

LA HISTORIA EVOLUTIVA DE UN COMPLEJO HÍBRIDO DE PECES DEL GÉNERO *SQUALIUS* BONAPARTE, 1837 (ACTINOPTERYGII: CYPRINIDAE) EN EL PARQUE NACIONAL DE CABAÑEROS

DIUSHI KERI CORONA-SANTIAGO¹, IGNACIO DOADRIO²

RESUMEN

Los vertebrados poliploides como consecuencia de hibridación interespecífica son poco frecuentes en la naturaleza, pero han sido objeto de numerosos estudios por su significado evolutivo y por el papel que juegan en la formación de nuevas especies. En la Península Ibérica se conoce un complejo de peces híbrido y endémico, perteneciente a la familia *Cyprinidae*, que presenta individuos con diferentes ploidías y sistemas de reproducción, denominado complejo "*Squalius alburnoides*". Además de este complejo híbrido, recientemente se encontró en el río Estena, dentro del Parque Nacional de Cabañeros, individuos que por su morfología y dotación cromosómica podrían pertenecer a un nuevo complejo híbrido que viviría en simpatria con "*Squalius alburnoides*". En este estudio realizamos un exhaustivo esfuerzo de muestreo para determinar la distribución del nuevo complejo utilizando marcadores mitocondriales y nucleares, y para estimar su estructura genética y divergencias, con el objetivo de entender su historia evolutiva. Corroboramos que efectivamente se trata de un nuevo complejo híbrido compuesto por machos y hembras triploides que presentan un genoma único (R) cuyo origen está en una especie ya extinguida del género *Squalius*. Nuestros análisis indican que esta especie del género *Squalius* (*Squalius* sp.) sería un grupo hermano de los microendemismos del suroeste de Portugal: *Squalius aradensis* y *Squalius torgalensis*. Los resultados sugieren que el complejo "*Squalius* sp." podría tener su origen en un evento de hibridación acaecido en los últimos 700 000 años. La información genética obtenida en este trabajo refleja la necesidad de aplicar programas eficientes de conservación, así como una descripción formal del nuevo complejo híbrido.

Palabras clave: Poliploidización, complejos híbridos, Parque Nacional de Cabañeros, *Squalius*, historia evolutiva.

¹ Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. c/ José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid, Spain. Tfno.: +34 914111328 ext 1118. Email: diushi.keri.c@gmail.com

² Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. c/ José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid, Spain. Tfno.: +34 914111328 ext 1118. Email: doadrio@mncn.csic.es

EVOLUTIONARY HISTORY OF A HYBRID COMPLEX OF FISH OF THE GENUS *SQUALIUS* BONAPARTE, 1837 (ACTINOPTERIGII CYPRINIDAE) IN CABAÑEROS' NATIONAL PARK

ABSTRACT

Polyploidy in vertebrates shows low frequency in nature. It usually arises as consequence of interspecific hybridization. Polyploidy has been the focus of many evolutionary studies due to its key role in speciation processes. There is a hybrid fish complex endemic to the Iberian Peninsula, called the *Squalius alburnoides* complex, in which individuals show different levels of polyploidy and different reproductive systems. Besides and based on morphology and chromosomal dotation, a new hybrid complex was recently found in the Estena River (within the National Park of Cabañeros) that could be in sympatry with the *Squalius alburnoides* complex. In this study we have carried out a thorough sampling effort in order to, 1) determine the distribution of this new complex through mitochondrial and nuclear markers; 2) define its genetic structure and divergence time, in order to understand their evolutionary history. We confirm *Squalius* sp. as a new hybrid complex comprised by polyploidy males and females with a genome R that represents an unknown ancestral species with high genetic divergences with respect to its sister groups in the south of Portugal. Our results suggest that the complex could have suffered at least one event of hybridization in the last 700 000 year. The genetic information obtained in this work reflects the necessity to apply efficient programs for conservation, as well as a formal description of the new complex hybrid.

Keywords: Polyploidization, hybrid complex, Cabañeros National Park, *Squalius*, evolutionary history.

INTRODUCCIÓN

La hibridación es un fenómeno que aparece en la mayoría de las especies animales de todo el mundo, aunque es raro en vertebrados, si exceptuamos a las especies de grupos como los peces que presentan fertilización externa (CUNHA et al., 2011). Sin embargo, la formación de nuevas especies ha sido explicada habitualmente por procesos de aislamiento reproductivo en simpatria o alopatría y muy poca atención se ha mostrado por la hibridación como generadora de nuevas especies, probablemente debido a que la hibridación suele ser considerada como un «cul de sac» evolutivo (BAACK & RIESEBERG, 2007; ABBOTT et al., 2013). La hibridación en los peces, es un pro-

ceso común por el alto número de especies con fertilización externa, pero suele dar lugar a híbridos estériles (MALLETT, 2008). Se conoce que familias de peces como los salmónidos y catostómidos o especies individuales como *Poecilia formosa* (Girard, 1859) o *Squalius alburnoides* (Steindachner, 1866) tienen su origen en fenómenos de hibridación por alopoliploidía, que da lugar a la duplicación de todo su genoma (LEGGATT & IWAMA, 2003). Entre los peces, el calandino (*Squalius alburnoides*) es probablemente el complejo híbrido mejor conocido. Este complejo es endémico del occidente de la Península Ibérica y presenta individuos diploides ($2n = 50$), triploides ($3n = 75$) y tetraploides ($4n = 100$) con una alta proporción de hembras triploides ($3n$) (CUNHA

et al., 2011). El complejo *S. alburnoides* utiliza varios modos de reproducción dependiendo de la configuración gamética (haploide o diploide) resultante de la ploidia de las hembras (di- tri- o tetraploides), aunque en todos los casos utiliza como modo de reproducción la hibridogénesis (ALVES et al., 2001; PALA & COEHL, 2005; CRESPO-LÓPEZ et al., 2006). El uso de la hibridogénesis hace que se mantenga intacta una parte del genoma (el genoma «A») que se hereda de generación en generación, y que corresponde a una especie ya extinguida de la subfamilia Alburninae Girard 1858 (CRESPO-LÓPEZ et al., 2006, ROBALO et al., 2006). En el río Estena perteneciente a la cuenca del río Guadiana, y dentro del Parque Nacional de Cabañeros, se encontraron individuos poliploides, con morfología diferente al complejo *Squalius alburnoides*, y que podrían pertenecer a un nuevo complejo híbrido que coexistiría con *S. alburnoides* en el mismo área de distribución (CUNHA & DOADRIO, 2009). Este complejo llamado *Squalius* sp. estaría compuesto principalmente por hembras triploides, desconociéndose sus relaciones con el complejo *S. alburnoides* (CUNHA & DOADRIO, 2009). Los individuos del complejo *Squalius* sp. presentan rasgos morfológicos característicos como escamas grandes, mal imbricadas y fácilmente caedizas, así como diferencias en la coloración, que dan lugar a su nombre común de calandino dorado (Doadrío, 2011). La única información genética existente sobre este complejo fue basada en la secuenciación del gen mitocondrial citocromo b y de un intrón del gen nuclear S7 (CUNHA & DOADRIO, 2009). Los resultados de CUNHA & DOADRIO (2009) mostraron que el complejo *Squalius* sp. utiliza las mismas estrategias reproductivas que *S. alburnoides* y que su origen fue un fenómeno antiguo de hibridación entre hembras del endemismo ibérico *Squalius pyrenaicus* y machos de una especie ya extinguida del género *Squalius*. Por tanto, los complejos *S. alburnoides* y *Squalius* sp tienen el mismo origen

materno en la especie *Squalius pyrenaicus*, endémica del centro y sur de la Península Ibérica. Sin embargo, el antiguo proceso de hibridación se realizó en ambos complejos con machos de diferentes especies hoy día extinguidas, en el caso de *S. alburnoides* con un alburnino y en el de *Squalius* sp con un leuciscino. Al genoma de *S. pyrenaicus* se le viene llamando genoma «P», al genoma del alburnino exclusivo de *S. alburnoides* genoma «A» y al genoma del leuciscino exclusivo de *Squalius* sp. genoma «R». Este genoma «R» está relacionado con las especies *S. torgalensis* y *S. aradensis* endémicas de una pequeña región del suroeste de Portugal.

