

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis genético de las poblaciones españolas del cangrejo de río**  
*Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Beatriz Matallanas Peña**

Directoras

M. Dolores Ochando González  
Carmen Callejas Hervás

**Madrid, 2015**

**Análisis genético de las poblaciones  
españolas del cangrejo de río  
*Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

Beatriz Matallanas Peñas

Madrid, 2015



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Genética

VºBº de la Directora de la Tesis

VºBº de la Directora de la Tesis

Fdo. Beatriz Matallanas Peñas

Fdo. M. Dolores Ochando González

Fdo. Carmen Callejas Hervás

***A mis padres***



## Resumen

---



El cangrejo de río *Austropotamobius pallipes* sensu lato es una especie autóctona en Europa que en las últimas décadas está sufriendo una drástica regresión poblacional, especialmente en España. Por ello actualmente está protegida tanto a nivel europeo como español y se están desarrollando planes para su conservación, los cuales desafortunadamente no incluyen información genética sobre la especie.

Mediante dos marcadores mitocondriales y microsatélites nucleares hemos analizado más de 250 ejemplares de cangrejos ibéricos pertenecientes a 10 cuencas hidrográficas. En conjunto hemos identificado 19 haplotipos mitocondriales y probado que todos los loci SSR estudiados son polimórficos en las poblaciones españolas. Los niveles de variabilidad haplotípica y nucleotídica detectados son 0,77 y 0,00074, respectivamente y la heterocigosis media 0,186. Valores dentro del rango descrito para la especie. Estos resultados concuerdan con severas restricciones del tamaño poblacional y la acción de la deriva genética.

Esta variación genética no se distribuye homogéneamente en nuestro país sino que podemos distinguir dos grandes grupos genéticos denominados 'Norte' y 'Centro'. En el grupo 'Norte' se distinguen además las poblaciones de la Cordillera Cantábrica de las localizadas en los Montes Vascos y en el grupo 'Centro', las poblaciones de la cuenca del Ebro de las restantes.

La estructura genética detectada podría estar influenciada por factores actuales, tales como las migraciones – naturales o antropogénicas –, los cuellos de botella causados por enfermedades o alteraciones del hábitat y, en definitiva, los efectos de la deriva genética. También por los cambios climáticos pasados, especialmente la última glaciación, ya que el análisis exhaustivo de los marcadores mitocondriales revela que la especie lleva largo tiempo establecida en España, al menos desde el Pleistoceno.

Con fines de conservación las poblaciones españolas parecen constituir una ESU diferenciada. Esta ESU estaría compuesta por dos MU, coincidentes con los grupos genéticos 'Norte' y 'Centro'. Para facilitar la inclusión de información genética en la gestión de estas poblaciones hemos puesto a punto la técnica de PCR – RFLP. Mediante el análisis de los cangrejos con dos enzimas de restricción, HpaI y CviAII, es posible asignarlos una de las dos MU propuestas y además, identificar el subgrupo genético al que pertenecen.

Dada la controversia que aún prevalece sobre el estatus taxonómico del complejo de especies *Austropotamobius pallipes*, una especie en peligro en todo su rango de distribución, también hemos evaluado las consideraciones taxonómicas que se desprenden del estudio de

la variabilidad genética. Estudiando la práctica totalidad de la información disponible en las bases de datos genéticas sobre este organismo con los marcadores 16S y COI, se pueden diferenciar claramente las dos especies reconocidas en este género, *A. torrentium* y *A. pallipes* sensu lato. El umbral que proponemos para diferenciarlas es de 7,6% con el gen 16S y 12,5% con el gen COI.

A su vez *A. pallipes* sensu lato parece estar compuesto por *A. pallipes* sensu stricto y *A. italicus*, que podrían haber empezado a diferenciarse hace unos 9,2 – 8,2 MA, y aun no habrían completado el proceso de especiación.

Por último en *A. italicus* podemos distinguir dos subgrupos genéticos, *A. i. italicus* y *A. i. carsicus*. Ambos subgrupos tienen un marcado patrón de distribución geográfica y las diferencias genéticas encontradas entre ambas podrían deberse a adaptaciones locales.

Palabras clave: *Austropotamobius italicus*, DNA mitocondrial, citocromo oxidasa subunidad I, 16S rDNA, microsatélites, variabilidad genética, estructura genética, flujo génico, filogeografía, conservación, unidades de manejo.

# Índice

---



Resumen	5
Summary	9
Introducción general	17
Objetivos	35
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>39</b>
Análisis de las poblaciones españolas de cangrejo de río: DNA mitocondrial	
Introducción	41
Material y métodos	45
Resultados	59
Discusión	77
Anexos	94
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>117</b>
Análisis de las poblaciones españolas de cangrejo de río: microsatélites	
Introducción	119
Material y métodos	123
Resultados	133
Discusión	149
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>159</b>
Reevaluación taxonómica del complejo de especies <i>Austropotamobius pallipes</i> mediante marcadores mitocondriales	
Introducción	161
Material y métodos	167
Resultados	178
Resumen de resultados	213
Discusión	225
Discusión general	239
Conclusiones	249
Bibliografía	253



## Summary

---



## Introduction

The white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* sensu lato, is endemic to western and southern Europe. The species colonises a wide range of water bodies and plays an important role in aquatic ecosystem dynamics. It is omnivorous, contributing to keep the balance of freshwater habitats, and as prey, it is part of the diet of many other endangered species. Crayfish populations have decreased in the last decades because of environmental degradation, habitat fragmentation, the rise in human demand for water and the introduction of alien species and crayfish plague. Particularly in Spain, the country with the greatest biodiversity in Europe, the white – clawed crayfish had an extinction trend of 30 – 50% every five years. As a consequence, the species is now enjoying protection under regional, national and international legislation. Conservation programs in our country are based mainly on translocation of individuals from other natural or farmed populations and are limited by the low number and abundance of existing populations. These action plans consider several factors such as the risk of transmission of crayfish plague, the risk of survival when establishing new populations, the characteristics of water bodies to be restored, or the distribution of exotic species in those areas. Notwithstanding, a major goal of such programs (up to now forgotten) should be also to maintain genetic variability—the basis for viability and future evolution of populations.

Phylogeographic methods are useful tools for this purpose. The preservation of genetic resources implies the identification of groups of populations that reflect the evolutionary importance of the different lineages that composes such a species. Therefore the knowledge of the genetic variability of the organism under study is the basis to detect management units from a conservation point of view.

Unfortunately Spanish populations of white – clawed crayfish are generally poorly represented in scientific reports and usually studied only with mitochondrial markers. Thus, to conserve this species in Spain is mandatory a comprehensive analysis with both mitochondrial and nuclear markers, in order to obtain genetic data, and take this information into account in management programs.

In addition, the highly controversial taxonomy of *Austropotamobius pallipes* species complex is constantly changing, making it difficult to preserve this emblematic species. Outdated or inaccurate classifications can hinder the comprehension of the diversity of a given

organism, leading to poorly planned conservation protocols. For that reason, a reevaluation of the taxonomic status of this organism is needed to ensure its proper classification and policies.

## **Objectives**

Aiming to contribute to a better understanding of the current status of white - clawed crayfish in Spain, we have analyzed mitochondrial and nuclear markers in locations from the main drainage basins across the species' distribution in Spain. Our purposes were to assess the genetic variation and structure of white – clawed crayfish populations, to analyze the distribution patterns of genetic diversity regarding their possible natural or human-mediated origin, and to provide some proposals for the species recovery plans in Spain. We have also assessed the taxonomic considerations in *A. pallipes* “sensu lato” through the analysis of most of the genetic information available to date in two mitochondrial genes.

## **Results and discussion**

### **Phylogeography of Spanish populations of white – clawed crayfish**

A total of 250 specimens were sequenced for the mitochondrial 16S (1317 bp) and COI (1184 bp) genes. Also 395 crayfish has been studied with nuclear SSR markers. Results indicate that the species exhibits in Spain a certain degree of genetic diversity at both mtDNA (16S rDNA and COI gene) and nuclear (SSR loci) level. A 2501 bp fragment (1184 bp from COI gene and 1317 bp from 16S rDNA gene) has been obtained from 240 individuals. 21 haplotypes are identified, 4 at high or intermediate frequencies (Haplotypes H1, H8, H15 and H18) and the remaining 17, at low frequencies. Considering the populations, 17 out of 24 samples are polymorphic, and 7 samples are monomorphic, although for different haplotypes. In addition, all the SSR loci tested are polymorphic even though the Spanish populations show low levels of observed heterozygosity. These outcomes are consistent with severe restrictions on population size and the action of genetic drift.

The distribution of the mitochondrial haplotypes shows a clear geographic pattern. Two main genetic clusters are observed, ‘North’ and ‘Central’. In the ‘North’ group, in turn, populations around the Cantabrian Cordillera are distinguished from those in the Basque

Mountains. In the 'Central' group, it is also possible to differentiate the Ebro basin from the rest of the areas. Data obtained from SSR analysis agree with the mitochondrial pattern. It has been suggested that several Iberian areas acted as shelter for different species during the Ice Age. The Iberian genetic clusters identified coincide with the areas where glacial refugia would be located. Thus, the genetic structure observed might ultimately be the consequence of the existence of such Iberian glacial refugia.

In addition, processes that occurred thereafter, in historical and recent times, such as bottlenecks and subsequent genetic drift, play a part in this genetic structure to a large extent. A tendency to an eastward gene flow – migration – is observed. Crayfish are able to spread along relatively long distance in the absence of obstacles. However, human translocations of crayfish have been common practice in Spain. In this context, significant gene flow estimates involving distant populations or close geographic samples of crayfish belonging to different river basins would highlight the human impact as an agent for the dispersal of white – clawed crayfish in our country.

The tests applied to the dataset show that Spanish populations have undergone expansion around 25,000 years ago, after the last glacial maximum, indicating that populations of white - clawed crayfish have been long established in Spain.

For future conservation plans, Spanish populations of white – clawed crayfish should be considered as a single evolutionary significant unit (ESU) with two management units (MUs), the 'North' and 'Central' genetic groups. The refinement of RFLP - PCR technique for analysing crayfish with two restriction enzymes, HpaI and CviAII, allows their allocation into one of the two putative MUs and also the identification of the genetic subgroup which they belong.

### **Taxonomy inferences**

Our results using mitochondrial markers support the official distinction of *A. torrentium* and *A. pallipes* "sensu lato" into the genus *Austropotamobius*. We have estimated thresholds of 12.5% and 7.6% of genetic divergence with COI and 16S respectively, to differentiate them. Considering conservative mutation rates around 2%, the splitting between the two species would have occurred about 12.6 – 13.2 MA.

The analyses of most of genetic information available in databases for mitochondrial markers along with our own data show that *A. pallipes* “sensu lato” includes two well differentiated haplogroups, AP and AI. Their divergences, 7.24% using COI gene and 4.50% with 16S, exceed the limits proposed for delimiting species by using these markers in related crayfish families and also in *Crustacea* in general. Haplogroups divergence could have started in the late Miocene, about 8.2 – 9.2 MA. The genetic - nuclear and mitochondrial – evidences together with morphological, ecological and even some partial reproductive data indicate that haplogroups AP and AI can be considered as two conspecific lineages, potentially corresponding to incipient species. Given the resemblance between these haplogroups and the putative species, AP can be identified as *A. pallipes* “sensu stricto” and AI as *A. italicus*. Our outcomes also point out that AI haplogroup contains, in turn, two genetic groups clearly distinguishable with mitochondrial markers. This finding is particularly striking because the existence of four subspecies is widely accepted. However, analyses show that there is no reason to differentiate four genetic groups into *A. italicus*. Therefore, we propose the existence of two lineages named as *A. i. italicus* and *A. i. carsicus*.

Hence, considering the genetic information available, the species complex *A. pallipes* “sensu lato” would comprise two species *A. pallipes* “sensu stricto” and *A. italicus*, and two different lineages within the latter.

In conclusion, the use of mitochondrial and nuclear markers and phylogeographic methods have been useful for assessing the current status of Spanish populations of white – clawed crayfish. The existence of certain genetic variability offers some confidence for the recovery of this species in Spain. Likewise, phylogenetic tools, and taxonomical inferences with most of the available information, have been crucial to establish thresholds to delimit *Austropotamobius* species.

## Conclusions

- 1.1. The current low levels of genetic variability of white - clawed crayfish in Spain could be due to successive and drastic bottlenecks and consequently, by the action of the genetic drift, enhanced in these small and fragmented populations.
- 1.2. Spanish populations are not genetically homogeneous, but two main genetic clusters occur, 'North' and 'Central'. Furthermore, genetic structure is observed in each cluster. This distribution pattern of genetic variability has been shaped by historic factors, like glaciations, and also by recent processes, such as migration and bottlenecks.
- 1.3. Estimates from molecular data indicate that white - clawed crayfish have been established in the Iberian Peninsula, at least, from the Pleistocene, supporting the autochthonous origin of the species in Spain.
- 1.4. Spanish population should be considered as a single ESU with two MUs corresponding with the genetic clusters 'North' and 'Central'. RFLP – PCR technique described here may help to include genetic information in future action plans.
- 1.5. *Austropotamobius torrentium* and *A. pallipes* “sensu lato” species are clearly differentiated at the mitochondrial level with divergence thresholds around 7.6% using 16S gene and 12.5% with COI.
- 1.6. *A. pallipes* “sensu lato” could be actually two species *A. pallipes* “sensu stricto” and *A. italicus*, whose differentiation might have begun in the late Miocene.
- 1.7. *A. italicus*, in turn, could harbor two genetic subgroups, *A. i. italicus* and *A. i. carsicus*, with a marked geographic distribution pattern.



## Introducción general

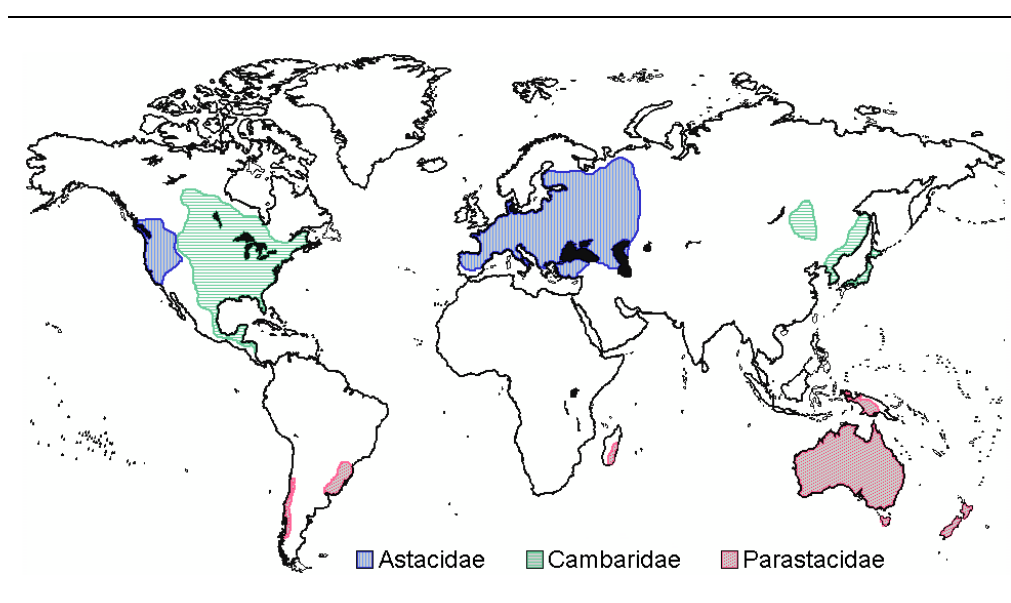
---



Los ecosistemas de agua dulce representan el 0,8% de la superficie terrestre. Su naturaleza fragmentada favorece la especiación, estimándose que albergan casi el 6% de todas las especies descritas. Pero, por múltiples factores, se encuentran en grave riesgo de deterioro, e incluso, de destrucción (Owen et al. 2015). Por tanto, los ecosistemas dulceacuícolas son esenciales para la biodiversidad y al mismo tiempo, están seriamente amenazados.

Los cangrejos de agua dulce son una parte esencial de estos ecosistemas en peligro. Ocupan una gran cantidad de hábitats como arroyos, lagos y algunos de ellos, incluso pueden encontrarse en tierra firme donde el agua de la lluvia es suficiente para mantener la humedad adecuada (Crandall & Buhay 2008).

Bajo esta denominación de cangrejos de agua dulce se engloban más de 600 especies pertenecientes a dos superfamilias que se distribuyen en las zonas templadas de todo el mundo excepto en la India y África continental (aunque en Madagascar habita un género endémico) (Figura 1). *Parastacoidea* en el hemisferio sur, se compone de una sola familia, *Parastacidae*, con 15 géneros y más de 170 especies. La otra superfamilia, *Astacoidea*, se distribuye por el hemisferio norte y consta de dos familias, *Cambaridae*, con mucho la familia de cangrejos con mayor diversidad, con más de 400 especies en 15 géneros, y *Astacidae* con 6 géneros y unas 39 especies (de Grave et al. 2009).



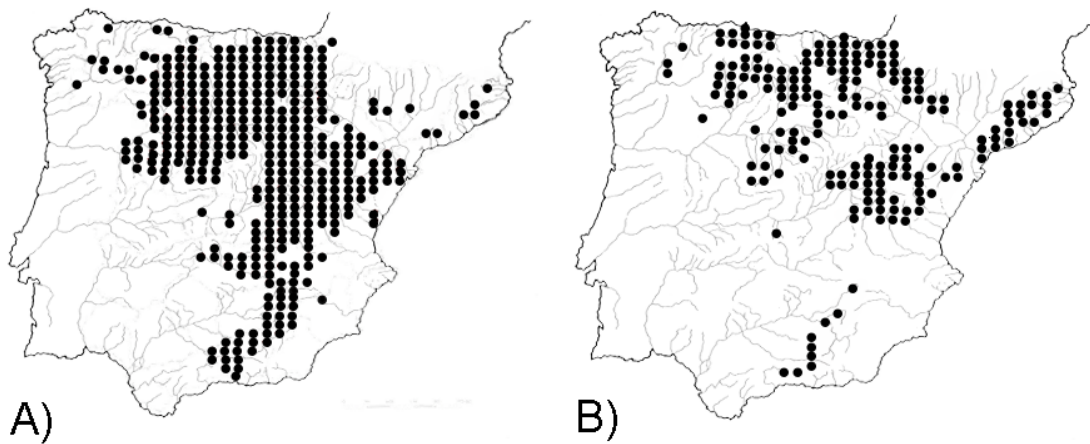
**Figura 1.** Distribución geográfica de las familias de cangrejos de agua dulce.

En la Península Ibérica el único astácido presente en nuestros ríos hasta la segunda mitad del siglo XX era el cangrejo de río del género *Austropotamobius*, tradicionalmente conocido en España como cangrejo común o autóctono. Este macroinvertebrado es una

especie clave en la regulación de los ecosistemas que habita, en primer lugar, por la elevada biomasa que puede llegar a representar (más de la mitad de la producción total de invertebrados y, en ocasiones, alcanzando una biomasa incluso mayor que la de los peces, hasta 500 Kg por hectárea). Como presa, forma parte de la dieta de numerosas especies. Como predador, tiene una dieta variada que incluye macroinvertebrados acuáticos, animales muertos, larvas y materia vegetal viva o en descomposición, contribuyendo a eliminar la materia orgánica de los ríos (Moñino et al. 2003). De esta forma, la presencia del cangrejo en los ecosistemas acuáticos hace que la columna de agua se vuelva cada vez más oligotrófica y el fondo se vaya enriqueciendo en oxígeno (Lindqvist 1988).

Además del importante papel que juega en los ecosistemas en los que habita, en España esta especie ha desempeñado un importante papel económico y social. En numerosas zonas los cangrejos eran objeto de pesca comercial, existiendo incluso cooperativas de pescadores profesionales (Pardo 1950-1951; Torre & Rodríguez 1964). También ha generado miles de jornadas de ocio a través de su pesca deportiva, por lo que ha constituido un elemento básico en la tradición cultural, deportiva y gastronómica de muchas regiones del país. Su pesca, además de ser una actividad muy popular, generaba importantes ingresos a los pescadores y a las Administraciones que concedían licencias para la misma.

No obstante, la distribución y abundancia de este macroinvertebrado ha ido descendiendo de forma drástica en las últimas décadas. Se estima que ya se han perdido entre el 50 – 80% de las poblaciones europeas (Füreder et al. 2010) y se ha calculado que el ritmo de pérdida de poblaciones españolas oscila entre el 30% y el 50% cada cinco años (Aldabe et al. 1991; Temiño & Sáez – Royuela 1998). En España, el país de la Unión Europea con mayor biodiversidad, en muy poco tiempo los cangrejos han pasado de ser un elemento de la fauna muy abundante en los cauces ibéricos a estar seriamente amenazados de extinción (Alonso et al. 2000). El cangrejo de río estaba presente en la Península Ibérica de manera bastante generalizada y, principalmente, en las provincias de Burgos, Palencia, Ciudad Real, Guadalajara, Cuenca, Soria, La Rioja, Zamora, Segovia, Valladolid, Jaén, Ávila, Navarra, Álava, Zaragoza, Teruel, Salamanca, Madrid y Toledo (Torre & Rodríguez 1964). Con menor densidad poblacional también se encontraba en Lugo, Orense, Asturias, Cantabria, Guipúzcoa, Vizcaya, Huesca, Lérida, Gerona, Tarragona, Barcelona, Castellón, Valencia, Murcia y León. Así pues, la distribución del cangrejo de río abarcaba prácticamente toda la España caliza hasta el sur de la provincia de Granada, límite meridional de la distribución mundial de la especie (Gil – Sánchez 1999; Laurent 1988). Únicamente estaba ausente en las dos provincias extremeñas, en Almería, Islas Canarias y Baleares (Figura 2A).



**Figura 2.** Distribución del cangrejo de río de patas blancas en España antes de 1975 (A) y en el año 2000 (B). Basado en Alonso *et al* (2000). Los puntos representan la presencia del cangrejo en un área de 1:50000.

Actualmente las poblaciones de este cangrejo han desaparecido de las provincias de Alicante, Murcia y Salamanca. Su presencia es dudosa en Ciudad Real, Segovia y Valladolid y en Portugal su estado es crítico (Alonso et al. 2000) (Figura 2B). En el resto de provincias donde se mantiene, encontramos poblaciones de estos cangrejos en las cabeceras de cuenca, normalmente aisladas del resto de la red fluvial, bien por zonas que quedan secas o por diferentes barreras físicas, ocupando tramos pequeños, que no superan el kilómetro, y en charcas naturales o seminaturales. En definitiva, actualmente las poblaciones de cangrejo de río están muy disminuidas y fragmentadas y, además, aparecen en los márgenes de su hábitat original.

Los motivos de la regresión que el cangrejo ha experimentado en las últimas décadas, tanto en España como en el resto de Europa, son principalmente la introducción de especies exóticas de cangrejos portadoras, en algunos casos, de enfermedades tan dañinas como la afanomicosis. A ello se une la alteración de los ecosistemas fluviales, especialmente la simplificación de los hábitats (ríos canalizados y/o regulados) en los que las especies de carácter invasor tienen mayor facilidad para instalarse y proliferar.

La presencia de especies exóticas ha sido una de las causas más importantes del declive de las poblaciones de cangrejo de río. En la última mitad del siglo XX se realizaron varias introducciones de cangrejos en nuestro país. La primera de la que se tiene constancia se produjo en 1962 cuando el Servicio Nacional de Pesca Fluvial y Caza introdujo la especie *Astacus astacus*. En 1974 se introdujeron en Badajoz y en las marismas del Guadalquivir

*Procambarus zonangulus* y *Procambarus clarkii*. En 1975 en la provincia de Valladolid *Astacus leptodactylus*, con fines de acuicultura. En 1983 se detectó *Cherax destructor* en pozas en Aragón (Bolea 1995) y posteriormente, en Navarra (Diéguez – Uribeondo & Múzquiz 1999). Ocasionalmente, se ha encontrado en mercados españoles *Orconectes limosus*, muy abundante en Francia (Bolea 1995). No obstante, las dos especies alóctonas que mayor efecto han tenido en el declive de las poblaciones de cangrejo de río españolas han sido dos cangrejos americanos, el rojo (*Procambarus clarkii*) y el señal (*Pacifastacus leniusculus*).

El cangrejo rojo, americano o de las marismas, *Procambarus clarkii*, se introdujo entre 1973 y 1974 en Badajoz y en las marismas del Guadalquivir (Habsburgo – Lorena 1979, 1986). Es una especie oportunista, omnívora, de rápido crecimiento y elevada fertilidad, que presenta gran tolerancia a los cambios ambientales y euriplasticidad fisiológica, colonizando gran parte de los cursos de agua de nuestro país. Su dispersión fue muy rápida, favorecida especialmente por la participación activa de los pescadores comerciales y deportivos. Ante la desaparición de las poblaciones españolas de cangrejo los pescadores favorecieron la propagación de *P. clarkii* sin ser conscientes de los graves problemas ecológicos que podía generar su introducción, puesto que carecían de la información necesaria. El cangrejo rojo es una especie con gran capacidad de invasión que influye de manera muy importante en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos (Holdich 1987; Momot 1995; Momot et al. 1978). Como gran depredador carnívoro, ingiere grandes cantidades de herbáceas y detritus mientras busca animales y, a altas densidades de cangrejos, el forrajeo se puede extender tanto que llega a destruir los tapetes microbianos y las praderas de macrófitos (Chambers et al. 1990; Olsen & Lodge 1991).

Al contrario de lo sucedido con el cangrejo rojo, el cangrejo señal *Pacifastacus leniusculus* fue introducido por la Administración en Comunidades como Castilla y León, País Vasco y Navarra. Se tienen registros de su introducción entre 1974 y 1975 en dos astacifactorías, una en el río Cifuentes, en la provincia de Guadalajara, y otra en el río Ucero, en Soria (Habsburgo – Lorena 1979). Esta especie tiene mayor capacidad de adaptación que *P. clarkii* a los tramos altos de las cuencas. Su crecimiento y maduración sexual son más lentos que en el cangrejo rojo, aunque más rápidos que en *Austropotamobius*. Por su mayor tamaño, fecundidad y agresividad los desplazan cuando conviven en un mismo tramo.

Pero la consecuencia más devastadora para los astácidos europeos es que los cangrejos de origen americano son transmisores de la afanomicosis o peste del cangrejo, una enfermedad producida por el hongo acuático parásito *Aphanomyces astaci*. Se cree que el hongo apareció por primera vez en Europa en 1860 (Alderman & Polglase 1986) y en la

Península Ibérica alrededor de 1970 (Diéguez – Uribeondo et al. 1997a). Esta enfermedad provoca una mortalidad del 100% entre las poblaciones de *Austropotamobius* afectadas (Diéguez – Uribeondo et al. 1997a; Cerenius & Söderhäll 1992). Existen distintas cepas, asociadas a cada una de las especies introducidas, que muestran diferencias ecológicas y epidemiológicas (Huang et al. 1994). El primer diagnóstico de afanomicosis confirmado en la Península corresponde a una mortandad ocurrida en 1978 en el río Riaza, en Segovia y Burgos (Cuellar & Coll 1983). Rápidamente, en 1979, se produjeron brotes en Vizcaya, Guipúzcoa, Álava, Navarra, Valladolid, Teruel, Zaragoza y Logroño, y en 1980 en Albacete, Ciudad Real, Toledo, Zamora, Palencia, León, Valladolid, Álava, Navarra, Logroño, Segovia, Burgos, Zaragoza y Soria (Cuellar & Coll 1983). Las mayores mortandades se produjeron entre los años 1984 y 1986. Pero fue en la década de los 90 cuando se identificó a *Aphanomyces astaci* como causante del 90% de los casos de mortandad (Diéguez – Uribeondo et al. 1997a).

Existen otros factores, como la alteración de los ecosistemas fluviales o el furtivismo, que también han contribuido en gran medida al declive del cangrejo común en España, pero que han quedado eclipsados por los efectos de la afanomicosis. Éstos han sido especialmente relevantes después de 1980, tras las grandes mortandades provocadas por afanomicosis, cuando las poblaciones de cangrejo de río eran pequeñas y habían quedado aisladas (Alonso & Martínez 2003).

En la actualidad la alteración de los ecosistemas fluviales se considera la causa más importante del declive de las poblaciones de cangrejo autóctono. Las que más han influido en el descenso del número de poblaciones son la destrucción de la estructura del cauce, especialmente resultado de las canalizaciones con los programas de prevención de avenidas, y la concentración parcelaria. También lo son los estiajes extremos, que secan completamente tramos marginales de la red fluvial donde se refugia la especie, las captaciones de agua para uso doméstico y agrario sobre cauces con muy escaso caudal estival y la destrucción de la vegetación de ribera en entornos agrícolas. No hay que olvidar la contaminación orgánica ligada a explotaciones agropecuarias y el empleo de productos tóxicos, particularmente pesticidas, en los sectores agrícola y forestal (Galindo et al. 2000).

Y por último hay que citar el furtivismo. Pese a la escasez de las poblaciones, puntualmente la densidad de este cangrejo puede llegar a ser elevada, lo que hace que aún resulte provechoso pescarlo, ya sea para consumo particular o para comercialización clandestina en establecimientos públicos (Alonso et al. 2000). Además de reducir el número de

individuos de las poblaciones, el furtivismo es una importante vía de transmisión de enfermedades por la falta de desinfección de los utensilios de pesca (Beroiz 2004).

Por todo lo anterior, no solo en España sino también en el resto Europa, la mayoría de las poblaciones de cangrejo de río están fragmentadas en subpoblaciones relativamente pequeñas con un intercambio limitado de individuos.

La desaparición de las poblaciones de *Austropotamobius* tiene graves consecuencias ecológicas y ambientales sobre las aguas continentales. Este cangrejo representa un importante nivel trófico y su presencia es imprescindible para el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas correspondientes (Momot et al. 1978). Consecuentemente, el cangrejo de río, designado como *Austropotamobius pallipes*, se incluyó en la Lista Roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) primero en la categoría de *vulnerable* y actualmente, *en peligro* (Füreder et al. 2010) y está protegido en todos los países en los que habita (IUCN 2004, VU B2bce+3bcd). También está el Anexo III del Convenio de Berna 1982 (tratado internacional relativo a la conservación de la vida silvestre en el territorio europeo) referido a especies protegidas. Igualmente, se incluye en el Anexo V de la Directiva 92/43/CEE relativa a la protección de Hábitats Naturales y Seminaturales y Fauna y Flora Silvestres, en referencia a las especies cuya recogida y explotación pueden ser objeto de medidas de gestión.

En España está incluido en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas clasificado como *vulnerable* (BOE nº 149 del 23 de junio de 2003). Una de las últimas leyes de aplicación estatal que afecta al cangrejo de río es la Ley 42/2007 del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. Esta ley establece el régimen jurídico básico de la conservación, uso sostenible, mejora y restauración del patrimonio natural y de la biodiversidad, como parte del deber de conservar y del derecho a disfrutar de un ambiente adecuado para el desarrollo de la persona, establecido en el artículo 45.2 de la Constitución (BOE nº 299 del 14 de diciembre de 2007). Pero la legislación española es compleja a este respecto, pues incluye leyes de conservación de la naturaleza, pesca continental y comercio de especies silvestres, tanto en el ámbito nacional como en el autonómico. Algunas Comunidades Autónomas han publicado sus propias actuaciones relativas a la conservación de la naturaleza y pesca interior, mientras que en aquellas otras en las que no se ha legislado específicamente sobre esta especie, se aplican las regulaciones nacionales. Hasta ahora, sólo en Aragón, La Rioja y Navarra hay vigente un Plan de Recuperación de la especie (Alonso 2012).

La elaboración de un Plan de Recuperación específico implica necesariamente una mayor dedicación potencial de recursos. Parte de las actuaciones que se realizan consisten en programas de restauración basados, principalmente, en la translocación de individuos desde otras poblaciones, naturales o de astacifactoría. Pero el bajo número y densidad de las poblaciones hace necesario incrementar la disponibilidad de ejemplares para la repoblación, ya sea mediante la creación de más astacifactorías tradicionales o estanques extensivos (Alonso et al. 2000). En la actualidad, estos planes de actuación consideran diversos factores como el riesgo de transmisión de la plaga del cangrejo (o afanomicosis), las características de los cuerpos de agua que se pretenden repoblar o la distribución de las especies exóticas de cangrejos en estas áreas (Alonso et al. 2000; Diéguez – Uribeondo et al. 1997b).

Pero no debemos olvidar, si queremos tener éxito, que un objetivo fundamental de este tipo de programas ha de ser la preservación de la variabilidad genética de la especie. El conocimiento de los niveles y patrones de distribución de la diversidad genética es fundamental cuando se toman decisiones de gestión en el ámbito de la conservación, ya que la pérdida de variación genética y la depresión endogámica expone a las poblaciones naturales a un mayor riesgo de extinción (Reed & Frankham 2003). Por tanto, se necesitan políticas de conservación eficaces a nivel específico que incluyan información genética de las poblaciones amenazadas (Souty – Grosset et al. 1997).

La idea de proponer políticas de conservación de unidades por debajo del nivel de especie utilizando datos moleculares cobró importancia cuando se acuñó el concepto de ESU (*Evolutionary Significant Units*, Ryder 1986) y más tarde el de MU (*Management Units*, Moritz 1994, 2002). En ambos casos se trata de identificar grupos de poblaciones de la misma especie que han acumulado divergencias genéticas significativas tras haber estado aislados un periodo de tiempo suficiente. Los métodos filogeográficos son herramientas útiles para investigar esta distribución de la diversidad genética de una especie a distintas escalas espaciales, lo que es esencial para la identificación de ESU y MU de especies en peligro. Por ello, el cangrejo de río del género *Austropotamobius*, una vez generalizada la dramática regresión de sus poblaciones, ha sido objeto de diversos estudios.

Los primeros métodos utilizados para conocer su variabilidad se basaban en caracteres morfológicos y merísticos, pero estos caracteres están muy influenciados por factores ambientales. Por ello, a medida que se han ido desarrollando diferentes técnicas moleculares los trabajos de caracterización de la especie han ido incorporando información genética.

La tecnología basada en el análisis molecular mediante electroforesis de proteínas isoenzimáticas surgió en 1960, pero hasta la década de los 90 no se empleó para estudiar al cangrejo de río. De hecho, sólo hay cuatro trabajos que estudien la variabilidad genética de poblaciones europeas de *Austropotamobius pallipes* con esta técnica. Zarazaga (1993) caracterizó en España tres especies de cangrejos de río (*Procambarus clarkii*, *Pacifastacus leniusculus* y *Austropotamobius pallipes*), encontrando en *A. pallipes* mayor variabilidad ( $H=0,12$ ) que en las alóctonas (*P. clarkii* y *P. leniusculus*). Lörtscher estudió diversas poblaciones de *A. pallipes* de Suiza (Lörtscher et al. 1997; 1998) y sus resultados revelaron niveles muy bajos de heterocigosidad ( $H= 0,005$ ) y un porcentaje de loci polimórficos entre 0 y 10%. Por último, Santucci (Santucci et al. 1997) analizó una muestra más amplia de poblaciones de *A. pallipes*, que incluía Francia, Inglaterra, Italia, España y los Balcanes, obteniendo valores reducidos de variabilidad genética ( $H=0,05$ ).

El análisis molecular de isoenzimas es un método relativamente económico, sencillo desde el punto de vista técnico y rápido, pero como cualquier técnica no está exenta de inconvenientes. Así, el número de sistemas enzimáticos a estudiar es limitado, lo que disminuye su capacidad de discriminación, y la expresión de algunas isoenzimas es sensible a las condiciones ambientales externas, por lo que sólo detecta una parte de la variación total. Con posterioridad se desarrollaron tecnologías basadas en el análisis del DNA que evitaban los inconvenientes que limitaban la utilidad de la técnica de electroforesis proteica.

Una de estas técnicas son los RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que se fundamentan en la detección de fragmentos específicos en el conjunto del DNA de un organismo, tras digerirlo con enzimas de restricción, y la separación electroforética de los fragmentos resultantes. Se han utilizado RFLP de DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) en trabajos de poblaciones europeas de cangrejos de río (Grandjean & Souty-Grosset 1996, 2000a, b; Grandjean et al. 1997a, b; 2001), de los que deriva la clasificación actual propuesta para el complejo de especies *Austropotamobius pallipes*.

En 1986 una nueva metodología, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), supone una auténtica revolución en la biología molecular. Su éxito radica en la amplificación de fragmentos específicos partiendo de pequeñas cantidades de un DNA molde.

Basada en la PCR se desarrolló una técnica conocida como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). En ella se emplean cebadores de pequeño tamaño, generalmente 10 nucleótidos de secuencia arbitraria, por lo que no precisa de conocimiento previo del genoma de la especie a estudiar. De esta manera, multitud de fragmentos son amplificados con cada

cebador en cada genoma. Sólo dos grupos han empleado RAPD en el organismo que nos ocupa. El primero de ellos, en poblaciones europeas de *Austropotamobius* (Gouin et al. 2001), encontró niveles de diversidad ( $H_o = 0,159$ ) más elevados que los obtenidos con el análisis de isoenzimas. El segundo, en poblaciones españolas de este astácido, evidenció un grado de polimorfismo similar al de otras poblaciones europeas y cierta diferenciación geográfica (Beroiz 2004; Beroiz et al. 2008).

Combinando las características de RFLP y RAPD, en 1995 apareció publicada la descripción de los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Sólo encontramos dos trabajos que han utilizado AFLP para el estudio de la variación genética de *A. pallipes* (Chiesa et al. 2010; 2011). En ellos, con más de 500 loci analizados, se obtuvieron unos niveles de polimorfismo cercanos al 90%.

Otra técnica basada en la PCR que se emplea en estudios poblacionales, son los microsatélites o repeticiones de secuencias simples (SSR). Los SSR se distribuyen por todo el genoma nuclear, normalmente son marcadores neutros (Pascual et al. 2001), poseen una alta tasa de mutación (Primmer et al. 1996) y elevados niveles de heterocigosis, incluso en poblaciones pequeñas de especies amenazadas (Allendorf & Luikart 2007). El análisis del genoma nuclear es fundamental en el estudio de especies amenazadas puesto que divergencias en las frecuencias alélicas a este nivel pueden contribuir a identificar poblaciones que deban ser conservadas de manera independiente por los recursos genéticos que albergan. El uso de los microsatélites en distintas especies de cangrejos es aun escaso, no obstante se han publicado varios trabajos en referencia a poblaciones europeas de *Austropotamobius*, encontrando niveles de variabilidad genética más altos que los estimados con otros marcadores moleculares (Baric et al. 2005a, 2006; Gouin 2000, 2002, 2006). Además, mediante su estudio en poblaciones francesas se han detectado dos grupos genéticamente diferenciados de *Austropotamobius*, norte y sur, que se han propuesto como ESU independientes (Gouin et al. 2006).

Pero sin duda, la secuenciación de determinadas regiones del DNA mitocondrial ha sido la técnica más empleada para conocer la variabilidad genética de las poblaciones europeas de cangrejo de río. Entre las razones de su empleo destaca su tasa de mutación, más elevada, en general, que la del DNA nuclear. Además, la herencia materna y la ausencia de recombinación también hacen del DNAm un marcador particularmente apropiado para trazar la historia evolutiva, incluyendo los procesos de colonización, migración, introducciones recientes y cuellos de botella de las poblaciones (Avise 2004). De los 37 genes que codifica el genoma mitocondrial, dos de ellos, el gen del RNA ribosómico 16S (16S) y el gen codificante de

la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), son los más estudiados en los astácidos. El gen 16S se usa habitualmente en el estudio de la diversidad genética en los niveles taxonómicos medios, como familia o género (Gerber et al. 2001). En cambio el gen COI, con su alta tasa de mutación, unas tres veces más alta que la del 16S, resulta más sensible para identificar entidades por debajo del nivel de especie y por tanto, distintas unidades de conservación (Rach et al. 2008). En concreto en *A. pallipes*, son varios los autores que han estudiado su estructura poblacional a una escala geográfica amplia, empleando secuencias del gen 16S (Baric et al. 2005a, b; Fratini et al. 2005; Grandjean et al. 2002a, b; Largiadèr et al. 2000; Zaccara et al. 2004) y secuencias del gen COI (Baric et al. 2005a; Callejas et al. 2009; Diéguez – Uribeondo et al. 2008; Matallanas et al. 2011, 2012; Trontelj et al. 2005; Zaccara et al. 2005). Estos trabajos han permitido adquirir conocimientos no sólo sobre la variabilidad genética a nivel cuantitativo, sino también sobre la estructura genética de las poblaciones de *Austropotamobius* y ayudar a dilucidar su posición taxonómica. Con fines de conservación, el análisis del DNAm ha resultado útil para identificar las unidades de manejo de este macroinvertebrado (Diéguez – Uribeondo et al. 2008; Grandjean et al. 1997b; Trontelj et al. 2005).

En conjunto, el empleo de técnicas moleculares en el estudio de poblaciones europeas de cangrejo de río ha supuesto un gran avance en el conocimiento del género. Se ha profundizado en el estudio de las rutas de colonización o en el efecto vicariante de algunas barreras geográficas. Pero también han surgido nuevas preguntas, entre ellas el origen autóctono del cangrejo de río en España, un tema ampliamente debatido y sobre el que hay varias hipótesis al respecto.

A pesar del interés que ha despertado el origen del cangrejo en nuestro país, los trabajos que se ocupan del mismo son escasos. Los primeros estudios del DNAm en las poblaciones españolas de *Austropotamobius* contaban con un número reducido de ejemplares muestreados. En ellos, ya sea mediante RFLP de mtDNA total (Grandjean et al. 1997a; 2000c), el análisis de las secuencias del gen 16S (Grandjean et al. 2002a, b) o del gen COI (Trontelj et al. 2005), no se encontró variabilidad genética ni diferenciación entre las poblaciones ibéricas. Además, se observó que las poblaciones españolas y las del norte de Italia presentaban el mismo haplotipo mitocondrial. Puesto que está documentado que el hombre ha realizado translocaciones de cangrejos por toda Europa desde hace siglos (Grandjean et al. 1997b, Lörtscher et al. 1997; Santucci et al. 1997; Swahn 2004), los hallazgos moleculares parecían indicar que la presencia de este astácido en España podría deberse a una reciente introducción de origen antropogénico desde el norte de Italia. En cambio, estudios moleculares más

recientes con un muestreo más amplio han mostrado, analizando también marcadores mitocondriales, la existencia de variación genética y cierta estructuración de la misma en las poblaciones españolas (Beroiz et al. 2008; Diéguez – Uribeondo et al. 2008; Pedraza – Lara et al. 2010), lo que no respaldaría el origen foráneo del cangrejo común en España.

Así pues, la falta de trabajos que analicen estas poblaciones con más de un marcador y contrasten los datos obtenidos con muestras italianas de un área geográfica determinada, favorece que el debate sobre el origen de la especie en nuestro país continúe.

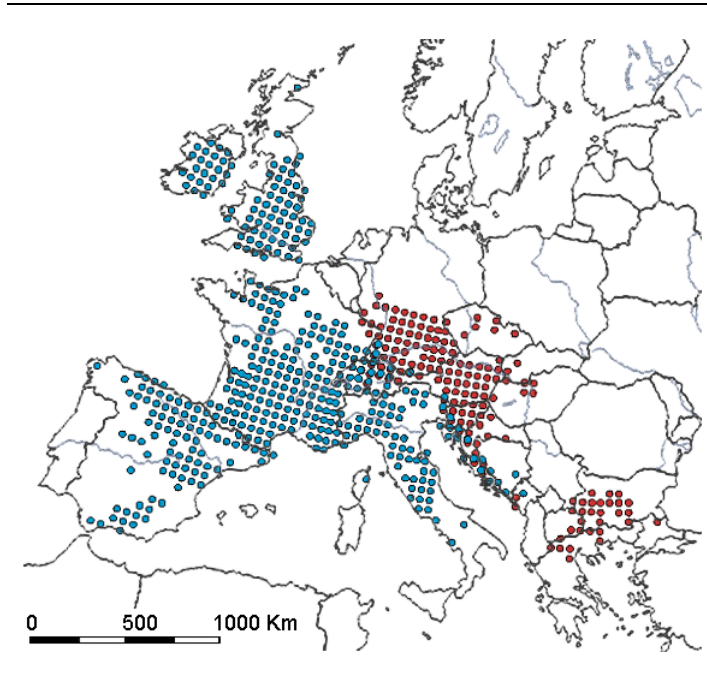
Si bien este asunto podría limitarse a un problema académico sin mayores repercusiones, resulta especialmente sensible en una especie en peligro de extinción para la que se están desarrollando e implantando planes de recuperación. Cuestionar el origen de la especie en España podría suponer que la eliminen del Catálogo Español de Especies Amenazadas, y por tanto, la pérdida de las medidas de protección y conservación vigentes que le afectan (Diéguez – Uribeondo et al. 2008).

En la adecuada gestión del cangrejo de río en España no sólo es urgente aumentar nuestro conocimiento sobre la variabilidad y estructura genética de sus poblaciones, sino que resulta imprescindible disponer de una taxonomía sólida. La taxonomía es la base de la conservación, ya que sin ella se pueden malinterpretar las prioridades de conservación, especialmente en las especies en peligro de extinción (Mathews et al. 2008; Owen et al. 2015).

Todas las especies autóctonas de cangrejos de río europeas están incluidas dentro de la familia *Astacidae*, y pertenecen a dos géneros, *Astacus* y *Austropotamobius*, cuya taxonomía se ha revisado numerosas veces en el siglo XX. En el género *Astacus* se han establecido entre una y nueve especies distintas, aunque la clasificación más aceptada distingue tres: *A. astacus* (Linnaeus 1758) distribuido por el centro y norte de Europa, *A. leptodactylus* (Eschholtz 1823) en la cuenca del mar Negro y *A. pachypus* (Rathke 1837) en la cuenca del Mar Caspio. La taxonomía del género *Austropotamobius* también ha sido, y sigue siendo, muy controvertida. Se han defendido varias clasificaciones en las últimas décadas por otros tantos autores, algunos proponiendo la existencia de una sola especie con varias subespecies o variedades y, otros postulando la existencia de diferentes especies. Actualmente se acepta que este género está compuesto por dos especies, *A. torrentium* y *A. pallipes*.

El área de distribución de *A. torrentium* se limita al centro y sureste de Europa, en la cuenca del Danubio (Figura 3) (Holdich et al. 2009). Las últimas investigaciones han revelado

que está compuesta por siete filogrupos que se pueden distinguir tanto geográfica como genéticamente. Tres se distribuyen por el sureste de los Alpes, Eslovenia y las cuencas del Rin y el Kolpa, y los otros cuatro en la región kárstica de los Alpes Dináricos (Klobučar et al. 2013).



**Figura 3.** Mapa de distribución del género *Austropotamobius* en Europa. En azul se muestra el área de distribución de *A. pallipes* sensu lato, y en rojo, el de *A. torrentium*. Basado en Holdich et al. 2009.

Mientras que el rango específico de *A. torrentium* ha sido ampliamente aceptado, la taxonomía de *A. pallipes* aún es controvertida debido a la gran variabilidad genética que presenta, por lo que se ha considerado como un complejo de especies. Así, la taxonomía de este complejo ha ido cambiando con el tiempo, llegándose a establecer un mínimo de una especie y un máximo de cuatro especies con hasta nueve subespecies diferentes (Albretch 1982; Bott 1950, 1972; Brodsky 1983; Karaman 1963; Pretzmann 1987; Starobogatov 1995). Las distintas clasificaciones basadas en caracteres morfológicos y merísticos no siempre han concordado entre sí ni con las taxonomías inferidas a partir de herramientas moleculares, por lo que se sigue debatiendo si *A. pallipes* está compuesta por una o dos especies.

