naturalist* 99: 377-390.
- Vrijenhoek RC. 1998. Conservation Genetics of Freshwater Fish. *Journal of Fish Biology* 53(Suppl. A): 394-412.
- Vrijenhoek RC, ME Douglas & GK Meffe. 1985. Conservation Genetics of endangered fish populations in Arizona. *Science* 229: 400-402.
- Waples RS. 1991. Pacific salmon, *Oncorhynchus spp.*, and the definition on the *Species* under the Endangered Species Act. *Marine Fisheries Review* 53(3): 11-22.
- Waples RS. 1995. Evolutionarily Significant Units and the Conservation of Biological Diversity under Endangered Species Act. *American Fisheries Society Symposium* 17: 8-27.
- Ward RD, DO Skibinski & M Woodwark. 1992. Protein Heterozygosity, protein structure and taxonomic differentiation. *Evolutionary Biology* 26: 73-159.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.