En este estudio se pretende conocer la extensión geográfica de *Squalius* sp. y su estructura poblacional así como datar su origen, y relaciones con el complejo *Squalius alburnoides* mediante la secuenciación de genes mitocondriales y nucleares. Además, se estudia la adecuación de su hábitat en proyecciones al presente, pasado y futuro, para realizar estrategias adecuadas de conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo y extracción de ADN

Para conocer la distribución geográfica del complejo *Squalius* sp. se muestrearon 52 afluentes del curso medio de la Cuenca del Guadiana (Fig. 1), de acuerdo al conocimiento previo sobre su distribución (DOADRIO, 2011). En estas localidades también se recogieron muestras de *S. alburnoides* debido a la dificultad que pudiera entrañar la determinación morfológica entre los individuos de *S. alburnoides* y *Squalius* sp. por la variedad de morfotipos existentes en ambos complejos (CUNHA et al., 2011; DOADRIO, 2011). En todos los casos se obtuvieron muestras de un pequeño trozo de la aleta caudal que se almacenaron en alcohol absoluto y fueron depositados en la colección de Tejidos

y ADN del Museo Nacional de Ciencias Naturales (DNA_MNCN_CSIC). Algunos ejemplares enteros de cada localidad fueron sacrificados por sobredosis de MS222 y se ingresaron en la colección de ictiología del Museo Nacional de

Ciencias Naturales (I_MNCN_CSIC) para estudios morfológicos posteriores. Las autorizaciones para la captura de los ejemplares fueron obtenidas de las administraciones regionales de Castilla La Mancha y Extremadura.

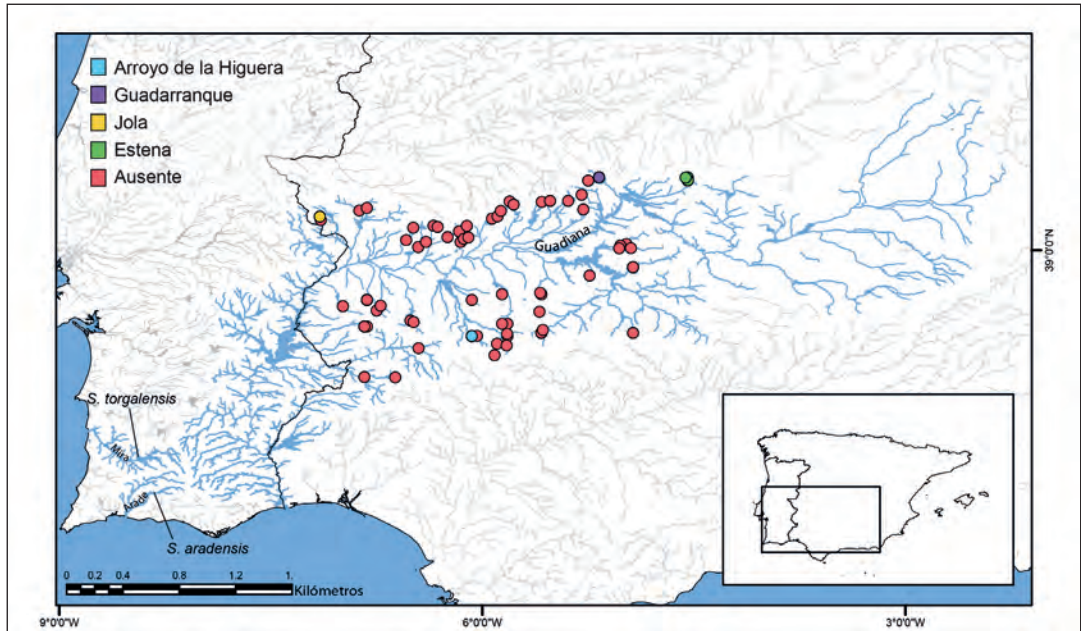


Fig. 1. Localidades de muestreo y actual distribución del complejo *Squalius* sp en la cuenca del Guadiana.

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemania) y según el protocolo del fabricante. Se estudiaron dos marcadores moleculares, la secuencia completa del gen mitocondrial citocromo b (*cytb*) y el primer intrón del gen nuclear *S7*. El *cytb* se amplificó con los cebadores y protocolos descritos en (PERDICES *et al.*, 2001). Para la amplificación del intrón *S7* se diseñaron cebadores específicos para los alelos ortólogos y parálogos con el fin de que pudiéramos discriminar correctamente entre individuos de *Squalius* sp. y *S. alburnoides*. Se realizaron dos aproximaciones siguiendo la metodología de clonación de SAMBROOK *et al.* (1989): (1) se diseñaron

cebadores específicos para los alelos ortólogos correspondientes al genoma R de *Squalius* sp, y (2) se obtuvieron cebadores para los parálogos de los genomas resultantes de la hibridación (genoma A de *S. alburnoides* y P de *Squalius pyrenaicus*). Los cebadores utilizados para amplificar el gen *S7* del genoma R fueron: *S7F2tor* con la secuencia F-5'-GTACAAA-ATAAGTAACATTTTCCTCC-3' y *S7R3tor* con la secuencia R-5'-CCCTCACTTTGTTCCAAACCTGAA-3'. El protocolo de amplificación fue: 2 min a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 1,5 min a 52,6°C, 2 min a 72°C y 7 min a 72°C para la extensión final. Cuando la PCR amplifica para el *S7* con estos cebadores, los individuos podrían ser *Squalius*

sp (genoma R) o individuos *S. alburnoides* AP o AAP amplificando sólo el genoma P, pero no el genoma A. Para amplificar el genoma A del S7 se utilizaron los cebadores S7F1 (CHOW & HAZAMA, 1998) y S7albR diseñados en este trabajo con la secuencia R-5'-CATT-TACTAACACTCACTTTGTTCCA-3. Para la amplificación se utilizó el protocolo siguiente: 2 min a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 1,5 min a 54,1°C, 2 min a 72°C, y 7 min a 72°C para la extensión final. El producto total de PCR se envió a secuenciación en Macrogen Inc. (Países Bajos) para sus análisis posteriores.

Diversidad y estructura genética

Para todas las poblaciones del complejo *Squalius* sp. y para ambos marcadores moleculares se estudiaron los parámetros básicos de variabilidad genética con el programa DNAsp v 5.0 (LIBRADO & ROZAS, 2009): diversidad de haplotipos h , diversidad de nucleótidos π y números de haplotipos H . Para el S7 se determinaron los diferentes haplotipos que tenían InDels (inserciones o deleciones) y se realizó una prueba de recombinación usando DNAsp v 5.0 con un algoritmo de coalescencia y 1000 repeticiones. Además, se estimaron distancias genéticas no corregidas (p) para ambos marcadores moleculares utilizando el método de deleciones por pares, para no eliminarlas. La estructura genética dentro del complejo se determinó usando el Análisis de la Variación Molecular AMOVA con el programa ARLEQUIN v 3.5.1.3 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

Inferencia filogenética y red de haplotipos

Las reconstrucciones de los árboles se realizaron utilizando dos análisis independientes para ambos marcadores moleculares: Inferencia Bayesiana (ML) y Máxima Verosimilitud

(ML). El modelo de sustitución más adecuado para nuestros datos se obtuvo en JModeltest v 1.1.6 (DARRIBA *et al.*, 2012). El modelo General Reversible por el Tiempo (TAVARÉ, 1986) + proporción de sitios Invariable (GTR + I) fue seleccionado para el *cytb* y el modelo General Reversible por el Tiempo + una distribución gamma (GTR + GAMMA) lo fue para el S7. El análisis de ML se implementó en RAxMLGUI v. 1.3.1 (STAMATAKIS, 2006; SILVESTRO & MICHALAK, 2012) con 10000 réplicas de bootstrap. Para el análisis de BI, utilizamos el software MrBayes v. 3.2.6 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) realizando 4 MCMC durante 5.000.000 generaciones y muestreando cada 100 generaciones. Para conocer las relaciones de parentesco filogenético de *Squalius* sp con las otras especies del género *Squalius* y otros miembros de la subfamilia Leuciscinae se incluyeron algunas secuencias del GenBank.

Tanto para el *cytb* como para el S7 se construyeron redes de haplotipos usando TCS v 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000). Para ver el número de haplotipos compartidos entre especies y el número de mutaciones que separan al complejo *Squalius* sp. se incluyeron individuos de *S. alburnoides* y *S. pyrenaicus* en las redes realizadas con el *cytb*.