Hay autores que consideran que *A. pallipes* constituye una única especie, la cual se distribuye ampliamente por Europa, desde la Península Ibérica en el oeste a la Península Balcánica al este, y desde las Islas Británicas al norte, al sur de Italia (Figura 3) (Chiesa et al. 2011; Scalici & Bravi 2012; Trontelj et al. 2005).

En cambio, otros autores proponen la existencia de dos especies, *A. pallipes* y *A. italicus*. *A. pallipes* se extendería por Francia, Inglaterra, Irlanda, Alemania (cuena del Rin al suroeste del país), Suiza (cuencas del Rin y Ródano), noroeste de Italia, y probablemente también por Bélgica. *A. italicus* ocuparía el resto de Italia, Austria (cuena del Danubio), Suiza (cuena del Po), Eslovenia, Bosnia, Croacia, Montenegro y la Península Ibérica. Empleando marcadores moleculares se han descrito a su vez 4 – 5 subespecies o linajes en *A. italicus*, dependiendo del autor (Fratini et al. 2005; Grandjean et al. 2000c, 2002a, b; Trontelj et al. 2005).

Oficialmente sólo se reconoce una especie, *A. pallipes*, pero en la práctica la clasificación más empleada distingue las dos especies mencionadas, *A. pallipes* y *A. italicus*, y es la que seguiremos en este trabajo. En esta clasificación, las poblaciones españolas de este astácido pertenecerían a la especie *A. italicus*, y más concretamente a la subespecie *A. italicus italicus*. Además, hoy día se distingue entre *A. pallipes* sensu estricto (s. e) y *A. pallipes* sensu lato (s. l.). En el primer caso, el nombre hace referencia a una especie concreta, mientras que el segundo se emplea al hablar de este cangrejo de río en sentido amplio, englobando a las dos especies antes nombradas. Otras formas comunes en la literatura para designar a *A. pallipes* sensu lato (s. l.) son complejo de especies *A. pallipes* y *A. pallipes/italicus*.

Como hemos visto los cangrejos europeos han sido objeto de numerosas revisiones taxonómicas y a pesar del esfuerzo realizado sigue sin haber un consenso en cuanto a su sistemática y taxonomía. Quizá la causa subyacente sea que cuando la ‘propia’ especie se convierte en el objeto de estudio es difícil establecer las fronteras que la definen, más si se tiene en cuenta la variabilidad entre organismos o incluso entre poblaciones de una misma especie. El desacuerdo sobre qué constituye una especie, y por lo tanto sobre cómo reconocerlas en la práctica, es uno de los problemas más antiguos de la biología.

Las numerosas definiciones del concepto ‘especie’ son, en ocasiones, contradictorias. Una de las últimas propuestas para definir el término es el concepto unificado de especie (de Queiroz 2005a) y quizá uno de sus mayores logros haya sido conciliar las definiciones anteriores, sin por ello negar la importancia de las propiedades que subyacen a sus diferencias (de Queiroz 2005b). Bajo este concepto se equipara especie con linajes de metapoblaciones que evolucionan de manera separada, o más específicamente, segmentos de tales linajes (De Queiroz 1998, 1999, 2005 a, b, c). Partiendo de esta definición, los esfuerzos se centran en

cómo delimitar los linajes, es decir, en decidir cuándo un linaje ha divergido lo suficiente para ser considerado una especie distinta (Wiens 2007).

A este respecto, las herramientas filogeográficas han demostrado su utilidad en la taxonomía, campo en el que el *DNA barcoding* ha supuesto un punto de inflexión. La idea de que una corta secuencia de DNA sirva para identificar especímenes animales, asignarlos a especies reconocidas, e incluso, establecer nuevas especies ha sido toda una revolución (Hebert et al. 2003). Hoy día resulta rápido y, relativamente, económico conseguir una gran cantidad de secuencias del grupo de estudio. Y esta disponibilidad de datos, a su vez ha puesto de manifiesto la necesidad de analizar la diversidad genética del grupo de estudio como paso previo al establecimiento de límites para discriminar especies. Para ello se han desarrollado nuevas metodologías que incluyen análisis estadísticos potentes de la información genética, para la asignación de individuos a especies o incluso establecer nuevas especies.

Estos avances han conducido al desarrollo de la 'taxonomía molecular'. El uso de caracteres moleculares proporciona una línea alternativa de evidencia que puede contribuir en la determinación de la relación sistemática de organismos y evaluar rango taxonómico (Burham & Dawkins 2013). La taxonomía molecular no reemplaza a los estudios taxonómicos morfológicos pero tiene una serie de ventajas sobre la taxonomía tradicional (basada en caracteres morfológicos y merísticos), entre las que podemos destacar el reconocimiento de especies morfológicamente crípticas (Hebert et al 2003; Stoeckle 2003), como podría ser el caso del complejo de especies *Austropotamobius pallipes*.

En definitiva, la distribución y abundancia de las poblaciones del cangrejo de río en España se han visto mermadas de forma drástica en las últimas décadas. Ha sido catalogada como especie *en peligro* en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) e incluida en los Anexos II y V de las Directivas 92/43/CEE y 97/62/UE como especie que requiere medidas especiales de conservación. En el Catálogo Nacional de especies amenazadas se ha incluido como especie *vulnerable* por su tendencia poblacional regresiva que le ha llevado a desaparecer de una gran parte de su área de distribución.

Para conservar esta especie en nuestro país resulta indispensable la adquisición de datos genéticos. A pesar de esta urgencia, en las publicaciones sobre este macroinvertebrado normalmente solo se muestrea una pequeña parte de su área de distribución en España o

bien, en muestreos más amplios el número de individuos analizados por población es muy reducido, muchas veces de un solo ejemplar por muestra y con un único marcador molecular, generalmente mitocondrial.

Así pues, para la adecuada conservación de las poblaciones españolas de cangrejo de río es indispensable su estudio con marcadores moleculares, tanto mitocondriales como nucleares, en un número significativo de poblaciones y especímenes distribuidos por todo el país. De esta manera será posible conocer el estado actual de las poblaciones de la especie en nuestro país y obtener información que redunde en una adecuada gestión de las mismas.

De otra parte, la mayoría de los estudios en *A. pallipes* sensu lato se han restringido a un área geográfica reducida, han analizado un pequeño tamaño muestral o han limitado el estudio a un solo gen. Todo esto resulta sorprendente pues hoy día se dispone de una gran cantidad de información genética, fundamentalmente procedente de dos genes mitocondriales en poblaciones de áreas geográficas muy extensas.

Teniendo en cuenta el impacto de la taxonomía en la conservación de las especies, es necesario adquirir un conocimiento exhaustivo de la variabilidad genética que alberga esta especie como paso previo a la realización de una revisión taxonómica molecular robusta.

Así pues, en este trabajo nos hemos propuesto el estudio genético de las poblaciones españolas de *Austropotamobius* mediante el análisis de marcadores mitocondriales y nucleares, constituyendo el primer trabajo de esta especie que incluye un número significativo de poblaciones, y ejemplares, distribuidas en toda España. También nos hemos planteado realizar una reevaluación de la taxonomía del complejo de especies *A. pallipes*, analizando la mayor parte de la información genética disponible hasta la fecha.



## Objetivos

---



Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, nos hemos planteado el estudio filogeográfico de las poblaciones de cangrejo de río españolas. Para ello hemos empleado dos técnicas moleculares con diferentes marcadores genéticos. Mediante el análisis de loci microsatélites abordaremos el estudio del genoma nuclear de *A. italicus* y con las secuencias de los genes que codifican el RNA ribosomal 16S y la subunidad I de la citocromo oxidasa realizaremos el análisis del DNAm.

Con la información obtenida hemos pretendido:

- Evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de cangrejo río en España a nivel nuclear y mitocondrial.
- Analizar los patrones de distribución de esa variabilidad genética.
- Inferir las relaciones entre las poblaciones.
- Reconstruir la historia demográfica de la especie en España, relacionándola con su posible origen natural o antropogénico.
- Identificar grupos de poblaciones de interés para la conservación de los recursos genéticos de la especie.
- Poner a punto la identificación genética de ejemplares mediante una técnica rápida, sencilla, económica y reproducible.
- Valorar las consideraciones taxonómicas que se desprenden del análisis de la variación genética de las poblaciones de este astácido en toda Europa.



## Capítulo 1

---

Análisis de las poblaciones españolas de cangrejo de río:  
DNA mitocondrial



## Introducción

Las poblaciones de la mayoría, si no todas, las especies muestran un cierto nivel de estructuración genética, que puede deberse a una variedad de procesos que no son mutuamente excluyentes (Balloux & Lugon – Moulin 2002). En genética de la conservación, el conocimiento de la relación entre los individuos que forman una población así como de la estructura genética de las especies, especialmente aquellas en peligro de extinción, es esencial para tomar medidas eficaces que minimicen la endogamia y la pérdida de variación genética (Frankham et al. 2002). Una disminución de la variabilidad genética reduce la capacidad de las poblaciones para hacer frente a los cambios ambientales y por tanto, disminuye su probabilidad de supervivencia a largo plazo (Saccheri et al. 1988).

Los métodos moleculares desempeñan un papel clave en la estimación de la variabilidad genética y son muy útiles para medir el flujo genético y diferenciación de las poblaciones, así como para rastrear genealogías y reconstruir su historia demográfica (Purugganan & Gibson 2003). La electroforesis de isoenzimas fue el primer método empleado para estimar los niveles de variabilidad genética existente en las poblaciones, se introdujo a mediados de 1960 y fue la técnica de referencia durante casi diez años. Entre 1970 y 1980 el análisis de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) de DNA, especialmente DNA mitocondrial (DNAMt), dominó este campo tanto como los estudios de isoenzimas lo hicieron la década anterior. Pero fue en la década de 1980 cuando se produjo un salto cualitativo en este tipo de análisis. Por una parte, el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Mullis et al. 1986) y de los primeros métodos de secuenciación rápidos y fiables (Innis et al. 1988; Sanger et al. 1977) permitieron el acceso directo a la información contenida en la secuencia nucleotídica. Por otro lado, se formalizó la teoría de la coalescencia (Kingman 1982) y se sentaron las bases de una nueva disciplina, la filogeografía (Avice et al. 1987). A partir de entonces, el avance en el desarrollo de las técnicas moleculares, los enfoques conceptuales y la aplicación de nuevos análisis estadísticos han permitido profundizar en el análisis de la estructura poblacional de muchas especies a diversas escalas geográficas y temporales.

La filogeografía se ocupa de la disposición espacial de los linajes genéticos, especialmente dentro de una especie, aunque también entre especies estrechamente relacionadas. Este análisis e interpretación de la distribución de los linajes requiere una gran cantidad de datos provenientes, entre otros, de la genética molecular y la genética de

poblaciones. En 1987 se describen las características que debería tener una molécula para abordar estudios filogeográficos concluyéndose que el DNA mitocondrial de los animales superiores resultaba ser un buen candidato (Avice et al. 1987). Las características que le hacen atractivo para este tipo de estudios son que se transmite, generalmente, por vía materna y que a efectos prácticos, se le puede considerar no recombinante y haploide, lo que simplifica en gran medida la reconstrucción de las relaciones filogenéticas. Además, su tasa de mutación es, de media, significativamente mayor que la del DNA nuclear, aunque menor que la encontrada en secuencias nucleares altamente repetidas como los microsátélites. Así, la variación en el DNAm surge más rápido que en los loci nucleares y por otro lado, problemas como la aparición y desaparición recurrente de alelos que complican el análisis de otros marcadores no son frecuentes. Por último, en cada célula hay un gran número de mitocondrias. Esto resulta particularmente relevante en el análisis de muestras de poblaciones naturales especialmente de especies protegidas. En estos casos la legislación establece que la toma de muestras no debe perjudicar al ejemplar por lo que, a menudo, las muestras son pequeñas, y pueden no preservarse adecuadamente hasta su llegada al laboratorio. Por tanto, el elevado número de copias de DNAm en las células animales facilita considerablemente su amplificación por PCR en muestras pequeñas y en algunos casos deterioradas.

El DNAm es una molécula circular, covalentemente cerrada, de pequeño tamaño (16 – 20 kilobases), que codifica un total de 37 genes (13 RNA mensajeros, 2 RNA ribosomales y 22 RNA de transferencia) y una región control de la replicación y transcripción en vertebrados y equinodermos. De los dos genes de RNA ribosomales que contiene, el gen 12S está altamente conservado y se ha empleado en el estudio de la diversidad genética en los niveles taxonómicos más altos, como *phyla*. En cambio, el gen 16S se usa habitualmente en los niveles medios, como familia o género (Gerber et al. 2001). Debido a que los genes mitocondriales que codifican proteínas tienen una tasa de mutación mayor que la de los genes de RNA ribosomales, se han convertido en los marcadores moleculares más usados en el análisis de la variación genética de los niveles taxonómicos más bajos, sobre todo a nivel específico e incluso poblacional. De los 13 genes codificantes del DNA mitocondrial, tres son los más usados: citocromo b, NADH deshidrogenasa subunidad 5 (NADH5) y citocromo oxidasa subunidad I (COI), aunque es el gen COI el más estudiado en los últimos años, puesto que su alta tasa de mutación permite identificar entidades por debajo del nivel de especie que podrían constituir, para lo que nos interesa, distintas unidades de conservación (Rach et al. 2008).

Sólo en los decápodos, la base de datos moleculares GenBank, perteneciente al NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), alberga más de 12000 y 25000 entradas de

los genes mitocondriales 16S y COI, respectivamente. Esto supone, al menos, entre 5 y 10 veces más información acerca de estos genes que del resto (el gen 12S tiene unas 2500 secuencias y la NADH5, unas 300). En relación con *Austropotamobius*, el análisis de estos dos marcadores en poblaciones europeas ha supuesto un gran avance en el conocimiento del género. Su estudio ha permitido proponer nuevos centros de radiación de la especie fuera de los refugios glaciares clásicos (Trontelj et al. 2005). También descartar el efecto vicariante de los Alpes en las poblaciones de *A. pallipes* de Francia e Italia (Stefani et al. 2009) a pesar de que los estudios anteriores parecían apoyar esta teoría (Fratini et al. 2005). Se han confirmado además a nivel molecular, los drásticos cuellos de botella sufridos por algunas de sus poblaciones, como las del sur del Tirolo y Toscana (Baric et al. 2005a; Bertocchi et al. 2008a) y han revelado que la influencia humana es clave para entender el patrón actual de distribución de la variabilidad genética de este género en Europa (Baric et al. 2006; Cataudella et al. 2010; Stefani et al. 2009).

En España los primeros estudios del DNAm de *Austropotamobius*, ya sea mediante RFLP (Grandjean et al. 1997a, 2000b, c), el análisis del gen 16S (Grandjean et al. 2002a, b) o el gen COI (Trontelj et al. 2005), no evidenciaron variabilidad genética ni diferenciación entre las poblaciones. Además, se observó que las poblaciones españolas y las del norte de Italia presentaban el mismo haplotipo mitocondrial. Aunque estudios recientes han mostrado la existencia de variación genética y cierta estructura de la misma en las poblaciones españolas (Diéguez – Uribeondo et al. 2008; Pedraza – Lara et al. 2010), hoy en día se sigue especulando sobre el origen natural o antropogénico del cangrejo de río en España. Un tema especialmente sensible en una especie en peligro de extinción para la que se están desarrollando e implantando planes de recuperación.

Los programas actuales de restauración activa de las poblaciones están basados en la translocación de individuos desde otras poblaciones naturales o en cautividad y por tanto, están limitados por el número y tamaño de las poblaciones ‘donantes’ existentes. Estos planes de actuación tienen en cuenta varios factores como el riesgo de transmisión de enfermedades, el riesgo que supone para su supervivencia establecer nuevas poblaciones, las características de los cuerpos de agua que se pretenden repoblar o la distribución de especies exóticas en esas áreas (Alonso et al. 2000; Diéguez – Uribeondo et al. 1997b). Sin embargo, hasta hoy, la información genética no se ha considerado objetivo prioritario de esos programas, y debería serlo, ya que variabilidad genética es la base de la viabilidad y evolución de las poblaciones (Avice 2000; Moritz et al. 2002).

En la biología de la conservación, la filogeografía también es una herramienta importante porque puede aportar información que resulte valiosa en el manejo de las especies en peligro (Moritz 1994; Saccheri et al. 1998). Entre estos datos cabe destacar el conocimiento de la distribución actual de la especie, la estructura genética de sus poblaciones, el flujo génico que mantienen y los eventos demográficos que han acontecido. A nivel infraespecífico es imprescindible conocer los niveles de variabilidad genética que alberga una especie, y con fines de conservación, identificar de manera precisa ‘grupos operativos’ que puedan reflejar la importancia evolutiva de los linajes que conforman la especie. Estos ‘grupos operativos’ serán la base para crear programas efectivos para la conservación de las especies en riesgo (Avice & Hamrick 1996). Se han acuñado distintas definiciones para estos ‘grupos operativos’ como se verá en la introducción del Capítulo 2. La identificación de estos grupos resulta indispensable en políticas de conservación responsables y eficaces, aunque para alcanzar esta meta es necesario disponer de herramientas moleculares rápidas y económicas.

Hoy en día el análisis conjunto de varios marcadores moleculares ha demostrado ser útil para clarificar aspectos controvertidos sobre la taxonomía y la biogeografía así como para reconstruir filogenias detalladas en distintos grupos de organismos, entre ellos los crustáceos decápodos (Harrison 2004; Nayak & Umadevi 2012; Negri et al. 2012), incluidos los astácidos (Maguire et al. 2013).

El cangrejo de río juega un papel clave en la dinámica en los ecosistemas en los que habita. En las últimas décadas, ha sufrido una drástica reducción en nuestro país, tanto en su área de distribución como en el número de poblaciones. Por tanto, el conocimiento de los niveles y distribución de su variabilidad genética resulta imprescindible para una buena planificación de su conservación. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el propósito de este capítulo es aportar información significativa y profundizar en la filogeografía de *Austropotamobius* en España. Para ello nos hemos propuesto el análisis conjunto de los genes mitocondriales 16S y COI para (1) evaluar la variabilidad genética mitocondrial en las poblaciones españolas de cangrejo de río y su patrón de distribución geográfico, (2) inferir las relaciones entre estas poblaciones, (3) reconstruir su historia demográfica, relacionándola con su posible origen natural o antropogénico, (4) desarrollar una herramienta molecular económica y eficaz que permita detectar, de una forma sencilla en laboratorios pequeños, la variabilidad genética de *A. italicus* y (5) ofrecer propuestas para futuros planes de recuperación de esta especie.

## Material y métodos

### Muestras

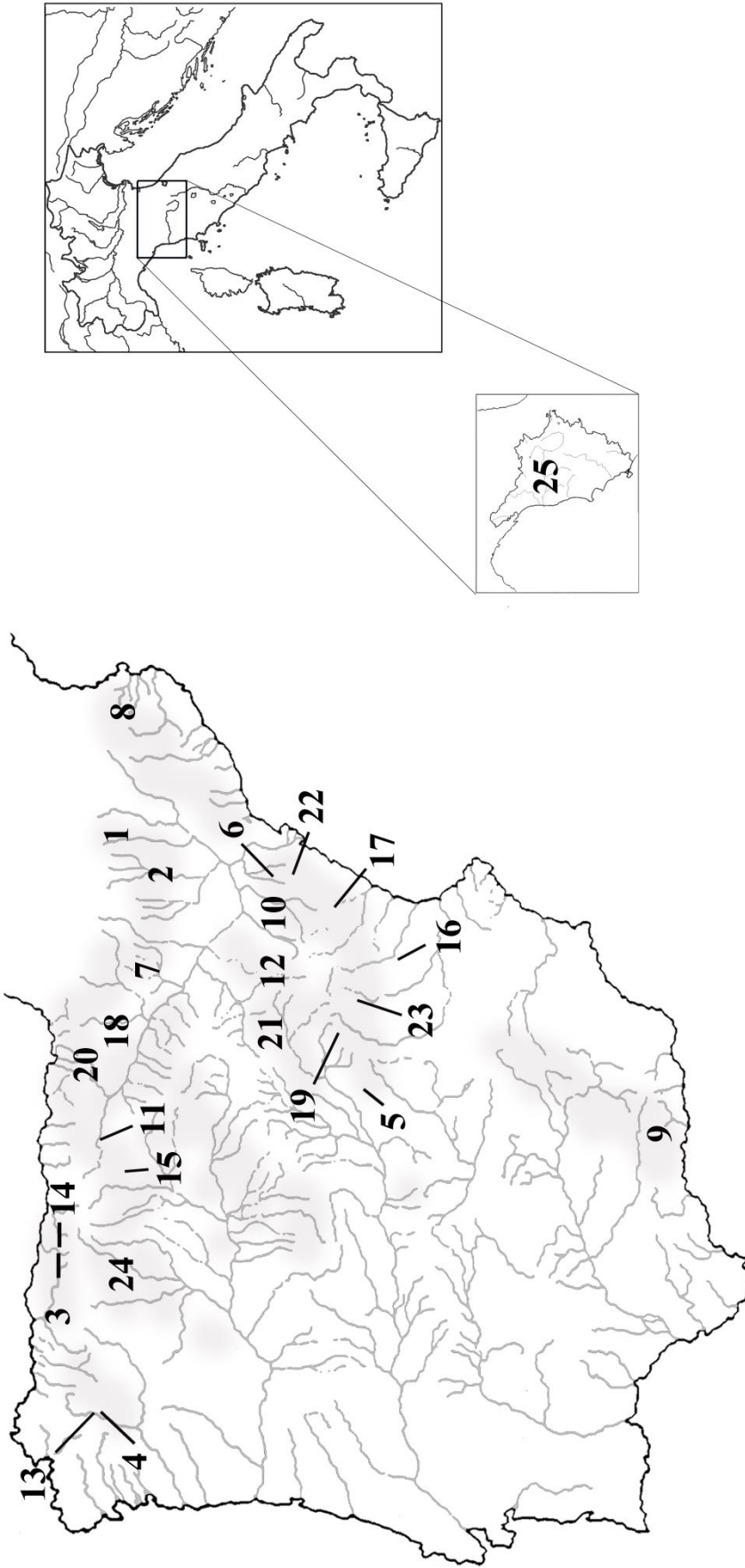
Se han analizado un total de doscientos cincuenta cangrejos de los cuales doscientos cuarenta pertenecen a veinticuatro poblaciones españolas, de las principales cuencas hidrográficas en todo el rango de distribución de la especie en España, y el resto a una población italiana. En España, las muestras provienen de poblaciones en libertad salvo dos, cuyos ejemplares se crían en cautividad en las astacifactorías de Rillo de Gallo (Guadalajara) y de Pont de Suert (Lleida) para posteriores repoblaciones. La localización de cada una de las muestras se detalla en la Tabla M1 y Figura M1.

En 10 de las 24 poblaciones españolas (#5, #8, #9, #11, #14, #17, #18, #19, #20 y #22) se disponía del ejemplar completo. Para obtener las restantes muestras, puesto que no es una especie pescable, se contactó con el personal de las Administraciones de Pesca Fluvial y Conservación de la Naturaleza de las distintas Comunidades Autónomas. Se dieron indicaciones para recoger un períopodo de cada individuo – que los cangrejos son capaces de regenerar – y conservarlo en etanol. Con esta técnica se evita la muerte del animal y los cangrejos se devolvieron vivos a los lugares de captura después de la toma de muestras.

La muestra italiana se usó como referencia externa. Para conseguirlo, se contactó con las Dras. S. Bertocchi y S. Brusconi, de la Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Biologia, que enviaron períopodos conservados en etanol de cangrejos procedentes de Italia.

Código	Población	Lugares de muestreo	Cuenca / Vertiente
#1	Astacifactoría	El Pont de Suert / Lérida	A
#2	Río Calcón	Casbas de Huesca / Huesca	Ebro / MED
#3	Arroyo Mestas	Cangas de Onís/ Asturias	Sella / CAN
#4	Río Azumara	Pol / Lugo	Miño / ATL
#5	Arroyo Cuende	Huerta de Obispalia/ Cuenca	Guadiana / ATL
#6	Río Ebro	Beceite / Teruel	Ebro / MED
#7	Río Gallego	Santa Eulalia de Gallego / Zaragoza	Ebro / MED
#8	P.N.V. Garrotxa	Olot / Gerona	C. Catalana / MED
#9	Arroyo Ermitas	Albuñuelas / Granada	Guadalquivir / ATL
#10	Río Guadalupe	Castellote / Teruel	Ebro / MED
#11	Arroyo Guztar	Padrones de Bureba / Burgos	Ebro / MED
#12	Río Huerva	Cucalón / Teruel	Ebro / MED
#13	Río Lea	Castro de Rei/ Lugo	Miño / ATL
#14	Lago Ercina	Cangas de Onís/ Asturias	Sella / CAN
#15	Manantial Madalena	Rebolledo de Traspesña/ Burgos	Duero / ATL
#16	Balsa Brenalejo	Utiel/ Valencia	Júcar / MED
#17	Barranco Gorgàs	Lucena del Cid/ Castellón	Júcar / MED
#18	Río Ega	Estella / Navarra	Ebro / MED
#19	Arroyo Pozuelo	El Pozuelo / Cuenca	Tajo / ATL
#20	Río Nervión	Altube/ Álava	Nervión / CAN
#21	Astacifactoría	Rillo de Gallo/ Guadalajara	A
#22	Barranco Salt	La Pobla de Benifassà / Castellón	Júcar / MED
#23	Río Guadazón	Valdemoro/ Cuenca	Júcar / MED
#24	Laguna Valsemana	Lugán / León	Duero / ATL
#25		Florenca y Prato / Italia	Arno / LIG

**Tabla M1.** Poblaciones de *A. italicus* muestreadas. A: Astacifactoría, CAN: Cuenca Cantábrica, MED: Cuenca Mediterránea, ATL: Cuenca Atlántica, LIG: Cuenca del Mar de Liguria. P.N.V Garrotxa: Parque natural de la zona volcánica de la Garrotxa.



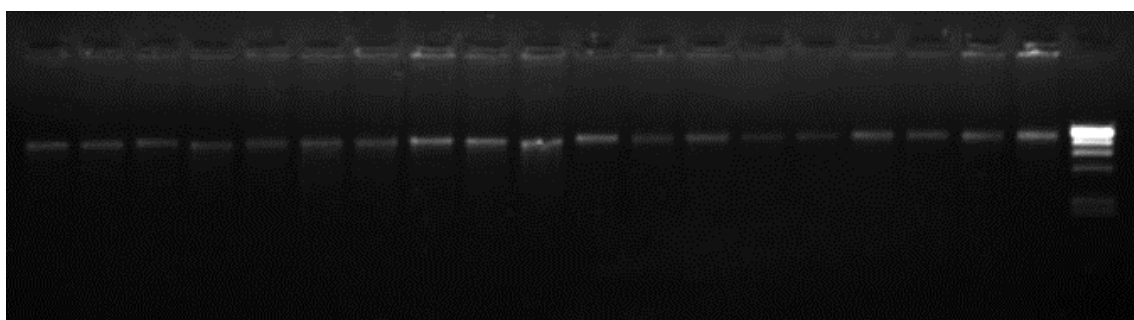
**Figura M1.** Localización de las poblaciones de *Austropotamobius* muestreadas. Las áreas sombreadas representan la distribución actual de la especie en España (modificado de Alonso et al. 2000). La Tabla M1 detalla las características de cada población.

### Aislamiento de DNA y amplificación

El DNA genómico se extrajo del tejido de los periópodos con el kit comercial *DNeasy Blood and Tissue* de Qiagen (Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se resuspendió en 100µl de tampón TE 10:1 (Tris – HCl 10mM y EDTA 1mM pH 8.0).

La concentración y pureza del DNA se estimó mediante la absorbancia a 260 – 280 nm con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-100 (NanoDrop Technologies, Willmington, USA). También se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con tampón TAE (Tris – Acetato 0,04 M, EDTA 1 mM pH 8,0) y bromuro de etidio (1µl/ml) para comprobar que no existía degradación del DNA ni restos de RNA (Figura M2).

---



---

**Figura M2.** DNA genómico extraído de 19 individuos de *A. italicus* de la población #9 (calles 1-19). Calle 20, marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III (AppliChem, Darmstadt, Alemania).

En algunos casos, cuando la calidad del DNA no era adecuada, las muestras se purificaban siguiendo un método de fenol : cloroformo. A la solución de DNA obtenida, se añadía un volumen de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar contaminantes proteicos. Tras centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm, se recogía la fase acuosa (la extracción fenólica se repetía 2-3 veces). Para eliminar los restos de fenol, se añadía un volumen de cloroformo y se recuperaba de nuevo la fase acuosa, que se mezclaba con 0,3 volúmenes de acetato sódico (3M pH 5,2) y un volumen de isopropanol para precipitar el DNA. La mezcla se mantenía a -20°C toda la noche.

El DNA precipitado se recuperaba tras una centrifugación de 20 minutos a 13000 rpm y para eliminar las sales, se realizaron lavados con 800 µl de etanol al 70%. Tras una centrifugación de 5 minutos a 13000 rpm, el precipitado obtenido se dejaba secar al aire. Por último, el DNA se resuspendía en 100 µl de TE 10:1. La concentración, pureza e integridad de

las muestras tratadas se determinaba por el procedimiento anteriormente descrito. Una vez valorado, una alícuota de DNA se llevaba a una concentración de 5 ng/ $\mu$ l con TE 10:1 y todo, stock y alícuota, se conservaba a -20°C hasta su utilización.

El DNA extraído de cada individuo se usó como molde en la amplificación de dos marcadores mitocondriales, un fragmento del gen de la Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) y una región del gen del RNA ribosómico 16S.

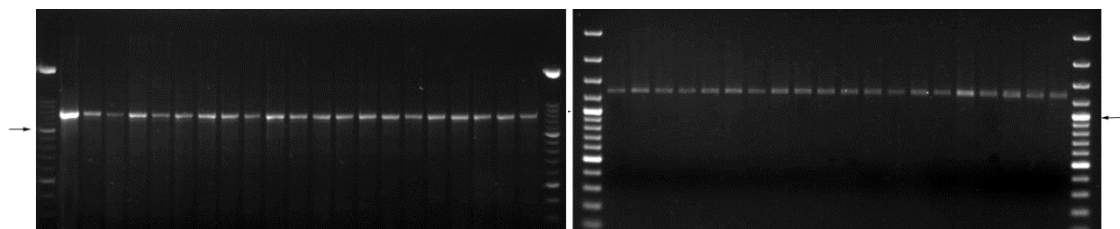
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen COI tenía un volumen final de 50  $\mu$ l y contenía 25ng de DNA, tampón de reacción 1x, 2mM de  $MgSO_4$ , 200  $\mu$ M de cada dNTP, 30  $\mu$ g de BSA (seroalbúmina bovina, fracción V, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), 1  $\mu$ M de cada cebador y 1 unidad de la polimerasa de alta fidelidad Vent<sub>R</sub>® DNA *polymerase* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Los cebadores empleados, después de distintas pruebas con diferentes combinaciones de cebadores específicos publicados, fueron C/N 2769 (Gopurenko et al. 1999) y LCO 1490 (Folmer et al. 1994). El programa de PCR óptimo incluía un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguido de 44 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 60 segundos de hibridación a 53°C y 90 segundos de polimerización a 72°C. El programa terminaba con un paso de amplificación final de 10 minutos a 72°C.

La amplificación del fragmento del 16S se llevó a cabo con los cebadores 1472 (Crandall & Fitzpatrick 1996) y Tor12sc (Largiadèr et al. 2000), con las siguientes condiciones de PCR: un paso inicial de desnaturalización de 95°C durante 2 minutos seguido de 9 ciclos de 25 segundos a 95°C, 30 segundos a 54°C y 150 segundos a 72°C. A continuación, 29 ciclos de 35 segundos a 95°C, 30 segundos a 54°C y 150 segundos a 72°C, más un paso final de 10 minutos a 72°C. Las reacciones se realizaban en un volumen final de 50  $\mu$ l y contenían 25 ng de DNA, tampón de reacción 1x, 2,2 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de cada dNTP, 100  $\mu$ g de BSA (seroalbúmina bovina, fracción V, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), 0,44  $\mu$ M de cada cebador y 1 unidad de la enzima AmpliTaq® DNA *polymerase* (Applied Biosystems, USA).

Los productos amplificados se purificaron con el *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) y se usaron como moldes para las reacciones de secuenciación realizadas en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. En todos los casos se secuenciaron las dos hebras del DNA con el *BIG Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Inc., USA) en un secuenciador 3730 DNA *Analyzer* (Applied Biosystems, Inc., USA) y con los cebadores empleados para la amplificación de los marcadores mitocondriales (C/N 2769 y LCO 1490 en el marcador COI y 1472 y Tor12sc en el 16S).

### Alineamiento de las secuencias y análisis filogeográfico

Para verificar que los fragmentos secuenciados correspondían a los genes COI y 16S de *Austroptamobius* (Figura M3), las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos GenBank usando el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul et al. 1997).



---

**Figura M3.** Amplicones de los marcadores 16S (gel de la derecha) y COI (gel de la izquierda) en la población #9. En la primera y la última calle de cada gel está el marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Las flechas marcan la banda de 1000 pb.

La edición y alineamiento de las secuencias obtenidas se realizó con el editor BioEdit v.7.0.9.0 (Hall 1999), donde se incluye el programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1997) que lleva a cabo un alineamiento múltiple progresivo.

Con el fin de asegurar que las secuencias del marcador COI obtenidas eran secuencias mitocondriales y no pseudogenes mitocondriales nucleares (*numts*), cada cromatograma o electrofenograma se repasó en busca de picos dobles y cada secuencia nucleotídica se tradujo a aminoácidos buscando codones de fin inesperados e inserciones y deleciones (indels), como se aconseja (Buhay 2009; Song et al. 2008). También se han empleado varios programas (Tabla M2) para predecir la estructura de la proteína codificada por este gen.

Después del alineamiento y la edición de las secuencias de los genes 16S y COI, la longitud final analizada fue de 1317 pb y de 1184 pb, respectivamente. Para comprobar que las secuencias de ambos se podían concatenar y formar un único conjunto de datos, se llevó a cabo un análisis de congruencia. La congruencia o concordancia entre marcadores indica que las filogenias de éstos, cuando se comparan, son iguales. Para medir el grado de congruencia entre los dos, se realizó el test de particiones homogéneas (PHT / ILD, Farris et al. 1995) con el programa PAUP v.4.0 (Swofford 2002). Este test evalúa si el nivel de incongruencia entre

ambos marcadores es mayor de lo esperado por azar, dado el nivel de incongruencia de cada uno. En primer lugar, se realizan análisis de parsimonia con los datos originales de cada marcador por separado, y se suman las longitudes de ambos árboles. Este parámetro es el valor de incongruencia de cada uno de ellos. Entonces, se realiza un análisis de parsimonia con las secuencias concatenadas y se obtiene el valor de la longitud del árbol que representa la incongruencia total. La diferencia entre estos dos valores es la incongruencia 'extra' generada por la combinación de los marcadores, es decir, la incongruencia entre los marcadores. A continuación, el conjunto de datos combinados se divide al azar en segmentos del mismo tamaño que el de los marcadores originales y la cantidad de incongruencia entre los fragmentos se calcula con el método ya descrito. El procedimiento de división al azar se repite varias veces, en este caso se realizaron 1000 réplicas con búsqueda heurística de adición de secuencias al azar, para generar una distribución del nivel esperado de incongruencia entre los fragmentos. Si este valor es un 5% superior al del conjunto de datos real, se puede concluir que la incongruencia observada es estadísticamente significativa a  $p = 0,05$ .

---

TMpred <sup>(1)</sup>	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>
TopPred <sup>(2)</sup>	<a href="http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=toppred">http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=toppred</a>
SOSUI <sup>(3)</sup>	<a href="http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/">http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/</a>
PSIpred <sup>(4)</sup>	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/</a>
TMHMM <sup>(5)</sup>	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
HMMTOP <sup>(6)</sup>	<a href="http://www.enzim.hu/hmmtop">http://www.enzim.hu/hmmtop</a>
DAS <sup>(7)</sup>	<a href="http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/DAS/DAS.html">http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/DAS/DAS.html</a>

---

**Tabla M2.** Programas usados para predecir la estructura de la proteína Citocromo Oxidasa subunidad I. <sup>(1)</sup> Hofmann & Stoffel 1993 <sup>(2)</sup> Claros & von Heijne 1994 <sup>(3)</sup> Hirokawa et al. 1998 <sup>(4)</sup> McGuffin et al. 2000 <sup>(5)</sup> Krogh et al. 2001 <sup>(6)</sup> Tusnady & Simon 2001 <sup>(7)</sup> Cserzo et al. 2002.

Una vez realizado el análisis de congruencia, se concatenaron las secuencias de los dos marcadores de cada individuo para formar un único fragmento de 2501 pb. En este nuevo set de datos, la identificación de los haplotipos y su frecuencia en las poblaciones se calcularon usando los programas DnaSP v.5.10 (Librado & Rozas 2009) y Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2005), respectivamente.

Para reconstruir las relaciones entre los haplotipos se han usado tres aproximaciones filogenéticas tradicionales diferentes: vecino más próximo (NJ), máxima parsimonia (MP) e

inferencia bayesiana (BI). El método NJ es un método basado en distancias genéticas y los métodos MP y BI son métodos basados en caracteres, en los que cada posición de la secuencia se considera un carácter y cada una de las cuatro bases un estado del carácter. Todos los árboles obtenidos se visualizaron con el programa FigTree v.1.3.1 (Rambaut 2010).

El método de NJ requiere el cálculo de distancias entre los pares de OTU (*Operational Taxonomic Unit*), de manera que en la construcción del árbol se agrupan primero aquellas OTU con una menor distancia entre sí y a continuación, tras recalculer las distancias entre las OTU restantes, se repite el proceso. Las distancias genéticas entre los haplotipos se obtuvieron con el método de Kimura 2 parámetros (K2P). La significación de estas distancias se ha realizado a partir de 1000 réplicas utilizando Mega v.5 (Tamura et al. 2011).

Los métodos MP operan seleccionando los árboles que minimizan la longitud total del árbol, es decir, el mínimo número de pasos evolutivos (transformaciones de un estado a otro) requeridos para explicar determinados datos. Del conjunto de sitios polimórficos presentes en la secuencia, sólo son informativos aquellos en los que están representados al menos dos nucleótidos distintos en al menos dos de las OTU estudiadas. Éste es uno de los pocos métodos que busca explícitamente la reconstrucción de las secuencias ancestrales. El análisis se llevó a cabo con el programa TNT v.1.1 (Goloboff et al. 2003) usando el método TBR (*Tree-Bisection-Reconnection*) de búsqueda heurística con 1000 réplicas y adición gradual de secuencias al azar. Posteriormente el árbol consenso se obtuvo con la opción *majority rule* a partir de 1000 repeticiones de *bootstrap*.

En los análisis de inferencia bayesiana (BI) se evalúa una hipótesis acerca de la historia evolutiva en términos de la probabilidad de que el modelo de proceso evolutivo que se propone y la historia que se postula den lugar a los datos observados. Mediante BI se produce un conjunto de los mejores árboles así como la totalidad de las posibles distribuciones de probabilidades basándose en el conjunto de datos observados y el modelo de evolución nucleotídica especificado. Para llevar a cabo la selección estadística de los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustasen a nuestro conjunto de datos, se utilizó jModeltest v.3.5 (Posada et al. 1998, 2001) con cada marcador por separado. Los modelos seleccionados mediante AIC (*Akaike Information Criterion*, Akaike 1974) fueron GTR + G + I para el gen COI y HKY para la región del 16S, por lo que el árbol se reconstruyó usando dos particiones, una por cada gen con su respectivo modelo de evolución. La inferencia bayesiana (BI) se realizó con el programa Mr. Bayes v.3.2 (Ronquist et al. 2011) utilizando el método Metrópolis acoplado a las cadenas de Markov – Monte Carlo con un millón de iteraciones

(generaciones), dos carreras (cuatro cadenas por ejecución) y un periodo de *burn – in* del 10%. Para asegurar la convergencia de las cadenas se analizó el parámetro SDSF (*Standard Deviation of Split Frequencies*) y los datos obtenidos se analizaron con Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond 2009).

Los métodos clásicos de reconstrucción de árboles filogenéticos admiten, estrictamente, la bifurcación dicotómica de las ramas y por tanto, una relación jerárquica de las secuencias analizadas. En individuos conespecíficos, no obstante, las relaciones entre los genes muestreados no son jerárquicas, lo que puede disminuir el poder estadístico de los métodos filogenéticos en estos casos concretos (Posada & Crandall 2001). Por ello, se han desarrollado otros métodos que permiten describir las relaciones evolutivas en forma de árboles multifurcantes, en los cuales un único haplotipo puede dar origen a muchos otros, creando lo que se conoce como redes. Las redes permiten una visualización más detallada de la información genética a nivel poblacional, ya que posibilitan la representación de todas las hipótesis igualmente parsimoniosas e incorporan específicamente la posibilidad de permanencia de más de un haplotipo ancestral en las poblaciones (Cassens et al. 2005). Teniendo en cuenta que se están analizando secuencias procedentes de individuos de la misma especie se generó una red de unión de medianas (*Median-Joining network*, MJ) con Network v.4.6 (<http://www.flexus-engineering.com>) a partir de los haplotipos detectados.

### **Variabilidad genética y análisis de la estructura poblacional**

Para calcular la diversidad genética presente en las muestras de cangrejo de río analizadas, se estimaron la diversidad haplotípica (H), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y el número de sitios segregantes (S), con el programa DnaSP v.5.10 (Librado & Rozas 2009).

Con el fin de analizar la estructura poblacional de *A. italicus* se calcularon las distancias genéticas de Nei, Dxy (1987) y las estimas  $F_{ST}$  de Weir y Cockerham (1984). Las distancias Dxy (DnaSP v.5.10) se basan en las frecuencias de los haplotipos y en su divergencia nucleotídica. Los índices de fijación  $F_{ST}$  de Weir y Cockerham (Arlequin v.3.11, Excoffier et al. 2005) son estimadores de diferenciación genética de las poblaciones, tienen en cuenta loci multialélicos, un número más amplio de poblaciones e individuos y diferentes tamaños muestrales en las poblaciones estudiadas. Además, para tratar de detectar la diferenciación genética entre poblaciones se empleó el estadístico  $S_{nn}$ , especialmente desarrollado para obtener estas estimas a partir de secuencias de DNA. El estadístico del vecino más cercano,  $S_{nn}$  (Hudson 2000), es una medida de la frecuencia con la que se pueden encontrar los vecinos más cercanos (referidos a las secuencias) en la misma localidad geográfica. Por tanto, este

estadístico solo es aplicable cuando los datos genéticos proceden de individuos muestreados en dos o más localidades geográficas distintas. Si un conjunto de poblaciones está fuertemente estructurado, se espera encontrar al vecino más cercano en esa misma localidad. Se espera que el valor de  $S_{nn}$  sea cercano a 1 cuando las muestras de las distintas localidades geográficas están muy diferenciadas. Los valores de  $S_{nn}$  se han calculado usando DnaSP v.5.10 con 1000 permutaciones para estimar su significación.

Para visualizar las relaciones entre poblaciones y determinar las principales tendencias de variación, se llevaron a cabo análisis de coordenadas principales (PCoA) (Gower 1966) a partir de las distancias genéticas  $D_{xy}$  y de los índices  $F_{ST}$  calculados. De esta forma se establece el número de coordenadas necesarias para explicar el 100% de la variación y el porcentaje que absorbe cada una de ellas. Además, el análisis PCoA permite representar de forma gráfica estas tendencias de variación. Para ello se proyectan las coordenadas principales en un gráfico de dos o tres dimensiones, según si se representan las dos o tres principales tendencias de variación, sobre el que se sitúan las poblaciones. Este análisis se realizó con el paquete de programas NTSYSpc v2.10q (Rohlf 2000).

En la caracterización de los patrones de variación de la diversidad genética en *A. italicus*, se realizaron análisis de la varianza molecular (AMOVA, Excoffier et al. 1992), con Arlequin v.3.11, estableciendo diferentes niveles jerárquicos. A partir de la localización geográfica de las muestras se definieron los grupos de variación, pero también se tuvieron en cuenta los resultados de las reconstrucciones filogenéticas y de los análisis de PCoA, al igual que en análisis posteriores. Los niveles de significación de los componentes de la varianza y los valores de los estadísticos F se calcularon con procedimientos permutacionales mediante 10000 réplicas.

La estructura genética de las poblaciones también se ve influenciada por el flujo génico. Si es alto, todas ellas evolucionan de manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección o deriva génica), pero si es muy bajo, las poblaciones empiezan a divergir, lo que puede contribuir al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin 1994). La mayoría de los modelos teóricos de flujo génico surgen de los conceptos desarrollados por Sewall Wright (1943) y suponen que los organismos están formando poblaciones discretas – modelo de islas – que se diferencian por distintos procesos. Esta diferenciación puede ser contrarrestada por el flujo génico que llega de otras poblaciones a una tasa  $m$ . En poblaciones en equilibrio,  $F_{ST}$  es aproximadamente  $1 / (2 Nm + 1)$ , donde  $N$  es el tamaño poblacional y  $m$ , la tasa de migración. El flujo génico efectivo puede calcularse

posteriormente de manera teórica como  $Nm \approx \frac{1}{2} (1 / F_{ST} - 1)$  para genomas haploides. De acuerdo con Wright (1969), una tasa de migración  $>1$  en cada generación es suficiente para contrarrestar la diferenciación genética. En este estudio, el flujo genético se ha estimado a partir de los índices  $F_{ST}$  de Weir y Cockerham (1984), calculados en Arlequin v.3.11, unos estimadores de los índices  $F_{ST}$  de Wright (1951) que permiten el uso de datos moleculares procedentes de secuencias de DNA.

En este trabajo también se ha calculado el flujo génico mediante un análisis de máxima verosimilitud basado en la coalescencia con el programa Migrate – N v.3.2.16 (Beerli 2009; Beerli & Felsenstein 2001). La teoría de la coalescencia es una herramienta matemática que puede utilizarse para estimar parámetros poblacionales incluyendo las tasas de migración (Beerli & Felsenstein 1999). La idea principal de la coalescencia es que los haplotipos de una población pueden rastrearse hacia atrás en el tiempo, hasta coalescer en un haplotipo ancestral común. Los modelos de migración con coalescencia fueron desarrollados por Takahata (1988), Takahata y Slatkin (1990) y Hudson (1990), y se ampliaron para incluir múltiples poblaciones y diferentes modelos de migración por Notohara (1990). Cuando se investiga el flujo genético dentro de una especie cuyas poblaciones presentan una divergencia moderada, el *software* Migrate permite identificar el sentido de la migración entre poblaciones o regiones (Beerli 2006, 2008; Beerli & Felsenstein 1999, 2001). Para ello se ha empleado un modelo de migración total con el método de Metrópolis – Hastings de cadenas Markov Monte Carlo que consistió en 20 cadenas cortas de 50.000 pasos seguidas de 2 cadenas largas de 50.000.000 de pasos, donde cada cadena se muestreó cada 100 pasos, después de descartar los primeros 10.000 (*burn – in*). El programa se ejecutó 3 veces con diferentes semillas aleatorias (valor inicial al azar) y se promediaron los resultados.

### **Inferencias históricas y demográficas**

Se ha inferido la historia demográfica de las poblaciones de *A. italicus* muestreadas en España mediante el análisis de la distribución de las frecuencias de las diferencias por pares de secuencias, o distribución de *mismatch* (Rogers & Harpending 1992; Slatkin & Hudson 1991). En estas representaciones aquellas poblaciones que han mantenido un tamaño constante tendrán una distribución multimodal, mientras que las poblaciones que hayan pasado por expansiones demográficas repentinas (Rogers 1995) tendrán distribuciones unimodales (Rogers & Harpending 1992). Se ha comprobado la concordancia de nuestros datos con ambos modelos, población estable o expansión repentina, mediante la aproximación de mínimos cuadrados (Schneider & Excoffier 1999) implementada en Arlequin v.3.11.

Como los test basados en las distribuciones de *mismatch* en ocasiones pueden tener poco poder para detectar crecimiento poblacional, también se han calculado los estadísticos de neutralismo  $R_2$  (Ramos – Onsins & Rozas 2002),  $D$  de Tajima (Tajima 1989) y  $F_s$  de Fu (Fu 1997), basados en la teoría de la coalescencia. Los parámetros  $R_2$  y  $D$  usan la información sobre la frecuencia de los sitios segregantes, mientras que el test  $F_s$  utiliza la información sobre la distribución de los haplotipos. Sus significaciones se calcularon con 10.000 muestras al azar y una modificación de la rutina *make-tree* (Hudson 1990) implementada en el simulador de coalescencia de DnaSP v.5.10.

En aquellos casos en los que los resultados obtenidos indicaban crecimiento poblacional, se calculó  $t$ , o tiempo en generaciones desde la expansión, que permite conocer el tiempo transcurrido en años considerando un tiempo de generación de 2 años en esta especie (Hobbs 1991). Para ello se utilizó la relación  $t = \tau / 2u$ . En esta expresión,  $\tau$  es un índice del tiempo transcurrido desde la expansión expresado en unidades de tiempo evolutivo (Slatkin & Hudson 1991) y estimado a partir del análisis de las distribuciones de *mismatch*. La tasa de divergencia por nucleótido y año,  $u$ , se obtiene de  $u = \mu k$ , donde  $\mu$  es la tasa de sustitución en la región específica de DNA analizado y  $k$  la longitud de la secuencia. En crustáceos decápodos, la tasa de sustitución de los dos marcadores utilizados varía considerablemente: de 0,88% a 2,2% en el gen 16S (Schubart et al. 1998; Stillman & Rebb 2001) y de 1,4% a 2,75% en el gen COI (Cook et al. 2008; Knowlton et al. 1993; Knowlton & Weigt 1998; Wares & Cunningham 2001). Así pues, y teniendo en cuenta que los análisis se basan en la concatenación de los dos marcadores mitocondriales, la tasa de sustitución empleada en los cálculos ha sido del 2% de divergencia por millón de años, promedio para la molécula completa de DNAm (Avice 1992).

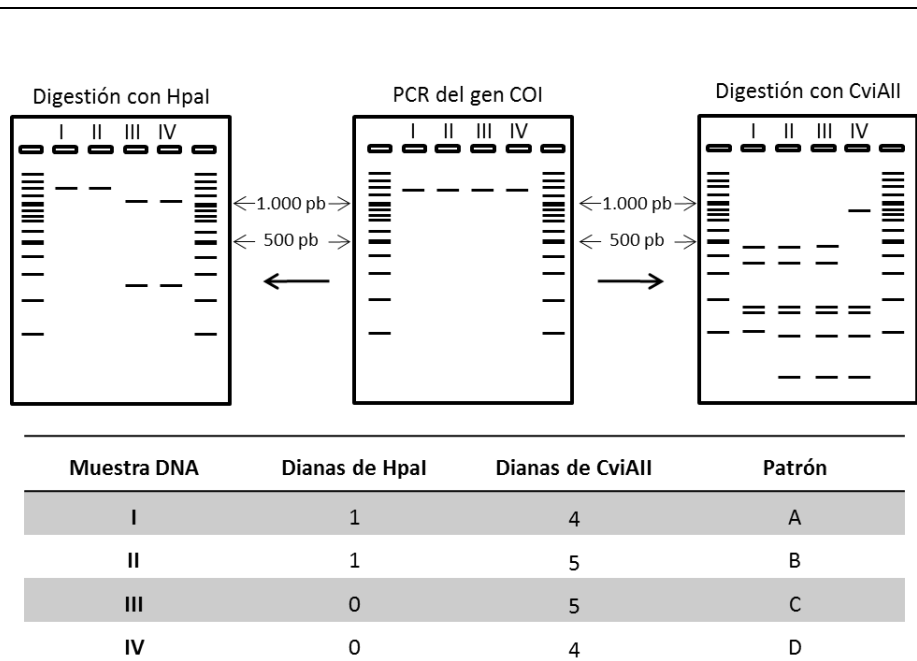
#### **Aplicación de la técnica PCR – RFLP en la gestión de las poblaciones de *A. italicus* en España**

Se analizaron todos los haplotipos encontrados en las poblaciones españolas buscando una combinación de enzimas de restricción que permitieran identificar los haplotipos de la mayoría de los ejemplares analizados de manera sencilla y rápida. Puesto que el marcador COI resultó ser el más variable, los esfuerzos se centraron en el mencionado fragmento.

Para ello, se analizó el patrón de restricción de cada uno de los haplotipos buscando las dianas de las más de 200 enzimas incluidas en el programa SeqBuilder® v.7 (DNASTAR, Madison, WI, USA). Tras los estudios in silico se vio que las enzimas HpaI y CviAI generaban unos patrones de restricción que permitirían discriminar los haplotipos más frecuentes del gen COI en las poblaciones españolas de cangrejo de río.

Las características de las enzimas seleccionadas, como la temperatura óptima de funcionamiento, eran compatibles y una digestión doble hubiese sido posible. No obstante, la producción de fragmentos de pequeño tamaño, resultado de la posición de las dianas de restricción en la doble digestión, dificultaría distinguir claramente los patrones obtenidos. Por ello, se optó por hacer dos digestiones independientes en cada fragmento del gen COI amplificado. La Figura M4 resume de manera esquemática el tamaño de los fragmentos esperados al digerir los cuatro haplotipos más frecuentes del gen COI con las enzimas seleccionadas. También muestra el número de dianas de cada enzima que caracterizan a los cuatro patrones de digestión esperados.

Para confirmar la idoneidad del diseño in silico se seleccionaron 16 poblaciones españolas de cangrejo de río (#2, #3, #5, #6, #8, #9, #11, #12, #14, #15, #17, #18, #19, #20, #23 y #24, Tabla M1). En 10 ejemplares de cada una de las poblaciones mencionadas se amplificó el gen COI mediante PCR siguiendo la metodología descrita en la sección ‘Aislamiento de DNA y amplificación’ de este capítulo.



**Figura M4.** Representación esquemática de los patrones esperados en las reacciones de restricción. En el gel central se representa el tamaño esperado del amplicón del gen COI analizado. En el de la derecha las bandas de DNA esperados al digerir con la enzima HpaI y en el gel de la izquierda, las que se obtendrían con CviAII. En los tres gels la primera y la última calle representan el marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific). La tabla inferior resume el número de dianas de las enzimas de restricción en los cuatro haplotipos principales del gen COI y el patrón de digestión conjunto asignado.

De cada amplificación se realizaron dos reacciones de restricción. La primera de ellas, en un volumen final de 25  $\mu$ l, contenía 5  $\mu$ l del producto de PCR, tampón de reacción 1x y 6 unidades de la enzima HpaI (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). La segunda, con un volumen final de 25  $\mu$ l, incluía 6  $\mu$ l de producto de PCR, tampón de reacción 1x, 1.6 mg/ml de BSA (seroalbúmina bovina, fracción V, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) y 16 unidades de la enzima CviAII (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Ambas reacciones se incubaron 24 horas a 37°C.

A continuación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 3% con las reacciones de digestión y los patrones electroforéticos se visualizaron con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV.

## Resultados

### Análisis de las secuencias

Se han secuenciado dos fragmentos de los genes mitocondriales COI y 16S en un total de 250 especímenes de *A. italicus*. La región de 1317 pb del marcador 16S corresponde a las posiciones 7216 – 8507 en *Cherax destructor* (AY383557, Miller et al. 2004) y 6499 – 7818 en *Austropotamobius pallipes* (KP205430, Grandjean et al. 2015) e incluye parte del gen 12S DNAr, la molécula completa del RNA de transferencia de valina (Val-RNAt) y la secuencia parcial del gen 16S. Aunque este fragmento incluye regiones de 3 genes distintos, por conveniencia a lo largo del texto nos referiremos a él como 16S. Las 1184 pb analizadas en el gen de la Citocromo Oxidasa subunidad I, abarcan el gen completo, salvo 350pb, y se corresponden con las posiciones de las secuencias mitocondriales 52 – 1242 en *Cherax destructor* (AY383557, Miller et al. 2004) y 52 – 1232 en *Austropotamobius pallipes* (KP205430, Grandjean et al. 2015).

En los fragmentos amplificados del marcador 16S se han encontrado 13 SNP (polimorfismos de un solo nucleótido, *Single Nucleotide Polymorphism*), de los cuales 1 se localizó en la secuencia del gen 12S DNAr, 4 en la del RNA de transferencia de valina (en un solo ejemplar) y 8 en la región del 16S DNAr.

Las secuencias del fragmento COI obtenidas han podido alinearse de manera inequívoca, en los cromatogramas no se han detectado picos dobles y la traducción a aminoácidos descartó la presencia de pseudogenes nucleares, al no encontrarse codones de fin inesperados. De los 11 sitios variables o SNP que se encontraron en la secuencia nucleotídica, cuatro posiciones dieron lugar a cambio de aminoácido. Dos, en las posiciones 968 (2284 en la secuencia concatenada) y 1114 (2430) originaron cambios conservativos: alanina sustituyendo a valina y leucina en lugar de fenilalanina, y otros dos no fueron conservativos, lisina en vez de metionina en 167 (1483) y prolina remplazando a treonina en la posición 754 (2070). Ninguno de los cambios parece afectar a la estructura de la proteína según los resultados de las distintas simulaciones realizadas (Tabla M3, Anexo M3).

Todas las secuencias se han depositado en el banco de datos GenBank, con los números de acceso FJ897840 - FJ897845, JF430567 - JF430573 correspondientes a los haplotipos de COI y JF430574 - JF430585 para los haplotipos del marcador 16S (Anexos M1 y M2).

Con el fin de estudiar los dos marcadores conjuntamente, se determinó si entre ambos existía incongruencia mediante el test de particiones homogéneas (PHT). Al combinar ambas secuencias, el test mostró que 871 réplicas de un total de 1000 produjeron la misma suma de longitudes que la longitud observada (24 pasos,  $p = 0,871$ ). Por lo tanto, las secuencias se concatenaron para formar un único conjunto de datos que se usó en los análisis posteriores.

El alineamiento final de las secuencias concatenadas de ambos genes tiene una longitud de 2501 nucleótidos, de los cuales veinticuatro son polimórficos, once informativos por parsimonia. Los fragmentos COI (1184 pb) y 16S (1317 pb) han contribuido con once y trece sitios variables, respectivamente. Estos veinticuatro SNP definen veintiún haplotipos que difieren entre una y ocho sustituciones (0,04 – 0,32%). Cuatro de los veintiún haplotipos descubiertos (H1, H8, H15 y H17) representan al 87,2% de los cangrejos analizados y en todas las poblaciones muestreadas están presentes uno o varios de ellos. Los diecisiete haplotipos restantes son específicos de población y están presentes a muy baja frecuencia, salvo el haplotipo H2 que se encontró en dos poblaciones (#4 y #12) (Tablas M3 y M4 y Figura M7).

**Tabla M3.** (Página siguiente) Haplotipos resultantes (H1 – H21) del análisis conjunto de los dos marcadores empleados en los 250 cangrejos de río estudiados. La tabla muestra la posición relativa de los sitios polimórficos en la secuencia, los SNP parsimónicamente informativos están en negrita. Las columnas 2 (Sa– Sj) y 16 (Ca – Cm) especifican los haplotipos encontrados en cada marcador por separado. En la columna 28 aparece la frecuencia relativa de cada haplotipo. Las mutaciones que originan cambio de aminoácido en la proteína codificada por el gen COI aparecen subrayadas.

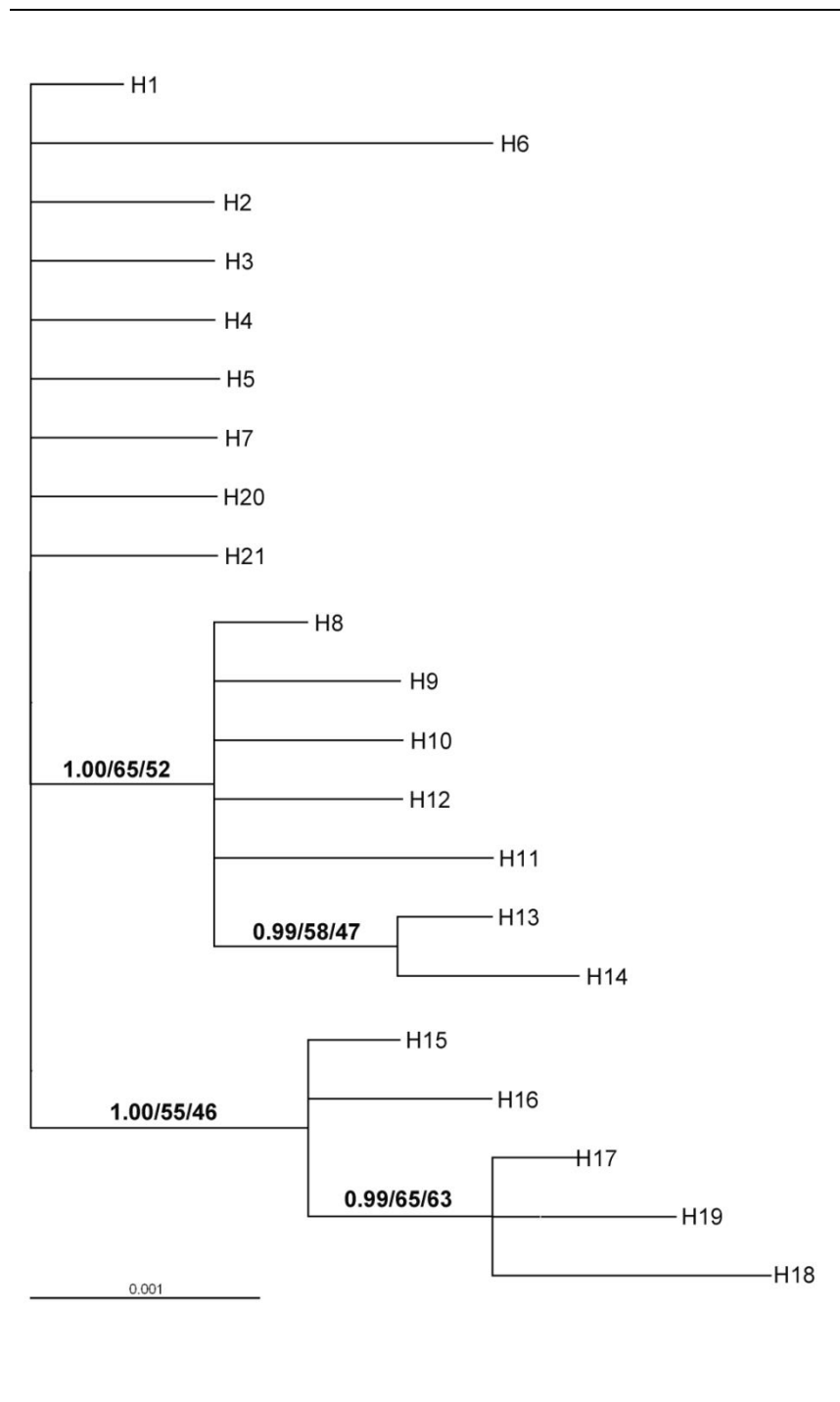
	16S	78	88	90	91	93	215	530	531	563	891	1032	1076	1162	COI	1376	1412	1483	1535	1950	2018	2070	2162	2284	2318	2430	Frec.		
H1	Sa	G	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	T	G	Cc	T	C	T	C	T	C	A	T	C	A	T	A	T	37
H2	Sb	A	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	G	Cc	T	C	T	C	T	C	A	T	A	T	A	T	0,8	
H3	Sa	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	G	Cm	G	C	T	C	T	C	A	T	A	T	A	T	0,4	
H4	Sa	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	G	Cl	T	C	T	C	T	C	A	T	C	A	T	A	T	1,6
H5	Sa	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	G	Ce	T	C	T	C	T	C	A	T	A	T	A	C	0,4	
H6	Se	G	T	C	C	C	A	C	C	A	A	A	T	G	Cc	T	C	T	C	T	C	A	T	A	T	A	T	0,4	
H7	Sa	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	G	Ch	T	C	T	C	T	C	A	T	A	T	A	T	0,4	
H8	Sa	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	G	Cb	T	C	T	T	T	C	A	T	A	T	A	T	21	
H9	Sa	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	G	Cj	T	C	T	T	T	C	C	T	A	T	A	T	0,4	
H10	Sg	G	A	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	Cb	T	C	T	T	T	C	A	T	A	T	A	T	0,4	
H11	Sh	G	A	A	A	A	A	C	C	A	C	C	T	G	Cb	T	C	T	T	T	C	A	T	A	T	A	T	0,8	
H12	Sa	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	G	Cg	T	T	T	T	T	C	A	T	A	T	A	T	0,4	
H13	Sa	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	G	Ca	T	C	T	T	T	C	A	C	T	A	T	A	T	2,4
H14	Sf	G	A	A	A	A	A	C	C	G	A	A	T	G	Ca	T	C	T	T	T	C	A	C	T	A	T	A	T	0,8
H15	Sd	G	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	T	G	Cd	T	C	T	C	T	C	A	T	A	T	G	T	12	
H16	Sd	G	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	T	G	Ck	T	C	T	C	T	C	C	T	A	T	G	T	0,4	
H17	Sd	G	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	T	G	Cf	T	C	T	C	T	T	A	T	A	T	G	T	16	
H18	Sc	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	C	C	G	Cf	T	C	T	C	T	T	A	T	A	T	G	T	0,4	
H19	Sd	G	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	T	G	Ci	T	C	A	C	T	T	A	T	A	T	G	T	0,4	
H20	Si	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	A	Cc	T	C	T	C	T	C	A	T	A	T	A	T	1,2	
H21	Sj	G	A	A	A	A	G	A	C	A	A	A	T	G	Cc	T	C	T	C	T	C	A	T	A	T	A	T	1,2	

### Inferencias filogenéticas

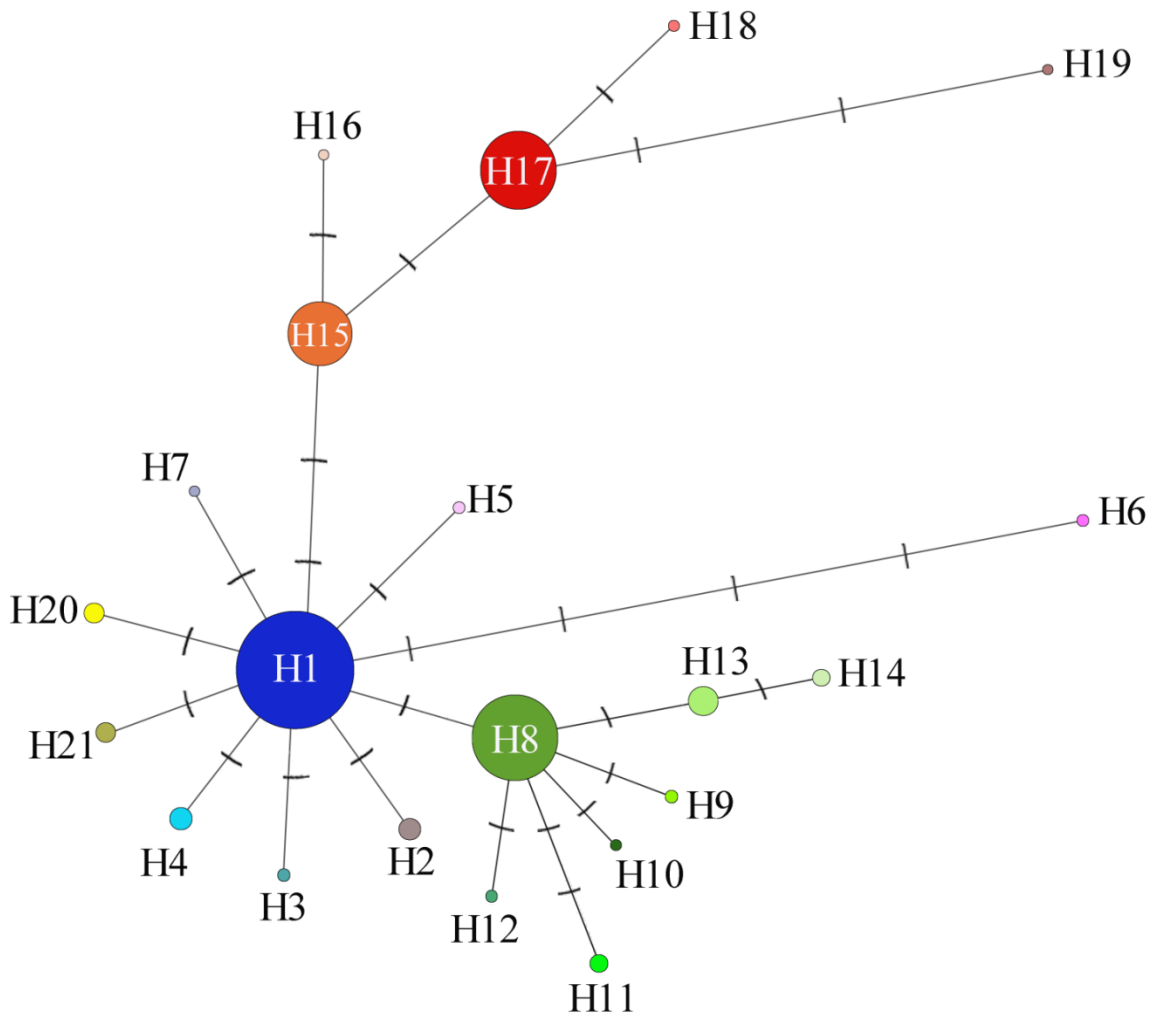
Los árboles de haplotipos obtenidos con las aproximaciones NJ, MP y BI, tienen una topología muy similar y a grandes rasgos identifican tres grupos (Figura M5). El primer grupo permanece en las posiciones basales del árbol y está formado por el haplotipo H1 y ocho haplotipos estrechamente relacionados. La mayoría de estos haplotipos se diferencian del H1 en una sola mutación, generalmente una transición. Los dos grupos restantes están apoyados por valores altos de las probabilidades posteriores en la aproximación BI y valores medios de *bootstrap* en los métodos de NJ. El segundo grupo engloba siete haplotipos, H8 ocupa la rama más corta y los otros seis difieren de H8 en 2 – 4 transiciones, salvo H11 donde además de transiciones existe una transversión en la posición 2070 de la secuencia. El tercero de los grupos mencionados está compuesto por cinco haplotipos, ocupando H15 la posición basal. Al igual que en el grupo anterior, la mayoría de las mutaciones del tercer grupo son transiciones, salvo en las posiciones 1483 de H18 y 2070 de H16, donde aparecen sendas transversiones que originan cambio de aminoácido.

La red intraespecífica generada por el método de unión de medianas o MJ refleja la estrecha relación que mantienen todas las secuencias. Además, en ella no aparecen haplotipos no muestreados para explicar la conexión entre los haplotipos encontrados en las poblaciones estudiadas. La red designa al haplotipo H1, el más frecuente en España y también presente en Italia, como el haplotipo ancestral (Figura M6). La mayoría de los haplotipos únicos difieren del H1 por un solo paso mutacional, por lo que la red adquiere la configuración de una topología en estrella.

Esta red revela la presencia de dos grupos bien diferenciados y separados por dos mutaciones. El primero incluye cinco haplotipos distribuidos a lo largo del norte de España, los haplotipos H17, H18 y H19 hacia el oeste y H15 y H16 hacia el este, y al que de ahora en adelante se denominará grupo 'Norte'. El segundo gran clado, a partir de ahora grupo 'Centro', engloba 16 haplotipos, y en él se pueden distinguir dos subgrupos. El primero está compuesto por el haplotipo H1 y ocho haplotipos únicos (H2, H3, H4, H5, H6 y H7) presentes en España y H20 y H21 en Italia, dando una forma de topología en estrella a este subgrupo. El otro subgrupo, a un solo paso mutacional del anterior y también con topología en estrella, está formado por siete haplotipos (H8, H9, H10, H11, H12, H13 y H14) exclusivamente detectados en ejemplares españoles, en su mayoría muestreados fuera de la cuenca del Ebro.



**Figura M5.** Árbol de haplotipos obtenido por el método de máxima parsimonia (MP). Sobre las ramas se muestran los valores de probabilidad posterior y de *bootstrap* según los métodos de reconstrucción filogenética: inferencia bayesiana (BI) / vecino más próximo (NJ) / máxima parsimonia (MP), respectivamente.



---

**Figura M6.** Rede de haplotipos gerada por el método de unión de medianas (MJ) a partir de las secuencias concatenadas de los marcadores mitocondriales 16S y COI. Las marcas en las medianas que unen los distintos haplotipos representan pasos mutacionales. El área del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo que representa.

### Variabilidad genética y análisis de la estructura poblacional

Las medidas de variabilidad genética muestran que la especie *A. italicus* presenta variación en las poblaciones españolas, pues se han detectado diecinueve haplotipos (H1 – 19). En conjunto, se han encontrado cuatro haplotipos mayoritarios y gran número de haplotipos a bajas frecuencias estrechamente relacionados con ellos (Figura M6 y Tablas M3 y M4). Diecisiete de las veinticuatro poblaciones analizadas presentan variabilidad a nivel mitocondrial mientras que las siete restantes son monomórficas aunque para distintos haplotipos. En las poblaciones monomórficas, el haplotipo presente es siempre uno de los mayoritarios. Uno de los estos casos serían las muestras #6, #9, #13 y #17 donde sólo se detecta H1. Estos haplotipos mayoritarios también se encuentran a frecuencias muy altas en algunas de las poblaciones polimórficas, como el haplotipo H1 en la muestra #4 o H15 en #18 (Tabla M4). Entre las poblaciones polimórficas, la mayor diversidad haplotípica y nucleotídica se ha encontrado en las poblaciones #12 (cinco haplotipos,  $H_d = 0,8$ ,  $\pi = 0,00046$ ) y #2 (cuatro haplotipos,  $H_d = 0,7$ ,  $\pi = 0,00077$ ). La muestra italiana alberga tres haplotipos, dos exclusivos (H20 y H21) y H1, el más común en España (Tabla M5).

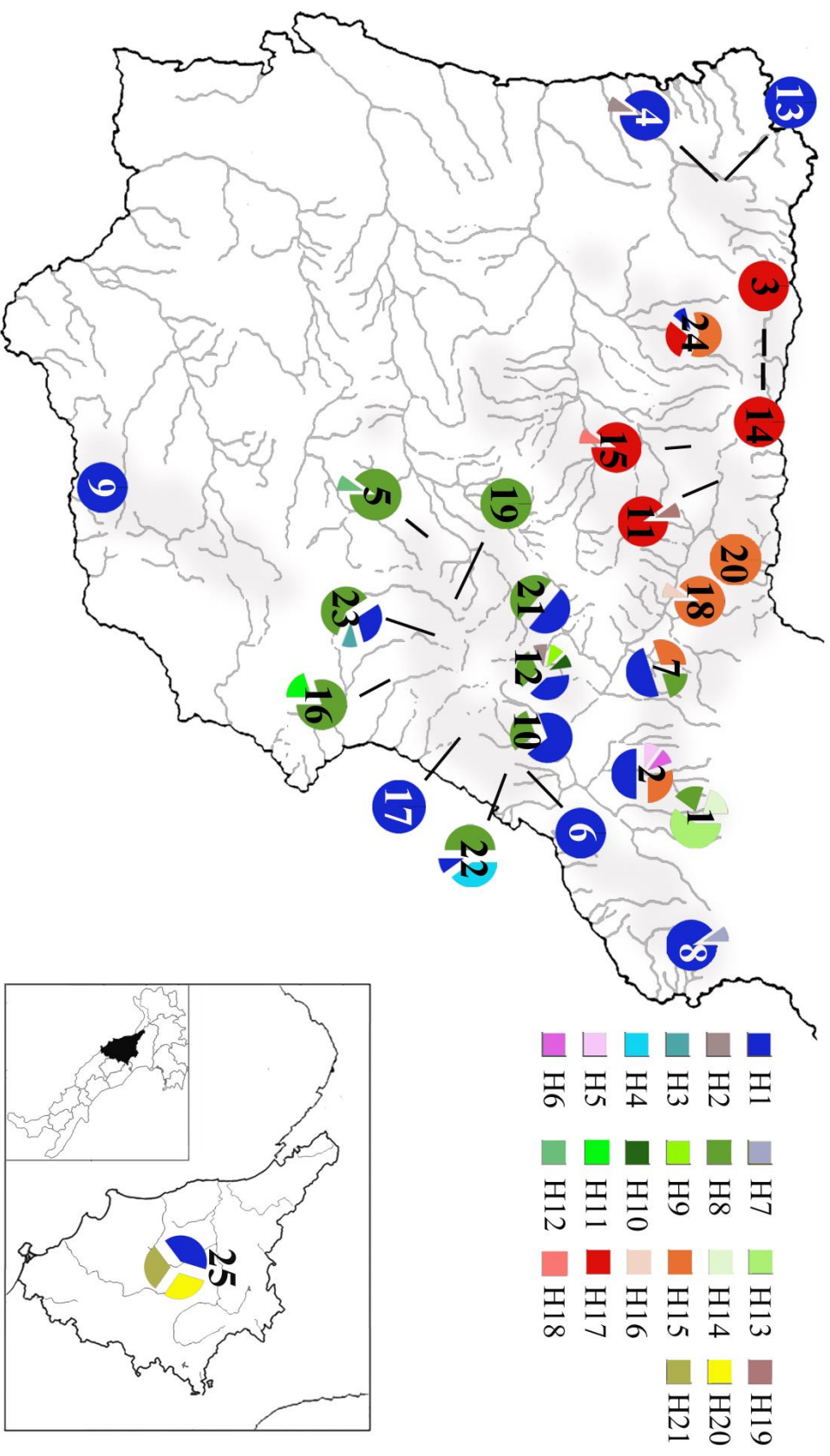
En la Figura M7 se representa la distribución geográfica de la variación genética encontrada en las poblaciones del cangrejo de río *A. italicus*, y como se puede observar, existe un marcado patrón en la distribución de los haplotipos, fundamentalmente por la localización de los cuatro mayoritarios. Los haplotipos H1 y H8 se distribuyen ampliamente por el centro de España, mientras que H15 y H17 lo hacen en el norte. A este respecto, el estadístico  $S_{nn}$  revela una diferenciación reducida pero significativa entre las poblaciones muestreadas ( $S_{nn} = 0,2797$ ,  $p < 0,001$ ) al considerar todas las muestras. Esta asociación es mucho mayor cuando se comparan los grupos 'Norte' y 'Centro' ( $S_{nn} = 0,9513$ ,  $p < 0,001$ ) detectados en los análisis filogenéticos.

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25	
H1	-	1	-	1	-	1	1	1	1	0,7	-	0,4	1	-	-	-	1	-	-	-	-	0,5	0,1	0,3	0,1	0,4
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-
H5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8	-	-	-	1	-	-	-	-	0,3	-	0,3	-	-	0,8	-	-	1	-	1	-	0,5	0,5	0,6	-	-	-
H9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H13	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	1	-	1	-	-	-	-	0,6	-
H16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H17	-	1	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	1	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
H18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H19	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
H21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-

**Tabla M4.** Frecuencia de los haplotipos detectados en las poblaciones analizadas cuyo código se detalla en la Tabla M1. En la tabla el símbolo '-' significa frecuencia 0.

Cód. pob.	S	H	H <sub>d</sub>	π	D	F <sub>s</sub>	R <sub>2</sub>
#1	2	8, 13, 14	0,622±0,138	0,00028±0,00008	0,02	-0,16	0,18
#2	7	1, 5, 6, 15	0,711±0,117	0,00077±0,00025	-0,93	0,52	0,18
#3	0	17	0	0	.	.	.
#4	1	1, 2	0,200±0,154	0,00008±0,00006	-1,11	-0,34	0,3
#5	1	8, 12	0,200±0,154	0,00008±0,00006	-1,11	-0,34	0,3
#6	0	1	0	0	.	.	.
#7	3	1, 8, 15	0,689±0,104	0,00052±0,00011	0,77	0,98	0,21
#8	1	1, 7	0,200±0,154	0,00008±0,00006	-1,11	-0,34	0,3
#9	0	1	0	0	.	.	.
#10	1	1, 8	0,467±0,142	0,00019±0,00005	0,82	0,82	0,23
#11	1	17, 19	0,200±0,154	0,00008±0,00006	-1,11	-0,34	0,3
#12	4	1, 2, 8, 9, 10	0,800±0,100	0,00046±0,0001	-0,7	-1,89*	0,13*
#13	0	1	0	0	.	.	.
#14	0	17	0	0	.	.	.
#15	2	17, 18	0,200±0,154	0,00016±0,00012	-1,41*	0,59	0,3
#16	2	8, 11	0,356±0,159	0,00028±0,00013	0,02	1,52	0,18
#17	0	1	0	0	.	.	.
#18	1	15, 16	0,200±0,154	0,00008±0,00006	-1,11	-0,34	0,3
#19	0	8	0	0	.	.	.
#20	0	15	0	0	.	.	.
#21	1	1, 8	0,556±0,075	0,00022±0,00003	1,46	1,09	0,28
#22	2	1, 4, 8	0,644±0,101	0,00044±0,00006	1,74	0,64	0,27
#23	2	1, 3, 8	0,511±0,164	0,00027±0,0001	0,12	-0,1	0,2
#24	3	1, 15, 17	0,600±0,131	0,00035±0,00012	-0,66	0,21	0,21
<b>Norte</b>	7	1, 15 – 19	0,536±0,038	0,00026±0,00004	-1,37	-2,02	0,06
<b>Centro</b>	13	1 – 15	0,601±0,031	0,00035±0,00004	-1,92*	-7,78*	0,03*
<b>España</b>	22	ene-19	0,771±0,015	0,00074±0,00003	-1,32	-6,70*	0,04
#25	2	1, 20, 21	0,733±0,076	0,00037±0,00006	1,03	0,34	0,24

**Tabla M5.** Medidas de diversidad genética y test de neutralismo de *A. italicus* en las distintas muestras. En cada población se especifica: Cód. pob.: código de población detallado en la Tabla M1. S, número de sitios polimórficos; H, haplotipos presentes; H<sub>d</sub>, diversidad haplotípica ± desviación estándar; π, diversidad nucleotídica ± desviación estándar, y los test de neutralismo D de Tajima, F<sub>s</sub> de Fu y R<sub>2</sub> de Ramos – Onsins y Rozas. \* p<0,05.



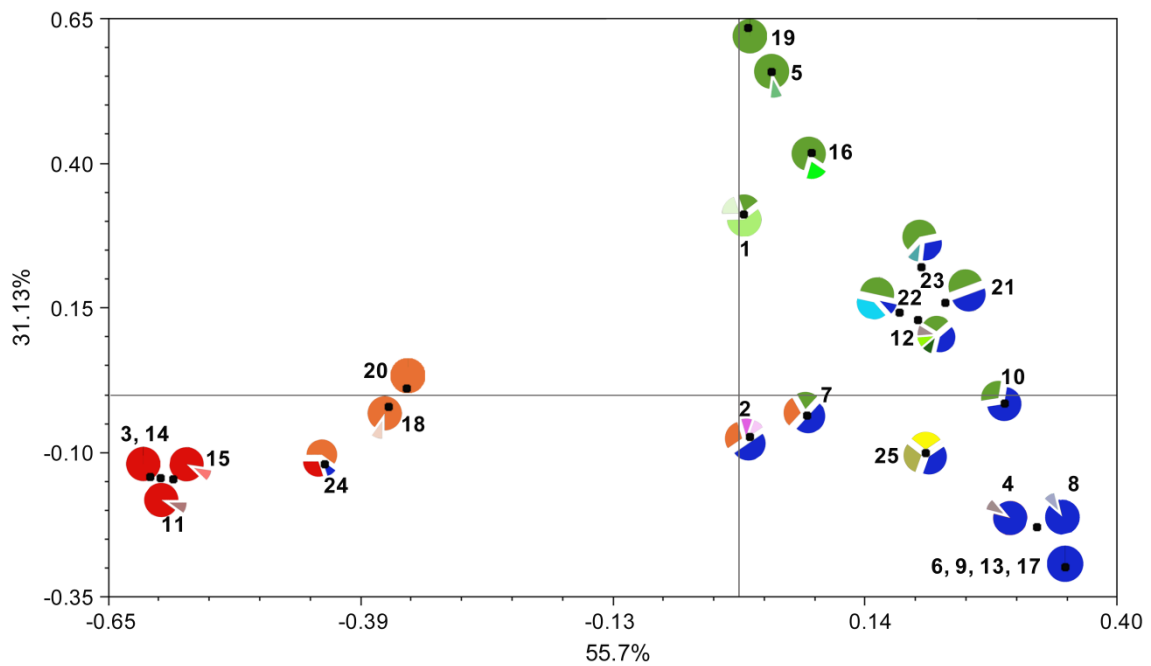
**Figura M7.** Localización geográfica de las poblaciones de *A. italicus* analizadas, haplotipos identificados por colores y frecuencias de los mismos, según el área del sector, en cada una de ellas. Las poblaciones aparecen identificadas por el código asignado en la Tabla M1.

El valor estimado del estadístico  $F_{ST}$  para el conjunto de las poblaciones españolas es 0,6905. Las estimas por parejas de los índices  $F_{ST}$  entre las poblaciones de estos dos grupos son significativas, variando entre 1 (muchas de las comparaciones) y 0,34 (#2 – #24) (Tabla M6). La estructura genética de las muestras de *A. italicus* analizadas también se aprecia en la proyección de los valores de  $F_{ST}$  en los dos primeros ejes del análisis PCoA (Figura M8). El primer eje explica el 55,7% de la varianza y diferencia a las poblaciones #3, #11, #14, #15, #18, #20 y #24, localizadas en el Norte de España y con H15 y H17 como haplotipos mayoritarios, de las restantes españolas.

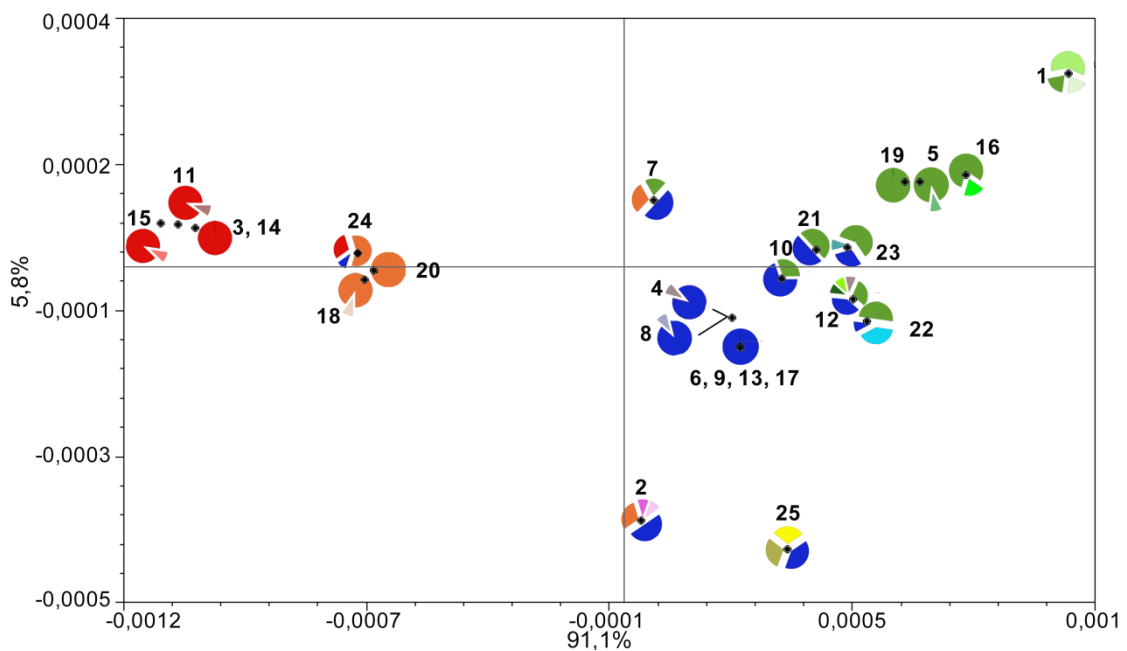
A su vez, las muestras de los alrededores de la Cordillera Cantábrica (#3, #11, #14 y #15) forman un grupo separado de las cercanas a los Montes Vascos (#18 y #20), con la muestra de Laguna Valsemana (#24) en una posición intermedia. El segundo eje del análisis PCoA absorbe el 31,13% de la variación y también distingue dos conjuntos de poblaciones, según predomine el haplotipo H1 (como en #6, #8, #9, #13 y #17) o el haplotipo H8 (como en #5, #16 y #19). El análisis PCoA realizado a partir de las distancias Dxy (Figura M9) también revela la existencia de los dos grupos principales, así como la subestructura dentro de cada uno de ellos, pero además, el segundo eje (5,8% de la varianza) permite distinguir la población italiana de las muestras españolas, si bien se sitúa cercana a la población del Río Calcón en la cuenca del Ebro (#2).

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25						
#1	·	0,4	0	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,1	0,3	0,1	0,5	0,1	0	0,1	0,5	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,4	0,5	0,5	0,1	0,2				
#2	0,6	·	0,3	4	0,5	3,6	∞	4	3,6	3	0,3	2,2	3,6	0,3	0,6	3,6	0,6	0,4	0,5	1,8	1,6	1,4	1	2,7							
#3	0,9	0,7	·	0	0	0	0,2	0	0	∞	0,1	0	∞	∞	0	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0,5	0,1				
#4	0,8	0,1	1	·	0,1	∞	2,4	∞	∞	2,5	0	1,7	∞	0	0,1	0,2	∞	0,1	0,1	0	0,9	0,9	0,7	0,2	2,1						
#5	0,6	0,5	1	0,8	·	0,1	0,5	0,1	0,1	0,4	0	1,5	0,1	0	5,1	0,1	0	∞	0	0,9	0,9	1,8	0,1	0,3							
#6	0,8	0,1	1	0	0,9	·	2,1	∞	∞	1,8	0	1,3	∞	0	0	0,2	∞	0	0	0	0,6	0,8	0,6	0,1	1,8						
#7	0,6	0	0,8	0,2	0,5	0,2	·	2,4	2,1	4,3	0,2	3,4	2,1	0,2	0,2	0,6	2,1	0,4	0,4	0,3	2,6	1,9	2	0,7	1,9						
#8	0,8	0,1	1	0	0,8	0	0,2	·	∞	2,5	0	1,5	∞	0	0,1	0,2	∞	0,1	0,1	0	0,9	0,9	0,7	0,2	2,1						
#9	0,8	0,1	1	0	0,9	0	0,2	0	·	1,8	0	1,3	∞	0	0	0,2	∞	0	0	0	0,6	0,8	0,6	0,1	1,8						
#10	0,7	0,1	0,9	0,2	0,6	0,2	0,1	0,2	0,2	·	0,1	∞	1,8	0	0,1	0,6	1,8	0,1	0,3	0,1	∞	3,2	7,5	0,2	1,8						
#11	0,9	0,6	0	0,9	1	1	0,7	0,9	1	0,9	·	0,1	0	∞	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1						
#12	0,5	0,2	0,9	0,2	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0	0,8	·	1,3	0,1	0,1	1,8	1,3	0,2	1,3	0,1	∞	7,2	∞	0,3	1,5						
#13	0,8	0,1	1	0	0,9	0	0,2	0	0	0,2	1	0,3	·	0	0	0,2	∞	0	0	0	0,6	0,8	0,6	0,1	1,8						
#14	0,9	0,7	0	1	1	1	0,8	1	1	0,9	0	0,9	1	·	∞	0	0	0,1	0	0	0	0,1	0,1	0,5	0,1						
#15	0,9	0,6	0	0,9	0,9	0,9	0,7	0,9	0,9	0	0,8	0,9	0	·	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1						
#16	0,5	0,5	0,9	0,7	0,1	0,8	0,4	0,7	0,8	0,5	0,9	0,2	0,8	0,9	0,9	·	0,8	0,1	4	0,1	1,2	1,1	2	0,8	0,4						
#17	0,8	0,1	1	0	0,9	0	0,2	0	0	0,2	1	0,3	0	1	0,9	0,2	·	0	0	0	0,6	0,8	0,6	0,8	1,8						
#18	0,9	0,5	0,9	0,9	0,9	1	0,6	0,9	1	0,9	0,8	0,8	1	0,9	0,8	0,9	1	·	0	∞	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1						
#19	0,6	0,5	1	0,9	0	1	0,5	0,9	1	0,7	1	0,3	1	1	1	1	1	·	0	0,6	0,8	1,4	0,9	0,2							
#20	0,9	0,5	1	1	1	1	0,6	1	1	0,9	0,9	0,8	1	1	0,8	0,9	1	0	1	·	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1						
#21	0,6	0,2	0,9	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0	0,9	0	0,4	0,9	0,9	0,3	0,4	0,9	0,4	0,9	·	0,1	∞	0,7	1,1						
#22	0,5	0,2	0,9	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,1	0,8	0,1	0,4	0,9	0,8	0,3	0,4	0,8	0,4	0,8	5,3	·	5,1	0,7	1						
#23	0,5	0,3	0,9	0,4	0,2	0,5	0,2	0,4	0,5	0,1	0,9	0	0,5	0,9	0,9	0,2	0,5	0,8	0,3	0,9	0	0,1	·	0,7	0,9						
#24	0,8	0,3	0,5	0,8	0,8	0,8	0,4	0,8	0,8	0,7	0,5	0,7	0,8	0,5	0,7	0,2	0,1	4	0,1	3,3	0,2	0,2	0,2	·	0,3						
#25	0,7	0,2	0,9	0,2	0,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,9	0,3	0,2	0,9	0,8	0,6	0,2	0,8	0,7	0,8	0,3	0,3	0,4	0,7	·						

**Tabla M6.** Estimaciones de  $F_{ST}$  por parejas (bajo la diagonal) y Nm (sobre la diagonal) entre las 25 poblaciones de A. *italicus* analizadas. Los valores significativos, después de las correcciones de Bonferroni, están en negrita.



**Figura M8.** Representación gráfica en 2D del PCoA de las 25 poblaciones de cangrejo de río, realizada con de las estimas de  $F_{ST}$ . Los diagramas de sectores representan la frecuencia de cada haplotipo presente en la población según el código de colores de la Figura M7.