Estimas de los tiempos de divergencia entre genomas

El cálculo de los tiempos de divergencia entre los genomas que tiene *Squalius* sp. y el de su grupo hermano se realizó independientemente para el *cytb* y el S7 utilizando el software BEAST v 1.8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2007). Se incluyeron las mismas secuencias que para el análisis filogenético lo que permitió realizar una calibración del reloj molecular basada en el registro fósil. Se incluyeron dos registros fósiles uno que corresponde al nodo basal

del género *Squalius* datado, aproximadamente en 13 Ma durante el Mioceno (para ambos marcadores moleculares), y el segundo se estableció en el nodo basal del género *Scardinius* datado también en el Mioceno hace aproximadamente 10 Ma (MACHORDOM & DOADRIO, 2001; CUNHA et al., 2002; DOADRIO & CARMONA, 2003). Para la calibración del reloj molecular del gen mitocondrial, se incluyó una tasa de mutación de 0,76%-2,2% de divergencia por millón de años entre linajes, que ha sido estimada para diferentes grupos de peces (Zardoya y Doadrio, 1999). Para las regiones *S7* y *cytb*, se realizaron respectivamente 80.000.000 y 60.000.000 millones de generaciones y muestreando cada 1.000 árboles. En ambos análisis, Tracer v 1.5 se implementó para evaluar el tamaño efectivo de muestra (ESS) para los parámetros posteriores. El Árbol de Máxima Credibilidad fue construido descartando el 10% p de estados en cada análisis.

Predicción de nichos ecológicos para *Squalius* sp. en diferentes períodos de tiempo

La modelización del hábitat más adecuado para el complejo híbrido *Squalius* sp. se implementó utilizando un enfoque de máxima entropía en MaxEnt v 3.3.3 (PHILLIPS et al., 2006; PHILLIPS & DUDÍK, 2008). Las predicciones se obtuvieron utilizando sólo las variables bioclimáticas disponibles (<http://www.worldclim.org/bioclim>) para el Holoceno Medio, hace unos 6.000 años, y para dos períodos en el futuro (2041-2060 y 2061-2080). La predicción del pasado coincide con el óptimo climático del Holoceno, caracterizado por un clima cálido, pero con una humedad elevada en la Península Ibérica y el Norte de África. El aumento de la pluviosidad supuso un mayor número y volumen de los cuerpos de agua de estas regiones (BARTLEIN et al., 2010). Para

las proyecciones futuras, se analizaron las proyecciones de concentración representativa 6,0 (RCP6,0) (FUJINO et al., 2006) del modelo de clima global 4 (MCG4) (MOSS et al., 2010), expuesto en el quinto informe (AR5) del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) (TAYLOR, et al., 2012). Antes de la modelización, se seleccionaron aquellas variables bioclimáticas no correlacionadas para el clima actual de la Península Ibérica mediante un análisis de correlación en el paquete R v 3.3.3 (R CORE TEAM, 2013). Cuando el coeficiente de correlación de Pearson entre pares fue superior a 0,8 se descartó una de las variables (RISSLER & APODACA, 2007). A continuación, se eliminaron las variables correlacionadas por colinealidad y que dan lugar a un aumento de la Varianza con el paquete VIF, incluido en el paquete HH: Análisis estadístico y presentación de datos del paquete R (HEIBERGER & HOLLAND, 2004). El análisis de Máxima Entropía (MaxEnt) se corrió para las 6 variables bioclimáticas seleccionadas con 5.000 iteraciones y 100 repeticiones de bootstrap con el fin de obtener intervalos de confianza del 95% para cada modelo, valores multiplicadores de regularización de 0,01 a 1 y se evaluaron los valores de las áreas bajo la curva ROC (AUC) usando la tasa de omisión para descartar AUC idénticas con diferentes valores de RM para cada proyección.

RESULTADOS

Sólo se encontraron cuatro puntos de muestreo de los 52 visitados, en la cuenca media del Guadiana, con presencia de individuos de *Squalius* sp. (Figura 1), estos correspondieron a los siguientes afluentes: río Jola (afluente de la cabecera del río Gévora), arroyo de la Higuera (afluente del río Matachel), río Guadarranque (afluente del cauce principal del Guadiana) y río Estena (afluente del río Guadiana en el Parque Nacional de Cabañeros). Se muestrearon 233

individuos de los que 91 (Tabla 1) correspondieron a *Squalius* sp. La población de *Squalius* sp. en la que se encontró un menor número de individuos fue el arroyo de la Higuera con dos ejemplares, mientras que la población con mayor número de ejemplares capturados fue la del río Jola, seguido de la población del río Guadarranque. Cuando se secuenciaron los productos de PCR, el genoma P no apareció en ningún individuo que tuviera el genoma R de *Squalius* sp. Por lo tanto, podemos determinar que las secuencias del genoma P obtenidas en todas las localidades representan individuos de *S. alburnoides* y que el genoma P no está presente en *Squalius* sp.

Cuando se realizó la PCR para amplificar el genoma A en los individuos de *Squalius* sp., se encontraron ejemplares con dos alelos R y ningún alelo A. Además, los individuos triploides de *Squalius* sp. que tenían un alelo con el genoma A pudieron ser determinados cuando los dos alelos del genoma R eran diferentes (heterocigotos) pero no cuando los dos alelos R eran idénticos (homocigotos).

Relaciones filogenéticas y divergencia genética

No se obtuvo recombinación significativa en las secuencias del gen S7. El BI y el ML fueron congruentes respecto a las relaciones filogenéticas observadas (Fig. 2 y Fig. 3). En el árbol filogenético basado en S7 (Fig. 3), se observó que el genoma R de *Squalius* sp. está más relacionado con las especies *S. aradensis* y *S. torgalensis*, mientras que el genoma A encontrado en el *Squalius* sp. está relacionado con el genoma ancestral (A) de *S. alburnoides* cuya especie hermana es *Anaocypris hispanica*. No se encontraron secuencias del S7 relacionadas con el genoma P de *S. pyrenaicus*. Para el S7 las divergencias genéticas estimadas entre el genoma R y *S. aradensis* y *S. torgalensis* fueron del 2,8%. El

genoma A de *Squalius* sp. tuvo una divergencia genética del 1,3% respecto al genoma A de *S. alburnoides*.

El árbol filogenético matrilineal basado en el gen mitocondrial *cytb* sugiere que *Squalius* sp. está estrechamente relacionado con *S. pyrenaicus* y *S. alburnoides*, con una divergencia genética de 0,8% y 0,4%, respectivamente. La distancia genética de *Squalius* sp. respecto a *S. aradensis* y *S. torgalensis* para el *cytb* fue de 10.1% y 11.2% respectivamente.

Tiempos de divergencia para los diferentes genomas

Nuestro análisis demuestra que el linaje mediterráneo del género *Squalius* (sensu SANJUR *et al.*, 2003) en la Península Ibérica se aisló entre el final del Mioceno y el Plioceno (10.1- 3.7Ma) (HPD \geq 95%) (Fig. 2). La separación entre el genoma R, de *Squalius* sp., con respecto al clado en el que se encuentran *S. alburnoides* y *S. pyrenaicus* ocurrió un poco después, entre 8,4 y 2,1 Ma. El genoma R de *Squalius* sp. se aisló de *S. aradensis* y *S. torgalensis* entre el final del Mioceno y principios del Pleistoceno entre 5,9 y 0,5 Ma. Por otra parte, se estimó que el tiempo de divergencia entre el genoma A de *Squalius* sp. respecto al de *S. alburnoides* fue entre el Plioceno y Pleistoceno pero este cálculo puede estar sobrestimado por la cantidad de haplotipos compartidos que se observaron en las redes de haplotipos y la inclusión en los análisis de las inserciones/delecciones.

En el caso de los tiempos de divergencia para el *cytb*, el genoma mitocondrial de *Squalius* sp. se aisló del de *S. pyrenaicus* o *S. alburnoides* durante el Pleistoceno entre 2 y 0.2 Ma (HPD \geq 95%) (Fig. 3), mientras que se separó de los endemismos portugueses *S. aradensis* y *S. torgalensis* en el Mioceno Superior entre 10.5 y 5.6 Ma.

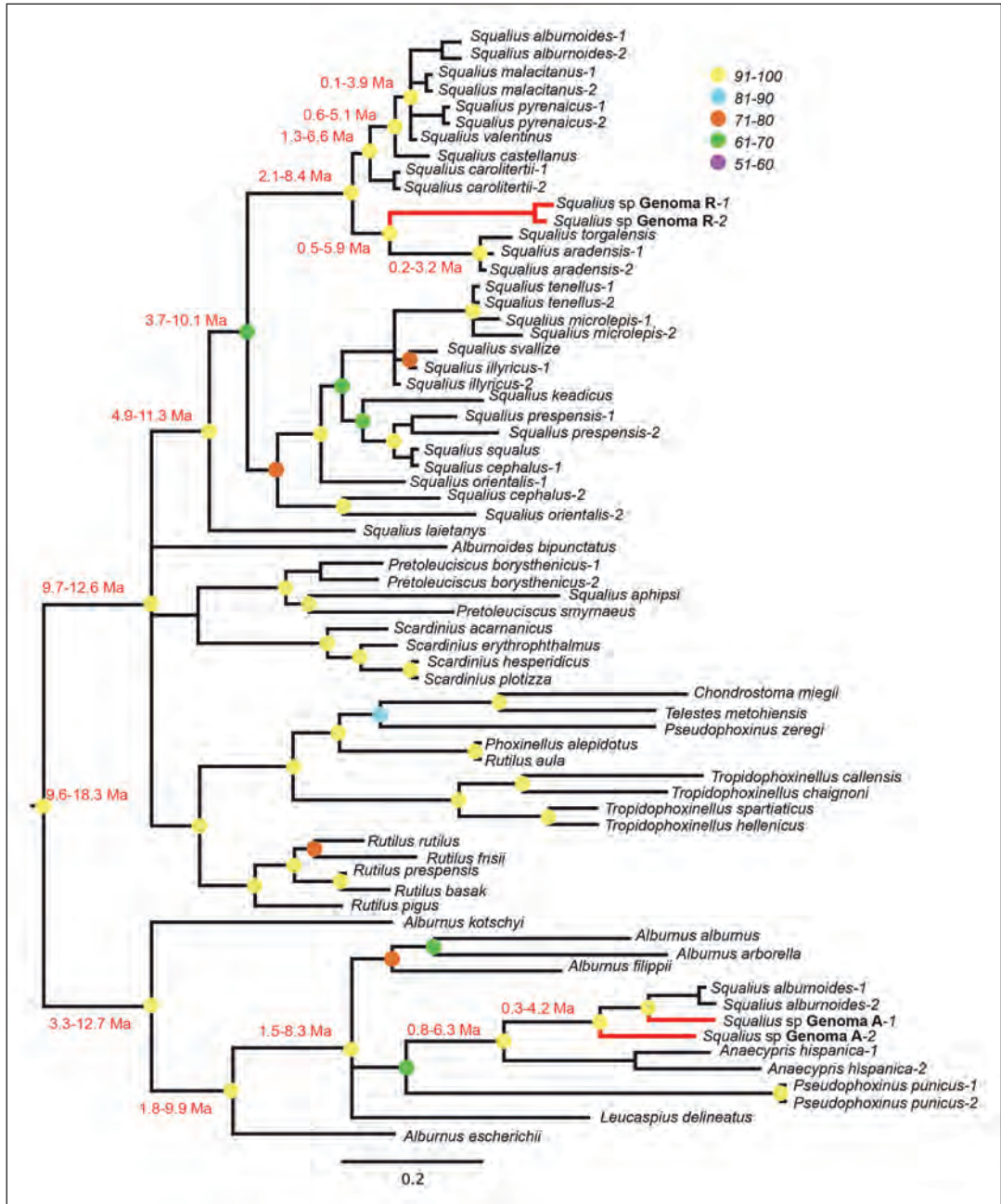


Fig. 2. Árbol de inferencia bayesiana basado en el Intrón S7 del genoma nuclear para la subfamilia Leuciscinae. Los círculos en los nodos representan la probabilidad posterior para el análisis bayesiano. Las ramas rojas indican la posición de los dos diferentes genomas (en negrita) del complejo *Squalius* sp. Los números en rojo son los tiempos de divergencia en millones de años Ma.

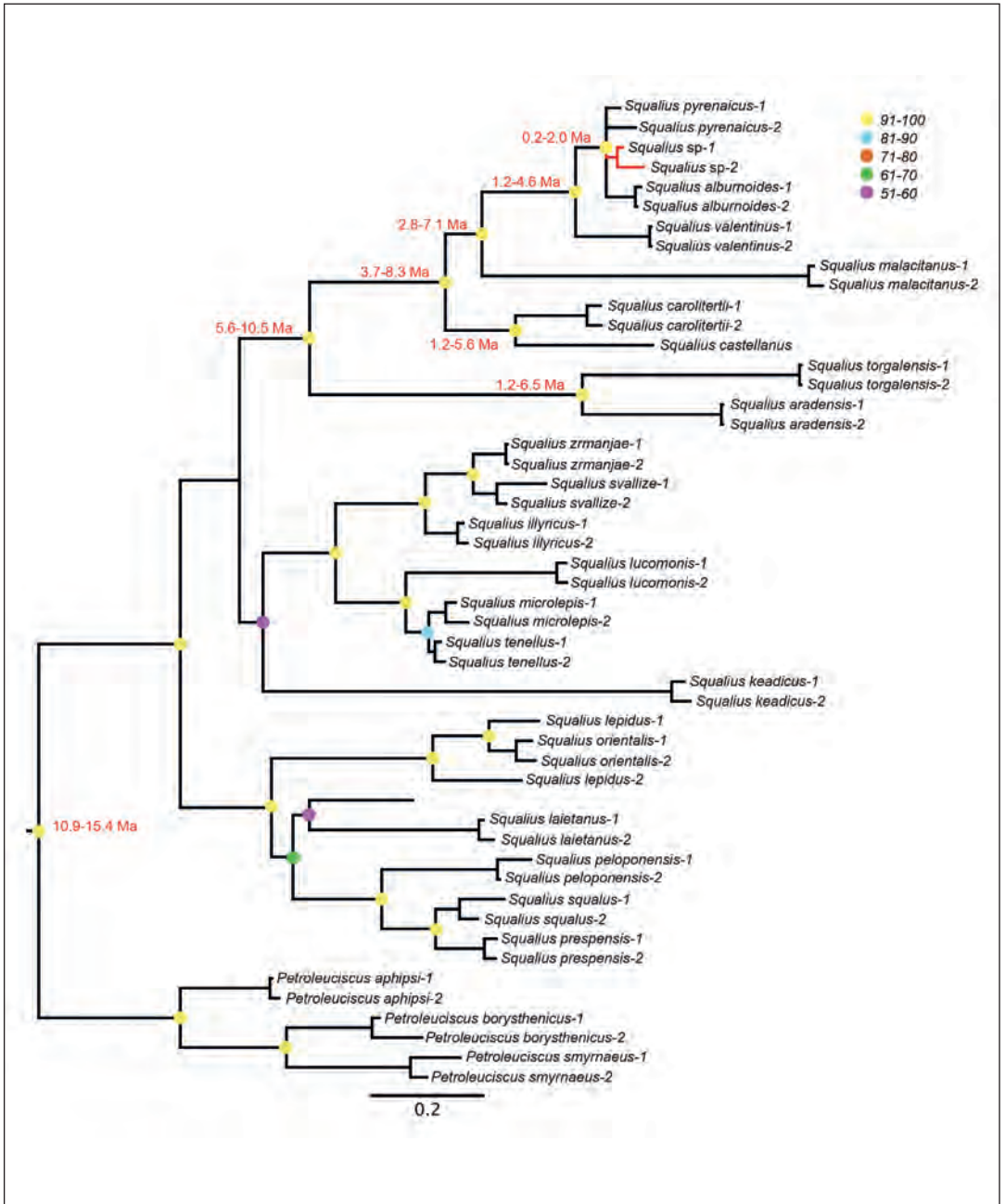


Fig. 3. Árbol de inferencia bayesiano basado en el gen mitocondrial *cytb* para el género *Squalius*. Los círculos en los nodos representan la probabilidad posterior para el análisis Bayesiano. Los números en rojo son los tiempos de divergencia estimados en millones de años Ma.

Diversidad genética y estructura de las poblaciones

Como era esperable la diversidad genética estimada para las cuatro poblaciones de *Squalius* sp. fue menor para el gen nuclear *S7* que para el *cytb* (Tabla 1). El número de haplotipos varió de 1 a 20 para el *cytb*, mientras que fue de 1 a 9 para el *S7*. En el *cytb*, la población con más haplotipos fue la del río Guadarranque con 20 haplotipos para los 27 individuos analizados. Sólo diez haplotipos de *cytb* se observaron en la población del río Jola (n=40), siendo la población con menor diversidad de ha-

plotipos sin tener en cuenta la población del arroyo de la Higuera de la que sólo se capturaron dos ejemplares. En el caso de las secuencias del intrón *S7*, la población con menor diversidad de haplotipos fue también la del río Jola con $H = 0,766$, mientras que el número de haplotipos observados en los ríos Guadarranque (n=20) y Estena (n=14) fue el mismo ($H = 9$). En general, la diversidad nucleotídica fue baja en todas las poblaciones de 0,001 a 0,004 para el *cytb* y de 0,002 a 0,004 para el *S7*. Además, se observaron polimorfismos debido a inserciones o deleciones (InDels) para las secuencias de *S7* en todas las poblaciones de *Squalius* sp.

Tabla 1. Variabilidad genética en el complejo *Squalius* sp. para *cytb/S7*

Población	n	H	h	π	hInDel
Estena	17 20	14 9	0.978 0.889	0.004 0.003	2
Guadarranque	27 28	20 9	0.977 0.838	0.002 0.004	4
Higuera	2 2	1 2	–	–	2
Jola	40 41	10 7	0.746 0.835	0.001 0.002	3

n = Tamaño de la muestra.