**Figura M9.** Gráfico de las dos primeras dimensiones del análisis PCoA basado en las distancias genéticas  $D_{xy}$  en las poblaciones de *A. italicus* analizadas. Los diagramas de sectores representan la contribución relativa de cada haplotipo a la población según el código de colores de la Figura M7.

Los análisis de AMOVA realizados para profundizar en la estructura poblacional de *A. italicus* en España, rechazan la hipótesis nula de poblaciones homogéneas ya que el 75,99% ( $p < 0,001$ ) de la varianza se debe a las diferencias entre poblaciones. Parte de la variación encontrada se puede atribuir a la diferencia entre los grupos, lo que se aprecia claramente cuando se considera la división de las poblaciones en 'Norte' y 'Centro' (72,83%,  $p < 0,001$ ). A las cuencas y vertientes se les puede atribuir también una parte estadísticamente significativa, aunque menor, de la varianza encontrada (39,38%,  $p < 0,01$  y 19,73%,  $p < 0,01$ , respectivamente). Los análisis de AMOVA igualmente muestran diferencias significativas entre las poblaciones españolas e italiana, aunque este resultado debe tomarse con cautela dado el tamaño muestral de la población italiana (Tabla M7).

En cuanto al flujo génico, se observa la misma tendencia con las estimas realizadas a partir de los valores de  $F_{ST}$  y las obtenidas del análisis de coalescencia con Migrate – N. Las mayores tasas de migración se dan entre las poblaciones dentro de los grupos descritos anteriormente, es decir, existe un mayor flujo génico entre las muestras englobadas en el grupo 'Norte' y entre las poblaciones del grupo 'Centro' que entre las poblaciones de 'Norte' y el 'Centro' o viceversa (Tabla M6). Cuando la tasa de migración se calcula entre los dos grandes grupos descritos en vez de entre las poblaciones, se observa un escaso flujo génico ( $Nm = 0,86$ ) que tiende a dirigirse, principalmente, desde el 'Centro' hacia el 'Norte' ya que la contribución del 'Norte' hacia el área 'Centro' se restringe a las poblaciones #18 y #20 ('Norte') con, las geográficamente cercanas, #2 y #7 ('Centro').

Además de entre los grupos genéticos las estimas realizadas con Migrate – N también permiten discernir el sentido del flujo génico entre pares de poblaciones. A este respecto cabe señalar que entre las poblaciones del norte los mayores valores de  $Nm$  se corresponden con flujos asimétricos. Así, los flujos génicos detectados entre las poblaciones #11 y #15 con las muestras #3, #14 y #24, se dirigen, principalmente, desde las primeras a las segundas. De la misma forma, la elevada tasa de migración encontrada entre las poblaciones del Río Nervión (#20) y Río Ega (#18), se dirige desde la población #20 a la #18.

Fuentes de variación	g.l.	Componente de la varianza	% de la varianza total
Todas las poblaciones españolas: 1 grupo			
Entre las poblaciones	23	71,94	75,99**
Dentro de las poblaciones	216	22,73	24,01
Poblaciones españolas. Cuencas fluviales: 11 grupos			
Entre las cuencas	10	38,19	39,38**
Entre las poblaciones de la misma cuenca	12	35,79	39,91**
Dentro de las poblaciones	207	22,99	23,71**
Poblaciones españolas. Vertientes hidrográficas: 4 grupos			
Entre las vertientes	3	19,62	19,73*
Entre las poblaciones de la misma vertiente	19	56,81	57,17**
Dentro de las poblaciones	207	22,99	23,13**
Poblaciones españolas: 2 grupos ('Norte' y 'Centro')			
Entre los grupos	1	111,87	72,83**
Entre las poblaciones del mismo grupo	20	19,82	12,90**
Dentro de las poblaciones	198	21,92	14,27**
Todas las poblaciones: 1 grupo			
Entre las poblaciones	24	70,69	74,90**
Dentro de las poblaciones	225	23,69	25,10
Poblaciones españolas e italianas: 2 grupos			
Entre los países	1	19,55	17,79**
Dentro de los países	248	90,32	82,21

g. l. = grados de libertad.

Significación: \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

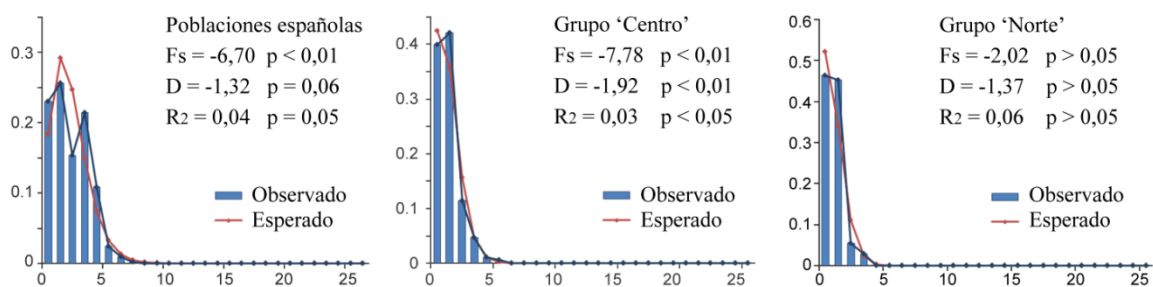
**Tabla M6.** Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) en las poblaciones de *A. italicus* muestreadas.

Dentro del grupo 'Centro' la situación es más heterogénea, se puede destacar a la población #6, con valores de Nm promedio altos, como fuente de migrantes para las poblaciones circundantes y a las muestras #17 y #21, con tasas de migración mucho menores, como sumideros o receptores de los mismos. También se encuentran poblaciones con valores de Nm, en general, intermedios a los descritos en los casos anteriores que pueden ser a la vez fuente (origen) y sumidero (destino) de migrantes, como son las poblaciones #10 y #12, situadas en Teruel, que tienen un papel importante en la migración entre las poblaciones de los alrededores.

La relación de estos grupos genéticos, 'Norte' y 'Centro', con la población italiana tampoco es simétrica. Por un lado, parte del flujo génico detectado se dirige desde las poblaciones del grupo 'Centro' hacia la población italiana. Por otro, el flujo génico detectado entre la población italiana y el grupo 'Norte' iría en el sentido opuesto.

### Inferencias demográficas

La historia demográfica de las poblaciones españolas de cangrejo de río se ha inferido por medio de los tests de neutralismo y las distribuciones de *mismatch* o distribuciones de las frecuencias de las diferencias por pares de secuencias..



**Figura M10.** Distribuciones de *mismatch*, observadas y esperadas, en el conjunto de las poblaciones españolas de cangrejo de río y en los grupos de poblaciones denominados 'Centro' y 'Norte'.

En las poblaciones españolas en conjunto se observa una desviación de la neutralidad, ya que los valores de los estadísticos  $F_s$  de  $F_u$ ,  $D$  de Tajima son negativos, y junto con  $R_2$ , son

estadísticamente significativos o cercanos a la significación ( $F_s = -6,70$ ,  $p < 0,01$ ;  $D = -1,32$ ,  $p = 0,06$ ;  $R_2 = 0,03$ ,  $p = 0,05$ ). La distribución de *mismatch* obtenida (Figura M10) se ajusta al modelo de expansión repentina ( $SDD = 0,008$ ,  $p > 0,05$ ). A partir del valor de  $\tau$  calculado en la distribución de *mismatch* ( $\tau = 1,242$ ), se ha estimado que esta expansión habría tenido lugar hace unos 25.000 años.

En el conjunto de las poblaciones que conforman el grupo 'Centro', todos los test de neutralismo son negativos y significativos ( $F_s = -7,78$ ,  $p < 0,01$ ;  $D = -1,92$ ,  $p < 0,001$ ;  $R_2 = 0,03$ ,  $p < 0,05$ ) indicando la existencia de expansión demográfica. Este resultado está apoyado por la distribución de *mismatch* de este grupo ( $SDD = 0,005$ ,  $p > 0,05$ ) y teniendo en cuenta el valor de  $\tau$  estimado (0,687), la expansión poblacional podría haber sucedido hace unos 14.000 años.

En el grupo 'Norte' los test de neutralismo  $F_s$  de  $F_u$  y  $D$  de Tajima son mayores que en el grupo 'Centro' ( $F_s = -2,02$ ;  $D = -1,37$ ) y ni éstos ni  $R_2$  (0,06) son significativos a  $p = 0,5$  ( $F_s$  y  $D$  tienen una significación  $p < 0,10$ ). A pesar de estos resultados, la distribución de *mismatch* es unimodal a la izquierda del gráfico lo que se ajusta al modelo de expansión ( $SDD = 0,03$ ,  $p > 0,05$ ). En conjunto, el análisis de todos los resultados sugiere un cuello de botella reciente y un evento de expansión poblacional posterior, probablemente hace unos 10.000 años.

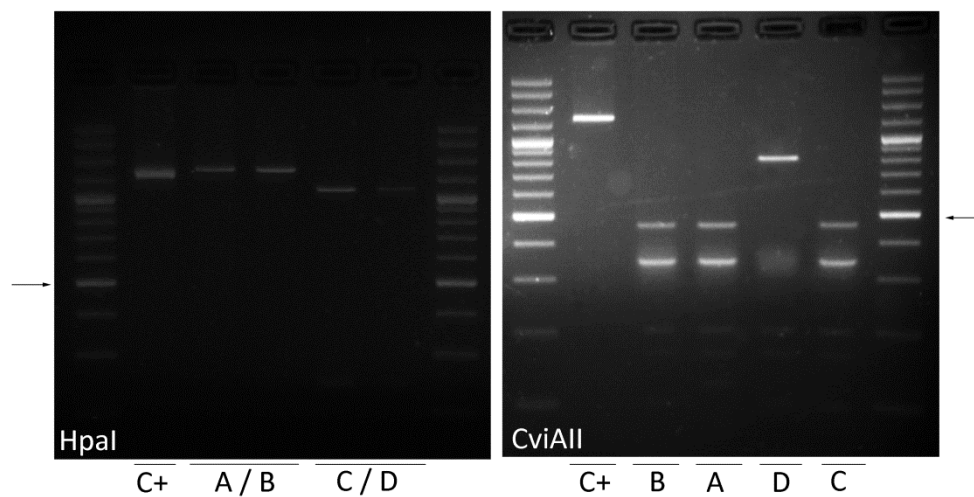
### **Aplicación de la técnica PCR – RFLP en la gestión de las poblaciones de *A. italicus* en España**

La amplificación del gen COI produjo un fragmento de alrededor de 1300 nucleótidos en todos los individuos analizados y los patrones de digestión de los diferentes haplotipos fueron los predichos en el estudio *in silico*. En algunos casos, los fragmentos de DNA de muy pequeño tamaño (<30 bases) no pudieron visualizarse en los geles. Esto no supuso un obstáculo a la hora de determinar los haplotipos puesto que el estudio conjunto de las dos enzimas, HpaI y CviAI, permitía despejar las posibles dudas.

El análisis combinado de las dos enzimas de restricción identificó 4 haplotipos presentes en el 92,8% de los cangrejos analizados mediante secuenciación (Figura M11). Estos haplotipos se corresponden, mayoritariamente, con los haplotipos del gen COI Cb (haplotipo A), Cc (B), Cd (C) y Cf (D) (Anexo M2). Dado que en las 16 poblaciones de cangrejo de río se habían detectado 11 haplotipos por secuenciación del fragmento estudiado, cada uno de los haplotipos RFLP detectados mediante enzimas de restricción engloba a más de un haplotipo de secuenciación. Esto se debe a que en el fragmento del gen COI la enzima HpaI podría tener un

solo sitio de restricción en el 30% de los cangrejos secuenciados, identificado como una transición en la posición 1002 por las técnicas de secuenciación. En cambio la enzima CviAII tendría cuatro o cinco dianas de restricción dependiendo del haplotipo del que se tratara. Dos de estos sitios coinciden con dos SNP, en las posiciones 220 y 703 de la secuencia estudiada, ambos transiciones. Así, el haplotipo A incluye a Cb, Cg y Cj, B a Cc, Ce, Ch y Cm, C a Cd y Ck y el haplotipo RFLP D a Cf y Ci. Teniendo en cuenta que los haplotipos exclusivos están presentes a muy bajas frecuencias, si identificamos los genotipos con los haplotipos más comunes (A = Cb, B = Cc, C = Cd y D = Cf) en el 95,6% de los cangrejos se diagnostica correctamente el haplotipo del gen COI que poseen.

---



---

**Figura M11.** Patrones de digestión detectados mediante las enzimas HpaI y CviAII en los principales haplotipos del marcador COI de las poblaciones españolas de cangrejo de río. En ambos geles, en la primera y la última calle se encuentra el patrón de peso molecular. La flecha marca la banda de 500 pb.

## Discusión

### Niveles de variabilidad genética

Conocer los niveles de variabilidad genética en las poblaciones de cangrejo de río supone una información básica y de primordial importancia en relación con los planes de recuperación de la especie.

Analizando el gen COI de *Austropotamobius*, el más variable de los dos-marcadores utilizados en este trabajo, se han encontrado 13 haplotipos (Tabla M3). Uno común a las poblaciones españolas y la muestra italiana analizada, y los doce haplotipos restantes exclusivos de la Península Ibérica (Tabla M4). Tras estudiar la secuencia del fragmento 16S, se ha detectado por primera vez diversidad en las poblaciones de *A. italicus* españolas con este marcador, en concreto 8 haplotipos. En las muestras italianas hemos encontrado tres haplotipos, dos exclusivos de estas poblaciones y uno también presente en los cangrejos ibéricos.

El valor promedio de diversidad nucleotídica en España es de  $0,0011 \pm 0,00005$  en el marcador COI y de  $0,00046 \pm 0,00004$  en el gen 16S. Estos valores son bajos pero similares a los descritos en poblaciones españolas y europeas de esta especie con el gen COI (Pedraza – Lara et al. 2010; Trontelj et al. 2005) y en el rango encontrado en poblaciones italianas con el marcador 16S (Cataudella et al. 2010). En términos de diversidad haplotípica (Tabla M5), la variabilidad observada es superior a la encontrada en otros estudios, especialmente con el marcador 16S que había sido descrito en trabajos previos como monomórfico (Grandjean et al. 2002a; Pedraza – Lara et al. 2010). El amplio muestreo realizado para este trabajo, así como el análisis de un mayor número de individuos por población, ha contribuido decisivamente a desvelar un mayor número de haplotipos en España que los identificados en trabajos previos. También ha sido determinante el análisis de fragmentos más largos que incluyen la región 5' del gen 16S y la 3' del gen COI. En el marcador 16S se suele estudiar una región más pequeña hacia el extremo 3' del gen, pero extender el análisis hacia la región 5' ha supuesto detectar 4 nuevos SNP. Entre ellos es importante destacar una transición en la posición 531 de la secuencia que permite distinguir entre los haplotipos del 'Norte' y los del 'Centro'. En cuanto al COI, es la primera mitad del gen la que se suele estudiar y donde hemos descubierto 3 SNP en las poblaciones españolas. Pero es en el resto de la secuencia, hacia el carboxilo, que no había sido analizada en profundidad hasta ahora donde se encuentran la mayor cantidad de variabilidad, 7 SNP.

Estos resultados concuerdan con lo descrito en trabajos previos en estos genes, pues las distintas regiones de los marcadores no evolucionan con la misma tasa de mutación. Lunt et al. (1996) mostraron que las distintas regiones del gen COI evolucionan a ritmos diferentes. Los patrones de variabilidad de la secuencia parecen estar asociados a los distintos dominios de la proteína que codifica dicho gen, de tal manera que el extremo carboxilo terminal es más variable que el resto de los dominios. En el caso del marcador DNAr 16S, no sólo la estructura secundaria condiciona la variabilidad (Reidys et al. 1997), sino que las interacciones terciarias también imponen restricciones a esta variación (Misof et al. 2002). Como cabría esperar dada su importancia funcional, tampoco todas las regiones tienen la misma tasa de cambio. Mientras que las secuencias que originan el núcleo estructural del ribosoma están altamente conservadas (Simon et al. 1994; Van der Peer et al. 1993), las secuencias que forman los elementos periféricos de la estructura secundaria son más variables.

En relación con las poblaciones, ocho de las veinticuatro analizadas son monomórficas aunque para distintos haplotipos, los más frecuentes en cada gen (Sa o Sd en el marcador 16S y Cb, Cc, Cd o Cf en el COI). Las otras dieciséis son polimórficas si bien exhiben, en general, un haplotipo mayoritario y los demás a bajas frecuencias (Tabla M4). Es decir, la mayoría de los cangrejos de una muestra concreta tienen el mismo haplotipo. Probablemente estos niveles reducidos de variabilidad genética intrapoblacional sean consecuencia del importante declive de las poblaciones de cangrejo de río en épocas recientes. Así, en la actualidad el número y tamaño de las poblaciones de cangrejo de río se ha reducido drásticamente, quedando confinadas, principalmente, a las cabeceras de los ríos (Alonso et al. 2000). La disminución del número y tamaño de las poblaciones de cangrejo de río puede deberse a distintas causas, entre las que podemos citar las condiciones climáticas (Alonso et al. 2000), reducción de los hábitats disponibles (Galindo et al. 2003), contaminación (Rallo et al. 2004), sobrepesca (Torre & Rodríguez 1964), expansión de parásitos y enfermedades infecciosas (Diéguez – Uribeondo et al. 1997a, c) e introducción de especies alóctonas muy competitivas (Alonso et al. 2010). La fragmentación del hábitat puede provocar cuellos de botella en las poblaciones, exacerbar el efecto de la deriva genética y reducir el flujo génico, lo que conduce a disminuir su variabilidad genética y aumentar su diferenciación (Dixo et al. 2009; Leonardi et al. 2012; Templeton et al. 1990).

Una de las muestras estudiadas con menor variabilidad genética es la granadina de Arroyo Ermitas (#9) (Tabla M5). En Andalucía, y concretamente en la provincia de Granada, donde se encuentra el límite meridional del rango de distribución de la especie en Europa, *A. italicus* ha tenido una evolución muy desfavorable en las últimas décadas que está bien

documentada (Galindo et al. 2003; Gil – Sánchez & Alba – Tercedor 1998, 2000). Sus poblaciones se han visto afectadas negativamente por diversas causas, la mayoría desconocidas, pues no se ha llevado a cabo un seguimiento adecuado. Entre las que se conocen destacan las mortalidades masivas causadas por el hongo *Saprolegnia parasitica*, las condiciones climáticas adversas en la década de los 90 (varias sequías graves y en 1997, además, una gran inundación) y las alteraciones del hábitat causadas por el ser humano y sus efectos sobre los cauces y la calidad de las aguas (Gil – Sánchez 1999). Así pues, los bajos niveles de variabilidad genética encontrados en esta población (#9) muy posiblemente son consecuencia de sucesivos e importantes cuellos de botella.

El efecto fundador consecuencia de la restauración activa sería también una causa a tener en cuenta, en relación con la escasa variabilidad intrapoblacional, pues podría haber afectado a un número importante de poblaciones (Alonso et al. 2012), sobre todo a aquellas situadas fuera del rango original de la especie (#3, #4, #13 y #14), en las que hemos encontrado muy poca variabilidad genética (Tabla M5). De acuerdo con Pardo (1942) el cangrejo de río no es nativo de Asturias (área de muestreo de las poblaciones #3 y #14, ambas monomórficas), donde se introdujo con éxito en el Lago Enol sobre 1900. De otras zonas, como Galicia (localización de #4 y #13 y en las que el haplotipo Sa del gen 16S está fijado y el haplotipo Cc del marcador COI se detecta en el 95% de los cangrejos) se tienen noticias más detalladas. Torre y Rodríguez (1964) anotan en la información del Río Miño que *‘se han soltado 20 docenas y parece ser que viven y se han reproducido, habiéndose encontrado crías y algunos cangrejos grandes a 1,5 Km aguas arriba de donde se efectuó la suelta’*. Así pues y aunque las poblaciones de origen se desconocen, los bajos o nulos niveles de variación genética de estas poblaciones pueden tener un componente estocástico como consecuencia de la dispersión antropogénica de la especie.

A pesar de lo expuesto anteriormente, algunas de las poblaciones estudiadas presentan unos niveles de variación genética moderados. Entre las que albergan una mayor cantidad de haplotipos, cabe destacar las muestras #2 y #12, que habitan en la cuenca del Río Ebro (Tablas M1 y M4). En ellas es posible identificar cinco haplotipos en cada marcador: Sa, Se, Sd, Sb y Sg en el gen 16S y Cb, Cc, Cd, Ce y Cj en COI (Tabla M3). En las poblaciones de Laguna de Valsemana (#24) y Barranco del Salt (#22), hemos encontrado tres haplotipos en cada una (Tablas M4 y M5). La protección legislativa en la zona de la primera muestra (#12) y el difícil acceso en la segunda (#22), podrían haber contribuido a mantener un alto número efectivo en estas poblaciones y/o a eludir enfermedades presentes en otras regiones. En estas poblaciones encontramos haplotipos a frecuencias intermedias, uno de ellos exclusivo de la

muestra Barranco del Salt (#22), lo que indica que las poblaciones llevan largo tiempo establecidas o que han permanecido con tamaños poblacionales elevados. Todo ello permitiría conservar unos niveles de variabilidad genética más elevados que en otras zonas.

Especial consideración merecen las poblaciones procedentes de las astacifactorías de Pont de Suert (#1) y Rillo de Gallo (#21). En ellas podemos encontrar el haplotipo 16S más frecuente (Sa) y dos de los cuatro haplotipos de COI más comunes (Cb y Cc) (Tabla M3). La astacifactoría más septentrional (#1) alberga haplotipos exclusivos que no se han detectado en el resto de las muestras (Sf y Ca). Pont de Suert es un Centro de Fauna que en el año 2003 adaptó sus instalaciones para acoger al cangrejo de río, a partir de ejemplares capturados en el Canal del Gavet (Pallars Jussà, Lleida). A pesar de las ventajas que supone un ambiente controlado, esta población ha sufrido graves cuellos de botella. Entre ellos una consecuencia directa de la afanomicosis, que en 2010 produjo una drástica reducción del número de ejemplares del centro (dejando una población superviviente de solo 28 cangrejos). En años sucesivos se realizaron aportaciones de poblaciones locales cercanas, a pesar de lo cual, en el año 2012 (último año del que se disponen de datos) la población constaba de 152 animales (Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural, Generalitat de Catalunya). Así pues, el efecto fundador y los cuellos de botella han exacerbado los efectos de la deriva genética en la variabilidad genética de esta muestra, en la que hemos detectado dos haplotipos, H13 y H14, en el 80% de los cangrejos, haplotipos que no hemos identificado en las demás poblaciones analizadas (Tabla M4).

La astacifactoría de Rillo de Gallo (#21) comenzó a funcionar a principios de la década de los 80, con cangrejos procedentes de las cuencas del Ebro y del Tajo, y al menos hasta 2004 no ha recibido aportaciones de cangrejos externas. Esta astacifactoría presenta unos niveles de variación semejantes aunque ligeramente superiores a la media encontrada en las poblaciones españolas, en concordancia con lo encontrado por Beroiz (2004) mediante el empleo de RAPD, probablemente porque su población se ha mantenido con un elevado número de individuos y protegida frente a depredadores y enfermedades.

En definitiva, la variación genética detectada en algunas poblaciones es moderada, pero en general, de promedio, baja. La existencia de variantes mitocondriales fijadas, o cercanas a la fijación, en las poblaciones analizadas es consistente con severas restricciones del tamaño poblacional, sin olvidar el efecto fundador consecuencia de las repoblaciones activas mediadas por el ser humano. En ocasiones estas causas no se presentan de forma aislada sino de manera sucesiva o incluso simultánea. A pesar de estos condicionantes, en las poblaciones

españolas de *Austropotamobius* hemos encontrado doce haplotipos del gen COI, y por primera vez, ocho haplotipos del gen 16S, lo que resulta ser positivo para la posible recuperación de la especie en España.

### **Patrones de distribución de la variabilidad genética e inferencias demográficas**

Un aspecto fundamental en la gestión de las poblaciones de organismos catalogados como especies ‘vulnerables’, es el que se refiere a los patrones poblacionales de distribución de su variabilidad genética. Para poner de manifiesto el patrón de distribución de esta variabilidad en las poblaciones de *Austropotamobius* en España, ha sido fundamental disponer de las secuencias 16S y COI en el mismo ejemplar. Una información más completa nos puede proporcionar una visión más amplia y exacta de la estructura genética de esta especie en nuestro país.

Como ya hemos comentado, los resultados obtenidos indican cierto grado de variabilidad genética de las poblaciones españolas de cangrejo de río en los dos genes analizados. La mayor parte de la variación genética encontrada en este trabajo se debe a diferencias entre las poblaciones. El valor promedio del índice de subdivisión ( $F_{ST}$ ) en las poblaciones españolas de *Austropotamobius* es de 0,69, lo que indica una clara diferenciación genética entre ellas. La existencia de poblaciones grandes y comunicadas entre sí conduce a una menor diferenciación de las poblaciones y a una mayor variabilidad dentro de ellas. Por el contrario, la existencia de poblaciones pequeñas y aisladas desemboca en la divergencia entre poblaciones y a la homogeneidad genética dentro de las mismas (Downie 2000; Lin et al. 1999). El cangrejo de río ha perdido parte de su hábitat, lo que ha provocado una fragmentación de sus poblaciones. Además, buena parte de ellas se han visto afectadas por diversas enfermedades en las últimas décadas, especialmente la plaga del cangrejo causada por el hongo *Aphanomices astaci*, que ha mermado las poblaciones hasta tal punto, que hasta hace pocos años, la tasa de extinción de las poblaciones españolas era una de las mayores registradas en Europa (Alonso et al. 2000). Estos sucesos provocan, debido a la deriva genética, la disminución de la variabilidad genética en las poblaciones y la diferenciación entre ellas.

Los análisis PCoA (Figuras M8 y M9) muestran que los 21 haplotipos concatenados identificados en este trabajo no se distribuyen homogéneamente en las poblaciones ibéricas. En la red de unión de medianas (Figura M6) se aprecia que el haplotipo H1, designado como el ancestral, aparece en el centro de una topología en estrella. Este haplotipo está presente en

muchas de las poblaciones del centro peninsular y además, también se ha identificado en la muestra italiana. Del haplotipo H1 y separado por tan solo una mutación, radia el haplotipo H8, el segundo más frecuente en el centro peninsular y predominante fuera de la cuenca del Ebro. Separados por, al menos, dos mutaciones del haplotipo H1, aparecen los haplotipos que definen las poblaciones del norte de España. El haplotipo H15 se distribuye, sobre todo, por los alrededores de los Montes Vascos, mientras que el haplotipo H17, a un paso mutacional de H15, se aleja de la cuenca del Ebro y caracteriza a las poblaciones de la Cordillera Cantábrica. Los árboles filogenéticos (Figura M5) corroboran los resultados de la red, y muestran que los haplotipos encontrados en el centro de la Península Ibérica ocupan posiciones basales respecto al resto, lo que sugiere que el haplotipo H1 y los estrechamente relacionados con éste son los más antiguos en España. A continuación, se separan los demás haplotipos encontrados en el centro del país, apoyando la subestructura genética encontrada en la red, y por último, formando las ramas más externas, se sitúan los haplotipos de las poblaciones del norte, pudiendo diferenciar, de nuevo, dos subgrupos genéticos en este sector.

La estructura genética observada en las poblaciones del cangrejo en la Península Ibérica concuerda y amplía la de otros trabajos recientes analizando diferentes fragmentos del DNA mitocondrial. El primer equipo que secuenciando una pequeña parte del gen COI encontró variabilidad genética en las poblaciones españolas, con un muestreo amplio, fue el de Diéguez – Uribeondo et al. (2008). Identificaron dos haplotipos que diferían en un solo SNP y que mostraban un patrón geográfico de distribución: A1, en el norte de la Península y A2 en el resto del país. Nuestros resultados corroboran y profundizan, ampliando considerablemente, esta primera aproximación: en el norte hemos identificado cinco haplotipos (H15 – H19) y en el resto del país catorce (H1 – H14) (Figura M7). En el estudio mencionado apuntaban la posibilidad de que la cuenca del Ebro fuera una zona de contacto entre los dos grupos genéticos que detectaron. Nuestros datos confirman este supuesto, ya que en esta cuenca hemos encontrado los haplotipos más frecuentes de cada uno de los grupos genéticos, H1, H8, H15 y H17. Los resultados del trabajo de Pedraza – Lara (2010), también apuntan en esta dirección aunque de una manera más indirecta. Hay que resaltar que el análisis de un fragmento del gen 16S en su trabajo resultó ser monomórfico.

En nuestro estudio los dos haplotipos mayoritarios del marcador 16S consolidan la distinción norte – centro de las poblaciones ibéricas, y los once haplotipos del gen COI revelan subestructura genética dentro de ese patrón principal. En conjunto, ambos marcadores nos aportan una visión clara y definida de los patrones genéticos de las poblaciones de *Austropotamobius* en España.

Otro de los factores que puede contribuir a moldear la estructura genética de las poblaciones, es la migración. Los cangrejos de río pueden cubrir distancias relativamente largas a lo largo de un curso de agua en ausencia de obstáculos, como han mostrado varios estudios mediante seguimiento por radio (Armitage et al. 2000; Robinson et al. 2000; Schütze et al. 1999). La migración natural probablemente sea una de las causas por las que encontramos los mismos haplotipos en poblaciones que habitan un mismo río. Así, podemos hallar mayoritariamente el haplotipo H8 en la cuenca del Júcar (muestras #16, #22 y #23), el haplotipo H1 en el bajo Ebro (#2, #10 y #12), el H15 en el alto Ebro (#18) y a ambos en poblaciones situadas en el tramo medio (#2 y #7) (Tabla M5 y Figura M7). En este sentido, se aprecia que una parte significativa de la variación genética encontrada es atribuible a las cuencas hidrográficas donde habitan las poblaciones, como apuntan los Análisis de la Varianza Molecular (Tabla M7).

Por otra parte, como ya hemos comentado, sabemos que se han producido translocaciones antropogénicas, dado el interés económico y social del cangrejo. Es de esperar, por tanto, que también estos hechos, jueguen un papel en el patrón genético observado en las poblaciones de *Austropotamobius*. A una escala geográfica reducida es interesante notar que poblaciones cercanas, separadas por pocos kilómetros, pertenecientes a cuencas hidrográficas diferentes son similares tal y como revelan los valores  $F_{ST}$  y la distribución de la variabilidad genética mostrada en la Figura M7. Ampliando la escala geográfica, los valores de  $Nm$  entre poblaciones muy alejadas pueden llegar a ser muy altos (Tabla M6). Como ejemplo, en la población de Beceite en Teruel (#6) las estimas de flujo con poblaciones que distan cientos de kilómetros, como A. Ermitas en Granada (#9) o Río Lea en Lugo (#13), son de las más elevadas. En la documentación acerca de reintroducciones y repoblaciones de cangrejos de río a menudo no se encuentra la población de origen que sirve para tales fines. A la luz de los resultados obtenidos parece que los movimientos de cangrejos se darían tanto dentro de una misma región como entre localidades de distintas Comunidades Autónomas.

Pero la variabilidad genética de las especies y su distribución no solo se ven afectadas por sucesos actuales. La distribución actual de la variabilidad genética detectada también es reflejo del pasado. El curso de las cuencas en el pasado juega un papel en la distribución actual del cangrejo de río. Gracias a las capturas fluviales, podría haberse establecido intercambio genético entre poblaciones de cauces que hoy día son independientes, tal y como se ha postulado para otras especies de agua dulce (Callejas & Ochando 2002; Hewitt 1996, 2004). Por ejemplo, las poblaciones de A. Guztar (#11) y M. Madalena (#15), en las cuencas del Ebro y Duero respectivamente, exhiben valores de flujo génico muy altos que podrían explicarse

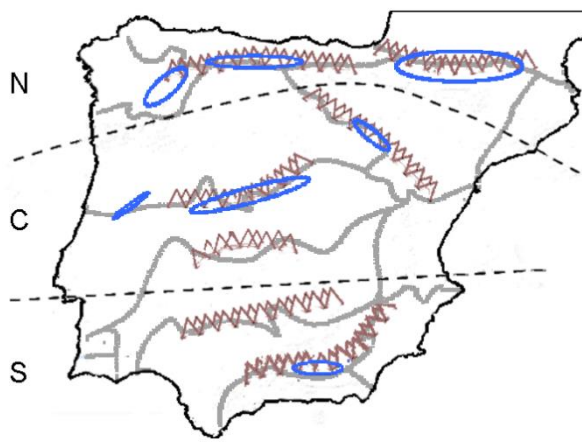
mediante los fenómenos de captura fluvial ya que la observación orográfico – fluvial de esas zonas evidencian esta posibilidad (Beroiz 2004).

Otros factores que han podido moldear la estructura genética hallada serían los cambios climáticos pasados, especialmente las glaciaciones pleistocénicas (Gómez & Lunt 2007; Hewitt 1996, 2004; Schmitt et al. 2006; Schmitt 2007). Los refugios durante el Pleistoceno, lugares con un clima más estable, no expuestos a extremos climáticos, podrían haber dado cobijo a distintas especies durante los periodos glaciales. A este respecto, nuestras inferencias demográficas, aplicando la tasa de sustitución media de la molécula completa de DNAm<sub>t</sub>, sugieren que *Austropotamobius* habría experimentado en España una expansión poblacional hace unos 25.000 años (Figura M10), es decir, después del último máximo glacial (LGM) (30.000 – 35.000 años, Hughes & Woodward 2008; Moreno et al. 2010). Esta estima está en el rango de la única datación publicada sobre las poblaciones de cangrejo de río en España (Pedraza – Lara et al. 2010). Después del LGM, paulatinamente, se produjo una mejora del clima, por lo que los cangrejos de río podrían haber encontrado condiciones climáticas y hábitats adecuados que les permitieran expandirse desde los refugios glaciales. Gracias a datos paleoecológicos y geológicos, se sabe que en esa etapa geológica en la Península Ibérica se produjo un aumento de las temperaturas acompañado de un calentamiento de las aguas continentales (González – Sampérez et al. 2006) y un aumento de la humedad ambiental (Fernández et al. 2007; Fletcher & Sánchez Goñi 2008). Todas ellas condiciones necesarias para la supervivencia de organismos de agua dulce como el cangrejo de río (Beroiz 2004; Souty – Grosset et al. 2006).

Pero las características de este calentamiento no fueron homogéneas a lo largo de la Península Ibérica (Cacho et al. 2010), lo que podría explicar el crecimiento asincrónico de los dos grandes grupos genéticos detectados (Figura M10). De las reconstrucciones filogenéticas (Figuras M5 y M6) se infiere que el haplotipo H1 y los estrechamente relacionados son los más antiguos en la Península Ibérica, haplotipos presentes, fundamentalmente, en el centro de España. Hemos estimado que la expansión de este conjunto de poblaciones (grupo ‘Centro’) habría sucedido hace unos 14.000 años. En ese periodo tuvo lugar la deglaciación del sector Central de la Península Ibérica, que comprende, entre otros, el Sistema Central (Figura M12), hace aproximadamente 16.000 – 12.000 años (Palacios et al. 2011, 2012).

De la misma manera, los árboles y redes filogenéticas evidencian que los haplotipos identificados en las poblaciones del norte de España son más recientes. En el sector norte de la Península Ibérica, que comprende la Cordillera Cantábrica y la Cadena Pirenaica (Figura M12),

hace unos 12.600 – 11.500 años se interrumpió el calentamiento asociado con la última deglaciación durante el periodo denominado *Younger Dryas* (González – Sampériz et al. 2006), en el cual, las condiciones climáticas fueron semiglaciares, con relativa aridez y frío (Cacho et al. 2010). Esta podría ser una de las razones por las que se detecta un crecimiento poblacional más tardío en el grupo genético ‘Norte’ (hace unos 10.000 años) de *Austropotamobius*, respecto al grupo ‘Centro’.



**Figura M12.** Mapa de la Península Ibérica donde se esquematizan las cuencas hidrográficas (gris), las principales cadenas montañosas (marrón) y los principales focos glaciares durante el Cuaternario (elipses azules), divididos en tres sectores: Norte, Centro y Sur (N, C y S. Líneas discontinuas). Adaptado de Acaso 2006 y Gómez y Lunt 2007.

En definitiva, los datos genéticos presentados revelan cuatro conjuntos genéticos definidos por haplotipos característicos de los genes 16S y COI, que se englobarían en dos grandes grupos genéticos, ‘Norte’ y ‘Centro’. Esta estructura genética y las estimas de crecimiento poblacional apuntan a que la especie lleva largo tiempo establecida en el país y que las condiciones biogeográficas y paleoclimáticas de la región, así como diversos factores antropogénicos, han influenciado de manera decisiva sus características genéticas.

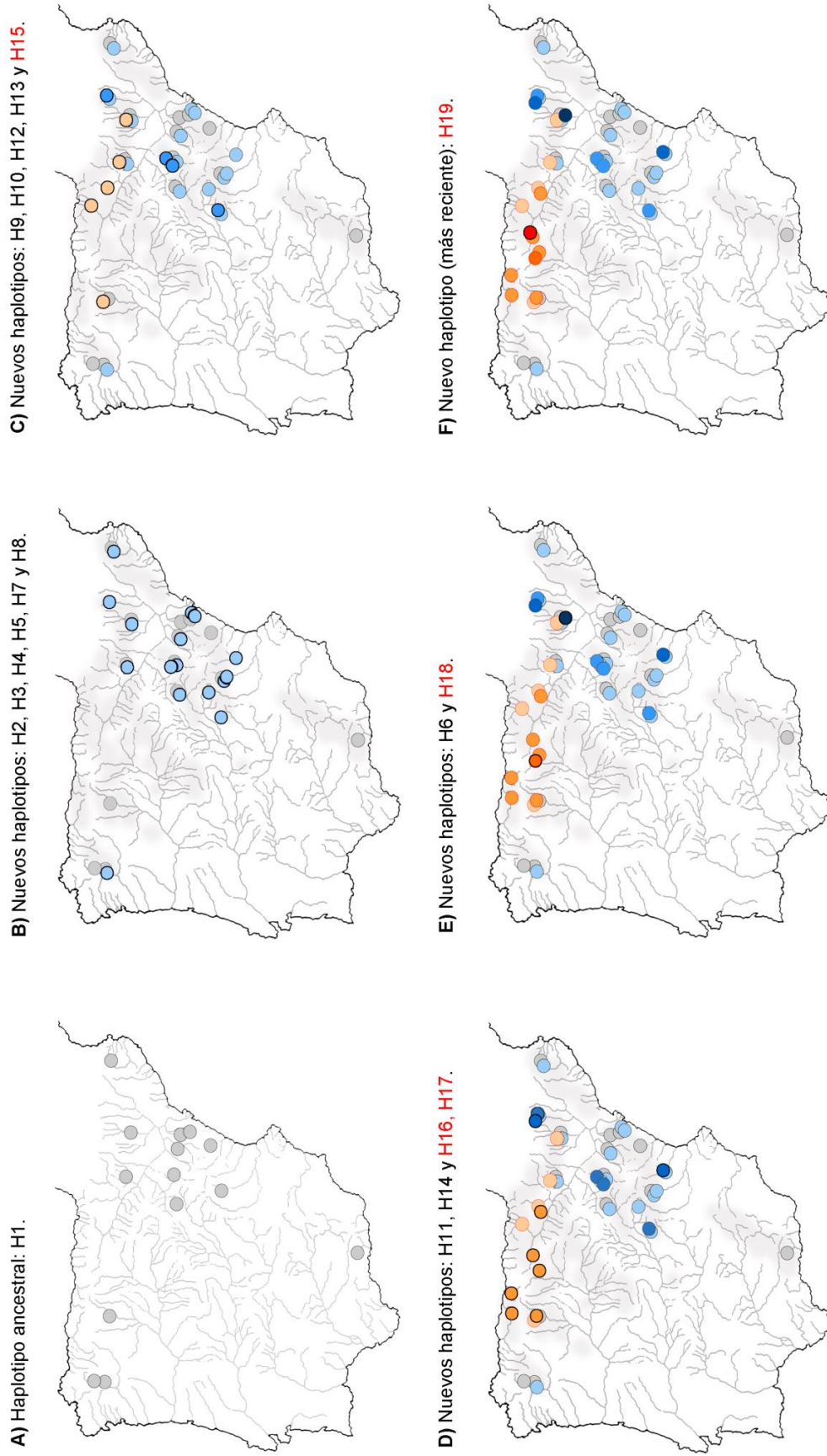
#### **El carácter autóctono del cangrejo de río en España**

Los niveles de variabilidad genética, su patrón de distribución, las reconstrucciones filogenéticas y las dataciones moleculares sugieren que el cangrejo de río lleva establecido en la Península Ibérica largo tiempo.

Trasladando la información genética a mapas geográficos, podríamos inferir la expansión del rango de distribución del cangrejo de río en España. El haplotipo H1 ocupa una posición basal en los árboles filogenéticos (Figura M5) y según la red de unión de medianas sería el haplotipo ancestral (Figura M6), parece lógico deducir que fue el primero, de entre los detectados, en aparecer en España y se expandiría, en principio, fundamentalmente por el centro del país (Figura M13 A). Diferenciándose de H1 en una mutación, aparecerían los haplotipos H2, H3, H4, H5, H7 y H8. Así pues parece que el cangrejo de río habría ampliado su rango de distribución por el noreste peninsular, pero la mayor parte de las poblaciones seguirían concentradas en el centro, donde aparecen las nuevas variantes mitocondriales, muchas de ellas en la cuenca del Ebro (Figura M13 B). A continuación, las reconstrucciones filogenéticas sugieren que las poblaciones del centro peninsular continuarían acumulando variabilidad genética ya que surgen nuevos haplotipos en esta (H9, H10, H12 y H13) y además, aparecería uno de los haplotipos característicos de las poblaciones del norte, el haplotipo H15 (Figura M13 C). A partir de este momento, en los dos grupos genéticos surgirían nuevas variantes mitocondriales que conducirían a la consolidación de los cuatro subgrupos genéticos que vemos hoy en día (Figura M13 D – F). En el centro del país los haplotipos H11, H14 y el haplotipo más reciente de este grupo genético, H6. En el norte de España aparecerían primero los haplotipos H16 y H17, a continuación H18 y por último, H19.

En conjunto, los niveles y patrones de variabilidad genética detectados son difícilmente conciliables con la uniformidad genética que cabría esperar si *Austropotamobius* fuese una especie introducida en España.

Estos datos contrastan con trabajos anteriores (Grandjean et al. 2001; Trontelj et al. 2005) que basados en un número limitado de muestras, generalmente de un área geográfica muy restringida, no hallaron variación genética mitocondrial en las poblaciones españolas. El hecho de que el único haplotipo mitocondrial detectado, por autores previos, también se encontrara en las poblaciones italianas condujo a Grandjean et al. (2001) a plantear que '*we could assume a translocation of crayfish from Italy to Spain*' (podríamos asumir una translocación de cangrejos desde Italia a España), aunque los autores de dicho trabajo exponen que es la falta de diversidad genética entre las poblaciones lo que les conduce a esa explicación. Esta falta de diversidad genética descartaba el origen autóctono de las poblaciones en España, hipótesis que algunos autores siguen manteniendo hoy en día (Chiesa et al. 2011; Clavero y Villero 2013). A pesar de su postura inicial, Grandjean modificó sus primeras conclusiones cuando se encontró variabilidad genética mitocondrial en los cangrejos ibéricos (Diéguez – Uribeondo et al. 2008), al mismo tiempo que se acumulaban



**Figura M13.** Posible expansión genealógica de los haplotipos encontrados en las poblaciones españolas de cangrejo de río. Cada mapa, con un intervalo de una mutación, representa un periodo de tiempo conforme a los pasos mutacionales detectados en la red MJ (Figura M6). Los haplotipos que aparecen en cada periodo se muestran con colores diferentes.

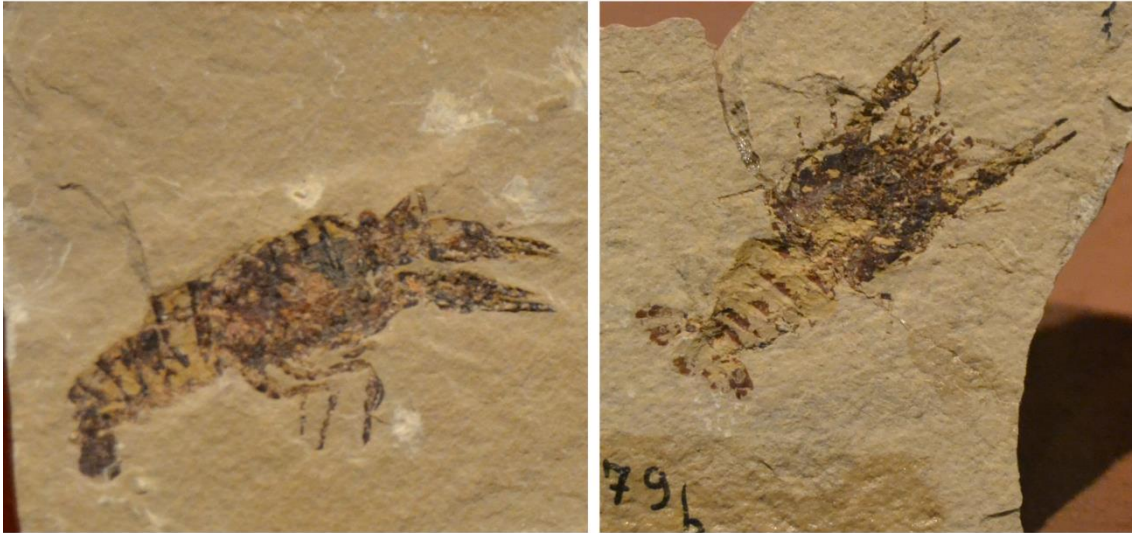
evidencias a nivel nuclear que diferenciaban las poblaciones españolas de las italianas (Beroiz et al. 2008). En los últimos años se ha constatado que existe más variación genética en nuestras poblaciones de cangrejo de río así como estructuración geográfica de la misma como demuestran ésta y otras investigaciones (Pedraza – Lara et al. 2010), lo que apoyaría el origen autóctono de *Austropotamobius* en España.

Si la hipótesis del origen no autóctono de la especie fuera cierta, cabría esperar que los haplotipos que albergan las poblaciones introducidas, es decir, las españolas, estuvieran presentes en el área de distribución original de la especie, Italia. En cambio en las poblaciones españolas se detectan haplotipos que no se encuentran en Italia (Tablas M4 y M5), si bien podría deberse a las diferencias en los tamaños muestrales analizados en ambos países. Por ello, de manera complementaria se realizó un análisis de rarefacción (Simberloff 1972) con el programa EstimateS (Colwell 2009) para evaluar el impacto del tamaño muestral sobre la riqueza haplotípica. Las curvas de rarefacción obtenidas indican que las diferencias en el número de haplotipos detectados en las muestras de cada país (España e Italia) no se explican por el tamaño de las muestras (Anexo M4). Por lo que excluye la posibilidad de que no se hayan detectado más haplotipos en Italia por un efecto del muestreo. De igual forma, Pedraza – Lara et al. (2010), también descartaron el efecto del muestreo en los grupos ibérico e itálico como causa de la aparición de haplotipos en España que no están presentes en Italia. Estos mismos autores analizando un mayor número de ejemplares italianos, establecieron que las poblaciones de ambos países habrían empezado a divergir durante la fase temprana del último máximo glacial (LGM), hace unos 35.000 años.