H = Número de haplotipos por mutaciones puntuales.

h = diversidad haplotípica.

π = diversidad nucleotídica.

hInDel = haplotipos por inserción o deleción para el *S7*.

La red de haplotipos basada en el *S7* para el genoma R de *Squalius* sp., en las cuatro poblaciones, no mostró una estructura geográfica compartiendo haplotipos entre todas ellas, pero también con presencia de haplotipos únicos en cada población (Figura 4). El mayor número de pasos mutacionales se observó entre un haplotipo de la población del río Guadarranque y un haplotipo del río Jola que son las poblaciones más lejanas geográficamente. El resto de haplotipos se separaron entre 1 y 2 pasos mutacionales.

La red de haplotipos para el *cytb* mostró haplotipos compartidos entre el genoma P de *S. alburnoides* y el de *Squalius* sp., pero no con el genoma P de *S. pyrenaicus*. Como ocurrió en la red de haplotipos del *S7*, no hubo una estructura geo-

gráfica, pero sólo un haplotipo es compartido entre las poblaciones de los ríos Jola y Guadarranque. Al contrario que ocurrió en otras poblaciones de *Squalius* sp. la población del río Jola no compartió haplotipos con *S. alburnoides*. Los haplotipos mitocondriales de *Squalius* sp se diferenciaron entre 1 y 4 pasos mutacionales de *S. pyrenaicus* y *S. alburnoides*.

La estructura genética fue baja pero significativa entre las poblaciones de *Squalius* sp. para ambos marcadores ($\Phi_{ST} = 0,05$ para *S7* y $\Phi_{ST} = 0,31$ para el *cytb*, $p < 0,05$) (Tabla 3). Esto sugiere que la mejor estructura para explicar la variación genética en *Squalius* sp. es cuando sólo se toma en cuenta un único grupo genético, debido a que el porcentaje de variación

fue mayor dentro de las poblaciones que entre ellas. Esta diferenciación genética significativa se estimó, para ambos marcadores, entre la población del río Jola respecto a las poblaciones de los ríos Estena y Guadarranque (Tabla 4). Aunque los valores de Φ_{ST} fueron relativa-

mente altos, no fueron significativos entre las poblaciones del arroyo de la Higuera respecto a las poblaciones de los ríos Estena y Jola. Además, no se observó estructura genética significativa entre las poblaciones de los ríos Estena y Guadarranque.

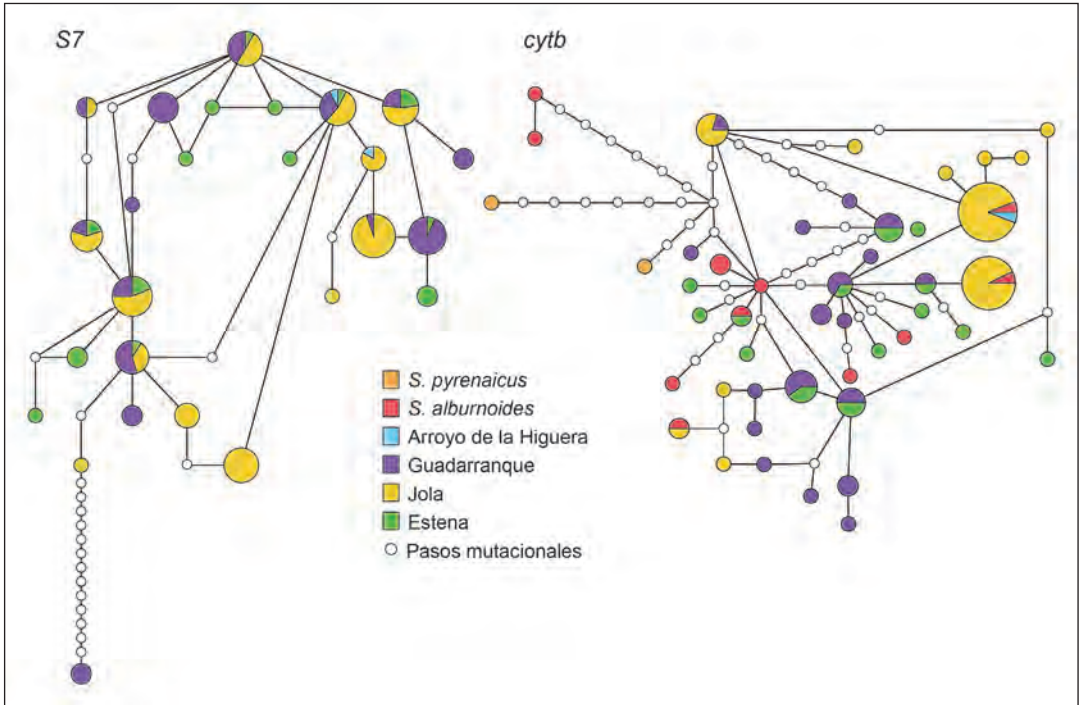


Fig. 4. Redes de haplotipos para el intrón nuclear S7 (izquierda) y para el gen mitocondrial cytb (derecha) para el complejo híbrido *Squalius* sp.

Tabla 3. Analisis molecular de la varianza (AMOVA) para el genoma R basado en el Intrón del gen nuclear S7.

Configuración genética	Φ_{ST}	Variación entre poblaciones	Variación dentro de las poblaciones
S7 Un grupo genético	0.05*	5.0%	95%
cytb Un grupo genético	0.31*	31.2%	68.8%

* $p < 0.05$

Predicción del hábitat adecuado para *Squalius* sp

Con los valores del AUC, las cuatro proyecciones se estimaron utilizando un valor de regularización de 0,01. En general, todas las proyecciones muestran modelos de nichos ecológicos con baja probabilidad (Fig. 5). La predicción para las condiciones presentes sugiere un modelo donde el hábitat adecuado se ubica en las cabeceras de los ríos de la margen izquierda del Guadiana medio, pero con baja probabilidad. De hecho, no se predijeron

condiciones adecuadas en el resto de la cuenca del Guadiana, incluyendo el área de los ríos Jola, Guadarranque y Estena donde existen poblaciones de *Squalius* sp. La proyección para 6.000 años antes del presente sugiere, con baja probabilidad, un nicho ecológico más amplio que incluye las regiones alrededor del río Jola y el arroyo de la Higuera en el Guadiana medio. Como ocurre en la predicción del presente, los ríos Guadarranque y Estena fueron regiones con hábitats poco

adecuados en el pasado. Las predicciones para los períodos futuros, con bajas probabilidades, mostraron que los posibles nichos ecológicos podrían aumentar para el periodo 2041-2060 pero disminuir el hábitat adecuado en el período de 2071-2080. De nuevo, como se observó en el resto de predicciones, los ríos Jola, Guadarranque, Estena, las regiones del Alto Guadiana y la cuenca del bajo Guadiana podrían ser áreas poco adecuadas para *Squalius* sp. en el futuro.

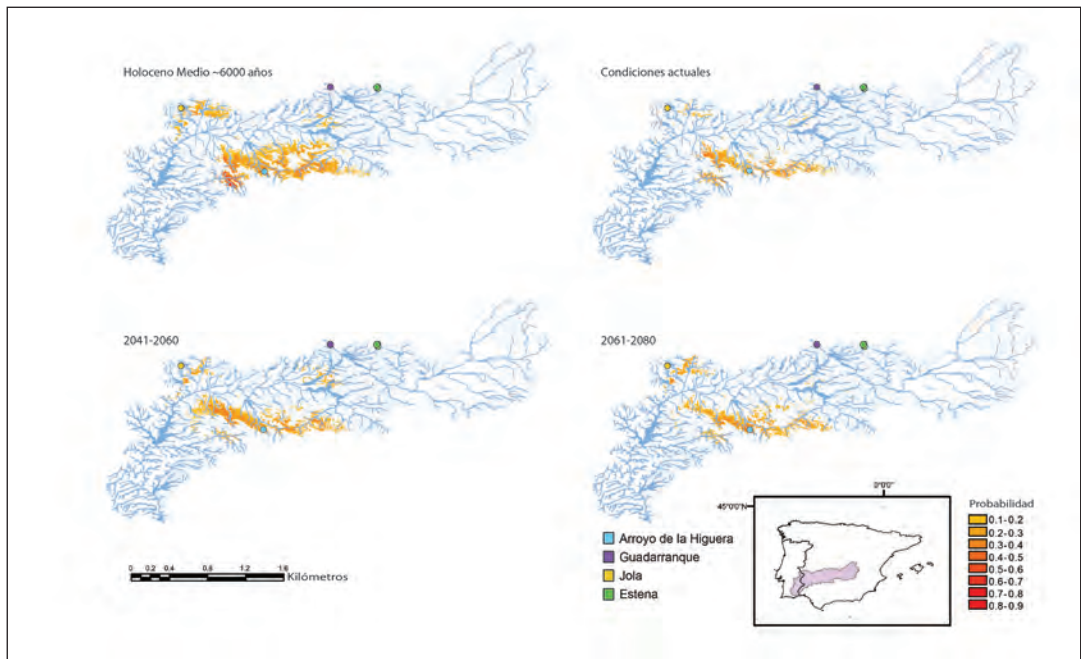


Fig. 5. Predicciones del hábitat adecuado para *Squalius* sp. en el río Guadiana en el pasado, presentes y futuro. Los puntos representan las poblaciones reales conocidas. Los valores de probabilidad del nicho ecológico adecuado se determinaron con un intervalo de confianza del 95%.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio indica que *Squalius* sp. es un nuevo complejo híbrido similar a *S. alburnoides*, pero con algunos rasgos evolutivos diferentes. En este trabajo describimos estas características y abrimos nuevas líneas de investigación para los complejos híbridos del género *Squalius*. La des-