Al margen de la información genética de los primeros trabajos en la especie, los principales argumentos que se han esgrimido para apoyar su origen foráneo en España han sido la ausencia de restos fósiles de cangrejo en yacimientos de la Península y la falta de referencias escritas, o de otro tipo, sobre el cangrejo en nuestro país antes del siglo XVII.

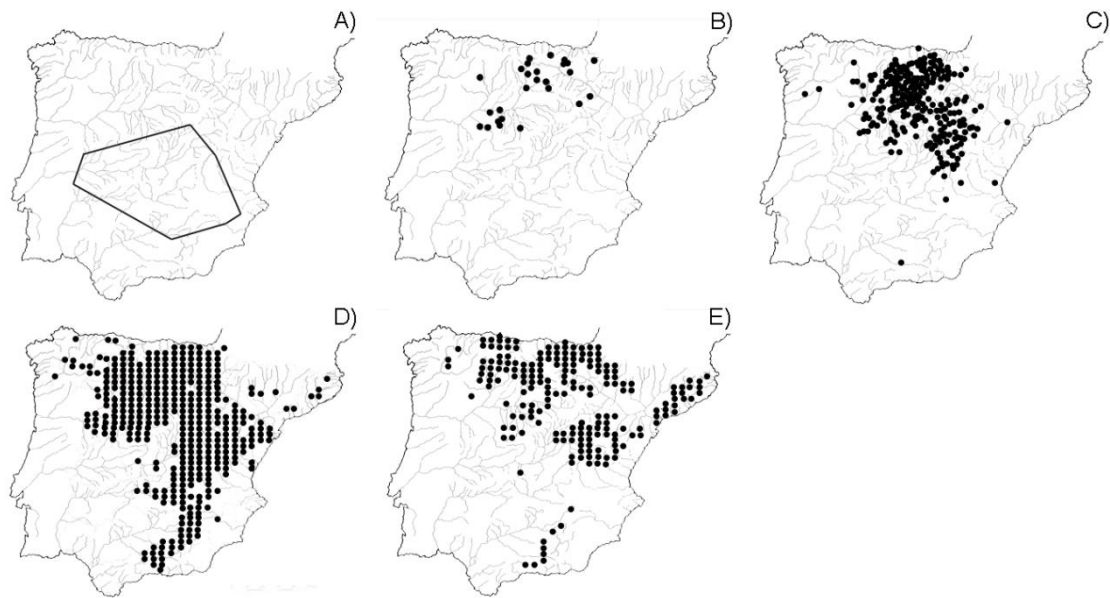
En relación con el registro fósil, en general, los fósiles de cangrejos terrestres son escasos debido a las condiciones desfavorables para su preservación (Pasini & Garassino 2011). En el limitado registro de astácidos, merece la pena mencionar la abundancia de especímenes adscritos a la especie extinta *Austropotamobius llopsi* en los yacimientos del Cretácico inferior de Las Hoyas (Cuenca) (Figura M14) y Montsec (Lleida) (Garassino 1997), si bien es cierto que no se han encontrado, hasta donde sabemos, otros más recientes. Evidentemente, tratar de establecer la presencia de estos animales en la Península Ibérica a través de datos paleontológicos tan exiguos resulta impensable. Hay que destacar que tampoco en Italia se

han encontrado restos fósiles del Cenozoico (Galindo et al. 2014), de donde se supone que provendrían los cangrejos de España.



**Figura M14.** Ejemplares de *Austropotamobius Ilopsi* procedentes del yacimiento de Las Hoyas (Cuenca). (Dra. Carmen Callejas)

En cuanto a las referencias históricas escritas, recientemente Clavero y Villero (2013) han afirmado que los cangrejos no habitaban la Península Ibérica antes del siglo XVII y que el primer documento sobre la presencia de los cangrejos en España data de 1775, por tanto, concluyen que la especie ha tenido que ser introducida en nuestro país con posterioridad al siglo XVI. Basan esta suposición en que los cangrejos de río no aparecen citados en las Relaciones Topográficas (años 1574 – 1582). Las Relaciones son el resultado de un estudio realizado en el reinado de Felipe II sobre historia, geografía, religión, salud, cosechas, ganado y especies piscícolas de los pueblos de España, entre otros temas, y se consideran una fuente documental de primera importancia. Si bien es cierto que el cangrejo no se menciona en las Relaciones, es interesante puntualizar que los ‘interrogatorios’ se restringieron a regiones de España donde la presencia de este macroinvertebrado no está documentada en el siglo XVII (Galindo et al. 2014).



**Figura M15.** Distribución del cangrejo de río en la Península Ibérica: A) el lazo indica la ausencia del cangrejo en el área documentada por las Relaciones Topográficas a finales del siglo XVI, B) los puntos representan localidades donde la especie ha sido citada a principios del siglo XIX, C) y mediados del siglo XIX. D) Los puntos indican la presencia del astácido según estudios de su distribución antes de 1975 y E) a finales del siglo XX. Mapas A, B y C basados en Clavero & Villena 2013 y los mapas D y E en Alonso et al. 2000.

Clavero y Villero (2013) concluyen que esta forma de expansión es propia de especies invasoras y que, probablemente, ésta en concreto pudo ser introducida en el norte de la Península y de cualquier manera, después del siglo XVI. Por tanto, el patrón de expansión de la especie en España obtenida a partir de nuestros datos genéticos se contrapone al descrito por los primeros trabajos genéticos (Grandjean et al. 2001; Grandjean et al. 2002a, b; Trontelj et al. 2005) y al reciente de Clavero y Villero (2013) apoyándose en datos documentales. Según nuestros resultados la región habitada desde hace más tiempo por el cangrejo de río sería el centro peninsular y no el norte. Parte de esta región del centro peninsular se sitúa fuera de los límites a los que se circunscriben las Relaciones. El hecho de que el haplotipo designado como el ancestral en España también esté presente en Italia no asegura que las poblaciones españolas procedan de las italianas, como plantean algunos autores, sino que podría deberse a un amplio rango de distribución de la especie en el pasado, y en cierto modo continuo, desde España a Italia tal y como proponen otros investigadores (Diéguez – Uribeondo et al. 2008; Karaman 1963). De hecho, Pedraza – Lara et al. (2010) estiman que las poblaciones de ambos países habrían divergido tras el último glacial máximo,

cuando el avance de los hielos pudo hacer inhabitable el sur de Francia para el cangrejo, quedando recluso, por tanto, en las penínsulas Ibérica e Itálica.

Parte de las discrepancias entre ambos patrones de expansión probablemente se deban a la dificultad de encontrar registro escrito sobre el cangrejo en España. Hipotetizar sobre el origen de una especie a partir de datos documentales es arriesgado, puesto que *'basta una sola cita contrastada para hacer retroceder la evidencia de presencia'* (Galindo et al. 2014) y de esta manera, alterar totalmente las conclusiones que se desprenden de este tipo de análisis. De hecho, Maldonado et al. (2008) recopilaron quince nuevas referencias al cangrejo de río, y entre ellas, documentaron la cita más antigua encontrada hasta el momento. Esta referencia se remonta a 1666 y no deja de ser curiosa, pues se refiere a los hábitos alimenticios de Mariana de Austria, madre del rey Carlos II: *'Los cangrejos o gambaros se traen de Valladolid para los viernes y vigiliass y se conservan en Valdemorillo en unas charcas al cuidado de una familia. Se pagan a real y no son suficientes, por las dificultades debajo del agua y porque los jabalíes de los montes del Escorial los persiguen mucho y van a comérselos'*.

En definitiva, el análisis de los niveles y patrones de diversidad genética con dos largos fragmentos mitocondriales no parece apoyar la teoría del origen antropogénico y reciente de la especie en nuestro país. La progresión del rango de expansión de este astácido en España y las dataciones moleculares respaldan un origen muy anterior al siglo XVII. En conjunto, las evidencias genéticas de este y otros estudios, apuntan al origen autóctono de la especie en la Península Ibérica tal y como se recoge en la última actualización del rango de distribución de *Austropotamobius pallipes* sensu lato en Europa (Kouba et al. 2014), y aunque las translocaciones desde Italia no se pueden descartar, poblaciones autóctonas e introducidas podrían coexistir.

### **Gestión de las poblaciones de cangrejo de río en España**

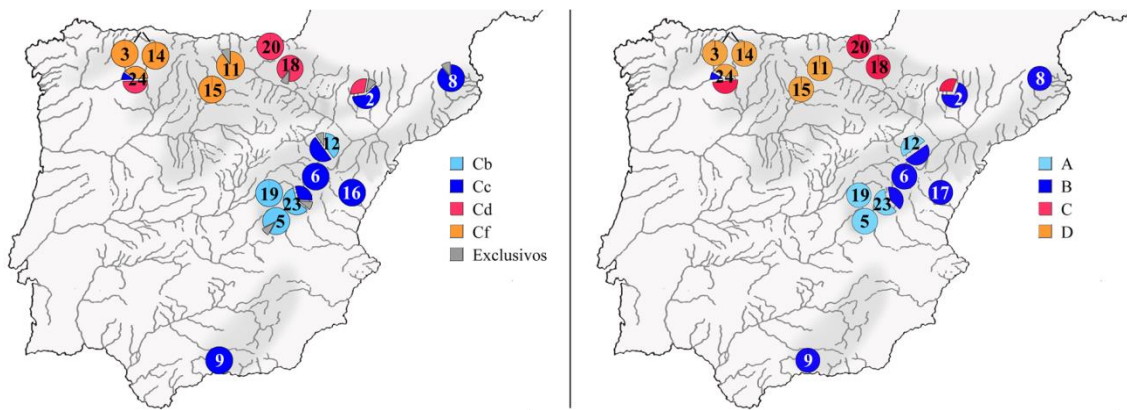
Considerando la utilidad de la información filogeográfica encontrada en este trabajo, nos parece indispensable incluir datos genéticos en los futuros planes de recuperación de la especie en España, donde está catalogada como 'vulnerable' por el drástico declive que han experimentado sus poblaciones en las últimas décadas.

Los grupos genéticos puestos de manifiesto mediante el estudio de genes mitocondriales deberían considerarse dos unidades de manejo diferenciadas, los grupos 'Norte' y 'Centro'. También debería preservarse la subestructura detectada en cada grupo genético, lo que nos llevaría a hablar de 4 conjuntos genéticos diferenciados.

Por otro lado, el análisis de ejemplares de las dos astacifactorías muestra que los procedentes de Rillo de Gallo (#21) se engloban en grupo genético 'Centro' y por tanto, sería conveniente que las repoblaciones y sueltas locales en el tercio centro peninsular se realicen a partir de individuos de esta astacifactoría. En ella sólo se han encontrado los dos haplotipos más frecuentes del grupo, H1 y H8. Por ello sería recomendable que se realizaran aportaciones externas poblaciones locales. Esto aumentaría la variabilidad genética de esta población destinada a fines de repoblación. La astacifactoría de Pont de Suert, también más relacionada con el grupo 'Centro' que con el 'Norte', cuenta con haplotipos únicos por lo que su preservación también resulta muy relevante como fuente de variación genética para poblaciones silvestres de *Austropotamobius* en nuestro país.

Por último, los resultados obtenidos mediante la técnica de RFLP apuntan a que ésta representa una herramienta metodológica rápida, sencilla y económica que podría implantarse en los centros de gestión con el propósito de incluir información genética en la conservación de las poblaciones de cangrejo de río. Como muestra la Figura M16 la distribución geográfica de los haplotipos RFLP detectados permite diferenciar los haplotipos más frecuentes en las poblaciones españolas de *Austropotamobius*. Con las dos enzimas de restricción probadas se obtiene además información acerca del subgrupo genético (Cordillera Cantábrica y Montes Vascos en el grupo 'Norte' y cuenca del Ebro y resto de las cuencas en el grupo 'Centro') al que pertenecen.

Este método permitiría de una manera sencilla y rápida seleccionar los ejemplares más adecuados para repoblaciones y reintroducciones, evitando la pérdida de la diversidad genética que caracteriza a los cuatro subgrupos puestos de manifiesto en España.



**Figura M16.** Localización de las poblaciones analizadas (según el código en la Tabla M1) y frecuencias de los principales haplotipos del gen COI (izquierda) y de los patrones de digestión detectados (derecha).

**Anexos**

**Anexo M1.** Alineamientos correspondientes a los haplotipos encontrados con el marcador 16S en las poblaciones de *A. italicus* (Sa – Sj) y *A. pallipes* (Sk – Sm).

	10	20	30	40	50	60
<b>Sa</b>	TATGTACATA	TCGCCCGTCG	CTTTCATTTA	AGGTGAAATA	AGTCGTAACA	TAGTAGGGGC
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>S1</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	70	80	90	100	110	120
<b>Sa</b>	ACTGGAAAGT	ACCCCTAGAA	TTTTAGCAAA	ATAAAGCTGA	AGATAAGCAG	CTCATTTACA
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....T.C	C.C.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....A..	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....A..	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....A..G	.....	.....A.....	.....
<b>S1</b>	.....	.....A..	.....A..G	.....	.....A.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....A..	.....A..G	.....	.....A.....	.....

	130	140	150	160	170	180
<b>Sa</b>	CTGAGAAGGG	TATCGTGAAA	TTTCGATTTAT	TTTGAATAAA	ATTAATTGCT	TATAAATAAT
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....
<b>S1</b>	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....

(...)

	190	200	210	220	230	240
<b>Sa</b>	AATGAGAAAA	ATATTTTACT	GTTTGTAGTA	GGGTAAATCG	AATAAAGAAG	AAGGCTTAAG
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	...G....	.....	.....
<b>Sk</b>	.G.....	.....	.....	...G....	...G....	.....
<b>Sl</b>	.G.....	.....	.....	...G....	...G....	.....
<b>Sm</b>	.G.....	.....	.....	...G....	...G....	.....

	250	260	270	280	290	300
<b>Sa</b>	TGTATTTTAC	TGTAAAGGAG	ATTTGAAATA	ATTGAAAATT	AAGTATGTAG	AAAGTAGTAA
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....	...A....	...A....
<b>Sl</b>	.....	.....	.....	.....	...A....	...A....
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....	...A....	...A....

	310	320	330	340	350	360
<b>Sa</b>	TTAAATTATG	TACCTTGTGT	ATTATAGGTG	CTTAAATTTA	TGTATTTTAA	TTACATATCT
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	...A...	.....	.....	.....
<b>Sl</b>	.....	.....	...A...	.....	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....	...A...	.....	.....	.....

(...)

	370	380	390	400	410	420
<b>Sa</b>	CGAAAGAGGA	AATAGCTAGG	GTAATAAGAA	AGTTTTTGTG	GAATAAAGAT	TTTAAATTTT
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sl</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	430	440	450	460	470	480
<b>Sa</b>	ATTTCTAAGA	GTGAAATATT	AATTGAGTTC	TCTAATATCT	AGTTTTTTGA	GAAATAAATT
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....	.....	A.....
<b>Sl</b>	.....	.....	.....	.....	.....	A.....
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....	.....	A.....

	490	500	510	520	530	540
<b>Sa</b>	TAATTTAGCT	TTTTTATATA	AATTTATAGG	AAAAGTAAGG	GTAGAGGGGA	CGAGCTCTTT
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	T.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....G	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	T.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	A.....	.....	.....	GG.....	...G...T	T....T...
<b>Sl</b>	A.....	.....	.....	GG.....	...G...T	T....T...
<b>Sm</b>	A.....	.....	.....	GG.....	...G...T	T....T...

(...)

	550	560	570	580	590	600
<b>Sa</b>	ATCATATAAT	TATATGAGGA	GGAAAGAATT	AACTAATTGA	ACTAAGCTTA	AAATTAGCTA
<b>Sf</b>	.....	.....	..G.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.T.....G	..G..G..	..T...C.G	.....	.....
<b>Sl</b>	.....	.T.....G	..G..G..	..T...C.G	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.T.....G	..G..G..	..T...C.G	.....	.....

	610	620	630	640	650	660
<b>Sa</b>	TGTTTATAAG	GTGTTATAAT	TAATATTAAA	GTTGTAAATT	ATTTTTATAT	CCTTTAAATT
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....A	.....	.....	A.....	.....C	.....
<b>Sl</b>	.....A	.....	.....	A.....	.....C	.....
<b>Sm</b>	.....A	.....	.....	A.....	.....C	.....

	670	680	690	700	710	720
<b>Sa</b>	CATATCGAAA	ATTAATTTAA	AATCTTATAA	AGTAGGTAT	AGTGAGTATA	TTAGTATATA
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	....T....	.....	.....	..G.....	.....	.....
<b>Sl</b>	....T....	.....	.....	..G.....	.....	.....
<b>Sm</b>	....T....	.....	.....	..G.....	.....	.....

(...)

	730	740	750	760	770	780
<b>Sa</b>	ATGATGTAGG	AGGAATATAT	GTAAAATGAA	GAATAAATTT	TATTTTTTTTT	ATGGTAGGTT
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	..G..G..	G.....C.C	.....C	.....	..A.G...	.....G..C.
<b>Sl</b>	..G..G..	G.....C.C	.....C	.....	..A.G...	.....G..C.
<b>Sm</b>	..G..G..	G.....C.C	.....C	.....	..A.G...	.....G..C.

	790	800	810	820	830	840
<b>Sa</b>	CAAGGAACTC	GGCAAATAAT	TATTTCTGCC	TGTTTAACAA	AAACATGTCT	ATATGAGAGG
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....A
<b>Sl</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....A
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....A

	850	860	870	880	890	900
<b>Sa</b>	TATATAAAGT	CTAACCTGCC	CATTGAGATT	TAAAAGGCCG	CGGTATTATG	ACCGTGCTAA
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	A.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sl</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....

(...)

<b>Sa</b>	910	920	930	940	950	960
<b>Sf</b>	GGTAGCATAA	TCATTAGTCT	TTTAATTGAA	GGCTGGTATG	AATGGTTGGA	CAAGAGATAA
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sl</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	970	980	990	1000	1010	1020
<b>Sa</b>	GCTGTCTCGA	GCAAAAATAT	TGAATTTAAC	TTTTAAGTGA	AAAGGCTTAA	ATTTTCTAGG
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sl</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
<b>Sa</b>	GGGACGATAA	GACCCTATAA	AACTTTATAT	TTTTAAAATA	TTAATTAATT	TTGTATGAGA
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.....
<b>Sh</b>	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....	.....C..G..	.....A..
<b>Sl</b>	.....	.....	.....	.....	.....C..G..	.....A..
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....	.....C..G..	.....A..

(...)

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
<b>Sa</b>	AGGCTATTTT	TAAATATTTT	ATTGGGGTGA	TAGGAATATA	ATAAAAGATA	ACTGTTTCTT
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	G..C.C....	.G.G.....	.....	...G....	.....	...T....
<b>Sl</b>	G..C.C....	.G.G.....	.....	...G....	.....	...T....
<b>Sm</b>	G..C.C....	.G.G.....	.....	...G....	.....	...T....
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
<b>Sa</b>	TTTTTTTACA	GAGGTGTTTG	AGTAAAAGAT	CCTAATTAGG	GAAAGAAGGT	TAAGTTACTT
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	..A.A....	.....T..	.....A..	.....	.....
<b>Sl</b>	.....	..A.A....	.....T..	.....A..	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	..A.A....	.....T..	.....A..	.....	.....
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
<b>Sa</b>	TAGGGATAAC	AGCGTAATTT	TCTTTAAGAG	TTCTTATCAA	CAGGAGAGTT	TGCGACCTCG
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....	.....	.....G.	..A.....	.....
<b>Sl</b>	.....	.....	.....	.....G.	..A.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....	.....	.....G.	..A.....	.....

(...)

	1270	1280	1290	1300	1310	1320
<b>Sa</b>	ATGTTGAATT	AAAAGTTCTT	TATGGAGCAG	AAACTATAAT	AGAAGGTCTG	TTCGACC
<b>Sf</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Se</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sd</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sb</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Si</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sg</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sc</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sh</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sj</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Sk</b>	.....	.....A	.....	.....	.....	.....
<b>Sl</b>	.....	.....A	.....	.....	.....	.....
<b>Sm</b>	.....	.....A	.....	.....C	.....	.....

**Anexo M2.** Alineamientos de los haplotipos encontrados en las poblaciones de *A. italicus* con el marcador mitocondrial COI.

	10	20	30	40	50	60
Ca	CAACATTTGT	TTTGGACTTG	AGCTGGGATA	GTAGGGACTT	CTTTAAGAAT	AATTATTCGT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....G

	70	80	90	100	110	120
Ca	GTGGAATTAG	GGCAGCCGGG	CAGTTTAATT	GGGGACGATC	AAATTTATAA	TGTAGTAGTT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	130	140	150	160	170	180
Ca	ACCGCCCATG	CCTTTGTTAT	AATTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTATTATAAT	TGGGGGATTT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

(...)

	190	200	210	220	230	240
Ca	GGGAATTGAT	TAGTTCCTTT	AATGTTAGGG	GCCCCTGATA	TGGCTTTCCC	CCGAATAAAT
Cb	.....	.....	.....	.....T.	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....T.	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....T.	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	250	260	270	280	290	300
Ca	AACATGAGAT	TTTGATTACT	TCCGTTTTCT	TTAACTCTAT	TATTAAGTAG	GGGGTTAGTG
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	310	320	330	340	350	360
Ca	GAGAGGGGAG	TTGGGACAGG	GTGAACTGTC	TACCCCCCTT	TAGCATCAGC	TATTGCTCAC
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

(...)

	370	380	390	400	410	420
Ca	GCAGGGGCGT	CTGTGGACCT	GGGGATTTTT	TCACTTCATT	TAGCGGGGGT	ATCTTCAATT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	430	440	450	460	470	480
Ca	TTAGGGGCGG	TAAATTTTAT	AACTACAGCT	ATTAATATAC	GAAGGGTAGG	GATAACCTTA
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	490	500	510	520	530	540
Ca	GATCGAATAC	CTCTTTTTGT	TTGATCCGTA	TTTATTACGG	CAGTTCTTTT	ACTTTTGTCT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

(...)

	550	560	570	580	590	600
Ca	CTACCTGTAT	TAGCAGGTGC	TATTACTATA	TTATTAACAG	ATCGTAATTT	AAATACTTCA
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	610	620	630	640	650	660
Ca	TTTTTTGATC	CTGCTGGGGG	AGGAGACCCG	GTTTTATATC	AACACTTATT	TTGGTTTTTT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	670	680	690	700	710	720
Ca	GGGCACCCAG	AGGTTTATAT	TTAATTTTA	CCAGCATTTG	GCATGGTATC	ACATATTGTC
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.T.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.T.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

(...)

	730	740	750	760	770	780
Ca	GCCCAGGAGT	CGGGAAAAAA	AGAAGCTTTT	GGTACATTAG	GGATAATTTA	TGCTATAGTT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	...C.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	...C.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	790	800	810	820	830	840
Ca	GCTATTGGTG	TATTAGGGTT	TGTTGTTTGG	GCTCACCATA	TATTTACGGT	GGGATAGAT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	850	860	870	880	890	900
Ca	GTGGAC <u>C</u> ACTC	GAGCATATTT	TACTTCTGCT	ACAATGATTA	TTGCTGTACC	AACTGGGATT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

(...)

	910	920	930	940	950	960
Ca	AAGATTTTTA	GGTGATTGGG	AACTTTACAG	GGAACTCAAA	TTAATTATAG	TCCCTCTCTA
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	970	980	990	1000	1010	1020
Ca	CTATGGGTCT	TAGGGTTTAT	TTTTTTATTT	ACTGTGGGGG	GATTAAGTGG	GGTAGTTTTA
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.G.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.G.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.G.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.G.....	.....
Cl	.....C..	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Ca	GCTAACTCTT	CTATTGATAT	TATTCTACAT	GATACTTATT	ATGTTGTGGC	GCATTTTCAT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

(...)

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Ca	TACGTTCTTT	CGATAGGGGC	TGTATTTGGT	ATTTTGTCTG	GGATTGTCA	TTGATTCCT
Cb	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cc	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cd	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ce	.....	.....	.....	..C.....	.....	.....
Cf	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cg	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ch	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cj	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ck	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cl	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cm	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1150	1160	1170	1180	
Ca	TTGTTTACTG	GGCTAACCTT	AAATCAAAAA	TGATTAAAAA	TTCA
Cb	.....	.....	.....	.....	....
Cc	.....	.....	.....	.....	....
Cd	.....	.....	.....	.....	....
Ce	.....	.....	.....	.....	....
Cf	.....	.....	.....	.....	....
Cg	.....	.....	.....	.....	....
Ch	.....	.....	.....	.....	....
Ci	.....	.....	.....	.....	....
Cj	.....	.....	.....	.....	....
Ck	.....	.....	.....	.....	....
Cl	.....	.....	.....	.....	....
Cm	.....	.....	.....	.....	....

**Anexo M3.** Alineamiento de proteínas correspondientes a los haplotipos encontrados con marcador COI. Las barras representan las teóricas regiones de hélices transmembrana (TMH1 – TMH10) según los programas de la Tabla M2. Las regiones en **negrita** las predicen todos los programas, en **gris** la describe por cinco de los siete programas.

	<b>TMH1</b>																										
	Q	H	L	F	W	T	W	A	G	M	V	G	T	S	L	S	M	I	I	R	V	E	L	G	Q	25	
Ca	Q	H	L	F	W	T	W	A	G	M	V	G	T	S	L	S	M	I	I	R	V	E	L	G	Q		
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	<b>TMH2</b>																										
	P	G	S	L	I	G	D	D	Q	I	Y	N	V	V	V	T	A	H	A	F	V	M	I	F	F	50	
Ca	P	G	S	L	I	G	D	D	Q	I	Y	N	V	V	V	T	A	H	A	F	V	M	I	F	F		
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	(...)

**THM2**

Ca	M	V	M	P	I	M	I	G	G	F	G	N	W	L	V	P	L	M	L	G	A	P	D	M	A	75
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ci	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

**THM3**

Ca	F	P	R	M	N	N	M	S	F	W	L	L	P	F	S	L	T	L	L	L	T	S	G	L	V	100
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

**THM3****THM4**

Ca	E	S	G	V	G	T	G	W	T	V	Y	P	P	L	A	S	A	I	A	H	A	G	A	S	V	125	
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	(...)

**THM4**

Ca	D	L	G	I	F	S	L	H	L	A	G	V	S	S	I	L	G	A	V	N	F	M	T	T	A	150
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**THM5**

Ca	I	N	M	R	S	V	G	M	T	L	D	R	M	P	L	F	V	W	S	V	F	I	T	A	V	175
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**THM5**

Ca	L	L	L	L	S	L	P	V	L	A	G	A	I	T	M	L	L	T	D	R	N	L	N	T	S	200
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	(...)

	<b>THM6</b>																									
Ca	F	F	D	P	A	G	G	G	D	P	V	L	Y	Q	H	L	F	W	F	F	G	H	P	E	V	250
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	<b>THM6</b>																									
Ca	Y	I	L	I	L	P	A	F	G	M	V	S	H	I	V	A	Q	E	S	G	K	K	E	A	F	275
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	<b>THM7</b>																									
Ca	G	T	L	G	M	I	Y	A	M	V	A	I	G	V	L	G	F	V	V	W	A	H	H	M	F	300
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	(...)

	<b>THM8</b>																									
Ca	T	V	G	M	D	V	D	T	R	A	Y	F	T	S	A	T	M	I	I	A	V	P	T	G	I	325
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	<b>THM8</b>										<b>THM9</b>															
Ca	K	I	F	S	W	L	G	T	L	Q	G	T	Q	I	N	Y	S	P	S	L	L	W	V	L	G	350
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	<b>THM9</b>																									
Ca	F	I	F	L	F	T	V	G	G	L	T	G	V	V	L	A	N	S	S	I	D	I	I	L	H	375
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	(...)

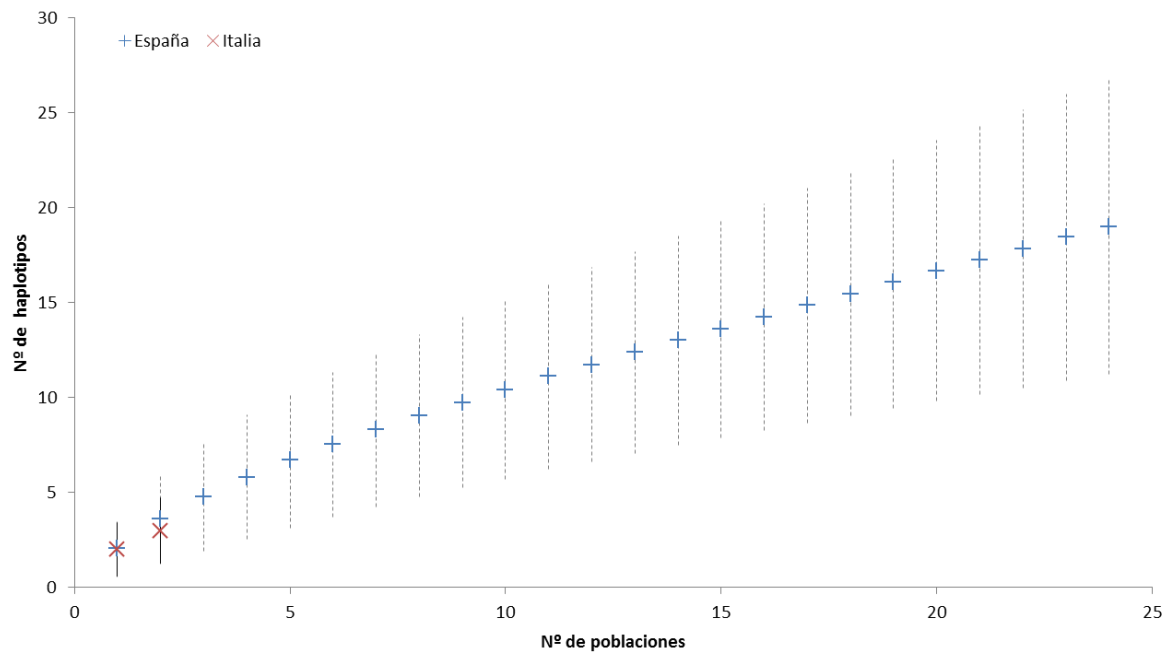
**THM10**

Ca	D	T	Y	Y	V	V	A	H	F	H	Y	V	L	S	M	G	A	V	F	G	I	F	A	G	I	400
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**THM10**

Ca	V	H	W	F	P	L	F	T	G	L	T	L	N	Q	K	W	L	K	I	
Cb	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ce	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cf	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cg	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ch	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ci	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cj	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ck	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Anexo M4.** Curvas de rarefacción para el número de haplotipos en las poblaciones españolas e italianas. En la gráfica también se muestran los intervalos de confianza *log – linear* al 95%.



## Capítulo 2

---

Análisis de las poblaciones españolas de cangrejo de río:  
microsatélites



## Introducción

Un objetivo prioritario en la biología de la conservación es mantener el potencial evolutivo de especies en peligro. Desde el punto de vista de la conservación, definir las unidades poblacionales, bien en forma de unidades evolutivas significativas (ESU, *Evolutionary Significant Units*) o como de unidades de manejo (MU, *Management Units*), implica el conocimiento de la variabilidad genética y la estructura poblacional de la especie. Ryder (1986) fue el primero en definir las ESU como grupos de organismos que han estado aislados de otros grupos de la misma especie un periodo de tiempo suficiente como para haber desarrollado divergencias genéticas significativas entre ellos. Más tarde, Moritz (1994, 2002) revisó el concepto de ESU y matizó el criterio genético, definiéndolo como un grupo de individuos o poblaciones recíprocamente monofiléticos a nivel mitocondrial y que divergen significativamente en las frecuencias alélicas de loci nucleares. Moritz consideró que la divergencia significativa en las frecuencias alélicas a nivel nuclear es un requisito indispensable para poder definir una ESU y evitar la clasificación errónea de aquellas poblaciones entre las que se detecta flujo génico nuclear, pero no organular.

En la práctica por tanto, aquellas poblaciones que no son recíprocamente monofiléticas a nivel mitocondrial pero sí presentan divergencias en las frecuencias alélicas a nivel nuclear también son importantes en la conservación de una especie, ya que representan poblaciones con flujos génicos tan bajos que funcionalmente pueden considerarse independientes. Por ello, las MU se definen como aquellas poblaciones con diferencias significativas en las frecuencias alélicas a nivel nuclear o mitocondrial. Estas unidades de manejo intentan integrar las características genéticas de distintas poblaciones, las cuales tienen que manejarse de manera independiente para asegurar la viabilidad de la ESU a la que pertenecen (Moritz 2002). Ambos tipos de unidades de conservación son relevantes pues las ESU se relacionan con la estructura poblacional histórica, la filogenia mitocondrial y las necesidades conservacionales a largo plazo, mientras que las MU reflejan la estructura poblacional actual y los problemas de gestión a corto plazo.

Los estudios genéticos sobre las poblaciones españolas de cangrejo de río, *Austropotamobius pallipes* sensu lato, se han basado fundamentalmente en el análisis del DNAm<sup>t</sup> y por tanto, las recomendaciones para su conservación sólo derivan de este conocimiento. Pero de acuerdo con las anteriores definiciones de ESU y MU, es también

necesario tener información acerca de loci nucleares para la adecuada gestión de la variabilidad genética global de una especie amenazada.

Entre las múltiples herramientas para evaluar la variabilidad y estructura genética a nivel nuclear, los microsatélites (SSR, *Simple Sequence Repeat* o STR, *Short Tandem Repeat*) se han convertido en uno de los métodos más populares en genética de la conservación. Estos marcadores codominantes consisten en repeticiones en tándem de una secuencia corta de DNA en una localización cromosómica determinada (Hamada et al. 1984). Se han descrito tres tipos primarios de SSR: repeticiones perfectas en los que no hay interrupciones (por ejemplo,  $(CA)_n$ ), repeticiones imperfectas en las que las repeticiones perfectas están interrumpidas por bases que no se repiten ( $(CA)_n GTC (CTA)_n$ ) y compuestos, formados por dos o más repeticiones perfectas adyacentes entre sí ( $(CA)_n (CTA)_n$ ). Los distintos alelos pueden distinguirse por la variación en el número de repeticiones que los conforman, que posiblemente se deban a errores introducidos por las polimerasas durante la replicación (*slippage*) (Zane et al. 2002) o por sobrecruzamientos desiguales (Smith 1976; Unruth & Woolley 1999). Muchas de estas mutaciones resultan en alelos de tamaños consecutivos, aunque el proceso mutacional tiende a producir alelos de tamaños que no siguen un modelo de escalera (Awise 2004). Además, los cambios en las regiones flanqueantes de los SSR se producen a una tasa no despreciable (Angers & Bernatchez 1997; Grimaldi & Crouau – Roy 1997), pudiendo impedir la hibridación del cebador con el DNA molde durante la amplificación por PCR de los microsatélites. Como resultado de esta falta de hibridación surgen los alelos nulos, que también pueden aparecer por la amplificación preferencial de alelos de pequeño tamaño o por el deslizamiento de la polimerasa durante la amplificación por PCR (Shinde et al. 2003). En numerosos taxones se han descrito la presencia de alelos nulos, en algunos casos como en los insectos (Meglecz et al. 2004) y los moluscos (Astanei et al. 2005), a altas frecuencias.

Los microsatélites han permitido poner de manifiesto una considerable variación genética en especies que mostraban poca diversidad con otros marcadores nucleares (Goodman 1998), así como diferencias entre especies estrechamente relacionadas (Koskinen et al. 2002). Por la gran variabilidad que presentan estos marcadores se han empleado para abordar cuestiones relacionadas con la diversidad genética y la estructura poblacional en varias especies dulceacuícolas (Aung et al. 2010; Nguyen et al. 2008), incluyendo los cangrejos de agua dulce (Azuma et al. 2011; Gouin et al. 2006; Gross et al. 2013). Los microsatélites son buenos candidatos para estudiar tales cuestiones ya que se distribuyen por todo el genoma nuclear, normalmente son neutros salvo que estén ligados a loci bajo presión selectiva (Pascual et al. 2001), poseen alta tasa de mutación (a menudo superior a  $10^{-3}$  o  $10^{-4}$  por

locus, gameto y generación, Primmer et al. 1996) y elevados niveles de heterocigosis, incluso en poblaciones pequeñas de especies amenazadas (Allendorf & Luikart 2007).

Desde el desarrollo de marcadores SSR específicos de *Austropotamobius* (Gouin et al. 2000), se han analizado poblaciones procedentes de Austria, Francia e Italia. Estas poblaciones europeas han sufrido un drástico declive (Changeux 2003) en las últimas décadas debido, entre otros factores, a la pérdida de hábitats, la contaminación de las aguas o las enfermedades introducidas por NICS (*non – indigenous crayfish species*) (Holdich et al. 2009). En todas las poblaciones europeas analizadas, los niveles de variabilidad genética encontrada con los SSR fueron mayores que los estimados con otros marcadores moleculares. Estos marcadores han permitido descubrir la influencia que tienen las cuencas hidrográficas en la estructura de la variabilidad genética en las poblaciones italianas (Bertocchi et al. 2008a) y los recientes cuellos de botella que han sufrido las poblaciones del sur del Tirol (Baric et al. 2005a). En Francia Gouin et al. (2006), demostraron la existencia de dos grupos genéticamente diferenciados de *Austropotamobius*, norte y sur, corroborando y ampliando el patrón encontrado mediante el estudio con otros marcadores moleculares en dichas poblaciones (Grandjean & Souty – Grosset 2000b) y poniendo, además, de manifiesto la influencia de factores demográficos en la diferenciación poblacional de los cangrejos de río (Gouin et al. 2011).

Las translocaciones de cangrejos han sido comunes en Europa desde el s. XVI (Machino et al. 2004; Swahn 2004) y el estudio de los microsatélites ha ayudado, en algunos casos, a identificar las poblaciones de origen. Así, se ha determinado que, probablemente, el origen de algunas de las poblaciones austríacas sea italiano, y no francés como se pensaba previamente (Baric et al. 2005a). Se ha propuesto que las poblaciones del este de Francia han servido para repoblar cursos de agua en el oeste de ese país (Gouin et al. 2006) y que la aparición de linajes más meridionales en el centro de Italia puede ser el resultado de translocaciones realizadas por el hombre y no de migraciones naturales (Bertocchi et al. 2008a).

Por todo lo anterior, los microsatélites constituyen una herramienta adecuada para evaluar la diversidad genética nuclear de las poblaciones españolas de cangrejo de río. Desafortunadamente, no hay antecedentes en la literatura científica que apliquen estos marcadores a las poblaciones ibéricas, de hecho, sólo se han llevado a cabo cuatro estudios a nivel nuclear y con otros marcadores. Zarazaga (1993) y Santucci et al. (1997) encontraron valores bajos de variabilidad genética en las poblaciones españolas de este astácido empleando electroforesis de proteínas (heterocigosis observada:  $H_o = 0,12$  y  $H_o = 0,05$

respectivamente). En cambio, utilizando marcadores ISSR (*Inter Sequence Simple Repeats*) el polimorfismo promedio estimado en poblaciones españolas fue considerable (69 – 86%, Callejas et al. 2009). El trabajo más extenso fue realizado por Beroiz et al. (2008) empleando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) en 11 poblaciones españolas de *Austropotamobius*. En este estudio se encontró un polimorfismo medio en el conjunto de las poblaciones analizadas del 15%, siendo mayor en las poblaciones localizadas en el norte de España. Además, las muestras tendían a agruparse por vertientes (mediterránea y atlántica) lo que revelaba el primer indicio de estructura genética a nivel nuclear de las poblaciones españolas. Pero los RAPD como todos los marcadores moleculares presentan una serie de desventajas como una herencia dominante y una necesaria y estricta estandarización de las condiciones de amplificación para asegurar la reproducibilidad. En este contexto, es recomendable el uso de otro tipo de marcadores nucleares para profundizar en el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones españolas de *Austropotamobius*.

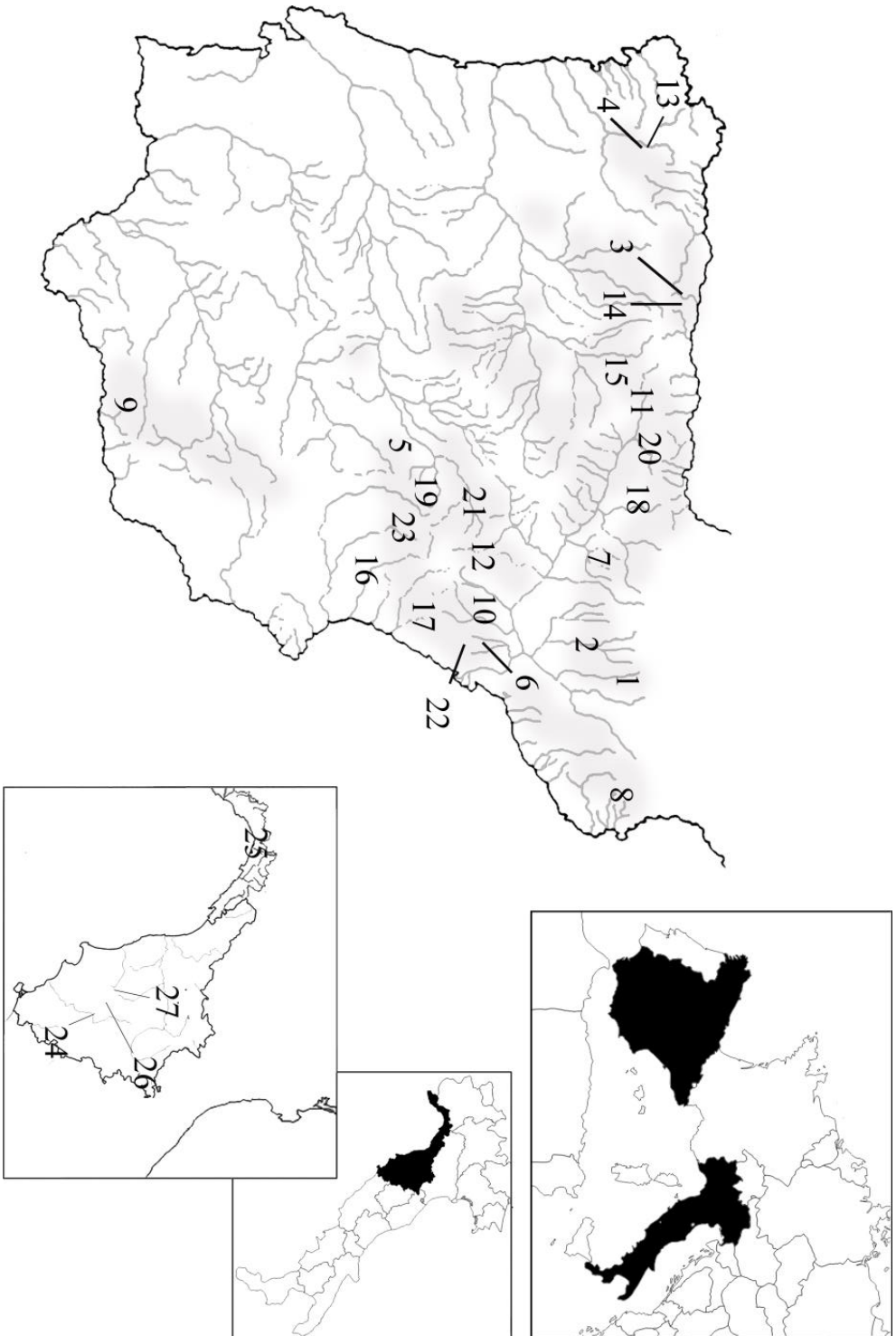
Dadas las ventajas de los marcadores SSR, los objetivos de este capítulo son (1) valorar la variabilidad genética y la estructura poblacional de las poblaciones de cangrejo río en España, (2) analizar los patrones de distribución de la variabilidad genética relacionándolos con su posible origen natural o antropogénico y (3) ofrecer propuestas para futuros planes de recuperación de la especie en nuestro país.

## Material y métodos

### Muestras

Se han estudiado 344 ejemplares españoles y 50 italianos pertenecientes a 27 poblaciones de cangrejo de río, adscritas en la actualidad a la especie *A. italicus*, 23 de ellas recogidas en distintos sistemas acuáticos de la Península Ibérica y 4 procedentes de Italia. Con las 23 poblaciones españolas se ha pretendido muestrear las principales cuencas hidrográficas en el rango de distribución de la especie en España. Todas las muestras provienen de poblaciones en libertad salvo dos, cuyos ejemplares (de origen desconocido) se crían en cautividad en las astacifactorías de Rillo de Gallo (Guadalajara) y de Pont de Suert (Lleida). La localización de cada una de las poblaciones se detalla en la Tabla N1 y Figura N1.

En 10 de las 23 poblaciones españolas (#5, #8, #9, #11, #15, #18, #19, #20, #21 y #23) se disponía del ejemplar completo. De las restantes muestras, puesto que no es una especie pescable, se contactó con los encargados de la gestión del cangrejo de río de las Administraciones de Pesca Fluvial y Conservación de la Naturaleza de las distintas Comunidades Autónomas. Se dieron indicaciones para recoger un periópodo de cada individuo – que los cangrejos son capaces de regenerar – y conservarlo en etanol. Con esta técnica que evita la muerte del animal, los cangrejos se pueden devolver vivos en los lugares de captura después de la toma de muestras.



**Figura N1.** Localización de las poblaciones de *Austropotamobius* muestreadas. Las áreas sombreadas representan la distribución actual de la especie en España (modificado de Alonso et al. 2000). Los lugares de muestreo se identifican según el código numérico descrito en la Tabla N1.