cripción formal de *Squalius* sp., como una nueva especie de origen híbrido debe ser realizada, en base a sus características morfológicas y genéticas, y teniendo en cuenta los resultados de este trabajo. La dificultad para describir como un linaje evolutivo independiente o como una especie a *Squalius* sp. está relacionada con su origen híbrido y la presencia de diferentes morfotipos y

ploidías. En este estudio, reconocemos características que podrían ser tomadas en cuenta para describir a *Squalius* sp. como una nueva especie, entre ellas la posesión de un genoma ancestral exclusivo, que llamamos R, en todos los individuos, y que es altamente divergente respecto a sus especies filogenéticamente más cercanas.

Historia evolutiva del complejo *Squalius* sp.

El Plioceno ha sido considerado como un importante período para la diversificación de los ciprínidos ibéricos, así como para otras especies de fauna acuática (ZARDOYA & DOADRIO, 1998; RIBERA & VOGLER, 2004; ROBALO *et al.*, 2006; SOUSA-SANTOS *et al.*, 2007, 2014; ALMADA & SOUSA-SANTOS, 2010; PEREA *et al.*, 2016). El aislamiento del clado mediterráneo del género *Squalius* en la Península Ibérica durante el Mioceno Superior y el Plioceno (Fig. 2) es congruente con trabajos previos que datan la separación de los clados Mediterráneo y Eurosiberiano del género *Squalius* en el Mioceno Superior (SANJUR *et al.*, 2003; PEREA *et al.*, 2010) (Figura 2). El final de la Orogenia Alpina se ha propuesto como la causa de la separación de estos dos grandes clados del género *Squalius* (PEREA *et al.*, 2011). Dentro del clado Mediterráneo, la especie ancestral del género *Squalius* que dio lugar al complejo híbrido *Squalius* sp. se aisló en la cuenca del Guadiana de los endemismos portugueses entre el Plioceno y Pleistoceno, lo cual podría ser consecuencia de la separación de la cuenca del Guadiana del Proto-Mira / Arade y la formación de las cuencas fluviales actuales (CALVO *et al.*, 1993; PAIS *et al.*, 2012). Además, el aislamiento del Guadiana desde el Plioceno ya ha sido considerado también por otros autores como un evento importante en la diversificación en los peces continentales (COELHO *et al.*, 1995; CARMONA *et al.*, 2000; DOADRIO & CARMONA, 2003; SANJUR *et al.*, 2003; MESQUITA *et al.*, 2005; PEREA *et al.*,

2016). La distribución actual de *Squalius* sp. en el Guadiana medio coincide con los depósitos terciarios que sitúan una extensa cuenca endorreica en esta región (FRIEND Y DABRIO, 1996; DEVICENTE *et al.*, 2011; TEJERO & GARZÓN-HEYDT, 2014; TEJERO *et al.*, 2017). Un pequeño ciprínido *Anaocypris hispanica* (Steindachner, 1866) comparte también, en gran medida, este patrón de distribución asociado al tramo medio y bajo del río Guadiana, con ausencia de la especie en el alto Guadiana a pesar de tener hábitats disponibles (DOADRIO, 2011).

La discrepancia entre el aislamiento más antiguo del genoma nuclear (R) con respecto al del mitocondrial (P) en *Squalius* sp. indica que la hibridación, de la especie ancestral del complejo *Squalius* sp., con *S. alburnoides* y/o *S. pyrenaicus* ocurrió después del aislamiento de esa especie ancestral en la cuenca media del río Guadiana. La presencia de *S. pyrenaicus* en la cuenca del Guadiana se remonta al origen de la cuenca lo que pudo favorecer la hibridación para formar el complejo *Squalius* sp. (PEREA *et al.*, 2011). De esta forma, se esperaría que el complejo *Squalius* sp. tuviera también el genoma nuclear (P) de *S. pyrenaicus* como ocurre en *S. alburnoides* (CUNHA *et al.*, 2011). Sin embargo, el complejo *Squalius* sp sólo tiene haplotipos mitocondriales de *S. pyrenaicus*, y está ausente el genoma nuclear (P) de *S. pyrenaicus*. Por tanto, se pueden sugerir dos hipótesis de hibridación y origen del complejo *Squalius* sp: (i) la hibridación se produjo en el Mioceno Superior en la cuenca endorreica del Guadiana donde viven *S. pyrenaicus* y el ancestro del complejo *Squalius* sp., de esta forma el complejo *Squalius* sp adquirió los genomas mitocondriales y nucleares (P) de *S. pyrenaicus*, pero el genoma nuclear (P) sería sustituido por hibridación con *S. alburnoides* durante el Pleistoceno. Esto implica, un aislamiento reproductivo de *Squalius* sp con *S. pyrenaicus* después del inicial evento de hibridación. (ii) La hibridación entre la especie ancestral del complejo *Squalius* sp. y *S. pyrenaicus* nunca ocurrió, y el genoma (P) presente en el complejo *Squalius* sp es el resultado de la hibridación con el complejo *S. al-*

burnoides probablemente en el Pleistoceno (de 0,2 a 2,0 Ma, Tabla 2). La adquisición del genoma (P) de *S. pyrenaicus* por el complejo *S. alburnoides* ha sido

datada en un periodo similar de tiempo 700.000 años en el Tajo-Guadiana (SOUSA-SANTOS et al., 2007, CUNHA et al., 2011).

Tabla 2. Distancias genéticas absolutas (%) entre el complejo híbrido de la cuenca del río Guadiana y sus grupos hermanos para el *cytb* (encima de la diagonal) y el S7 (debajo de la diagonal).

Especies	<i>Squalius</i> sp	<i>S. aradensis</i>	<i>S. torgalensis</i>	<i>S. alburnoides</i>	<i>S. pyrenaicus</i>	Genoma A de <i>Squalius</i> sp	Genoma A de <i>S. alburnoides</i>
<i>Squalius</i> sp.		10.1	11.2	0.4	0.8	–	–
<i>S. aradensis</i>	2.8		6.1	10.1	9.9	–	–
<i>S. torgalensis</i>	2.8	0.3		11.2	11	–	–
<i>S. alburnoides</i>	3.2	2.2	2.2		0.8	–	–
<i>S. pyrenaicus</i>	3.2	2.2	2.2	0.8		–	–
Genoma A de <i>Squalius</i> sp.	9.0	8.3	8.3	7.1	7		–
Genoma A de <i>S. alburnoides</i>	9.5	8.8	8.8	7.6	7.5	1.3	

Una de las consecuencias de la formación de estos complejos híbridos es la presencia de individuos con diferentes ploidías lo que da lugar a duplicación génica. Esta duplicación genética implica beneficios y costos a los seres vivos. Los beneficios a corto plazo incluyen la ventaja de tener una dosis de genes incrementada y, por tanto, una mayor expresión génica (WAGNER, 2010). Tales ventajas pueden existir tanto para los productos génicos que tienen una demanda extremadamente alta en una célula, como para los genes que se expresan a niveles muy bajos cuando están en una sola copia (BAR-EVEN et al., 2006). Otro beneficio a corto plazo surge cuando el nuevo gen duplicado difiere en función y secuencia y es beneficioso para la célula ya que su portador puede aumentar su frecuencia a través de la selección natural (VINCKENBOSCH et al., 2006; WAGNER, 2010). En este caso, la evolución de *Squalius* sp. y *S. alburnoides* podría estar asociada al proceso histórico que llevó a adquirir estrategias de duplicación de genes para una rápida adaptación a un ambiente cambiante. La región donde se sitúa el río Guadiana se caracteriza por un fuerte estiaje con temperaturas superiores a los 40°C, que provocan la

discontinuidad de los cuerpos de agua que quedan aislados en pozas hasta los periodos pluviales que reconectan los cuerpos de agua (ZAMORA, 1987). Esta característica climática de la cuenca del Guadiana ocurre ya desde el período interglacial hace aproximadamente 700.000 años (PRIETO, 2012). Por tanto, la duplicación génica podría ser una estrategia de adaptación del género *Squalius* a ambientes mediterráneos extremos. Sin embargo, algunas preguntas se pueden plantear como por qué el complejo *Squalius* sp. no tiene el mismo «éxito» en la naturaleza que el complejo *S. alburnoides* ampliamente extendido por la cuenca del Guadiana (DOADRIO, 2011). Una respuesta puede ser que por su aislamiento reproductivo con *S. pyrenaicus* que no ocurre en *S. alburnoides*.