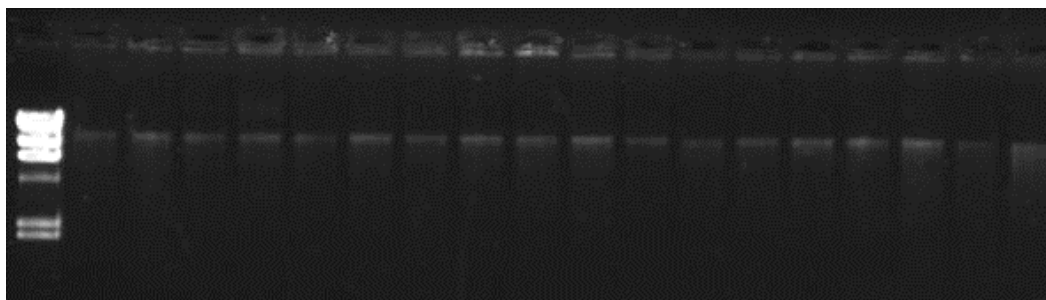
Código	Población	Lugares de muestreo	Cuenca / Vertiente	N
#1	Astacifactoría	El Pont de Suert / Lleida	A	15
#2	Río Calcón	Casbas de Huesca / Huesca	Ebro / MED	15
#3	Arroyo Mestas	Cangas de Onís/ Asturias	Sella / CAN	10
#4	Río Azumara	Pol / Lugo	Miño / ATL	15
#5	Arroyo Cuende	Huerta de Obispalía/ Cuenca	Guadiana / ATL	15
#6	Río Ebro	Beceite / Teruel	Ebro / MED	16
#7	Río Gallego	Sta Eulalia de Gallego / Zaragoza	Ebro / MED	15
#8	P.N.V Garrotxa	Olot / Gerona	C. Catalana / MED	15
#9	Arroyo Ermitas	Albuñuelas / Granada	Guadalquivir / ATL	15
#10	Río Guadalupe	Castellote / Teruel	Ebro / MED	15
#11	Arroyo Guztar	Padrones de Bureba / Burgos	Ebro / MED	16
#12	Río Huerva	Cucalón / Teruel	Ebro / MED	15
#13	Río Lea	Castro de Rei / Lugo	Miño / ATL	16
#14	Lago Ercina	Cangas de Onís / Asturias	Sella / CAN	16
#15	Manantial Madalena	Rebolledo de Traspesña/ Burgos	Duero / ATL	15
#16	Balsa Brenalejo	Utiel / Valencia	Júcar / MED	15
#17	Barranco Gorgàs	Lucena del Cid / Castellón	Júcar / MED	15
#18	Río Ega	Estella / Navarra	Ebro / MED	15
#19	Arroyo Pozuelo	El Pozuelo / Cuenca	Tajo / ATL	15
#20	Río Nervión	Altube/ Álava	Nervión / CAN	15
#21	Astacifactoría	Rillo de Gallo / Guadalajara	A	15
#22	Barranco Salt	La Pobla de Benifassà / Castellón	Júcar / MED	15
#23	Río Guadazón	Valdemoro / Cuenca	Júcar / MED	15
#24	Río Sieve	Florenzia / Toscana	Arno / LIG	15
#25	Río Tonno	Génova / Liguria	Scrivia / ADR	5
#26	Río Bisenzio	Prato / Toscana	Arno / LIG	15
#27	Río D'omicio	Pistoia / Toscana	Serchio / LIG	15

**Tabla N1.** Poblaciones de *Austropotamobius* estudiadas. En cada columna se especifica (1) el código numérico de identificación de la población, (2) el sistema fluvial, (3) municipio y provincia donde se encuentra, (4) cuenca hidrográfica y vertiente de pertenencia y (5) número de ejemplares analizados. La línea horizontal separa las poblaciones españolas (#1 – #23) de las italianas (#24 – #27). A: Astacifactoría, CAN: Cuenca Cantábrica, MED: Cuenca Mediterránea, ATL: Cuenca Atlántica, LIG: Cuenca del Mar de Liguria, ADR: Cuenca Adriática. P.N.V Garrotxa: Parque natural de la zona volcánica de la Garrotxa.

### Aislamiento de DNA y amplificación

El DNA genómico se extrajo del tejido de los periódodos con el kit comercial *DNeasy Blood and Tissue* de Qiagen (Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y finalmente, se resuspendió en 100µl de tampón TE 10:1 (Tris – HCl 10mM y EDTA 1mM pH 8.0).

La concentración y pureza del DNA se estimó mediante la absorbancia a 260 – 280 nm con el espectrofotómetro NanoDrop® ND – 100 (NanoDrop Technologies, Willmington, USA). También se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con tampón TAE (Tris – Acetato 0,04 M, EDTA 1 mM pH 8,0) y bromuro de etidio (1µl/ml) para comprobar que no existía degradación del DNA ni restos de RNA (Figura N2).



**Figura N2.** DNA genómico extraído de 19 individuos de *Austropotamobius* de las poblaciones #5 (calles 2 – 5), #8 (6 – 10), #19 (11 – 15) y #21 (16 – 19). Calle 1, marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind* III (AppliChem, Darmstadt, Alemania).

En algunos casos, cuando la calidad del DNA no era adecuada, las muestras se purificaban siguiendo un método de fenol:cloroformo. A la solución de DNA obtenida se añadía un volumen de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar contaminantes proteicos. Tras centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm, se recogía la fase acuosa (la extracción fenólica se repetía 2 – 3 veces). Para eliminar los restos de fenol, se añadía un volumen de cloroformo y se recuperaba de nuevo la fase acuosa, que se mezclaba con 0,3 volúmenes de acetato sódico (3M pH 5,2) y finalmente, un volumen de isopropanol para precipitar el DNA. La mezcla se mantenía a – 20°C durante toda la noche.

El DNA precipitado se recuperaba tras una centrifugación de 20 minutos a 13000 rpm y para eliminar las sales, se realizaron lavados con 800  $\mu$ l de etanol al 70%. Tras una centrifugación de 5 minutos a 13000 rpm, el precipitado obtenido se dejaba secar a temperatura ambiente. Por último, el DNA se resuspendía en 100  $\mu$ l de TE 10:1. La concentración, pureza e integridad de las muestras tratadas se determinaba por el procedimiento anteriormente descrito. Una vez valorado, una alícuota de DNA se llevaba a una concentración de 5 ng/ $\mu$ l con TE 10:1 y todo, alícuota y stock, se conservaba a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

El DNA de los 394 ejemplares se analizó mediante los cebadores de microsatélites disponibles para la especie (Ap1, Ap2, Ap3, Ap4, Ap5, Ap6 y Ap7), cuyas características se detallan en la Tabla N2. De estos siete marcadores, hemos obtenido resultados para cinco de ellos: Ap1, Ap2, Ap3, Ap5 y Ap6.

Cebador	Secuencia 5' – 3'	Fluorocromo
<b>Ap1 – F *</b>	TCTTGGGGATTGGCTAGTTG	FAM
<b>Ap1 – R *</b>	CCTGAACTAAAAGGTGCTTTGG	–
<b>Ap2 – F *</b>	TTCGATATAACCGTTTGACCTG	PET
<b>Ap2 – R *</b>	TCGACTTTGGCCATTGAAG	–
<b>Ap3 – F *</b>	CGCTATCTAACCTTGGTTGTC	VIC
<b>Ap3 – R *</b>	GGACTGGGAAGCCTTGTC	–
<b>Ap4 – F*</b>	GCGTTCCTTATGTTGGTC	–
<b>Ap4 – R*</b>	GAGTGTAAAGACAATTTTTGG	–
<b>Ap5 – F **</b>	TCTTTATTGTGAGGGGGAAGG	FAM
<b>Ap5 – R *</b>	TGTCTCCAGGGACGTGAG	–
<b>Ap6 – F *</b>	GCTGTGTGGGATGGAGGT	VIC
<b>Ap6 – R *</b>	CACTAGCGTATTCAAGCAACT	–
<b>Ap7 – F**</b>	ATGTACGCACTGCTTCACTGG	–
<b>Ap7 – R**</b>	TTGTTTGTGGTGTGAATTACCG	–

**Tabla N2.** Cebadores empleados para la amplificación de los loci SSR, secuencia y fluorocromo empleado para su visualización. \*Gouin et al. 2000, \*\*Gouin et al. 2002.

La coamplificación de los loci Ap1, Ap2, Ap3 y Ap6 se realizó mediante PCR multiplex en un termociclador Lab Cycler (Senso – Quest, Göttingen, Alemania). La mezcla, en un volumen final de 6,5  $\mu$ l, contenía 5 ng de DNA, 3,25  $\mu$ l de *multiplex PCR Master Mix 2x* (QIAGEN® Multiplex PCR kit, Hilden, Alemania), 0,1  $\mu$ M de los cebadores Ap1 y Ap3 y 1  $\mu$ M de

los cebadores Ap2 y Ap6 (Tabla N2). El programa empleado para la amplificación consistía en un ciclo de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, seguido de 36 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 62°C y 60 segundos de polimerización a 72°C. El programa de PCR finalizaba con un paso final de 10 minutos a 72°C. El locus Ap5 se amplificó en un volumen final de 6,5 µl con 35 ng de DNA total, tampón 1x, 1,9 mM de MgCl<sub>2</sub>, 8 µM de cada dNTP, 0,2 µM del cebador Ap5 – F, 0,4 µM del cebador Ap5 – R (Tabla N2) y 0,5 U de AmpliTaq® DNA polimerasa (Applied Biosystems, USA). El programa óptimo para este marcador incluía un paso inicial de desnaturalización de 10 minutos a 94°C seguido de 15 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C 35 segundos y 72°C 50 segundos, a continuación 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C 35 segundos y 72°C 50 segundos, además de un ciclo final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis capilar de fluorescencia en un secuenciador 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) con el marcador GeneScan™ 500LIZ® (Applied Biosystems, USA) como control de tamaño interno. El tamaño de los alelos se determinó usando el programa Peak Scanner™ Software v.1.0 (Applied Biosystems, USA). En todos los individuos se pudieron amplificar los cinco loci. Antes del análisis completo de los datos se empleó el programa MicroChecker v.2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004) para comprobar si existían errores de anotación, problemas de amplificación o presencia de alelos nulos en el set de datos de SSR obtenido, con un intervalo de confianza del 95% mediante 1000 réplicas.

### **Análisis de datos**

Con el fin de evaluar la diversidad genética presente en cada muestra con el programa Popgene (Yeh et al. 1997) se calcularon, el número observado ( $A$ ) y efectivo ( $n_e$ ) de alelos, la heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) (Nei 1978) y el número ( $n_p$ ) y la frecuencia media ( $A_p$ ) de alelos exclusivos. La frecuencia media de alelos nulos ( $A_n$ ) se estimó con el programa FreeNA (Chapuis & Stoup 2007). Genepop v.4 (Raymond & Rousset 1995) se usó para detectar las desviaciones del equilibrio de Hardy – Weinberg, el desequilibrio de ligamiento y el índice de fijación  $F_{IS}$  en cada población (Weir & Cockerham 1984). Los niveles de significación estadística se determinaron aplicando las correcciones secuenciales de Bonferroni (Rice 1989).

Para inferir la estructura poblacional, se ha calculado la diferenciación entre las poblaciones mediante las distancias genéticas por parejas de Cavalli – Sforza y Edwards ( $D_c$ ,

1967) y las estimas de  $F_{ST}$  (Chapuis & Stoup 2007). El índice de subdivisión de la población ( $F_{ST}$ ) formulado por Wright (1943; 1965) mide el grado de diferenciación genética de las subpoblaciones. Su valor oscila entre 0 y 1, siendo 0 cuando las subpoblaciones presentan idénticas frecuencias alélicas, y 1 cuando la divergencia entre las subpoblaciones es máxima. Los valores  $F_{ST}$  son muy sensibles a la presencia de alelos nulos en el conjunto de datos, ya que éstos modifican la estimas de diferenciación de las poblaciones, por ejemplo reduciendo la diversidad genética intrapoblacional (Paetkau & Strobeck 1995) y por tanto, aumentando los valores de  $F_{ST}$  (Paetkau et al. 1997; Slatkin 1995). Para evitar este sesgo, las estimas  $F_{ST}$  se han calculado con el software FreeNA (Chapuis & Stoup 2007) que introduce correcciones por el método ENA (*Excluding Null Alleles*) cuando se contempla la posible existencia de alelos nulos en el conjunto de datos de SSR. Las frecuencias alélicas por locus y población, incluyendo las estimas de frecuencias de alelos nulos, se calcularon siguiendo el algoritmo de Dempster et al. (1997). Las distancias genéticas  $D_c$  (1967), menos afectadas por la presencia de alelos nulos, también se han obtenido con el programa FreeNA mediante el método INA (*Including Null Alleles*). El método ENA no puede aplicarse para el cálculo de distancias genéticas porque éstas se expresan en términos de proporción de alelos similares entre y dentro de las poblaciones.

A partir de las matrices obtenidas de estimas de  $F_{ST}$  y distancias genéticas  $D_c$ , se llevaron a cabo análisis de coordenadas principales (PCoA) (Gower 1966) con el paquete de programas NTSYS v.2.10q (Rohlf 2000). De esta forma se establece el número de coordenadas necesarias para explicar el 100% de la variación, así como el porcentaje de la misma que absorbe cada una de ellas. Este análisis permite representar de forma gráfica las dos o tres principales tendencias de variación y visualizar las relaciones entre las poblaciones.

Las distancias genéticas  $D_c$ , también se usaron para construir dos fenogramas por medio de los métodos UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*) (Sneath & Sokal 1973) y del vecino más próximo (NJ, *Neighbor Joining*) (Saitou & Nei 1987), con el programa Phylip v3.69 (Felsenstein 2005). En ambos casos (UPGMA y NJ) se llevó a cabo un análisis de bootstrap (1000 réplicas) para comprobar la fiabilidad de los agrupamientos obtenidos.

El método de UPGMA se basa en la identificación de los pares de unidades taxonómicas operacionales (OTU, *Operational Taxonomic Units*) entre las cuales existe la menor distancia genética y en el cálculo de la media de las distancias entre ellas y el resto de OTU para reconstruir el árbol. La longitud de las ramas en estos fenogramas es proporcional a la distancia genética existente entre dos OTU. Se ha observado que este método se comporta

muy bien en estudios de simulación porque las estimas de distancia genética están sujetas a grandes errores estocásticos y el procedimiento de promediar las distancias, utilizado en el UPGMA, reduce el efecto de este error en las estimas de la longitud de las ramas (Nei 1983; Sourdis & Krimbas 1987; Tatenno et al. 1982). Estos aspectos metodológicos sugieren que si la distancia genética está sujeta a un elevado error estocástico, pero se espera que este error sea aproximadamente lineal en el tiempo, el UPGMA es un buen método para construir árboles (Nei 1987).

El método de NJ también se basa en encontrar pares de vecinos u OTU que minimicen la longitud total de las ramas del árbol en cada paso del agrupamiento, pero permite tasas desiguales de cambio molecular entre las distintas ramas. Para seleccionar las secuencias que se agrupan es necesario construir una matriz de distancias genéticas, en este caso las  $D_c$ , entre todas las posibles combinaciones de OTU. El árbol se elabora uniendo aquellas con menor distancia entre ellas, a continuación esta agrupación se considera como una sola entidad, y se busca el siguiente vecino que tenga la menor distancia con ésta (Avice 2004). Los estudios de simulación muestran que se trata de un método muy eficiente, probablemente porque en cada paso se aplica el criterio de mínima evolución o máxima parsimonia, y la aplicación repetida de este principio reduce los efectos del error de muestreo.

Con el propósito de determinar el número más probable de subpoblaciones o grupos genéticos ( $K$ ) en nuestro conjunto de datos, se usó el programa STRUCTURE v.2.2, teniendo en cuenta sus restricciones (Falush et al. 2003; Pritchard et al. 2000). El valor más probable de  $K$  se estimó mediante el estadístico  $\Delta K$  siguiendo el método de Evanno et al. (2005). El programa también calcula la probabilidad de pertenencia (*fractional membership*) de cada individuo a cada grupo genético ( $q$ ). Se simularon 20 carreras independientes para cada  $K$  (1 – 28 posibles grupos genéticos) con los parámetros estándar del modelo de mezcla (*admixture model*) seleccionando la opción de frecuencias alélicas correlacionadas. Para cada  $K$  realizaron 100.000 iteraciones, con un periodo de *burn-in* de 100.000 repeticiones.

Para completar el estudio de la estructura poblacional también se realizaron análisis de la varianza molecular (AMOVA) propuestos por Excoffier et al. (1992). Los componentes de la varianza se calculan a partir de la información proporcionada por las frecuencias alélicas (Excoffier et al. 1992), dividiéndose en dos o tres niveles distintos: (1) diferencias entre los grupos, (2) diferencias entre las poblaciones dentro de los grupos y (3) diferencias individuales dentro de las poblaciones. De esta manera se obtiene una medida del porcentaje de varianza atribuible a cada una de las fuentes de variación. Los análisis de AMOVA se han realizado con

el programa ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier et al. 2005) y los niveles de significación de los componentes de la varianza se estimaron mediante procedimientos permutacionales.

El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque nos informa hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre las poblaciones, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas, pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona de forma casi independiente (Slatkin 1994).

El modelo usado clásicamente para estimar flujo génico fue propuesto por Wright (1951), donde las poblaciones pueden tratarse como réplicas y caracterizarse con solo dos parámetros: tamaño poblacional ( $N$ ) y tasa de migración ( $m$ ). El coeficiente  $F_{ST}$ , como medida de la subestructuración poblacional, también proporciona información acerca de la importancia del flujo génico. Wright relacionó la migración con la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones, y por tanto la diferenciación genética entre ellas, medida como  $F_{ST}$ , mediante la fórmula  $F_{ST} \approx 1 / (1 + 4Nm)$ . El flujo génico efectivo puede posteriormente calcularse en el equilibrio de manera teórica como  $Nm \approx \frac{1}{4} (1 / (F_{ST} - 1))$ . Es relativamente fácil obtener los datos necesarios para calcular  $F_{ST}$  y estimar  $Nm$ . Sin embargo, las estimas de  $Nm$  derivadas de  $F_{ST}$  reflejan tasas de dispersión a largo plazo y son 'lentas' respondiendo a los cambios producidos por los patrones de migración actuales, que en especies vulnerables son necesarios conocer con fines de gestión (Paetkau et al. 2004).

Gracias al desarrollo de técnicas y análisis moleculares, es posible estimar el flujo génico de una manera detallada y con mayor resolución. Estas técnicas se basan principalmente en observar la distribución de alelos en las poblaciones para hacer inferencias acerca de los niveles o patrones de flujo génico en las mismas (Slatkin 1985). Con el desarrollo de metodologías que permiten el análisis de marcadores genéticos altamente variables, como los SSR, es posible recoger suficiente información sobre los organismos individuales y así poder cambiar las unidades de análisis de las poblaciones a los individuos. En este contexto, para estudiar los movimientos interpoblaciones, es importante poder identificar a los migrantes. Partiendo de la hipótesis nula que plantea que un individuo es originario de la población en la que fue muestreado, Paetkau y Strobeck (1995) demostraron que es posible asignar individuos a poblaciones. Para ello usan la probabilidad de obtener un genotipo multilocus determinado a partir de la distribución observada de alelos en una serie de poblaciones estudiadas.

Por tanto, para calcular la probabilidad de que cada ejemplar analizado pudiera pertenecer a la población en la que fue muestreado, o bien ser migrante procedente de otra

de las poblaciones, se realizaron test de asignación (*assignment test*) con el programa GeneClass v.2.0 (Piry et al. 2004). Estos tests se basan en el cálculo de la frecuencia esperada de cada genotipo en cada una de las poblaciones para, posteriormente, poder asignar cada individuo a la población donde la frecuencia esperada de ese genotipo es más alta. La probabilidad del genotipo y la asignación se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en Paetkau et al. (2004), implementados en GeneClass v.2.0. Para calcular el umbral a partir del cual un individuo se considera migrante, se aplicó el método de Rannala y Mountain (1997) basado en cadenas de Markov – Monte Carlo (MCMC). Los errores de tipo I se fijaron en 0,01.

Teniendo en cuenta las desventajas y restricciones implícitas del programa GeneClass, el conjunto de datos SSR también se analizó con el programa BayesAss v.3.0.1 (Wilson & Rannala 2003) como un método adicional para detectar flujo génico. Este programa no exige asunciones sobre tamaños poblacionales constantes, migración simétrica ni equilibrio genético. BayesAss también funciona con un método bayesiano en genotipos multilocus. Las tasas de migración se estimaron con 10.000.000 repeticiones MCMC con un intervalo de muestreo de 100 y un periodo de *burn – in* de 100.000 repeticiones. Los parámetros de simulación (el valor delta de las frecuencias alélicas, las tasas de migración y los valores de endogamia dentro de cada población) se ajustaron siguiendo las recomendaciones de los autores del programa BayesAss.

## Resultados

### Niveles de variación genética

Todos los loci SSR amplificadas son polimórficos, con un total de 58 alelos identificados, si bien los cinco loci se distinguen tanto por el número de alelos como por el rango de tamaños de los mismos: Ap1: 6 alelos (124 – 128 bp); Ap2: 16 alelos (106 – 212 bp); Ap3: 16 alelos (126 – 216 bp); Ap5: 2 alelos (397 y 399 bp) y Ap6: 15 alelos (352 – 380 bp). Los loci Ap3 y Ap6 tienen la mayor riqueza alélica, con una media de 5,37 y 5,11 alelos respectivamente, mientras que el locus Ap5 es el que presenta una menor variabilidad alélica (Figura N3). No se observó equilibrio de Hardy – Weinberg en muchos de los loci en las poblaciones (Tabla N3). En general, esta desviación no se centra en ningún locus o población en particular. Tampoco se detecta desequilibrio de ligamiento entre los pares de loci.

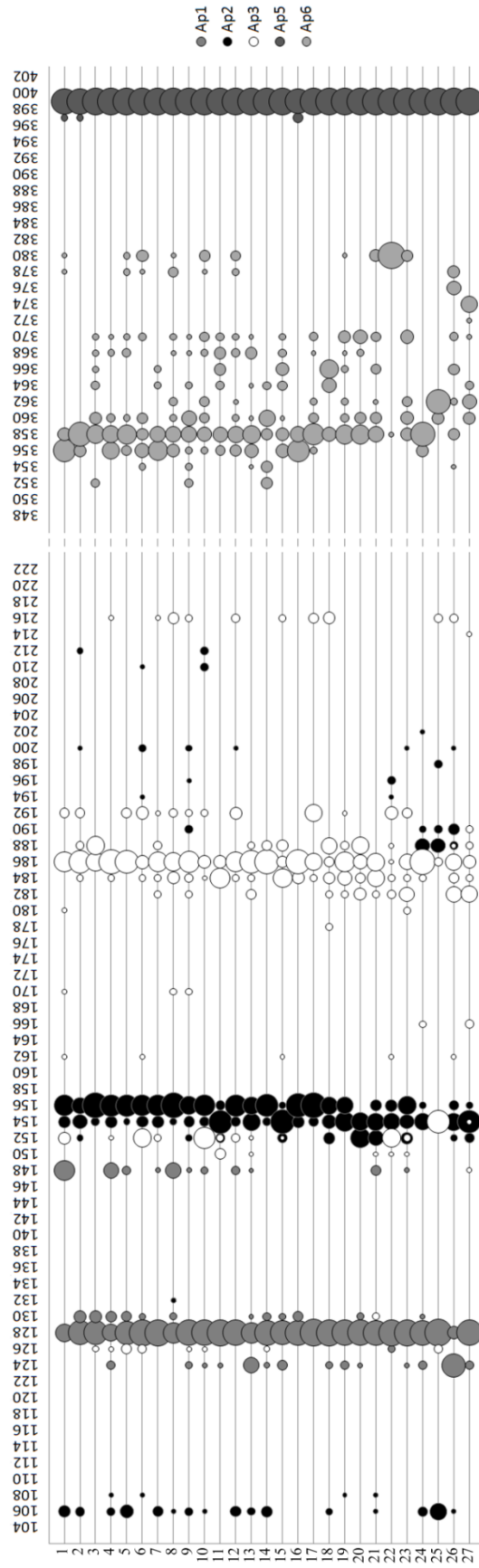
La Tabla N4 resume la variación genética encontrada en las poblaciones estudiadas. La diversidad alélica media por locus ( $A$ ) en las poblaciones italianas oscila entre 2,6 (población #25) y 4,8 (población #26), con una media de 3,7. En las poblaciones españolas varía entre 1,9 (población #3) y 5,2 (población #9), con una media de 3,37. Se han detectado alelos exclusivos ( $n_p$ ) en 4 de las 23 muestras españolas y en las 4 poblaciones italianas. La mayor frecuencia de alelos exclusivos está presente en la población italiana #27 ( $A_p = 0,106$ ) seguida por 4 poblaciones españolas (#8, #18, #21 y #22;  $A_p = 0,013$ ) (Tabla N4). El número efectivo de alelos ( $n_e$ ) es siempre menor que el correspondiente número de alelos observados. Se detecta la misma tendencia en la heterocigosis media observada,  $H_o$  (entre 0 y 0,3467), en relación con la esperada,  $H_e$  (de 0,3085 a 0,5480).

El coeficiente de fijación  $F_{IS}$  es positivo y significativamente distinto de cero (tras 1000 permutaciones) en todas las poblaciones salvo en la muestra del río Tonno (#25), reflejando la deficiencia en heterocigotos. En este sentido cabe destacar que las estimas más elevadas de  $F_{IS}$  son las correspondientes a las poblaciones españolas septentrionales. A pesar de que se pudieron amplificar todos los loci SSR en cada uno de los ejemplares muestreados, según las estimas obtenidas con el programa FreeNA podrían existir alelos nulos que contribuirían a la deficiencia de heterocigotos observada (Tabla N4).

En general, las poblaciones del centro – este peninsular, especialmente las de las provincias de Cuenca y Teruel (#5, #6, #10, #12 y #23), presentan los mayores niveles de diversidad genética en términos de número de alelos observados y efectivos, y de heterocigosis observada y esperada.

Cod	Ap1		Ap2		Ap3		Ap5		Ap6	
	$n_a$	$F_{IS}$	$n_a$	$F_{IS}$	$n_a$	$F_{IS}$	$n_a$	$F_{IS}$	$n_a$	$F_{IS}$
#1	2	-0,19	3	0,32	6	0,06	2	1,00	4	0,72
#2	2	1,00	7	0,49	4	0,74	2	1,00	2	1,00
#3	2	1,00	2	1,00	3	0,83	1	-	7	0,36
#4	4	0,17	4	0,50	5	0,36	1	-	5	0,72
#5	3	0,51	3	0,74	3	0,25	1	-	7	0,37
#6	2	1,00	6	0,79	5	0,31	1	-	7	0,41
#7	1	-	3	0,40	8	0,34	1	-	4	1,00
#8	4	0,32	4	0,48	5	0,91	1	-	8	0,36
#9	3	-0,05	7	0,65	7	0,59	1	-	8	0,59
#10	3	-0,05	5	0,66	5	0,29	1	-	8	0,24
#11	2	-	3	1,00	4	0,31	1	-	6	0,55
#12	2	-0,08	4	0,38	5	0,21	1	-	8	0,36
#13	4	0,08	4	0,61	6	0,76	1	-	7	0,49
#14	3	0,66	3	0,20	3	0,73	1	-	5	0,09
#15	3	1,00	3	1,00	6	0,83	1	-	7	0,56
#16	2	1,00	2	1,00	2	1,00	2	1,00	2	1,00
#17	1	-	2	1,00	4	0,62	1	-	6	0,58
#18	2	-0,04	4	0,82	6	0,84	1	-	3	1,00
#19	2	0,65	3	0,76	5	0,90	1	-	7	-0,03
#20	3	0,66	2	1,00	4	1,00	1	-	4	0,41
#21	2	-0,12	5	0,81	5	0,90	1	-	6	0,18
#22	2	1,00	5	0,83	8	0,19	1	-	2	-
#23	3	-0,02	4	0,90	7	0,75	1	-	5	0,68
#24	3	0,74	6	0,47	3	1,00	1	-	2	1,00
#25	1	-	5	-0,29	4	0,27	1	-	2	1,00
#26	2	0,83	8	0,75	6	0,65	1	-	7	0,54
#27	2	-0,08	4	1,00	9	0,68	1	-	6	-0,13

**Tabla N3.** Análisis por locus de cada una de las poblaciones estudiadas de cangrejo de río.  $n_a$ : número observado de alelos;  $F_{IS}$ : índice de fijación (desviaciones del equilibrio de Hardy – Weinberg en cursiva);  $A_n$ : frecuencia estimada de alelos nulos.



**Figura N3.** Frecuencia alélica (área de la burbuja) y distribución de los tamaños de los alelos (en pares de bases) de los loci SSR analizados, en las 27 poblaciones estudiadas de cangrejo de río.

Código	$n_a$	$n_e$	$n_p$	$A_p$	$A_n$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
#1	1,965	0,789	0	0,000	0,105	0,346	0,464	0,261
#2	1,989	0,752	0	0,000	0,229	0,106	0,411	0,747
#3	1,918	0,654	0	0,000	0,183	0,120	0,373	0,691
#4	2,131	0,825	0	0,000	0,122	0,253	0,446	0,441
#5	3,400	1,935	0	0,000	0,128	0,226	0,412	0,460
#6	4,200	2,602	0	0,000	0,149	0,225	0,451	0,510
#7	3,600	1,959	0	0,000	0,137	0,173	0,387	0,561
#8	4,400	2,565	2	0,013	0,151	0,226	0,475	0,532
#9	5,200	2,567	0	0,000	0,152	0,213	0,474	0,559
#10	4,400	2,565	0	0,000	0,083	0,293	0,438	0,339
#11	3,200	2,253	0	0,000	0,129	0,175	0,386	0,556
#12	4,000	2,402	0	0,000	0,072	0,320	0,441	0,283
#13	4,400	2,216	0	0,000	0,135	0,250	0,483	0,492
#14	3,000	1,939	0	0,000	0,097	0,254	0,365	0,314
#15	4,000	2,468	0	0,000	0,226	0,100	0,439	0,778
#16	2,000	1,468	0	0,000	0,263	0,000	0,320	1,000
#17	2,800	1,747	0	0,000	0,142	0,106	0,308	0,662
#18	3,200	2,478	1	0,013	0,216	0,080	0,457	0,830
#19	3,600	2,040	0	0,000	0,159	0,200	0,417	0,529
#20	2,800	2,101	0	0,000	0,212	0,093	0,422	0,785
#21	3,800	2,555	1	0,013	0,144	0,226	0,481	0,538
#22	3,600	2,037	1	0,013	0,122	0,160	0,334	0,530
#23	4,000	2,816	0	0,000	0,194	0,133	0,483	0,731
#24	3,000	1,739	1	0,006	0,169	0,093	0,314	0,710
#25	2,600	1,793	1	0,020	0,054	0,280	0,337	0,188
#26	4,800	3,131	1	0,053	0,210	0,186	0,548	0,667
#27	4,400	2,501	5	0,106	0,124	0,266	0,443	0,407
<b>ESPAÑA</b>	3,374	1,988	5	0,034	0,155	0,186	0,420	0,570
<b>ITALIA</b>	3,700	2,291	8	0,053	0,129	0,206	0,410	0,493

**Tabla N4.** Estimaciones de variabilidad genética en las 27 poblaciones de *Austropotamobius* analizadas.  $n_a$ : número observado de alelos;  $n_e$ : número efectivo de alelos;  $n_p$ : número de alelos exclusivos;  $A_p$ : frecuencia media de alelos exclusivos;  $A_n$ : frecuencia media estimada de alelos nulos;  $H_o$ : heterocigosis observada;  $H_e$ : heterocigosis media esperada; índice de fijación  $F_{IS}$  (en cursiva se encuentra el valor estadísticamente no significativo).

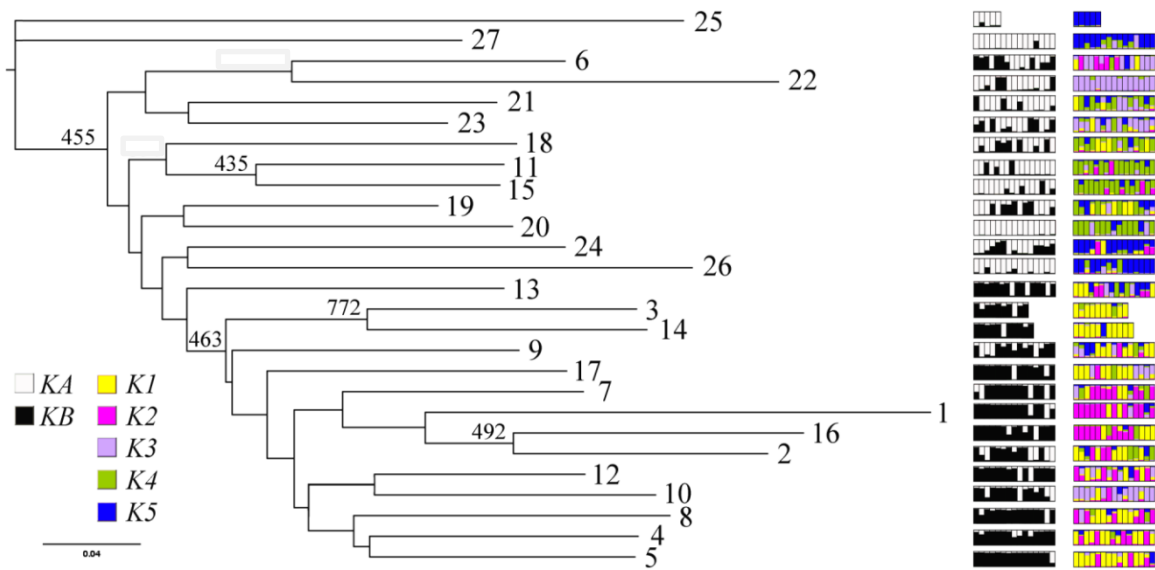
### Estructura poblacional

La diferenciación genética entre poblaciones se cuantificó mediante las estimas  $F_{ST}$  (Tabla N5). El valor promedio  $F_{ST}$  en las comparaciones por pares entre las poblaciones españolas y las muestras italianas es de 0,22, oscilando entre 0,03 (comparación entre las poblaciones #2 – #24) y 0,42 (poblaciones #22 – #25). Las poblaciones situadas en la franja del norte – centro peninsular (#11, #15, #18 – #20) parecen estar menos diferenciadas de las poblaciones italianas (#25 – #27) que las restantes. En cuanto a las comparaciones entre las poblaciones españolas, la media de los valores de  $F_{ST}$  es de 0,14, los más altos corresponden a las comparaciones de las poblaciones #22 (este peninsular), #11, #18 y #20 (localizadas en el centro – norte) con cualquiera de las demás poblaciones. En cambio, los valores más bajos se encuentran al comparar tres de las poblaciones del centro de España (#5, #12 y #19) con la mayoría de las restantes.

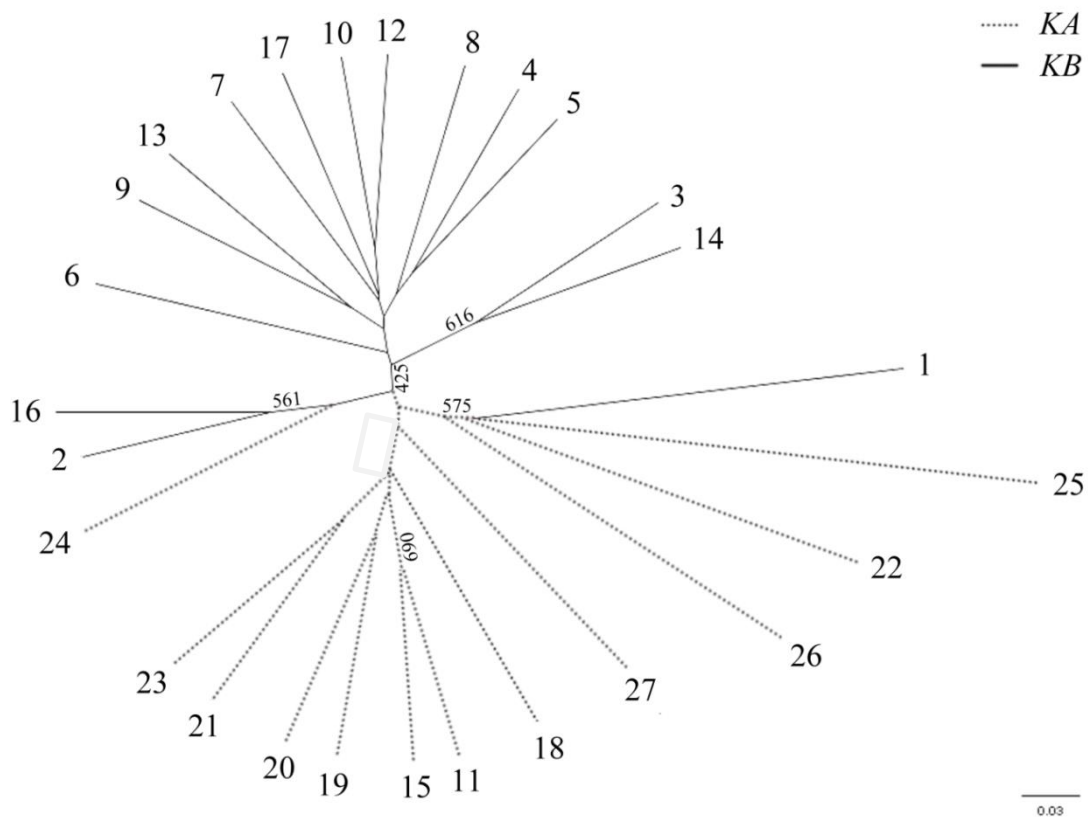
A partir de las distancias genéticas  $D_c$  se han construido fenogramas con los métodos de UPGMA y NJ (Figuras N8 y N9). Ambas topologías son congruentes y, aun cuando los valores de *bootstrap* no son elevados, podemos apreciar que la primera población que se separa es la muestra italiana #25, mientras que otras poblaciones italianas (#26 y #27) se agrupan con las poblaciones españolas de la franja centro – norte. Aunque en las muestras españolas no parece haber un patrón de agrupamiento claro, se pueden detectar asociaciones entre poblaciones geográficamente cercanas, como entre las poblaciones #10 y #12 del centro de España, o entre #11 y #15 y entre #3 y #14, en el norte peninsular. Cabe señalar que en el fenograma UPGMA es posible reconocer los dos grupos de poblaciones, ya observados y descritos en los análisis de PCoA.

**Tabla N5.** (Página siguiente) Estimaciones de  $F_{ST}$  entre las poblaciones de *Austropotamobius*, calculadas con el software FreeNA.

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25	#26
#2	0,1																									
#3	0,2	0,1																								
#4	0	0,1	0,1																							
#5	0,1	0	0,1	0																						
#6	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1																					
#7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1																				
#8	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1																			
#9	0,2	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0	0,1																		
#10	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0	0,1	0,1	0,1																	
#11	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2																
#12	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0,1	0	0,1	0,2															
#13	0,1	0	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1														
#14	0,2	0,1	0	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0,2	0,3	0,1	0,1													
#15	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0,1	0,3												
#16	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2											
#17	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0	0,1	0,1	0,3	0,2										
#18	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2								
#19	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1							
#20	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1						
#21	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0	0						
#22	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2				
#23	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0	0,1	0	0,2				
#24	0,2	0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,4	0,2		
#25	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	
#26	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	
#27	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2

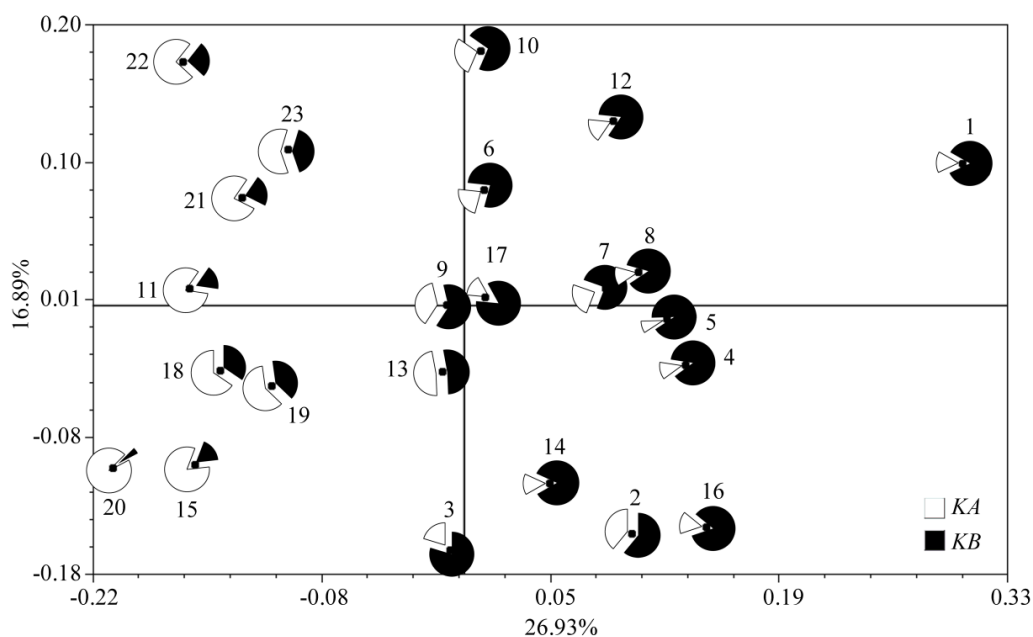


**Figura N4.** Fenograma obtenido por el método NJ a partir de distancias  $D_c$ . Las dos columnas de la derecha muestran los grupos genéticos ancestrales detectados con STRUCTURE. El código numérico que identifica las poblaciones es el descrito en la Tabla N1.

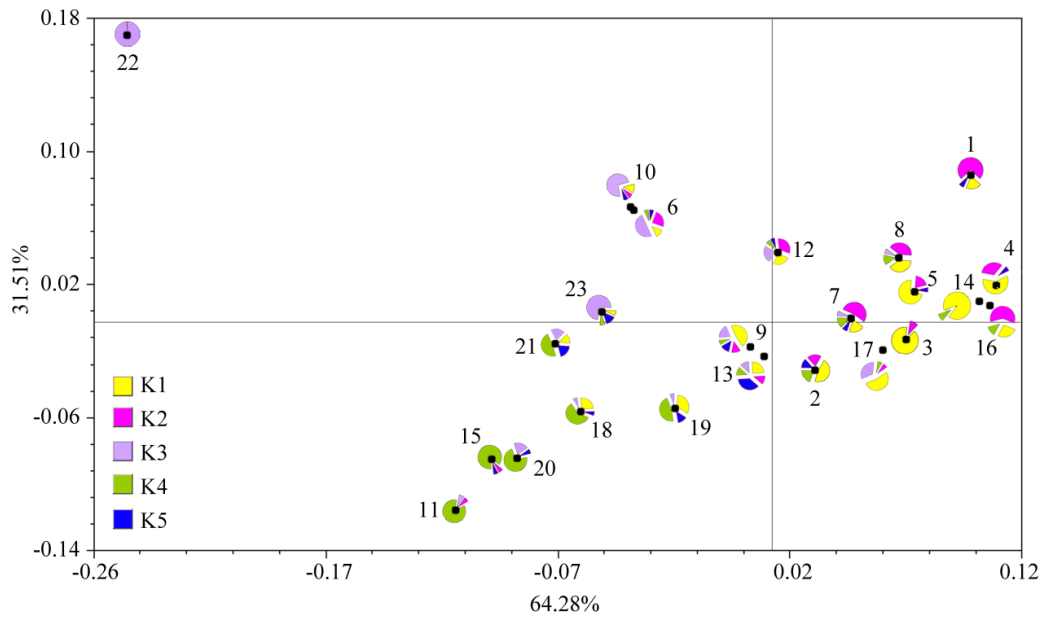


**Figura N5.** Fenograma obtenido mediante el método UPGMA a partir de las distancias  $D_c$ . En línea discontinua se muestran las ramas correspondientes al grupo genético ancestral KA y en línea continua las que forman el grupo KB, según análisis de Structure.

Las relaciones entre las poblaciones de cangrejos analizadas se aprecian en los gráficos de los análisis de coordenadas principales (PCoA). En la Figura N4, correspondiente al PCoA de las poblaciones españolas basado en las distancias genéticas de Cavalli – Sforza y Edwards (Dc), podemos observar que el primer eje (26,93% de la varianza) separa las poblaciones en dos grupos. Las poblaciones #11, #15, #18 – #23, componen el primer grupo, mientras que las restantes se engloban en el segundo. En el PCoA, también de poblaciones españolas, realizado a partir de las estimas de  $F_{ST}$  (Figura N5), los dos primeros ejes explican el 95,79% de la varianza total. Mientras que el primer eje (64,28%) permite distinguir los dos grupos antes descritos, el segundo eje (31,51%) separa en un subgrupo a cinco poblaciones geográficamente cercanas a las cuencas del Ebro y Júcar (#6, #10, #22 y #23) de las poblaciones del centro – norte peninsular (#11, #15, #18, #19 – #21). En cambio, algunas poblaciones como #9 y #13, no forman parte, de manera clara, de ninguno de los grupos descritos, reflejando la mezcla de distintas poblaciones de origen o un elevado flujo génico (ver más adelante).

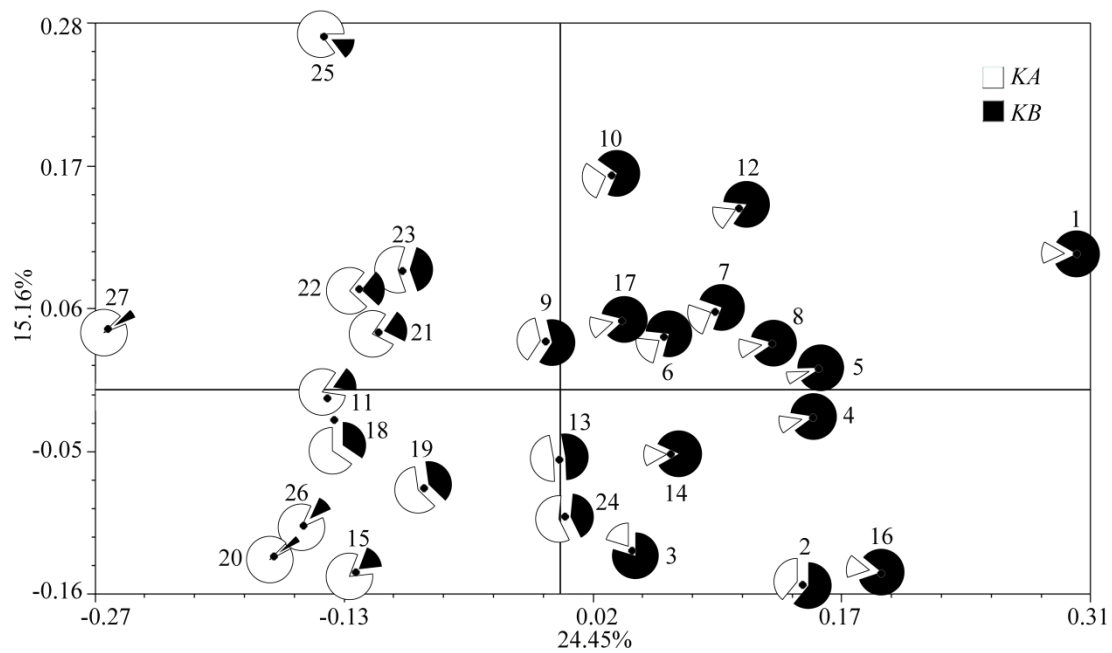


**Figura N6.** Análisis de coordenadas principales. Proyección de las poblaciones españolas de cangrejo de río en el gráfico definido por los dos primeros ejes a partir de las distancias genéticas Dc. Las poblaciones están numeradas según el código de la Tabla N1. Los diagramas de sectores superpuestos representan la probabilidad de pertenencia de las poblaciones a los dos grupos genéticos ancestrales (KA – KB), según el análisis con Structure.

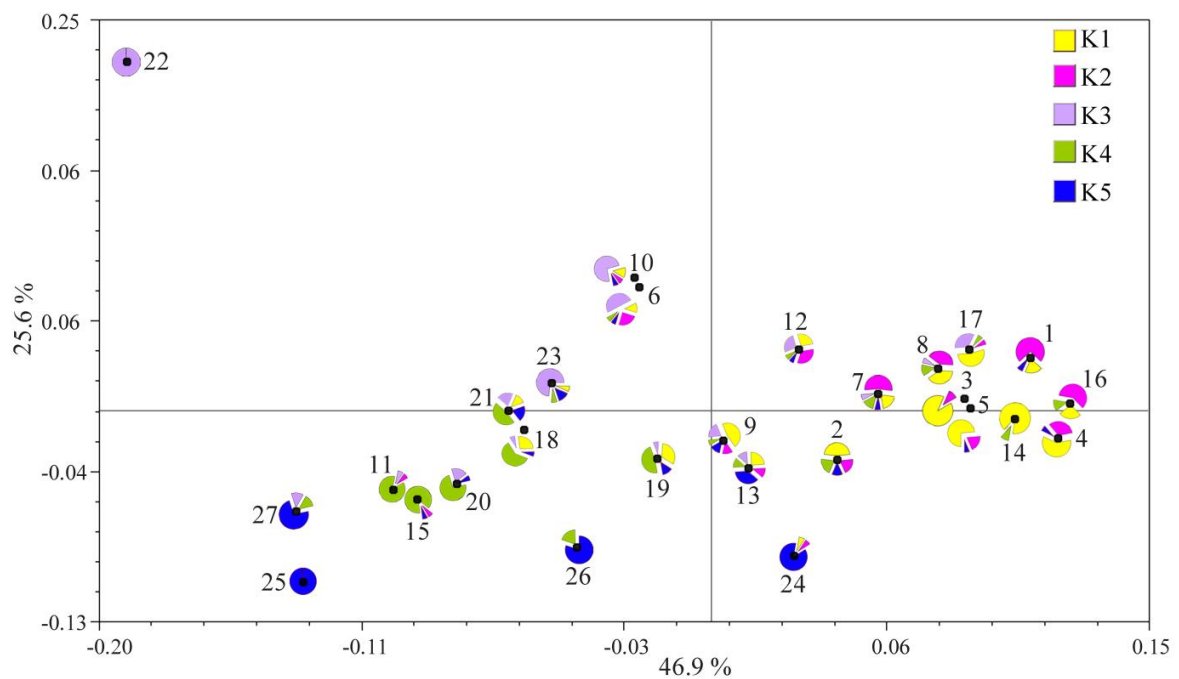


**Figura N7.** Análisis de coordenadas principales. Proyección de las poblaciones españolas de *Austropotamobius* en el gráfico definido por los dos primeros ejes a partir de las estimas  $F_{ST}$ . Las poblaciones están numeradas según el código de la Tabla N1. Los diagramas de sectores superpuestos representan la probabilidad de pertenencia de las poblaciones a los grupos genéticos ancestrales (K1 – K5) según el análisis con Structure.

Con la finalidad de examinar las relaciones entre las muestras españolas e italianas, se han realizado análisis PCoA basados en las distancias  $D_c$  (los dos primeros ejes explican el 36.91% de la varianza, Figura N6) y en las estimas de  $F_{ST}$  (el 72.5% de la variación la absorben las dos primeras dimensiones, Figura N7). La información obtenida de los PCoA pone de manifiesto que las muestras italianas están más relacionadas con las poblaciones Burgos (#11, #15), Navarra (#18) y País Vasco (#20) que con las restantes. En estos PCoA que incluyen todas las muestras, las relaciones encontradas en análisis anteriores entre las poblaciones españolas, no se ven modificadas por la inclusión de las poblaciones italianas.

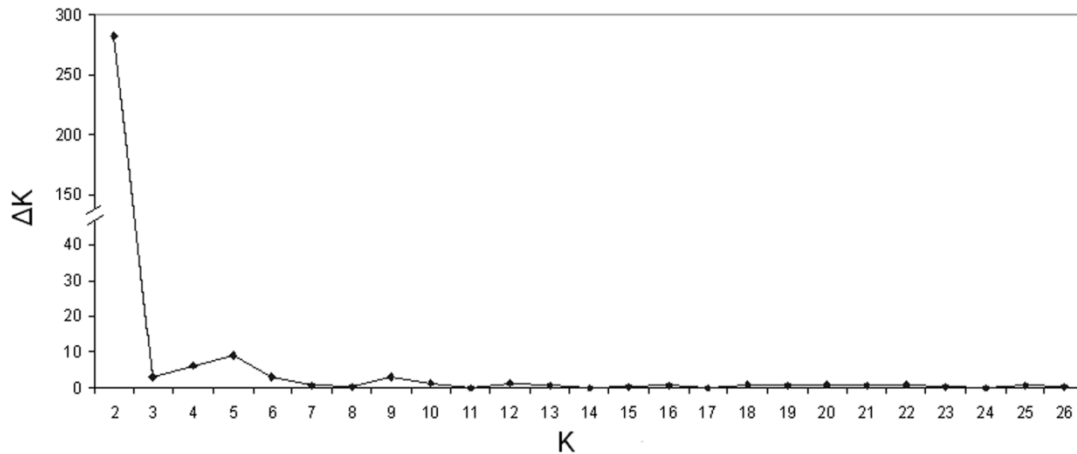


**Figura N8.** Análisis de coordenadas principales. Proyección de las 27 poblaciones analizadas en el gráfico definido por los dos primeros ejes basado en las distancias genéticas  $D_c$ . Las poblaciones están numeradas según el código de la Tabla N1. Los diagramas de sectores superpuestos representan la probabilidad de pertenencia de las poblaciones a los dos grupos genéticos ancestrales ( $KA - KB$ ) según el análisis con Structure.



**Figura N9.** Análisis de coordenadas principales. Proyección de las poblaciones estudiadas en el gráfico 2D a partir de las estimas  $F_{ST}$ . Las poblaciones están numeradas según el código de la Tabla N1. Los diagramas de sectores superpuestos representan la probabilidad de pertenencia de las poblaciones a los grupos genéticos ancestrales ( $K1 - K5$ ) según el análisis con Structure.

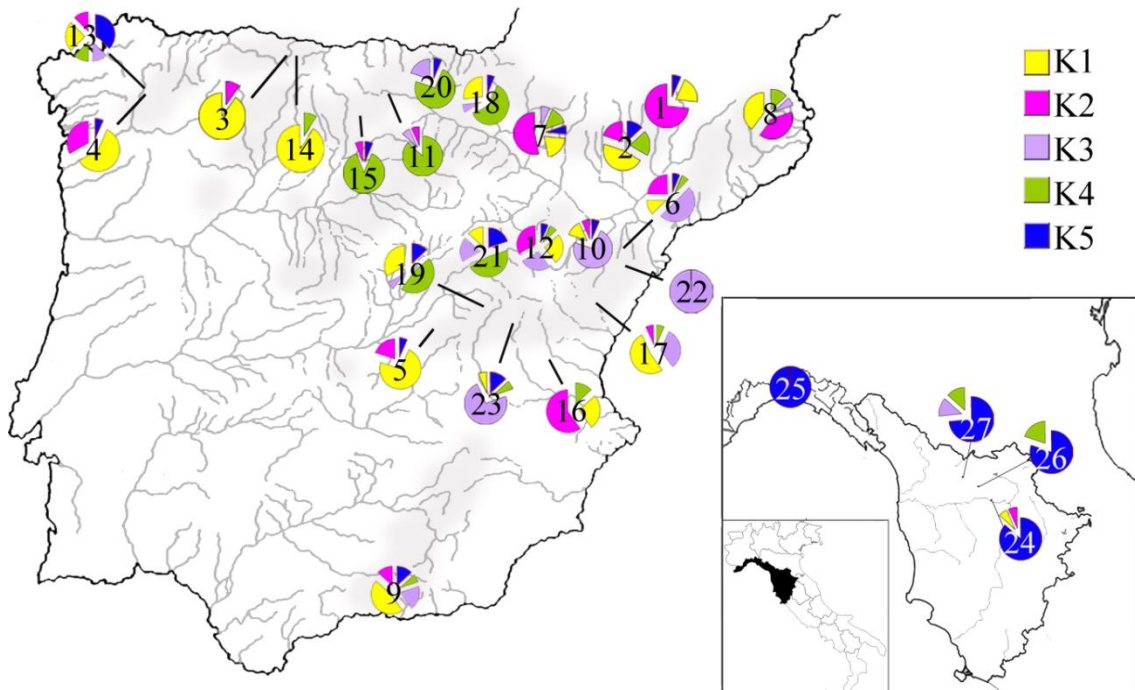
Con el programa Structure se ha realizado un examen adicional sobre la estructura genética de las poblaciones de *Austropotamobius* en España. El análisis apunta a la diferenciación en dos grupos genéticos o subpoblaciones como el resultado más probable para producir el set de datos observado (Figura N10).



**Figura N10.** Valores de  $\Delta K$  como función de  $K$  (número de posibles grupos ancestrales) inferidos del análisis con STRUCTURE para las 27 poblaciones de *Austropotamobius*.

En un grupo genético ( $K_A$ ) se incluirían parte de las poblaciones del norte de España (#11, #15, #18 y #20), dos del centro peninsular (#19 y #21) y las muestras italianas. El resto de las poblaciones españolas pertenecerían a un grupo genético ancestral diferente ( $K_B$ ). Sin embargo, a  $K = 5$  la ruptura de la pendiente de los valores de probabilidad también revela una estructura informativa en el conjunto de datos (Figura N10) tal y como se puede observar en la Figura N11. A este nivel, la inmensa mayoría de los cangrejos muestreados en España pertenecen a las subpoblaciones  $K_1 - K_4$ , aunque algunos especímenes, como los de la muestra del río Lea (#13, noroeste peninsular), pueden pertenecer al grupo genético  $K_5$  localizado fundamentalmente en Italia. Los cuatro grupos genéticos,  $K_1 - K_4$ , no están uniformemente repartidos por la Península Ibérica,  $K_4$  está presente casi exclusivamente en la franja centro - norte de España (#11, #15, #18, #19, #20 y #21), mientras que  $K_3$  aparece principalmente en las muestras del centro - este: #6, #10 y #12 en la cuenca del Ebro, y #17,

#22 y #23 en la cuenca del Júcar. Por otra parte, los grupos genéticos *K1* y *K2* tienen un rango de distribución más amplio. El *K1* está presente en prácticamente todas las regiones donde habita el cangrejo de río en España y *K2* se encuentra algo más localizado en la cuenca del Ebro. En definitiva las relaciones obtenidas con el programa Structure coinciden en gran medida con lo revelado por los análisis de PCoA.



**Figura N11.** Distribución geográfica de los grupos genéticos ancestrales revelados por STRUCTURE. Los diagramas de sectores representan la proporción relativa, en cada población, de *K1* – *K5*. Las poblaciones están numeradas con el código detallado en la Tabla N1.

Los resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA, Tabla N6) indican que la mayor proporción de la varianza se debe a la variación dentro de las poblaciones, entre el 77,18 y el 83,59% ( $p < 0,001$ ) dependiendo del nivel jerárquico. Las diferencias encontradas entre las poblaciones españolas e italianas representan el 5,21% de la varianza total ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar que los grupos genéticos inferidos de los análisis PCoA y Structure, fundamentalmente parte de las poblaciones del norte de España (#11, #15, #18, #20) frente a las restantes, difieren de manera muy significativa ( $p < 0,001$ ). Finalmente, los análisis revelan que ni la cuenca ni la vertiente hidrográfica tienen una influencia significativa sobre la varianza molecular.

Fuente de variación	g,l	Componente de la varianza	% de varianza total	p valor
Todas las poblaciones (españolas e italianas): 1 grupo				
Entre las poblaciones	26	25,79	19,61	
Dentro de las poblaciones	753	105,72	80,39	p<0,001
Todas las poblaciones: 2 grupos (poblaciones españolas e italianas)				
Entre los países	1	7,137	5,21	p<0,05
Entre las poblaciones del mismo país	25	24,130	17,61	p<0,001
Dentro de las poblaciones	753	105,724	77,18	p<0,001
Poblaciones españolas: 1 grupo				
Entre las poblaciones	22	22,085	17,30	
Dentro de las poblaciones	657	105,606	82,70	p<0,001
Poblaciones españolas, Cuencas fluviales: 11 grupos				
Entre las cuencas	10	0	0	0,482
Entre las poblaciones de la misma cuenca	12	22,239	17,42	p<0,001
Dentro de las poblaciones	657	105,606	82,72	p<0,001
Poblaciones españolas, Vertientes hidrográficas: 4 grupos				
Entre las vertientes	3	0,503	0,39	0,357
Entre las poblaciones de la misma vertiente	19	21,795	17,02	p<0,001
Dentro de las poblaciones	657	105,606	83,59	p<0,001
Poblaciones españolas: 2 grupos (grupos ancestrales KA y KB según el análisis de STRUCTURE)				
Entre K	1	12,89	9,53	p<0,001
Entre las poblaciones del mismo K	21	167,62	12,39	p<0,001
Dentro de las poblaciones	657	105,61	78,07	p<0,001
Poblaciones españolas: 4 grupos (grupos ancestrales K1 – K4 según el análisis de STRUCTURE)				
Entre K	3	13,09	10,01	p<0,001
Entre las poblaciones del mismo K	19	12,17	9,30	p<0,001
Dentro de las poblaciones	657	105,06	80,69	p<0,001
Todas las poblaciones: 5 grupos (grupos ancestrales K1 – K5 según el análisis de STRUCTURE)				
Entre K	4	12,430	9,29	p<0,001
Entre las poblaciones del mismo K	22	15,626	11,68	p<0,001
Dentro de las poblaciones	753	105,724	79,03	p<0,001

g, l, = grados de libertad

**Tabla N6.** AMOVA de las 27 poblaciones de *Austropotamobius* en relación con los loci SSR examinados. En los análisis el nivel de significación se fijó mediante 1000 permutaciones.

En relación con el flujo génico, las estimas realizadas con las diferentes aproximaciones muestran la misma tendencia. Los valores más elevados de  $N_m$  (Tabla N7), inferidos de los índices  $F_{ST}$ , se observan en las comparaciones de algunas de las poblaciones del centro de España (como #5, #12 y #19) y la muestra más meridional (#9) con la mayoría de las poblaciones restantes. Entre estos valores destacan estimas muy altas que oscilan entre 30,27 para las poblaciones #7 – #12 y 13,40 en el par #9 – #23. Las estimas hechas con el programa GeneClass proporcionan información acerca del sentido del flujo génico, y a pesar de sus limitaciones, coinciden con los patrones encontrados al inferir los valores de  $N_m$  de los valores de  $F_{ST}$ . Las poblaciones #5, #9, #12 y #19 presentan las tasas de migración asimétrica más elevadas (Tabla N8) y dado que las tasas de emigración son más altas que las de inmigración, podrían actuar como fuente de migrantes. Por el contrario, las poblaciones analizadas de la cuenca del Júcar, #16 y #17, son las que tienen las tasas de inmigración más altas. La población #22, la más diferenciada de acuerdo con el análisis de Structure y PCoA, posee los valores de  $N_m$  más bajos ( $N_m < 1$ ) y según los resultados de GeneClass, el escaso flujo génico se debe a los migrantes que recibe de las poblaciones geográficamente cercanas, como #6 y #10. Las estimas entre las poblaciones españolas e italianas, en general, evidencian valores bajos y no significativos.

**Tabla N7.** (Página siguiente) Tasas de flujo génico ( $N_m$ ) calculadas a partir de los valores de  $F_{ST}$  en las 27 poblaciones de *Austropotamobius* analizadas.

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25	#26
#2	1,5																									
#3	1,2	3,13																								
#4	6	3,15	2,5																							
#5	2	10,1	4,6	11																						
#6	1,4	1,82	2,3	1,42	2																					
#7	1,8	2,47	2,6	2,19	4,8	3,6																				
#8	3	2,04	6,2	5,43	4,1	2,6	2,6																			
#9	1,3	3,96	3,4	2,28	6,3	3,6	7,56	2,5																		
#10	1,1	1,41	1,8	1,13	1,6	∞	2,19	1,8	2,5																	
#11	0,6	1,19	0,8	0,69	0,8	1,3	1,08	0,8	1,58	1,1																
#12	1,9	3,67	4,2	2,89	27	6,6	30,3	5,2	19	4,1	1,14															
#13	1,7	7,03	2,7	5,26	5,3	2,1	3,04	2,4	5,54	1,7	1,56	3,69														
#14	1,2	2,04	5,5	2,99	5,8	1,7	2,98	2,4	9,64	1,4	0,67	4,94	2,6													
#15	0,8	1,44	0,9	0,9	0,9	1,4	1,05	1	1,47	1	10,4	1,06	2,2	0,7												
#16	2,7	2,9	2	3,69	3,3	1,8	5,75	2,7	2,35	1,2	0,77	3,23	2,6	2,1	0,9											
#17	0,8	2,04	3,1	1,12	2,8	2,5	2,98	2,4	3,55	1,9	0,81	15,8	1,6	1,7	0,7	1,4										
#18	0,7	1,44	1,9	0,86	1,2	2,2	2,14	1,4	2,99	1,6	2,06	2,02	1,8	1,2	2,4	1	1,5									
#19	1	6,55	2,7	1,67	2,8	2,4	2,33	1,8	6,1	2	3,42	3,5	7,8	1,7	3,7	1,5	2,5	2,8								
#20	0,7	2,05	1,3	0,85	1,1	1,5	1,1	1	2,15	1,2	1,97	1,29	2,1	0,9	2,8	0,8	1	2,6	4,81							
#21	1	2,61	1,5	1,29	1,9	2,5	1,93	1,5	6,01	2	5,53	2,71	2,9	1,4	4,1	1,2	1,5	4	14,6	8,2						
#22	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	1,1	0,48	0,5	0,58	0,9	0,53	0,67	0,6	0,4	0,6	0,4	0,4	0,6	0,59	0,6	0,9					
#23	1	2	2	1,23	2	6	3,1	1,9	13,4	3,8	1,92	5,08	2,8	1,9	1,8	1,4	2,6	4,2	6,18	3,8	13,8	0,9				
#24	0,9	8,33	1	1,55	2,5	1	1,39	0,9	2,52	0,9	1,12	1,65	4,1	1,1	1,2	1,2	0,9	1	3,57	1,5	2,16	0,4	1,4			
#25	0,5	0,59	0,5	0,46	0,6	0,7	0,59	0,6	0,81	0,7	0,55	0,71	0,7	0,5	0,6	0,4	0,4	0,7	0,64	0,6	0,84	0,4	0,9	0,5		
#26	0,8	1,11	0,9	1,12	0,9	0,9	0,68	1	1,02	0,7	0,76	0,79	2,5	0,8	1,4	0,7	0,5	0,9	1,25	1,1	1,11	0,5	1	0,9	0,6	
#27	0,6	0,92	0,8	0,67	0,7	1,2	0,96	0,8	1,56	1	1,55	0,99	1,4	0,8	2	0,7	0,7	1,6	1,7	1,7	2,18	0,6	2,9	0,9	0,9	1

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#27	
#1	<b>0.52</b>	0.02	0.00	<u>0.22</u>	<u>0.11</u>	<u>0.11</u>	<u>0.11</u>	<u>0.20</u>	0.10	<u>0.11</u>	0.00	<u>0.24</u>	0.08	0.01	0.01	0.00	0.00	0.04	0.01	0.00	0.07	0.00	0.04	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00
#2	<u>0.18</u>	<b>0.46</b>	<u>0.15</u>	<u>0.26</u>	<u>0.35</u>	<u>0.21</u>	<u>0.32</u>	<u>0.32</u>	<u>0.45</u>	<u>0.21</u>	<u>0.14</u>	<u>0.43</u>	<u>0.35</u>	<u>0.14</u>	<u>0.14</u>	<u>0.07</u>	<u>0.21</u>	<u>0.08</u>	<u>0.30</u>	<u>0.08</u>	<u>0.25</u>	0.00	<u>0.24</u>	<u>0.20</u>	0.00	<u>0.11</u>	0.01	0.01
#3	0.01	0.09	<b>0.46</b>	<u>0.13</u>	<u>0.15</u>	0.08	<u>0.12</u>	<u>0.16</u>	<u>0.32</u>	<u>0.13</u>	0.01	<u>0.18</u>	<u>0.19</u>	<u>0.23</u>	0.02	0.01	<u>0.07</u>	<u>0.21</u>	<u>0.17</u>	0.00	0.04	0.00	0.10	0.01	0.00	0.03	0.01	0.01
#4	<u>0.29</u>	<u>0.12</u>	<u>0.11</u>	<b>0.48</b>	<u>0.29</u>	0.10	<u>0.19</u>	<u>0.42</u>	<u>0.33</u>	<u>0.16</u>	0.00	<u>0.33</u>	<u>0.28</u>	0.07	0.01	0.04	0.09	<u>0.02</u>	<u>0.11</u>	0.00	0.10	0.00	<u>0.15</u>	0.04	0.00	0.04	0.00	0.00
#5	0.11	<u>0.25</u>	<u>0.20</u>	<u>0.34</u>	<b>0.48</b>	0.19	<u>0.19</u>	<u>0.42</u>	<u>0.43</u>	<u>0.24</u>	0.01	<u>0.43</u>	<u>0.29</u>	0.12	0.01	0.07	<u>0.17</u>	<u>0.03</u>	<u>0.15</u>	0.00	0.08	0.00	<u>0.14</u>	0.04	0.00	0.05	0.00	0.00
#6	0.07	0.02	0.04	0.06	<u>0.11</u>	<b>0.48</b>	0.05	<u>0.11</u>	<u>0.13</u>	<u>0.40</u>	0.00	<u>0.28</u>	0.07	0.02	0.00	0.00	0.04	0.00	<u>0.08</u>	0.00	0.06	0.08	<u>0.22</u>	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
#7	<u>0.23</u>	<u>0.22</u>	<u>0.15</u>	<u>0.31</u>	<u>0.33</u>	<u>0.22</u>	<b>0.48</b>	<u>0.32</u>	<u>0.40</u>	<u>0.20</u>	0.09	<u>0.37</u>	<u>0.31</u>	<u>0.11</u>	<u>0.12</u>	<u>0.12</u>	<u>0.14</u>	<u>0.08</u>	<u>0.15</u>	0.00	<u>0.11</u>	0.00	<u>0.18</u>	0.06	0.00	0.07	0.03	0.00
#8	<u>0.11</u>	0.02	0.01	<u>0.20</u>	<u>0.15</u>	0.08	0.08	<b>0.47</b>	<u>0.20</u>	<u>0.09</u>	0.00	<u>0.27</u>	<u>0.11</u>	0.00	0.01	0.01	0.05	0.01	<u>0.02</u>	0.00	0.07	0.00	<u>0.11</u>	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
#9	0.05	0.09	0.07	<u>0.11</u>	0.10	<u>0.11</u>	0.09	<u>0.16</u>	<b>0.50</b>	0.09	0.02	<u>0.16</u>	<u>0.12</u>	<u>0.13</u>	0.04	0.03	0.08	0.04	<u>0.11</u>	0.00	0.07	0.00	<u>0.10</u>	0.04	0.00	0.07	0.01	0.00
#10	0.04	0.00	0.01	0.08	0.06	<u>0.25</u>	0.06	0.07	<u>0.11</u>	<b>0.50</b>	0.00	<u>0.23</u>	0.04	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	<u>0.02</u>	0.00	0.02	0.02	<u>0.14</u>	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
#11	0.03	0.04	0.01	0.06	0.02	0.06	0.07	0.09	<u>0.15</u>	0.04	<b>0.42</b>	0.08	<u>0.19</u>	0.00	0.00	0.03	0.01	0.06	<u>0.12</u>	0.04	<u>0.21</u>	0.00	0.07	0.03	0.00	0.08	0.01	0.01
#12	<u>0.16</u>	<u>0.13</u>	0.06	<u>0.21</u>	<u>0.23</u>	<u>0.19</u>	<u>0.19</u>	<u>0.40</u>	<u>0.29</u>	<u>0.24</u>	0.02	<b>0.49</b>	<u>0.17</u>	0.05	0.02	0.09	<u>0.11</u>	0.06	<u>0.12</u>	0.00	0.09	0.01	<u>0.18</u>	0.03	0.00	0.03	0.01	0.01
#13	0.04	0.08	0.03	<u>0.21</u>	0.07	0.05	0.08	0.06	<u>0.29</u>	0.07	0.05	0.08	<b>0.46</b>	0.02	<u>0.12</u>	0.01	0.02	<u>0.02</u>	<u>0.15</u>	0.06	0.08	0.00	<u>0.14</u>	0.09	0.00	0.16	0.01	0.01
#14	0.01	0.03	0.11	0.09	0.09	0.14	0.06	0.06	0.65	0.06	0.00	0.10	<u>0.16</u>	<b>0.52</b>	0.00	0.00	0.01	0.04	0.00	0.02	0.00	0.06	0.01	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02
#15	0.00	0.02	0.01	0.05	0.02	0.04	0.07	0.06	0.11	0.02	<u>0.23</u>	0.05	<u>0.12</u>	0.00	<b>0.42</b>	0.02	0.01	<u>0.12</u>	<u>0.11</u>	0.07	0.10	0.00	<u>0.12</u>	0.10	0.00	0.05	0.00	0.00
#16	<u>0.42</u>	<u>0.39</u>	<u>0.15</u>	<u>0.53</u>	<u>0.40</u>	<u>0.42</u>	<u>0.55</u>	<u>0.57</u>	<u>0.48</u>	<u>0.23</u>	0.09	<u>0.51</u>	<u>0.48</u>	<u>0.11</u>	<u>0.15</u>	<b>0.43</b>	<u>0.17</u>	0.05	<u>0.16</u>	0.02	<u>0.12</u>	0.00	<u>0.12</u>	0.10	0.00	0.05	0.00	0.00
#17	<u>0.11</u>	<u>0.23</u>	<u>0.18</u>	<u>0.22</u>	<u>0.37</u>	<u>0.37</u>	<u>0.20</u>	<u>0.56</u>	<u>0.58</u>	<u>0.32</u>	0.07	<u>0.63</u>	<u>0.19</u>	<u>0.13</u>	0.06	0.04	<b>0.45</b>	0.07	<u>0.27</u>	0.02	<u>0.16</u>	0.01	<u>0.39</u>	0.03	0.00	0.08	0.01	0.01
#18	0.00	0.04	0.10	0.01	0.00	0.02	0.06	0.05	<u>0.11</u>	0.02	0.04	0.03	0.06	0.02	<u>0.14</u>	0.01	0.01	<b>0.37</b>	0.09	0.04	<u>0.12</u>	0.00	0.06	0.00	0.00	<u>0.12</u>	0.01	0.01
#19	0.04	<u>0.11</u>	<u>0.14</u>	<u>0.16</u>	<u>0.16</u>	<u>0.13</u>	<u>0.12</u>	<u>0.19</u>	<u>0.33</u>	<u>0.16</u>	<u>0.24</u>	<u>0.21</u>	<u>0.26</u>	0.06	<u>0.24</u>	0.03	<u>0.11</u>	<b>0.45</b>	<u>0.13</u>	<u>0.39</u>	0.00	<u>0.32</u>	0.05	0.00	<u>0.20</u>	0.09	0.01	0.07
#20	0.00	0.04	0.03	0.02	0.01	0.03	0.02	<u>0.18</u>	0.03	0.08	0.03	<u>0.13</u>	0.02	<u>0.18</u>	0.00	0.01	0.07	<u>0.18</u>	<b>0.36</b>	<u>0.18</u>	0.00	<u>0.18</u>	0.01	0.00	0.10	0.07	0.01	0.05
#21	0.04	0.03	0.02	0.09	0.07	0.04	0.03	0.10	<u>0.19</u>	0.07	0.05	0.10	0.10	0.02	<u>0.11</u>	0.00	0.02	<u>0.13</u>	0.10	<b>0.42</b>	0.00	<u>0.19</u>	0.01	0.00	0.07	0.05	0.01	0.05
#22	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	<u>0.22</u>	0.00	0.00	0.00	<u>0.19</u>	0.00	<u>0.11</u>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	<b>0.47</b>	<u>0.14</u>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
#23	0.01	0.03	0.01	0.03	0.05	0.08	0.03	0.09	<u>0.20</u>	0.09	0.00	<u>0.13</u>	0.07	0.00	0.01	0.00	0.06	0.01	0.09	0.04	<u>0.11</u>	0.04	<b>0.37</b>	0.00	0.00	0.05	0.06	0.06
#24	0.05	<u>0.20</u>	0.04	<u>0.16</u>	0.10	0.06	<u>0.12</u>	0.07	<u>0.33</u>	0.05	0.09	<u>0.13</u>	<u>0.29</u>	0.03	<u>0.12</u>	0.03	0.03	<u>0.02</u>	<u>0.17</u>	0.07	<u>0.14</u>	0.00	0.09	<b>0.49</b>	0.00	<u>0.21</u>	0.01	0.01
#25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<b>0.48</b>	0.00	0.00	0.00
#26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.01	0.00	0.05	0.00	0.00	<b>0.45</b>	0.05	0.05
#27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.00	0.10	0.00	0.01	0.02	<b>0.51</b>	0.06

**Tabla N8.** Tasas medias de migración calculadas con el programa GeneClass a (filas) y desde (columnas) cada población. Los números en negrita muestran la proporción de individuos pertenecientes a la población en la que fueron muestreados. Las tasas de migración superiores a 0,1 están subrayadas. El intercambio genético entre las poblaciones españolas e italianas aparece recuadrado.

## Discusión

### Niveles de diversidad genética

Uno de los objetivos del presente trabajo es evaluar la variabilidad genética nuclear mediante microsatélites en las poblaciones españolas de *Austropotamobius*.

Todos los loci SSR estudiados son polimórficos en el conjunto de las muestras ibéricas de cangrejos, incluso el marcador Ap5, donde se han encontrado dos alelos en tres poblaciones españolas (#1, #2 y #16, Tabla N3), que no pudo ser amplificado con éxito en estudios anteriores de esta especie (Bertocchi et al. 2008a; Gouin et al. 2000).

Los microsatélites han demostrado, en muchas especies y sus poblaciones, ser altamente variables, en parte debido a que son marcadores codominantes, por lo que, en general, puede observarse un mayor número de alelos y lógicamente, un mayor polimorfismo con respecto a otros tipos de marcadores. A este respecto, el único trabajo previo con marcadores nucleares en los cangrejos de río españoles se realizó con RAPD (marcadores con dominancia completa) (Beroiz 2004; Beroiz et al. 2008) y se observó un polimorfismo promedio del 15%. Nuestros resultados con SSR muestran un nivel de variabilidad moderado a pesar del amplio muestreo realizado, dato que concuerda con la limitada variabilidad genética encontrada con distintos marcadores en el cangrejo de río (Fetzner & Crandall 2001). Aunque no comparable directamente dada la naturaleza de los marcadores, mediante el empleo de SSR hemos encontrado un polimorfismo del 79,1% y una heterocigosis observada en las poblaciones españolas de 0,186. De esta manera, en algunas poblaciones en las que los RAPD evidenciaban poca diversidad hemos podido encontrar, con los SSR, valores semejantes a los de otras poblaciones.

Comparando nuestros resultados con los de otros estudios llevados a cabo con SSR en este género, parece que el número de alelos encontrado en cada marcador está relacionado con el origen de las poblaciones analizadas. Los loci Ap1, Ap3 y Ap6 poseen mayor riqueza alélica en las poblaciones analizadas de Italia y España que en las poblaciones francesas. En el caso del locus Ap3, se han detectado hasta cuatro veces más alelos en las muestras íberas e itálicas que en las francesas ( $n_a = 7$ , Bertocchi et al. 2008a;  $n_a = 4$ , Gouin et al. 2006;  $n_a = 16$ , presente trabajo, Tabla N4). Mientras que los loci Ap2 y Ap5 también presentan un mayor polimorfismo en las poblaciones españolas que en las de Liguria y Toscana (Italia), aunque tienen menor riqueza alélica que las de Francia o en Sur del Tirol (Baric et al. 2005a; Gouin et al. 2006). En resumen, el número de alelos encontrado en los loci Ap1, Ap3 y Ap6 parece ser

mayor en las poblaciones españolas e italianas (adscritas a la especie *A. italicus*) que en las francesas (pertenecientes a *A. pallipes*), mientras que en los loci Ap2 y Ap5 sucede lo contrario.

En cuanto al número total de alelos exclusivos de población detectados en *A. italicus*, en las muestras españolas ha resultado ser inferior (5 alelos en 23 poblaciones) al encontrado en poblaciones italianas (14 alelos en un total de 6 muestras, Baric et al. 2005a; 5 alelos en 8 poblaciones, Bertocchi et al. 2008a; 8 alelos en las 4 poblaciones italianas del presente trabajo). Este dato parece indicar que o bien las poblaciones españolas de cangrejo de río han atravesado cuellos de botella recientes y han perdido parte de la variabilidad que las caracterizaba, o bien se trata de poblaciones con un elevado flujo genético que dificulta la diferenciación de las mismas. Los datos sobre la heterocigosis encontrada, aporta más información al respecto, para discutir estas hipótesis.

En relación con la heterocigosis observada en las muestras españolas, los valores obtenidos ( $H_0 = 0,186$ , Tabla N4) son similares ( $H_0 = 0,11$ , Bertocchi et al. 2008a;  $H_0 = 0,22$ , Gouin et al. 2006) o inferiores ( $H_0 = 0,53$ , Baric et al. 2005a) a los descritos en otras poblaciones europeas con marcadores SSR. En general, se observa un déficit de heterocigotos en todas las poblaciones estudiadas (Tablas N3 y N4) que podría deberse a varias causas. Uno de los factores sería la presencia de alelos nulos en el conjunto de datos analizado, si bien hay que considerar que el limitado número de especímenes que se puede muestrear en una especie en peligro hace que disminuya la probabilidad de detectar todos los posibles genotipos en los diferentes loci. Otros aspectos también parecen indicar que la presencia de alelos nulos no sería la principal causa de este exceso de homocigosis observada. Así, se han podido amplificar todos los ejemplares analizados con los cebadores empleados; la aparición de alelos nulos no implicaría, en general, a los mismos SSR en todas las poblaciones estudiadas y, tercero, la deficiencia de heterocigotos observada afecta a todos los loci amplificados. Por tanto, han de ofrecerse otras explicaciones.

Una de las principales razones para tales defectos de heterocigotos podría ser la reducción de los tamaños efectivos poblacionales. Se han encontrado valores considerables de  $F_{IS}$  en las muestras españolas, por otra parte inevitables en poblaciones con tamaños efectivos muy restringidos (Tabla N4). Durante los últimos 40 años se ha producido un gran declive de las poblaciones de cangrejos en España por diferentes factores, entre los que cabe destacar el deterioro de los hábitats, la competencia por los recursos con especies exóticas de cangrejos de río y la plaga del cangrejo causada por el hongo oomiceto *Aphanomices astaci* y transmitida

por los cangrejos americanos (Alonso et al. 2010; Diéguez – Uribeondo et al. 1997a; Galindo et al. 2003; Rallo et al. 2004).

De hecho, se dispone de información concreta sobre las grandes mortandades que han sufrido algunas de las poblaciones en las que se han detectado mayores tasas del índice de fijación  $F_{IS}$ . Entre estas causas se hallan las condiciones climáticas adversas (muestra #9, Gil – Sánchez 1999), enfermedades como la saprolegniosis (causada por *Saprolegnia* spp., en la misma área donde habita la población #9, Gil – Sánchez 1999), la peste del cangrejo (*A. astaci*, regiones donde se muestrearon las poblaciones #15, #18, Diéguez – Uribeondo et al. 1997a), o la competencia con especies invasoras como *Pacifastacus leniusculus* en los mismos cursos fluviales (como es el caso de la población #18, Gobierno de Navarra 2011).

Además de los factores antes mencionados, la sobrepesca ha sido una de las causas fundamental del declive del cangrejo de río en España. Los cangrejos eran objeto de pesca comercial en numerosas zonas, existiendo cofradías de pescadores dedicadas a la misma (Pardo 1950 – 1951; Torre & Rodríguez 1964). Incluso, en determinados lugares eran tratados como una especialidad gastronómica local. Las cifras de capturas anuales llegaron a ser de más de 2000 Tm (Torre & Rodríguez 1964) antes de la irrupción de la afanomicosis a finales de 1970 (Cuellar & Coll 1983). Estos datos muestran la importancia del cangrejo de río en el contexto de la pesca continental, no sólo desde el punto de vista económico sino también desde el punto de vista recreativo y social. Su importancia relativa puede apreciarse analizando la evolución del número total de licencias de pesca, que creció de forma continua desde principios del s. XX, cayendo en casi un tercio, de 726.734 a 515.349, en el período 1978 – 1983 (Muñoz 1988), por la decisión de las autoridades ante la reducción de las poblaciones astacícolas debido a la afanomicosis. Además hay que tener en cuenta que ante la disminución del número de poblaciones, y dados los intereses que representaba este macroinvertebrado, se realizaron un gran número de repoblaciones incontroladas, por parte de particulares, o planificadas por la Administración (Torre & Rodríguez 1964).

Por tanto, los altos valores del índice de fijación  $F_{IS}$  y el exceso de homocigotos encontrados en las muestras españolas también pueden atribuirse a los cuellos de botella y al efecto fundador como consecuencia de la sobrepesca y las repoblaciones respectivamente. Se han encontrado valores similares del índice de fijación  $F_{IS}$  en poblaciones italianas de *Austropotamobius* estudiando estos mismos loci SSR (Baric et al. 2005a; Bertocchi et al. 2008a). Las explicaciones ofrecidas por los autores han sido cuellos de botella en algunas

poblaciones debido a la sobrepesca o bien, translocaciones y repoblaciones realizadas por el hombre, aunque no analizaron la posible presencia de alelos nulos.

Los niveles de variación genética de *Austropotamobius* en España se han visto afectados por sucesivos y drásticos cuellos de botella y por la acción de la deriva genética. Sin embargo, en algunas de las poblaciones analizadas el nivel de variabilidad genética y la presencia de alelos exclusivos (como en #8 o #22, Tabla N4) indican que, o bien derivan de poblaciones grandes y consolidadas, o que están recobrando la variación genética gracias a su catalogación como especie no pescable. En ciertos casos, parece que la implantación de programas de conservación o recuperación para la especie ha servido de ayuda. El análisis con loci microsatélites de estas poblaciones ha revelado una mayor variabilidad genética que la previamente descrita con otros marcadores nucleares, a pesar del declive poblacional y los efectos de la deriva.

### **Patrones de variabilidad genética**

Un aspecto primordial en el estudio de organismos como el cangrejo de río, catalogado como especie 'vulnerable', es el que se refiere a los patrones de distribución de su variabilidad genética.

Los resultados obtenidos han permitido revelar que la variabilidad genética encontrada en las poblaciones no está homogéneamente distribuida por la Península Ibérica. De hecho, el valor promedio del índice de subdivisión  $F_{ST}$  de Wright es de 0,14, lo que indica una diferenciación moderada de las poblaciones españolas. Asimismo, los valores por pares de este estadístico (0 – 0,4, Tabla N5) muestran que ciertas poblaciones están muy diferenciadas unas de otras y en los análisis PCoA (Figuras N4 – N7) se puede observar que la mayor divergencia es la que separa a las poblaciones del norte peninsular (#11, #15, #18 y #20) de las restantes. A su vez, entre estas últimas se aprecia un subconjunto de poblaciones geográficamente cercanas (#6, #10, #22 y #23) que pueden considerarse como un grupo diferenciado. Los resultados de Structure concuerdan con las relaciones puestas de manifiesto por los análisis PCoA y los árboles filogenéticos (Figuras N8 y N9), aun cuando la capacidad de agrupamiento del análisis bayesiano (Figura N11) se ve afectada por el número de loci analizados, los desequilibrios de Hardy – Weinberg o los tamaños muestrales. El programa Structure, evidencia como más probable, dos grupos genéticos ancestrales en España, diferenciándose parte de las poblaciones septentrionales (*KA*) de las demás (*KB*). Este análisis también revela otra agrupación de las poblaciones españolas, que aunque menos probable, resulta informativa. La separación de las poblaciones españolas en cuatro grupos genéticos

mantiene las poblaciones del norte peninsular en un grupo distinto (*K4*) al del resto de las poblaciones. En relación a estas últimas, el patrón de distribución no es sencillo aunque se pueden distinguir las poblaciones de la cuenca del Ebro (*K2*) y parte de las poblaciones del levante (*K3*). Esta imagen se completa con el grupo ancestral *K1*, disperso en toda el área de distribución de esta especie.

Los análisis de AMOVA muestran que una parte estadísticamente significativa de la variación encontrada se debe a la varianza entre las poblaciones ibéricas (17,30%, Tabla N6). A pesar de que el cangrejo de río es una especie dulceacuícola, las cuencas hidrográficas o las vertientes no parecen jugar un papel fundamental en la filogeografía de las poblaciones de esta especie. Por el contrario, otros agrupamientos como los descubiertos a través de los análisis PCoA y Structure parecen ser más relevantes.

Diversos autores empleando distintas metodologías (Granjean et al. 2001 RFLP; Trontelj et al. 2005 secuenciación COI) encontraron una distribución homogénea de la variabilidad genética en las poblaciones de este astácido en España. Diéguez – Uribeondo et al. (2008) fueron los primeros en poner de manifiesto la diferenciación de las poblaciones de *Austropotamobius* en España. Estos autores encontraron un claro patrón geográfico en la distribución de los dos haplotipos encontrados al estudiar un pequeño fragmento de DNAm. El haplotipo A1 estaba presente en el norte y el haplotipo A2 en el resto de la península; además en algunas poblaciones de la cuenca del Ebro detectaron los dos. El análisis de fragmentos más largos del DNAm de las poblaciones españolas (Capítulo 1) ha confirmado este patrón de distribución de la variación genética y además lo ha ampliado, por lo que podemos comparar el resto de los grupos descubiertos en el análisis de los SSR. La estructura genética observada con ambos tipos de marcadores parece concordar, puesto que la distribución de los haplotipos mitocondriales más frecuentes en España (H1 y H8 del capítulo anterior) es aproximadamente la misma que la de los grupos genéticos ancestrales con un mayor rango de distribución (*K1* y *K2*). Igualmente, podemos encontrar que los alrededores del Sistema Ibérico y la Cordillera Cantábrica albergan haplotipos mitocondriales distintivos (H4 y H15, respectivamente) que tienen su reflejo a nivel nuclear (*K3* y *K4*). Cabe señalar además, que de igual forma que en el trabajo antes mencionado de Diéguez – Uribeondo et al. (2008), en algunas poblaciones de la cuenca del Ebro parecen converger las características de los dos grandes grupos genéticos. Se pueden encontrar tanto los haplotipos mitocondriales como las particularidades nucleares características de las dos regiones.

El empleo de microsatélites en otras poblaciones europeas de *Austropotamobius* también ha desvelado la existencia de estructura genética a nivel nuclear. Gouin et al. (2006), pusieron de manifiesto una diferenciación genética entre las poblaciones francesas del norte y el sur, albergando las del sur una mayor variación genética. Diversos estudios han demostrado que los marcadores microsatélites pueden ayudar a dilucidar las relaciones de poblaciones divergentes (Koskinen et al. 2002; Fraser & Bernatchez 2005). Dada la naturaleza de los microsatélites, su huella molecular es menos duradera que la de otros marcadores (Avice 2004) y se han propuesto diversos límites en número de generaciones para detectar su influencia sobre la estructura poblacional actual (Estoup & Angers 1998). Considerando que en los cangrejos de agua dulce el tiempo de generación es de 2 – 4 años y tomando uno de estos límites, la diferenciación norte – sur encontrada en las poblaciones francesas mencionadas, podría haber tenido lugar hace más de 4000 años, después de la última etapa glacial, y ya en el Holoceno, coincidiendo con la mejora del clima en Europa. En este caso los autores proponen sendos refugios glaciares, uno en la costa atlántica francesa y otro en la mediterránea, desde los cuales se pudo producir la dispersión post – pleistocénica tal y como se ha descrito en otras especies de agua dulce (Bernatchez 2001; Nagel 2000).

En el caso de las poblaciones españolas de cangrejo de río analizadas en este trabajo, eventos históricos antiguos tales como la fragmentación de las poblaciones (Beroiz et al. 2008), la recolonización desde los refugios después de las glaciaciones (Diéguez – Uribeondo et al. 2008; Grandjean et al. 2000c, 2001) y la formación de las cuencas fluviales en la Península Ibérica, han debido contribuir a moldear la estructura genética de estas poblaciones (ver discusión del Capítulo 1). De hecho se ha demostrado esta influencia en otras especies dulceacuícolas en España (Callejas & Ochando 2002; Hewitt 1996, 2004). Los grupos genéticos detectados se localizan en varias regiones con altos niveles de biodiversidad y endemismos, que han sido propuestos como refugios para especies de peces, anfibios, reptiles, plantas y mamíferos durante la última época glacial (ver Figuras N2 y N3 en Gómez y Lunt 2007 y sus referencias). Así, la estructura genética observada en las poblaciones de *Austropotamobius* en España podría ser consecuencia última de la existencia de tales refugios glaciares. No obstante, procesos acaecidos después, históricos y/o recientes, tales como cuellos de botella y la consecuente deriva genética, y las translocaciones, parecen haber jugado un papel fundamental en los patrones de distribución de la variabilidad genética actual.

Las estimas del flujo génico muestran valores más altos hacia el este peninsular, principalmente desde el centro de España hacia la cuenca del Júcar, pero también a lo largo del Ebro (Tablas N7 y N8). En ausencia de obstáculos los cangrejos de río pueden cubrir

distancias relativamente largas (Gouin et al. 2002), por lo que parte de las estimas de flujo obtenidas, por ejemplo en poblaciones que habitan el Ebro, podrían ser de origen natural. Sin embargo, las mayores estimas de Nm (tasa efectiva de migración) se han encontrado entre localidades geográficamente cercanas (Tablas N7 y N8), aun cuando pertenecientes a cuencas fluviales o incluso vertientes diferentes, tal y como se aprecia entre las muestras #4 – #11 o entre #9 – #14 (Tablas N7 y N8, Figura N1). Estas tasas de migración pueden explicarse mejor como un desplazamiento de los cangrejos de origen antropogénico.

Las translocaciones de cangrejos han sido una práctica común en Europa. Se ha identificado la influencia humana, a través de estas prácticas, como uno de los principales factores que han contribuido a modelar la actual estructura genética de las poblaciones de cangrejo en Suiza (Lörtscher et al. 1998), Irlanda (Gouin et al. 2003) o en los Alpes Marítimos (Stefani et al. 2009).

En España, la dispersión antropogénica de cangrejos está documentada en algunas regiones, como Asturias (donde se encuentran las poblaciones #3 y #14) alrededor del año 1900 (De la Hoz 1997; Pardo 1942), Gerona (localización de #8) en el año 1930 (Pardo 1942) o Galicia (donde habitan #4 y #13) (Torre & Rodríguez 1964), si bien el origen de estas repoblaciones continúa sin conocerse. Las actividades de repoblación han sido especialmente activas en las provincias del centro de España, así por ejemplo en Cuenca (muestras #5, #19 y #23) cerca del 35% de las poblaciones son repobladas. Pero también en el norte, donde el 25% de las poblaciones en Álava (muestra #20) o el 10% de las navarras (muestra #18) provienen de astacifactorías (Alonso et al. 2000). Toda esta documentación permite poner en perspectiva las estimas de flujo génico obtenidas. La restauración activa de las poblaciones del cangrejo autóctono, en algunos casos fuera del área original de la especie como Galicia (#4 y #13) y Asturias (#3 y #14), podría explicar tanto estas estimas de migración obtenidas, como la aparición en el norte de España de características de poblaciones de cangrejos más meridionales.