Caracterización de las poblaciones e implicaciones de conservación

El complejo *Squalius* sp. presenta machos y hembras de origen híbrido con un genoma R heredado hemiclinalmente a través de la reproducción por hibridogénesis, como ocurre con el genoma A en

S. alburnoides (CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2007) (Fig. 4). Hemos podido reconstruir un modelo sobre las estrategias de reproducción del nuevo complejo a través de nuestros resultados y la proporción de las diferentes ploidías obtenidas en un trabajo previo (CUNHA & DOADRIO, 2009). En el complejo *Squalius* sp. aparece el genoma A por su hibridación con *S. alburnoides*, pero algunos individuos no tienen el genoma A, sólo el R, lo que sugiere que el nuevo complejo utiliza las estrategias reproductivas de *S. alburnoides*, donde los gametos haploides (gametos R y A) en las hembras triploides se producen por hibridogénesis permitiendo la restauración de individuos no híbridos (CUNHA *et al.*, 2011). Debido a la ausencia del genoma P de *S. pyrenaicus* (Fig. 4) en *Squalius* sp., el número de ploidías se reduce drásticamente con respecto a *S. alburnoides*, lo que sugiere que los individuos de *Squalius* sp., pueden ser: RR, RA, RRA y RAA. En resumen, como ocurre en *S. alburnoides*, la proporción de machos de *Squalius* sp. es muy baja en la naturaleza y nosotros mediante frotis abdominal en la época reproductiva sólo encontramos 6 machos para 91 individuos muestreados y todos los machos fueron capturados en la población del Guadarranque. Los machos en el río Guadarranque siempre fueron localizados en la cabecera del mismo y en zonas sombreadas con rápidos, y siempre en ausencia o presencia esporádica de *S. alburnoides*.

La distribución del complejo *Squalius* sp. es muy reducida, y en este trabajo se encontraron

cuatro pequeñas poblaciones con abundancias muy diferentes y aisladas geográficamente. Esto es corroborado por los bajos pero significativos valores del índice de fijación estimados para el genoma R entre el río Jola respecto a los ríos Guadarranque y Estena ($\Phi_{ST} = 0,410$ y $0,382$ respectivamente, Tabla 4). Estos valores bajos del índice de fijación sugieren una antigua conectividad entre las poblaciones y que la fragmentada estructura actual es debida a alteraciones de la cuenca en el presente. De hecho, la cuenca media y baja del Guadiana ha sufrido un gran deterioro ambiental desde el siglo pasado, y todas las poblaciones del complejo *Squalius* sp., excepto la del arroyo de la Higuera, están situadas en zonas de cabeceras donde existen menos alteraciones y menor presencia de especies exóticas. La población de *Squalius* sp. del arroyo de la Higuera, afluente del río Matachel, tiene unas densidades muy bajas y un hábitat muy deteriorado con un elevado número y densidad de especies exóticas. La cuenca del Guadiana en general ha sufrido un gran impacto a través de especies exóticas como: *Lepomis gibbosus*, *Gambusia holbrooki*, *Alburnus alburnus*, *Micropterus salmoides*, *Cyprinus carpio*, o *Exos lucius* que fueron encontradas en la mayoría de los puntos muestreados. La construcción de numerosos embalses en toda la cuenca del Guadiana ha permitido que la rápida colonización de las especies exóticas sea uno de los factores de riesgo más importantes para el ecosistema acuático (PÉREZ-BOTE & PULA, 2002).

Tabla 4. Índice de Fijación Φ_{ST} basado en el *cytb* (encima de la diagonal) y *S7* (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de *Squalius* sp.

Población	Estena	Guadarranque	Arroyo de La Higuera	Jola
Estena		0.007	0.385	0.410*
Guadarranque	0.005		0.393	0.382*
Arroyo de La Higuera	0.099	0.029		0.498
Jola	0.055*	0.063*	0.083	

* p values < 0.05 después de la corrección de Bonferroni.

Nuestros modelos de nichos ecológicos sugieren que, con probabilidades altas, no existe un hábitat adecuado para *Squalius* sp. en el presente, teniendo en cuenta únicamente las variables bioclimáticas. Este hecho indica la vulnerabilidad del complejo *Squalius* sp. a las fluctuaciones climáticas (Fig. 5). Este mismo patrón se observó para las condiciones climáticas futuras, siendo el hábitat adecuado reducido y en un área actualmente con muchas alteraciones ambientales entre las que destaca la alta presencia de especies exóticas. Es por esto que recomendamos que las poblaciones del complejo híbrido *Squalius* sp. sean consideradas como en peligro crítico y que se apliquen urgentemente programas eficientes de manejo de los recursos naturales en la cuenca del Guadiana.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Daniela Galván, Hamid Ghanavi, Elena González, José Luís González, Rosa Gabriela Beltrán, Carina Cunha, Paloma Garzón, Silvia Perea, Joana Robalo, José Ambrosio G. Carmona y Carla Sousa por su ayuda en los trabajos de campo. A los responsables del Parque Nacional de Cabañeros por las facilidades para trabajar en el mismo especialmente a José Jimenez, Ángel Gómez, Eularico y Carllos Rodríguez Vigal. Este trabajo fue financiado por la Red de Parques Nacionales en su programa de investigación de 2012 mediante el proyecto 741/2012 «EVOLUCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS VERTEBRADOS UNISEXUALES ENDÉMICOS DEL RÍO ESTENA EN EL PARQUE NACIONAL DE CABAÑEROS».

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMADA, V. y SOUSA-SANTOS, C. (2010): Comparisons of the genetic structure of *Squalius* populations (Teleostei, Cyprinidae) from rivers with contrasting histories, drainage areas and climatic conditions based on two molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2): 924-931.
- ALVES, M. J.; COELHO, M. M. y COLLARES-PEREIRA, M. J. (2001): Evolution in action through hybridisation and polyploidy in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica* 111: 375-385.
- BAACK, E. J. y RIESEBERG, L. H. (2007): A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current Opinion in Genetics Development* 17: 513-518.
- BAR-EVEN, A.; PAULSSON, J.; MAHESHRI, N.; CARMÍ, M.; O'SHEA, E.; PILPEL, Y. y BARKAI, N. (2006): Noise in protein expression scales with natural protein abundance. *Nature genetics* 38: 636-643.
- BARTLEIN, P. J.; HARRISON, S. P.; BREWER, S.; CONNOR, S.; DAVIS, B. A. S.; GAJEWSKI, K.; GUIOT, J.; HARRISON-PRENTICE, T. I.; HENDERSON, A.; et al. (2010): Pollen-based continental climate reconstructions at 6 and 21 ka: a global synthesis. *Climate Dynamics*, DOI: 10.1007/s00382-010-0904-1.
- CALVO SORANDO, J. P.; DAAMS, R.; MORALES, J.; LÓPEZ MARTÍNEZ, N.; AGUSTÍ, J.; ANADÓN, P.; et al. (1993): Up-to-date Spanish continental Neogene synthesis and paleoclimatic interpretation. *Revista de la Sociedad Geológica de España* 6: 29-40.
- CARMONA, J. A.; DOMÍNGUEZ, J. y DOADRIO, I. (2000): Congruence between allozyme and cytochrome b gene sequence data in assessing genetic differentiation within the Iberian endemic *Chondrostoma lemmingii* (Pisces: Cyprinidae). *Heredity* 84: 721-732.
- CHOW, S. y HAZAMA, K. (1998): Universal PCR primers for 57 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology* 7: 1255-1256.
- CLEMENT, M.; POSADA, D. y CRANDALL, K. (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.
- COELHO, M. M.; BRITO, R. M.; PACHECO, T. R.; FIGUEIREDO, D. y PIRES, A. M. (1995): Genetic variation and divergence of *Leuciscus pyrenaicus* and *L. carolitertii* (Pisces, Cyprinidae). *Journal of Fish Biology* 47: 243-258.
- CRESPO-LÓPEZ, M. E.; DUARTE, T.; DOWLING, T. y 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. y 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.; DOADRIO, I.; ABRANTES, J. y COELHO, M. M. (2011): The evolutionary history of the allopolyploid *Squalius alburnoides* (Cyprinidae) complex in the northern Iberian Peninsula. *Heredity* 106: 100-112.
- CUNHA, C. y DOADRIO, I. (2009): Evidencias de un nuevo complejo híbrido unisexuado del género *Squalius* (Teleostei, Cyprinidae) en el río Estena (Parque Nacional de Cabañeros): una aproximación filogenética. *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales*: 357-375.
- CUNHA, C.; MESQUITA, N.; DOWLING, T. E.; GILLES, A. y COELHO, M. M. (2002): Phylogenetic relationships of Eurasian and American cyprinids using cytochrome b sequences. *Journal of Fish Biology* 61: 929-944.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R. y POSADA, D. (2012): jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9: 772-772.
- DE VICENTE, G.; CLOETINGH, S. A. P. L.; VAN WEES, J. D. y CUNHA, P. P. (2011): Tectonic classification of Cenozoic Iberian foreland basins. *Tectonophysics* 502: 38-61.
- DOADRIO, I. y CARMONA, J. A. (2003): Testing freshwater Lago Mare dispersal theory on the phylogeny relationships of Iberian cyprinid genera *Chondrostoma* and *Squalius* (Cypriniformes, Cyprinidae). *Graellsia* 59: 457-473.
- DOADRIO, I. (2011): Ictiofauna continental española: Bases para su seguimiento. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Centro de Publicaciones.
- DRUMMOND, A. J.; HO, S. Y. W.; RAWLENCE, N. y RAMBAUT, A. (2007): A rough guide to BEAST 1.4. University of Edinburgh, United Kingdom.
- EXCOFFIER, L. y LISCHER, H. E. (2010): Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10: 564-567.
- FRIEND, P. F. y DABRIO, C. J. (1996): Tertiary basins of Spain: the stratigraphic record of crustal kinematics (Vol.6). Cambridge University Press.
- FUJINO, J.; NAIR, R.; KAINUMA, M.; MASUI, T. y MATSUOKA, Y. (2006): Multi-gas mitigation analysis on stabilization scenarios using AIM global model. *Multigas Mitigation and Climate Policy. The Energy Journal*. 3 (Special Issue).
- HEIBERGER, R. M. y HOLLAND, B. (2004): *Statistical Analysis and Data Display: An Intermediate Course: Accompanying Online Files*.
- LEGGATT, R. A. y IWAMA, G. K. (2003): Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13: 237-246.
- LIBRADO, P. y ROZAS, J. (2009): DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- MACHORDOM, A. y DOADRIO, I. (2001): Evidence of a Cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 252-263.
- MALLET, J. (2008): Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 2971-2986.
- MESQUITA, N.; HÄNFLING, B.; CARVALHO, G. R. y COELHO, M. M. (2005): Phylogeography of the cyprinid *Squalius ardensis* and implications for conservation of the endemic freshwater fauna of southern Portugal. *Molecular Ecology* 14: 1939-1954.
- MOSS, R. H.; EDMONDS, J. A.; HIBBARD, K. A.; MANNING, M. R.; ROSE, S. K.; VAN VUUREN, D. P.; et al. (2010): The next generation of scenarios for climate change research and assessment. *Nature* 463: 747-756.
- PAIS, J.; CUNHA, P. P.; PEREIRA, D.; LEGOINHA, P.; DIAS, R.; MOURA, D.; et al. (2012): The Paleogene and Neogene of Western Iberia (Portugal): A Cenozoic Record in the European Atlantic Domain. En: *The Paleogene and Neogene of Western Iberia (Portugal)*. pp. 1-138. Springer Berlin Heidelberg.
- PALA, I. y COELHO, M. M. (2005): Contrasting views over a hybrid complex: between speciation and evolutionary «dead-end». *Gene* 347: 283-294.
- PERDICES, A. y DOADRIO, I. (2001): The molecular systematics and biogeography of the European cobitids based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19 (3): 468-478.

- PEREA, S.; BÖHME, M.; ZUPANČIČ, P.; FREYHOF, J.; ŠANDA, R.; ÖZULUĞ, M.; et al. (2010): Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily *Leuciscinae* (Teleostei, *Cyprinidae*) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolutionary Biology* 10: 265.
- PEREA, S.; COBO-SIMON, M. y DOADRIO, I. (2016): Cenozoic tectonic and climatic events in southern Iberian Peninsula: implications for the evolutionary history of freshwater fish of the genus *Squalius* (*Actinopterygii*, *Cyprinidae*). *Molecular phylogenetics and evolution* 97: 155-169.
- PEREA, S.; GARZÓN, P.; GONZÁLEZ, J. L.; ALMADA, V. C.; PEREIRA, A. M. y DOADRIO, I. (2011): New distribution data on Spanish autochthonous species of freshwater fish. *Graellsia* 91-102.
- PÉREZ-BOTE, J. L. y PULA, H. J. (2002): Usos del agua y problemática ambiental en la cuenca media del Guadiana. *Revista de Estudios Extremeños* 58: 722-729.
- PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P. y SCHAPIRE, R. E. (2006): Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological modeling* 190: 231-259.
- PHILLIPS, S. J. y DUDÍK, M. (2008): Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31: 161-175.
- PRIETO, I.; ARMAS, C. y PUGNAIRE, F. I. (2012): Water release through plant roots: new insights into its consequences at the plant and ecosystem level. *New Phytologist* 193: 830-841.
- R. CORE TEAM (2013): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- RIBERA, I. y VOGLER, A. P. (2004): Speciation of Iberian diving beetles in Pleistocene refugia (*Coleoptera*, *Dytiscidae*). *Molecular Ecology* 13: 179-193.
- RISSLER, L. J. y APODACA, J. J. (2007): Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology* 56: 924-942.
- ROBALO, J. I.; SANTOS, C. S.; LEVY, A. y ALMADA, V. C. (2006): Molecular insights on the taxonomic position of the paternal ancestor of the *Squalius alburnoides* hybridogenetic complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 276-281.
- RONQUIST, F. y HUELSENBECK, J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. y MANIATIS, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- SANJUR, O. I.; CARMONA, J. A. y DOADRIO, I. (2003): Evolutionary and biogeographical patterns within Iberian populations of the genus *Squalius* inferred from molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 20-30
- SILVESTRO, D. y MICHALAK, I. (2012): raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution* 12: 335-337.
- SOUSA-SANTOS, C.; COLLARES-PEREIRA, M. J. y ALMADA, V. (2007): Reading the history of a hybrid fish complex from its molecular record. *Molecular phylogenetics and evolution* 45: 981-996.
- SOUSA-SANTOS, C. (2014): Reproductive behaviour and the evolutionary history of the hybridogenetic complex *Squalius alburnoides*: (Pisces, *Cyprinidae*). Tesis Doctoral. PhD Thesis, Lisbon University. 2007. Available: <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/1683>.
- STAMATAKIS, A. (2006): RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- TAVARÉ, S. (1986): Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on mathematics in the life sciences* 17: 57-86.
- TAYLOR, K. E.; STOUFFER, R. J. y MEEHL, G. A. (2012): An overview of CMIP5 and the experiment design. *Bulletin of the American Meteorological Society* 93: 485-498.
- TEJERO, R. y GARZÓN-HEYDT, G. (2014): The Guadiana River: the role of tectonics on drainage Configuration. *Comunicações Geológicas* 101, Especial III: 1467-1471.
- TEJERO, R.; GOMEZ-ORTIZ, D.; HEYDT, G. G.; TOLEDO, F. M.; MARTÍNEZ, C. M. C.; RODRIGUEZ, M. D. M. S. y SUAREZ, J. J. Q. (2017): Electrical resistivity imaging of the shallow structures of an intraplate basin: The Guadiana Basin (SW Spain). *Journal of Applied Geophysics* 139, 54-64.

- VINCKENBOSCH, N.; DUPANLOUP, I. y KAESSMANN, H. (2006): Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 3220-3225.
- WAGNER, A. (2010): On the energy and material cost of gene Duplication. *Evolution after Gene Duplication* 207-214.
- ZAMORA, J. F. (1987): El río Guadiana. Fisiografía, Geoquímica y Contaminación Departamento de Publicaciones de la Excma. Diputación, Badajoz.
- ZARDOYA, R. y DOADRIO, I. (1998): Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 265: 1365-1372.
- ZARDOYA, R. y DOADRIO, I. (1999): Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of molecular evolution* 49: 227-237.