No obstante, las peculiaridades genéticas encontradas en algunas de las poblaciones analizadas parecen apuntar a una escasa influencia antropogénica en determinadas regiones. Por ejemplo, hasta donde sabemos no hay constancia documental de actuaciones humanas en el área donde se localiza la población castellonense de Barranco del Salt (#22) quizá porque habita un terreno de muy difícil acceso. En este caso, la presencia de alelos nucleares exclusivos (Figura N3 y Tabla N4) y haplotipos mitocondriales únicos (Capítulo 1, Tablas M4 y M5) indican que esta población lleva largo tiempo establecida. Además, su pertenencia a un

solo grupo genético ancestral confinado a un área bastante localizada (K3) revela un flujo genético muy restringido con las poblaciones circundantes (Tablas N7 y N8 y Figura N11).

Como se ha comentado en el capítulo (anterior, posterior, el del mitocondrial) la presencia de los cangrejos de agua dulce en la Península Ibérica aparece citada con frecuencia en la literatura científica como ejemplo de introducción antropogénica desde Italia durante el s. XIX, aunque no se aportan datos históricos que sustenten esta hipótesis. En uno de los trabajos que más repercusión ha tenido en este aspecto (Grandjean et al. 2001), se analizaron catorce poblaciones españolas de *Austropotamobius* mediante RFLP de DNAm<sub>t</sub>, encontrando en todas ellas el mismo haplotipo, idéntico al previamente descrito en poblaciones italianas. Hay que señalar que doce de las catorce muestras pertenecían a la misma cuenca hidrográfica y a la misma Comunidad Autónoma, Navarra.

El esfuerzo de muestreo realizado en este trabajo permite poner de manifiesto que, debido a las condiciones biogeográficas de la Península Ibérica, extraer conclusiones acerca de la filogeografía de esta especie en España a partir de un número reducido de muestras pertenecientes a regiones geográficas próximas es arriesgado. Nuestros resultados confirman que las poblaciones italianas están más relacionadas con las poblaciones del norte de España (Figuras N4 – N7 y N11), de donde procedían las muestras analizadas por Grandjean et al. (2001), que con las restantes.

El otro argumento que se ha propuesto para apoyar el origen antropogénico del cangrejo de río en España, es la falta de variación genética dentro las poblaciones y la falta de diferenciación entre ellas. En cambio, diversos estudios (Diéguez – Uribeondo et al. 2008; Pedraza – Lara et al. 2010; Santucci et al. 1997), incluyendo los resultados de nuestros propios trabajos (Beroiz et al. 2008; Callejas et al. 2009; Capítulo 1), revelan la existencia de variabilidad y un patrón de distribución de la misma en las poblaciones ibéricas que difícilmente se puede explicar tras un efecto fundador por translocaciones recientes desde Italia. Por tanto, la variabilidad genética observada y su patrón de distribución, no permiten descartar la hipótesis de un origen nativo de la especie en la Península Ibérica y, aunque las translocaciones desde Italia hubiesen tenido lugar, poblaciones naturales e introducidas pueden coexistir.

### **Implicaciones para la conservación**

El conocimiento de los niveles y patrones de distribución de la variabilidad genética, la base de la viabilidad y la evolución de las poblaciones (Avice 2000; Moritz et al. 2002), es

crítico cuando se toman decisiones concernientes a la conservación de las especies. El mantenimiento de la variación y estructura poblacional en especies amenazadas, puesta de manifiesto mediante técnicas moleculares (Crandall et al. 2000), debería ser un objetivo prioritario en la gestión de su conservación.

La pérdida de la diversidad genética expone a las poblaciones españolas silvestres de cangrejo de río a un mayor riesgo de extinción (Reed & Frankham 2003). Se ha observado que las poblaciones analizadas presentan niveles de variabilidad genética similares y en algunos casos superiores a los encontrados en otras poblaciones europeas. Estos niveles de variación moderados encontrados en algunas poblaciones suponen una esperanza para su recuperación en la Península Ibérica. Sin embargo, hay que tener presente que el exceso de homocigosis y las altas estimas de  $F_{IS}$  detectadas (Tabla N4), características de poblaciones que han atravesado cuellos de botella (Garza & Williamson 2001), son factores que no juegan a su favor. En el presente escenario, sobreviven alrededor de mil poblaciones de cangrejos de río pequeñas y aisladas (Alonso comunicación personal, 2013), donde la endogamia puede reducir la eficacia biológica de los individuos (Frankham et al. 2002) y aumentar la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (O'Brien & Evermann 1988), con el consiguiente peligro de extinción.

Desde un punto de vista de la conservación a corto plazo y dada la distribución de la variabilidad genética encontrada en la Península Ibérica, se pueden distinguir dos grandes grupos de poblaciones que deberían tratarse como unidades de manejo (MU) independientes. La primera de estas unidades incluiría a las poblaciones del norte de España, en las provincias de Burgos, Navarra y País Vasco (#11, #15, #18 y #20), mientras que la segunda MU estaría formada por las demás poblaciones. Sería aconsejable emplear poblaciones locales que alberguen cierta variabilidad genética respecto a la población receptora para los propósitos de restauración dentro de cada MU, como medio para incrementar la heterocigosis. De esta manera se podría ayudar a evitar la pérdida de la diversidad genética que las caracteriza, así como la erosión de la riqueza genética de estas poblaciones en su conjunto.



## Capítulo 3

---

Reevaluación taxonómica del complejo de especies  
*Austropotamobius pallipes* mediante marcadores  
mitocondriales



## Introducción

El orden Decápoda es el grupo más conocido de todos los crustáceos (De Grave et al. 2009), e incluye cangrejos ‘verdaderos’ (*Brachyura*), cangrejos ermitaños (*Anomura*), camarones (*Dendrobranchiata*, *Caridea* y *Stenopodidea*) y langostas (*Astacidae* y *Thalassinidea*), entre otros (Martin et al. 2009).

Los cangrejos de agua dulce se engloban en el infraorden *Astacidea* que alberga dos superfamilias, *Parastacoidea*, en el hemisferio sur, y *Astacoidea* en el hemisferio norte, con las familias *Astacidae* en Europa y *Cambaridae* en América.

Los astácidos son animales con un papel clave en la regulación de los ecosistemas que habitan no sólo por la elevada biomasa que pueden llegar a representar dentro de la comunidad macroinvertebrada de ríos y lagunas y la baja tasa de renovación de sus poblaciones, sino también por sus hábitos alimenticios, que incluyen la totalidad de los niveles tróficos. Además, varias de sus especies también poseen importancia económica dado el interés que tiene su cría para el consumo humano. De ahí que la mayoría de las investigaciones realizadas se hayan centrado en el estudio de su ecología, fecundidad y las enfermedades que pueden contraer, fundamentalmente en las astacifactorías (Evans & Edgerton 2002; Holdich 2002; Reynolds 2002; Rode & Babcock 2003). Sólo recientemente los estudios han abordado aspectos filogeográficos, en parte para revisar su taxonomía y en parte, dado el dramático declive de las poblaciones de algunas de las especies, para elaborar políticas de conservación eficaces.

Los cangrejos europeos han sido objeto de sucesivas revisiones taxonómicas, que al nivel más sencillo, han establecido una clasificación con un solo género y cinco especies, y en el más complejo, cinco géneros y diecinueve especies. Actualmente se ha llegado a un consenso al reconocer un género, *Austropotamobius* y dos especies, *A. torrentium* y *A. pallipes*. El cangrejo de río *A. pallipes* es nativo de Europa y está ampliamente distribuido por el oeste y sur del continente. Su área de distribución abarca de Montenegro a España, de este a oeste, y de las Islas Británicas a las regiones más meridionales de España e Italia (Souty – Grosset et al. 2006). La taxonomía y sistemática de *A. pallipes* es bastante compleja y no existe un acuerdo sobre el número, nomenclatura y distinción de las especies y subespecies que la componen.

Los primeros estudios del complejo de especies *A. pallipes*, se basaron en caracteres morfológicos y merísticos aun cuando estos métodos, a veces, no proporcionan una delimitación precisa de especies estrechamente relacionadas (Souty – Grosset & Reynolds 2009). La plasticidad fenotípica y la variabilidad en los caracteres empleados para el reconocimiento de especies pueden conducir a identificaciones incorrectas. Algunas claves taxonómicas pueden ser efectivas sólo en determinados estados del desarrollo y muchos individuos no pueden ser reconocidos correctamente (Hebert et al. 2003). Así, se han defendido varias clasificaciones por otros tantos autores basándose en métodos clásicos. De Bott (1950) a Starobogatov (1995) (Tabla T1), la taxonomía morfológica ha distinguido entre una y cuatro especies, y hasta cinco subespecies.

Donde los datos morfológicos han resultado ser inconclusos, los marcadores genéticos pueden proporcionar indicadores precisos e inequívocos de divergencia taxonómica (Wilson et al. 1985). Por ello, las herramientas moleculares han cobrado gran importancia entre los biólogos sistemáticos, y en particular, entre aquellos que estudian decápodos (Martin et al. 2009). Gracias a estas herramientas se han podido resolver conflictos taxonómicos y detectar especies crípticas y/o polimórficas (Puillandre et al. 2011; Xiao et al. 2010).

Desde finales del siglo XX la aplicación de marcadores moleculares al estudio de los astácidos ha permitido realizar importantes avances en el conocimiento de su filogenia, sistemática y taxonomía. Pero en el género *Austropotamobius* las nuevas herramientas taxonómicas basadas en caracteres moleculares (Chiesa et al. 2011; Fratini et al. 2005; Grandjean et al. 1998, 2000c, 2002a, b; Scalici & Bravi 2012; Trontelj et al. 2005; Tabla T1) no siempre concuerdan entre sí ni con la taxonomía basada en caracteres morfológicos. Como consecuencia existe en la literatura una considerable controversia sobre este complejo de especies. La mayoría de las revisiones taxonómicas moleculares llevadas a cabo con DNA mitocondrial (DNAmt), coinciden en que *A. pallipes* sensu lato se compone de dos especies, *A. pallipes* y *A. italicus*, con un número de subespecies variable, dependiendo del autor. Ésta ha sido la clasificación más aceptada en los últimos diez años, pero en 2011 Chiesa et al., trabajando con AFLP, no encontraron la suficiente variación en el genoma nuclear como para apoyar los linajes identificados a nivel mitocondrial, y por tanto, consideraron que *A. pallipes* sensu lato es en realidad una sola especie, *A. pallipes*.

Las poblaciones españolas del cangrejo de río son un ejemplo de los controvertidos cambios en la taxonomía del grupo. Desde que Bott basándose en caracteres clásicos (1950, 1972), propusiera que las poblaciones de la Península Ibérica pertenecían a *A. pallipes*

*lusitanicus*, una subespecie distinta a la presente en el resto de Europa, su estatus taxonómico ha cambiado en varias ocasiones. Los primeros estudios moleculares (Grandjean et al. 1998) mantuvieron esa nomenclatura, pero pronto las poblaciones ibéricas se incluyeron en una nueva especie, *A. italicus* (Grandjean et al. 2000c), y ahora se las adscribe a una subespecie que aún no se reconoce oficialmente, *A. italicus italicus* (Fratini et al. 2005; Grandjean et al. 2002a). Aunque su pertenencia a esa subespecie ha sido ampliamente aceptada durante años, las últimas revisiones morfológicas y moleculares (Chiesa et al. 2011; Scalici & Bravi 2012) abogan por la existencia de una sola especie, y por tanto, las poblaciones españolas de cangrejo de río se denominarían de nuevo *A. pallipes*.

A pesar de los sucesivos intentos por esclarecer la taxonomía del grupo, empleando diferente marcadores morfológicos y/o marcadores moleculares, el número de especies, subespecies, variedades o linajes propuestos varían dependiendo del criterio del autor acerca de lo que es una especie (Souty – Grosset & Reynolds 2009). Delimitar especies no es un problema que sólo se circunscriba al estudio de los cangrejos de agua dulce, sino que es un tema polémico y ampliamente debatido, por lo que han surgido una gran cantidad de definiciones para el concepto de especie, muchas de ellas, conflictivas y en ocasiones contradictorias. Durante décadas éste parecía ser un debate sin fin, pero últimamente el concepto unificado de especie parece ir consiguiendo una amplia aceptación. Bajo este concepto se equipara especie con linajes de metapoblaciones que evolucionan de manera separada, o más específicamente, segmentos de tales linajes (De Queiroz 1998; 1999; 2005 a, b, c). Este concepto no excluye a los anteriores sino que los incorpora como criterios operacionales o líneas de evidencia relevantes para evaluar la separación de los linajes y para definir subcategorías dentro de especie (De Queiroz 2007). Así, el debate se traslada desde cómo delimitar los linajes, a decidir cuándo un linaje ha divergido lo suficiente para ser considerado una especie distinta (Wiens 2007).

A este respecto, el concepto de *DNA barcoding* ha supuesto una verdadera revolución para la taxonomía. Brevemente, Hebert et al. (2003) propusieron que se podrían identificar especímenes animales analizando parte de un solo gen mitocondrial, asignarlos a especies reconocidas, e incluso, establecer nuevas especies. El gen que más se ha usado en animales con estos fines ha sido, y sigue siendo, el gen mitocondrial codificante de la citocromo oxidasa subunidad I (COI). Pero existen otros marcadores como el 16S DNAr, también mitocondrial, que se están evaluando dado su extenso uso en taxonomía molecular. Puesto que la tasa de evolución del DNAm es menor en las plantas, se han propuesto genes de cloroplastos como los codificantes para la maturasa K (matK) y la subunidad grande de la RuBisCo (Ribulosa – 1,5

– Bifosfato Carboxilasa Oxigenasa) (rbcl) para estos estudios. En contraste con el limitado número de caracteres morfológicos disponibles, los cuatro nucleótidos presentes en estas cortas secuencias de DNA (de entre 500 y 600 bases) proporcionan, prácticamente, un número infinito de combinaciones. En una década el *DNA barcoding* ha agilizado la asignación de ejemplares a las especies existentes, ha acelerado el descubrimiento de otras muchas y se ha presentado como la manera de superar los problemas asociados a la taxonomía clásica (Goldstein & DeSalle 2010). A raíz de la publicación de Hebert et al. (2003) la idea ha sido muy debatida (Blaxter 2004; Dasmahapatra & Mallet 2006; Frézal & Leblois 2008; Hickerson et al. 2006; Moritz & Cicero 2004; Song et al. 2008 entre otros), pero al mismo tiempo, ha sido ampliamente aceptada. En realidad, la metodología del *DNA barcoding* no es nueva, pero los avances en las tecnologías de secuenciación y los aspectos computacionales de su análisis lo han convertido en una parte sustancial de la información necesaria para avanzar en la comprensión de las relaciones evolutivas y genéticas (Hajibabaei et al. 2007).

La avalancha de datos genéticos de *DNA barcoding* provenientes de distintos organismos puso de manifiesto la necesidad del análisis previo de la diversidad genética del grupo de estudio, como requisito para poder discriminar especies empleando uno, o pocos, marcadores moleculares. Desde este punto de partida, se han propuesto varios métodos para establecer un límite entre la divergencia intra- y la interespecífica. Se puede destacar el límite del 3% de divergencia genética entre los individuos de una misma especie propuesto por Smith (2005) o la regla del 10x de Hebert (2004), según la cual el límite de variación en una especie se establecería como 10 veces su variabilidad intraespecífica. A pesar de las diferentes aproximaciones, no se ha encontrado un límite o umbral universal (Bichain et al. 2007; Fergusson 2002; Gómez et al. 2007; Holland et al. 2004) y además, en varios estudios (Elias et al. 2007; Smith et al. 2008; Wiemers & Fiedler 2007) se ha puesto de manifiesto que, a menudo, las distancias intra- e inter- específicas solapan, por lo que es difícil definir un nivel umbral de divergencia genética para separar especies.

Los datos procedentes de *DNA barcoding*, como el resto de las secuencias, se suelen analizar mediante métodos de agrupación, como el del vecino más próximo. Pero gracias al interés que ha despertado el *barcoding*, se están desarrollando otras metodologías más complejas, que incluyen pruebas estadísticas para la asignación de especies (como en Abdo & Golding 2007; Meier et al. 2008; Nielsen & Matz 2006; Puillandre et al. 2012) y métodos de agrupación basados en caracteres (DeSalle et al. 2005, entre otros).

En la Tabla T1, que resume las revisiones taxonómicas efectuadas en *A. pallipes*, queda patente que casi todas las aproximaciones moleculares llevadas a cabo se han basado en el estudio del DNA mitocondrial (DNAMt). Especialmente en dos genes, el gen codificante de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) y un gen de RNA ribosómico, el 16S. No obstante, hay que resaltar que la mayoría de estos estudios se han restringido a un área geográfica reducida, han analizado un pequeño tamaño muestral o han limitado el estudio a un solo gen.

Dados los avances que se han producido en la taxonomía molecular, en este capítulo nos hemos propuesto realizar una reevaluación taxonómica y sistemática del complejo de especies *Austropotamobius pallipes*, aprovechando la práctica totalidad de la información disponible sobre los genes COI y 16S depositada en las bases de datos genéticas. Además, nos hemos propuesto plasmar las principales conclusiones de este trabajo sobre mapas físicos. Con ello pretendemos obtener una panorámica detallada de la distribución geográfica de la variabilidad genética del cangrejo de río en Europa y facilitar la comprensión de la taxonomía de este complejo de especies.

Introducción

Autor(es)	Género	Especie	Subespecie	Tipo de datos
Lereboullet 1858	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>	<i>pallipes</i>	Morfológicos
	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>	<i>pallipes</i>	
Bott 1950, 1972			<i>italicus</i>	Morfológicos
			<i>lusitanicus</i>	
		<i>berndhauseri</i>		
Karaman 1963	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>		Morfológicos
	<i>Austropotamobius</i>	<i>italicus</i>	<i>italicus</i>	
			<i>lusitanicus</i> <i>carsicus</i>	
Albrecht 1982	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>	<i>pallipes</i>	Morfológicos
			<i>lombardicus</i>	
			<i>carinthiacus</i> <i>trentinicus</i>	
Brodsky 1983	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>	<i>pallipes</i>	Morfológicos, ecológicos y biogeográficos
			<i>bispinosus</i>	
		<i>italicus</i>	<i>italicus</i>	
			<i>lusitanicus</i> <i>carsicus</i>	
Pretzmann 1987	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>	<i>pallipes</i>	Morfológicos
			<i>fulcisonus</i> (= <i>italicus</i> )	
Starobogatov 1995	<i>Atlantoastacus</i>	<i>pallipes</i>	<i>pallipes</i>	Morfológicos
			<i>rhodanicus</i>	
		<i>fulcisianus</i>	<i>lusitanicus</i>	
			(= <i>A. berndhauseri</i> + <i>A. p. lombardicus</i> + <i>A. p. trentinicus</i> )	
			<i>italicus</i>	
		<i>orientalis</i>	<i>orientalis</i> (= <i>carsicus</i> ) <i>carinthiacus</i>	
Santucci et al. 1997	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>		Alozimas
		<i>italicus</i>		
Grandjean et al. 1998	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>	<i>pallipes</i>	Morfológicos y RFLP de DNAm completo
			<i>italicus</i> <i>lusitanicus</i>	
Grandjean et al. 2000c	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>	<i>pallipes</i>	DNAm – 16S DNAr
		<i>italicus</i>	<i>italicus</i>	
			<i>carsicus</i>	
			<i>carinthiacus</i> <i>lusitanicus</i>	
Grandjean et al. 2002a, b	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>	<i>pallipes</i>	DNAm – 16S DNAr
	<i>Austropotamobius</i>	<i>italicus</i>	<i>italicus</i>	
			<i>carsicus</i>	
			<i>carinthiacus</i>	
Fratini et al. 2005	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>		DNAm – 16S DNAr
		<i>italicus</i>	<i>italicus</i>	
			<i>meridionalis</i>	
			<i>carsicus</i> <i>carinthiacus</i>	
Trontelj et al. 2005	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>		DNAm – COI
Chiesa et al. 2011	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>		DNAm – COI y AFLP
Scalici & Bravi 2012	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>		Morfológicos

**Tabla T1.** Revisiones taxonómicas del complejo de especies *Austropotamobius pallipes*.

## Materiales y métodos

### Material

Con el fin de analizar la mayor cantidad de información posible sobre este complejo de especies se han incluido los haplotipos identificados en este trabajo y secuencias de *Austropotamobius pallipes* s.l. de la base de datos GenBank. De todas las secuencias encontradas para los marcadores 16S y COI, se han utilizado aquellas que no contuvieran indeterminaciones y cuyo artículo de referencia facilitara la localización geográfica de las muestras. En total, se ha recopilado información sobre 2518 cangrejos, 266 lugares de muestreo y 132 haplotipos (Tabla T2).

En resumen, se han elaborado 3 conjuntos de datos:

- I) 16S DNAr: Alberga los 13 haplotipos identificados en el presente trabajo y otros 56 haplotipos de GenBank extraídos de 383 animales provenientes de 131 lugares de muestreo. En total, este set de datos incluye 69 haplotipos de 637 especímenes y 158 poblaciones. La longitud de las secuencias analizadas es de 464 nucleótidos.
- II) COI (I): Contiene los 13 haplotipos detectados en este trabajo y 63 haplotipos de GenBank, correspondientes a 2052 ejemplares de 154 poblaciones. Este set contiene 76 haplotipos de 2317 especímenes y 182 poblaciones. La longitud de las secuencias analizadas en este caso es de 360 bases.
- III) COI (II): En el conjunto anterior, la inclusión de prácticamente todas las secuencias de *Austropotamobius pallipes* s. l. disponibles condujo al análisis de un limitado número de nucleótidos. Por ello, en este nuevo set se han seleccionado 41 haplotipos que junto con nuestros datos, suponen un total de 54 haplotipos de 551 cangrejos y 110 lugares de muestreo. De esta manera, se ha podido analizar un fragmento mayor de este gen, 533 nucleótidos.

Adicionalmente, se han seleccionado secuencias de organismos pertenecientes a otros géneros y familias como referencias externas, para llevar a cabo determinados análisis. En concreto, varias secuencias de *Austropotamobius torrentium*, *Procambarus clarkii* y *P. fallax* (ver Métodos y Tabla T2).

Lugar de muestreo	16S	COI	16S   COI (I)   COI (II)
Acquapendente, Alta Tuscia, IT		AY121111 <sup>g</sup>	12 .   c15   .
Aguamula, Jaén, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup> , HM622603 <sup>i</sup>	3 S22   c33   C22, C28
Albera, Catalunya, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup> , HM622610 <sup>i</sup> , HM622611 <sup>i</sup>	10 S22   c33   C28
Albuñuelas, Granada, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup>	10 S22 (Sa)   c33   C28
Alcaucín, Málaga, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3 S22   c33   C28
Almijara, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3 S22   c33   C28
Altube, Álava, ES	EF489427 <sup>b</sup>	EF485041 <sup>b</sup>	10 S22 (Sd)   c33   C28
Amanaderos, Aragón, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622603 <sup>i</sup>	3 S22   c33   C22
Amandole, Esino River, Marches, IT	EU077568 <sup>e</sup> , EU077569 <sup>e</sup> , EU077570 <sup>e</sup>	EU077568 <sup>c</sup> , EU077569 <sup>c</sup> , EU077570 <sup>c</sup>	12 .   c15, c25, c28   C11, C12, C19
Arcos de las Salinas, Valencia, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3 S22   c33   C28
Arenas del Rey, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3 S22   c33   c28
Arno, Arezzo, IT	EU308123 <sup>a</sup> , EU308124 <sup>a</sup>		5 S24, S27   .   .
Arvigo, Bisagno, IT	AY611202 <sup>e</sup>		1 S1   .   .
Asabón, Aragón, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3 S22   c33   C28
Avasinis, Carnia, IT		AY121124 <sup>g</sup>	29 .   c11   .
Badia di M., App. Romagnolo, IT		AY121115 <sup>g</sup>	30 .   c33   .
Batania, Koupa, Políastro, GR		AY667138 <sup>j</sup>	2 -
Bco. De Fago, Aragón, ES		HM622601 <sup>i</sup> , HM622603 <sup>i</sup>	3 .   c33   C22, C28
Beceite, Aragón, ES		AY121115 <sup>g</sup>	52 .   c33   .
Beceite, Teruel, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup>	10 S22 (Sa)   c33   C28
Bieno, Fondo Toce, IT		AY121114 <sup>g</sup> , AY121116 <sup>g</sup>	21 .   c36, c38   .
Bisenzio, Prato, IT	EU308122 <sup>a</sup> , EU308126 <sup>a</sup> , EU308127 <sup>a</sup>		25 S14, S15, S22   .   .
Bisignano, App. Marchigiano, IT		AY121111 <sup>g</sup>	11 .   c15   .
Bologne, IT	AF237603 <sup>f</sup> , AF237604 <sup>f</sup>		2 S22, S29   .   .
Borbona, Monti Reatini, IT		AY121111 <sup>g</sup>	11 .   c15   .
Borenitzr Bach, Weissbriach, Hermagor, AT		AY667112 <sup>j</sup>	1 .   c10   C9
Borgo Priolo (Coppa), IT	AY521289 <sup>k</sup>		2 S16   .   .
Borgo Ticino, Pianura Padana, IT		AY121114 <sup>g</sup>	20 .   c36   .
Borgo Velino, Monti Reatini, IT		AY121111 <sup>g</sup>	32 .   c15   .
Borosa, Jaén, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3 S22   c33   C28
Bottazzo, Carso Triestino, IT		AY121121 <sup>g</sup>	45 .   c27   .
Bracana Potok, Buzet, HR		AY667109 <sup>j</sup>	2 .   c17   C15
Bracchio, Bassa Val d'Ossola, IT		AY121116 <sup>g</sup>	32 .   c38   .
Breginj, Prealpi Giulie, SI		AY121118 <sup>g</sup>	40 .   c4   .
Brescia (Chiese), IT	AY521288 <sup>k</sup>		1 S8   .   .
Briosco (Lambro), IT	AY521289 <sup>k</sup>		2 S16   .   .
Buzet, Istria, HR		AY121119 <sup>g</sup>	47 .   c18   .
Cabañeros, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup> , HM622604 <sup>i</sup> , HM622605 <sup>i</sup>	3 S22   c33, c34   C23, C24, C28
Cabra, Córdoba, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3 S22   c33   C28

Campo de Arriba, Valencia, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Campotejar, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622606 <sup>i</sup>	1	S22   c33   C26
Campotosto, Monti della Laga, IT		AY121111 <sup>g</sup>	40	.   c15   .
Canal Blancherie (Rhône), Les Poujes, CH	AJ242708 <sup>h</sup>		1	S18   .   .
Cangas de Onís, Asturias, ES	EF489427 <sup>b</sup>	FJ897843 <sup>m</sup>	20	S22 (Sd)   c33   C28
Canzo (Lambro), IT	AY521289 <sup>k</sup>		2	S16   .   .
Caramanico Terme, Majella, IT		AY121111 <sup>g</sup>	30	.   c15   .
Casalese (Stura), IT	AY521290 <sup>k</sup>		2	S20   .   .
Casali, App. Ligure – Emiliano, IT		AY121114 <sup>g</sup>	34	.   c36   .
Casalzuigno, Prealpi Lombarde, IT		AY121114 <sup>g</sup>	38	.   c36   .
Casanno Sp (Predasso), IT	AY521291 <sup>k</sup>		2	S21   .   .
Casbas de Huesca, Huesca, ES	JF430574 <sup>m</sup> , JF430576 <sup>m</sup> , EF489427 <sup>b</sup>	EF485041 <sup>b</sup> , FJ897840 <sup>m</sup> , JF430567 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa), S22 (Se), S22 (Sd)   c33   C28
Castellote, Teruel, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup> , FJ897841 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C22, C28
Castelluccio, IT		AY121112 <sup>g</sup>	1	.   c24   .
Castro de Rei, Lugo, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C28
Cateletto (Orba), IT	AY521290 <sup>k</sup>		3	S20   .   .
Cazorla, Jaén, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Cehovini, Carso, SI		AY121126 <sup>g</sup>	30	.   c7   .
Claro, Cantón Ticino, CH		AY121114 <sup>g</sup>	35	.   c36   .
Clivio, Po, IT	AY611183 <sup>e</sup> , AY611185 <sup>e</sup>		2	S16   .   .
Clodig, Prealpi Giulie, IT		AY121118 <sup>g</sup>	16	.   c4   .
Contone, Cantón Ticino, CH		AY121114 <sup>g</sup>	60	.   c36   .
Coscile, Crati, IT	AY611192 <sup>e</sup>		2	S14   .   .
Coto Ríos, Jaén, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup> , HM622603 <sup>i</sup>	4	S22   c33   C22, C28
Cremona (Ora), IT	AY521292 <sup>k</sup>		2	S9   .   .
Crostolo, Modolena (Pò), IT	AJ242705 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Cucalón, Teruel, ES	JF430574 <sup>m</sup> , JF430577 <sup>m</sup> , JF430579 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup> , FJ897841 <sup>m</sup> , JF430571 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa), S22 (Sb), S22 (Sg)   c33   C22, C28
Cugnasco, Cantón Ticino, CH		AY121114 <sup>g</sup>	11	.   c36   .
Damodossola (Toce), IT	AY521289 <sup>k</sup>		2	S16   .   .
Donje Postinje, Dalmazia, HR		AY121120 <sup>g</sup>	16	.   c6   .
Dragonja River, Piran, SI		AY667107 <sup>j</sup>	2	.   c29   C18
El Pont de Suert, Lérida, ES	JF430574 <sup>m</sup> , JF430575 <sup>m</sup>	FJ897841 <sup>m</sup> , FJ897844 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C22
El Pozuelo, Cuenca, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897841 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C22
El Rasillo, La Rioja, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Estella, Navarra, ES	EF489427 <sup>b</sup>	EF485041 <sup>b</sup> , JF430572 <sup>m</sup>	10	S22 (Sd)   c33   C28
Eyrieux/Doux (Rhône) Lamastre (Ardeche), FR	AJ242700 <sup>h</sup>		1	S1   .   .
Faldetores, La Rioja, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Fallopia (Ticino, Pò) Seseglio, CH	AJ242706 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Farfereta, Arno, IT	AY611187 <sup>e</sup> , AY611188 <sup>e</sup>		2	S25, S26   .   .
Farnese, Alta Toscana, IT		AY121111 <sup>g</sup>	30	.   c15   .
Felizzano (Tanaro), IT	AY521292 <sup>k</sup>		3	S9   .   .
Ferrano, Valdarno, IT		AY121115 <sup>g</sup>	34	.   c33   .

Firenze, IT	JF430578 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup>	10	S28 (Si)   c33   C28
Foce, Massiccio del Pollino, IT		AY121111 <sup>g</sup>	20	.   c15   .
Fondrats, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622608 <sup>i</sup> , HM622614 <sup>i</sup> , HM622615 <sup>i</sup>	4	S22   c33   C22
Fraille, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Fresnedilla, Jaén, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup> , HM622602 <sup>i</sup>	3	S22   c33, c35   C27, C28
Garrotxa, Catalunya, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup> , HM622609 <sup>i</sup>	10	S22   c33   C28
Gavi (Lemme), IT	AY521287 <sup>k</sup>		2	S7   .   .
Genes, FR	AF237596 <sup>f</sup>		1	S1   .   .
Genoa, IT		FJ897840 <sup>m</sup>	1	.   c33   C28
Gitchtal, Alpi della Gail, AT		AY121117 <sup>g</sup>	30	.   c10   .
Glinscica Creek, Ljubljana, SI		AY667110 <sup>j</sup>	2	.   c27   C17
Gójar, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Granada, Andalucía, ES		AY121115 <sup>g</sup>	23	.   c33   .
Grogardo, Appennino Ligure, IT		AY121111 <sup>g</sup>	15	.   c15   .
Guadix, Granada, ES		AY667114 <sup>j</sup>	1	.   c33   C28
Guajar, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Gubbio, Appennino Umbro, IT		AY121113 <sup>g</sup>	10	.   c20   .
Gumpen (Rhine), Zizers, CH	AJ242705 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Higuera, Valencia, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Hornero, Aragón, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622603 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C22
Huerta de Obispalía, Cuenca, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897841 <sup>m</sup> , JF430568 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C22, C29
Idrija, Carso, SI		AY121118 <sup>g</sup>	110	.   c4   .
Iggio, Appennino Emiliano, IT		AY121114 <sup>g</sup>	27	.   c36   .
Jezero Modro Oko, Ploce, HR		AY667106 <sup>j</sup> , AY667116 <sup>j</sup>	2	.   c6   C5, C6
Konavoski Dvori, Dubrovnik, HR		AY667106 <sup>j</sup>	1	.   c6   C6
Krebsbach, Sankt Daniel, Hermagor, AT		AY667112 <sup>j</sup>	2	.   c10   C9
Kriebenbachl, Tresdorf, Hermagor, AT		AY667112 <sup>j</sup>	1	.   c10   C9
La Pobla de Benifassà, Castellón, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup> , FJ897841 <sup>m</sup> , FJ897845 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C22, C28
Lac Grond (Rhine), Laax, CH	AJ242704 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Laghi del Botasso (Pò), Palanzano, IT	AJ242706 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Lake Caldonazzo, Brenta, IT	AY611198 <sup>e</sup>		1	S11   .   .
Lake Ercina, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	4	S22   c33   C28
Lama, Bidente – Ronco, IT	AY611189 <sup>e</sup>		2	S24   .   .
Lambro, Po, IT		AY611183 <sup>e</sup> , AY611184 <sup>e</sup> , AY611185 <sup>e</sup> , AY611195 <sup>e</sup> , AY611196 <sup>e</sup> , AY611197 <sup>e</sup>	10	S9, S16   .   .
Landquart (Rhine), Schiers, CH	AJ242705 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Las Illas, Pyrénées Orientales, ES		AY121111 <sup>g</sup> , AY121115 <sup>g</sup>	50	.   c15, c33   .
Lazuola, Po, IT	AY611183 <sup>e</sup>		3	S16   .   .

Lemme, Po, IT	AY611201 <sup>e</sup>		2	S1   .   .
Les Preses, Catalunya, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Leza, La Rioja, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Licenza, Monti Sabini, IT		AY121111 <sup>g</sup>	20	.   c15   .
Linarejos, Jaén, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Lindenbach (Limmat, Rhine), Obfelden, CH	AJ242701 <sup>h</sup>		1	S1   .   .
Loja, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	2	S22   c33   C28
Longeau – River, Fresnes – en – Woëvres, FR		AY667115 <sup>j</sup>	1	.   c2   C1
Lucena del Cid, Castellón, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C28
Lugán, León, ES	EF489427 <sup>b</sup> , JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup> , EF485041 <sup>b</sup> , FJ897843 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa), S22 (Sd)   c33   C28
Lusema (Pellice), IT	AY521286 <sup>k</sup>		2	S1   .   .
Magra, Massa, IT	EU308125 <sup>a</sup>		10	S16   .   .
Marconaga (Adda), IT	AY521292 <sup>k</sup>		2	S9   .   .
Meride, Cantón Ticino, CH		AY121114 <sup>g</sup>	40	.   c36   .
Mlake, Vipava, SI		AY667108 <sup>j</sup> , AY667117 <sup>j</sup>	2	.   c4, c5   C3, C4
Molí del'Esquirola, Catalunya, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622603 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C22
Moulin des Adrets Creek, Brignoud, FR		AY667115 <sup>j</sup>	1	.   c2   C1
Monte Barro (Adda), IT	AY521292 <sup>k</sup>		1	S9   .   .
Montecrestese, Alta Val d'Ossola, IT		AY121114 <sup>g</sup>	38	.   c36   .
Montejaque, Málaga, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup> , HM622605 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C23, C28
Montenotte, Po, IT	AY611204 <sup>e</sup>		1	S2   .   .
Monti Berici (Adige), Vicenza, IT	AJ242710 <sup>h</sup> , AJ242711 <sup>h</sup>		4	S10   .   .
Montsant, Catalunya, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622603 <sup>i</sup>	4	S22   c33   C22
Moosbach (Aare, Rhine), Ursenbach, CH	AJ242703 <sup>h</sup>		1	S1   .   .
Moosbachl, Sankt Georgen, Bruneck, IT		AY667113 <sup>j</sup>	1	.   c8   C7
Nava (Lambro), IT	AY521289 <sup>k</sup>		2	S16   .   .
Nirano, Appennino Emiliano, IT		AY121115 <sup>g</sup>	17	.   c33   .
Nordkanal (Rhône), Raron, CH	AJ242708 <sup>h</sup>		1	S18   .   .
O Riolo Romano, Monti Sabatini, IT		AY121111 <sup>g</sup>	22	.   c15   .
Odolina, Carso, SI		AY121121 <sup>g</sup>	10	.   c27   .
Olgiate C. (Lambro), IT	AY521289 <sup>k</sup>		2	S16   .   .
Olot, Gerona, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup> , JF430569 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C28
Opfingen, Freiburg im Breisgau, DE		AY667115 <sup>j</sup>	1	.   c2   C1
Orozco, País Vasco, ES		AY121115 <sup>g</sup>	20	.   c33   .
Osapska reka, Koper, SI		AY667120 <sup>j</sup>	1	.   c26   C16
Ottone, Appennino Ligure, IT		AY121114 <sup>g</sup>	20	.   c36   .
Padrones de Bureba, Burgos, ES	EF489427 <sup>b</sup>	FJ897843 <sup>m</sup> , JF430570 <sup>m</sup>	10	S22 (Sd)   c33   C25, C28
Palazzolo S., App. Romagnolo, IT		AY121115 <sup>g</sup>	10	.   c33   .
Pantano, Massiccio del Pollino, IT		AY121112 <sup>g</sup>	8	.   c24   .
Papiano di Stia, Casentino, IT		AY121115 <sup>g</sup>	40	.   c33   .

Paterno, Monti della Maddalena, IT		AY121111 <sup>g</sup>	8	.   c15   .
Paudèze (Rhône), Les Fiolettes, CH	AJ242703 <sup>h</sup> , AJ242708 <sup>h</sup>		3	S1, S18   .   .
Piave Murin (Ticino, Pô) Ligornetto, CH	AJ242705 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Pied des Champs (Rhône) Ardon, CH	AJ242708 <sup>h</sup>		1	S18   .   .
Pistoia, IT		FJ160743 <sup>d</sup> , FJ897840 <sup>m</sup>	10	.   c32, c33   C28
Plansee (Danube), Plansee, AT	AJ242706 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Plansee, AT	AF237600 <sup>f</sup> , AF237607 <sup>f</sup>		2	S16, S17   .   .
Podovia Bach, Sankt Lorenzen, Hermagor, AT		AY667112 <sup>j</sup>	1	.   c10   C9
Poitou – Charentes, France	JF430583 <sup>m</sup> , JF430584 <sup>m</sup> , JF430585 <sup>m</sup>		3	S3 (Sk, Sl, Sm)   .   .
Pol, Lugo, ES	JF430574 <sup>m</sup> , JF430577 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa), S22 (Sb)   c33   C28
Pont de Suert, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622603 <sup>i</sup> , HM622607 <sup>i</sup>	10	S22, S22 (Sa), S22 (Sf)   c33   C28
Ports de Beseit, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup> , HM622603 <sup>i</sup>	10	S22   c33   C22, C28
Pozzatoio, Esino River, Marches, IT		EU077506 <sup>c</sup> , EU077567 <sup>c</sup> , EU077573 <sup>c</sup>	14	.   c15, c19, c22   C11, C13, C14
Prato, IT	JF430574 <sup>m</sup> , JF430582 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa), S22 (Sj)   c33   C28
Proscarno (Malone), IT	AY521286 <sup>k</sup>		2	S1   .   .
Pujol Avencó, Catalunya, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	2	S22   c33   C28
Quéntar, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Rebolledo de Traspesña, Burgos, ES	EF489427 <sup>b</sup> , JF430580 <sup>m</sup>	FJ897843 <sup>m</sup>	10	S22 (Sd), S31 (Sc)   c33   C28
Redipollos, Castilla y León, ES		AY121115 <sup>g</sup>	16	.   c33   .
Reisach, Hermagor, AT		AY667112 <sup>j</sup>	3	.   c10   C9
Resco Simontano, IT	HM622594 <sup>i</sup>	HM622599 <sup>i</sup> , HM622600 <sup>i</sup>	4	S16   c36, c37   C20, C21
Rigobundo, Aragón, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Rigoroso (Scrivia), IT	AY521285 <sup>k</sup> , AY521289 <sup>k</sup>		2	S1, S16   .   .
Rillo de Gallo, Guadalajara, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup> , FJ897841 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C22, C28
Río Nervión, Álava, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	2	S22   c33   C28
Río Valturcana, Belluno, IT		FJ160746 <sup>d</sup>	3	.   c14   .
Río Zadoya, Álava, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	2	S22   c33   C28
Riudaria, Catalunya, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Rivabellosa, La Rioja, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Rivarolo, Stirone (Pô), Taro, IT	AJ242706 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Rižana, Adriatic, SI	AF237593 <sup>f</sup>		2	S13   .   .
Rocca di Mezzo, Sirente – Velino, IT		AY121111 <sup>g</sup>	14	.   c15   .
Roccaraso, App. Marsicano, IT		AY121111 <sup>g</sup>	6	.   c15   .
Rocchetta Tanaro, Monferrato, IT		AY121114 <sup>g</sup>	14	.   c36   .

Roma, IT		FJ160748 <sup>d</sup>	3	.   c21   .
Roncesvalles, Navarra, ES		AY121115 <sup>g</sup>	16	.   c33   .
Ronda, Málaga, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Ronta, Mugello, IT		AY121115 <sup>g</sup>	30	.   c33   .
Rosandra, Rosandra, IT	AY611186 <sup>e</sup>		2	S12   .   .
Rossana, Varaita, IT	AY521287 <sup>k</sup>		2	S7   .   .
Rovescala (Ardiversa), IT	AY521291 <sup>k</sup>		2	S21   .   .
S. Antonio di Polla, Valli di Diano, IT		AY121111 <sup>g</sup>	13	.   c15   .
S. Gregorio, Prealpi Bellunesi, IT		AY121121 <sup>g</sup>	10	.   c27   .
Sagliano, Oltrepo' Pavese, IT		AY121114 <sup>g</sup>	20	.   c36   .
Salines, Catalunya, ES	HM622597 <sup>i</sup>	HM622612 <sup>i</sup> , HM622613 <sup>i</sup>	21	S14   c15, c16   C10, C11
Saltrio (Clivio), IT	AY521289 <sup>k</sup>		2	S16   .   .
Sanguerone, Esino River, Marches, IT		EU077570 <sup>c</sup> , EU077573 <sup>c</sup>	12	.   c15, c28   C11, C19
Santa Eulalia de Gallego, Zaragoza, ES	EF489427 <sup>b</sup> , JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup> , FJ897841 <sup>m</sup>	10	S22 (Sd), S22 (Sa)   c33   C22, C28
Santa Pau, Catalunya, ES		AY121115 <sup>g</sup>	12	.   c33   .
Sant – Genis, Espolla, Figueres, ES		AY667114 <sup>j</sup>	1	.   c33   C28
Schizzola, Po, IT	AY611183 <sup>e</sup>		2	S16   .   .
Scrvia, Po, IT	AY611183 <sup>e</sup>		2	S16   .   .
Serchio, Lucca, IT	EU308125 <sup>a</sup>		5	S16   .   .
Serchio, Pistoia, IT	EU308122 <sup>a</sup>		5	S22   .   .
Serravalle S. (Sesia), IT	AY521287 <sup>k</sup>		2	S7   .   .
Sesto C. (Ticino), IT	AY521289 <sup>k</sup>		3	S16   .   .
Siberia, Alta Val d'Ossola, IT		AY121114 <sup>g</sup>	31	.   c36   .
Sillar Baja, Granada, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Sondrio, Po (Adda), IT	HM622597 <sup>i</sup>		5	S9   .   .
Sopotnika Creek, Tolmin, SI		AY667119 <sup>j</sup>	1	.   c3   C2
Sous le Cex (Rhône), Massongez, CH	AJ242709 <sup>h</sup>		1	S19   .   .
Spineto S. (Scrvia), IT	AY521289 <sup>k</sup>		2	S16   .   .
Staggia, Arno, IT	AY611189 <sup>e</sup>		2	S24   .   .
Staudlerbachl, Greifenburg, AT		AY667112 <sup>j</sup>	1	.   c10   C9
Steinbach (Aare, Rhine), Seeberg, CH	AJ242702 <sup>h</sup>		1	S1   .   .
Sterpo, Piana del Tagliamento, IT		AY121123 <sup>g</sup> , AY121125 <sup>g</sup>	21	.   c9, c12   .
Stradabach (Rhine), Illanz, CH	AJ242705 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Tafalla, ES	AF237603 <sup>f</sup>		1	S29   .   .
Tagliacozzo, Monti Carseolani, IT		AY121111 <sup>g</sup>	32	.   c15   .
Tanaro, Po, IT	AY611183 <sup>e</sup>		3	S16   .   .
Tassarolo (Lemme), IT	AY521291 <sup>k</sup>		3	S21   .   .
Ticino (Ticino, Pô), Cugnasco, CH	AJ242707 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Titaguas, Valencia, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Torrente Licenza, Roma, IT		FJ160748 <sup>d</sup>	3	.   c21   .
Torrente Nenno, Genova, IT		FJ160744 <sup>d</sup>	10	.   c1   .
Torrente Sovara, Arezzo, IT	HM622598 <sup>i</sup>	HM622616 <sup>i</sup>	10	S23   c33   C28
Torricella in S., Monti Sabini, IT		AY121111 <sup>g</sup>	20	.   c15   .
Tortulhas, Miranda do Douro, PT		AY667114 <sup>j</sup>	1	.   c33   C28
Trecate, Pianura Padana, IT		AY121114 <sup>g</sup>	9	.   c36   .
Udine, IT		FJ160747 <sup>d</sup>	2	.   c13   .
Utiel, Valencia, ES	JF430574 <sup>m</sup> , JF430581 <sup>m</sup>	FJ897841 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa), S30 (Sh)   c33   C22

V. Castellana, Monti della Laga, IT		AY121111 <sup>g</sup>	30	.   c15   .
V. del Lanza (Pô) Como, IT	AJ242706 <sup>h</sup>		1	S16   .   .
Vadillo, Jaén, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Val di Varri, Monti Carseolani, IT		AY121111 <sup>g</sup>	3	.   c15   .
Valdemoro, Cuenca, ES	JF430574 <sup>m</sup>	FJ897840 <sup>m</sup> , FJ897841 <sup>m</sup> , JF430573 <sup>m</sup>	10	S22 (Sa)   c33   C22, C28
Valdepeñas, Jaén, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Valhondo, Aragón, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Valle Imagna, Prealpi Orobic, IT		AY121122 <sup>g</sup>	70	.   c30   .
Varaita, Po, IT	AY611201 <sup>e</sup>		2	S1   .   .
Varzi (Staffora), IT	AY521289 <sup>k</sup>		2	S16   .   .
Vedronza, Prealpi Giulie, IT		AY121123 <sup>g</sup>	45	.   c9   .
Vignole (Borbera), IT	AY521289 <sup>k</sup> , AY521294 <sup>k</sup> , AY521295 <sup>k</sup> , AY521296 <sup>k</sup>		5	S4, S5, S6, S16   .   .
Vignolo (Ticino), IT	AY521291 <sup>k</sup>		2	S21   .   .
Villa D'Agri, Potenza, IT		FJ160745 <sup>d</sup>	1	.   c23   .
Visone, Po, IT	AY611192 <sup>e</sup> , AY521293 <sup>k</sup>		6	S14   .   .
Vites, Jaén, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Volpara (Versa), IT	AY521290 <sup>k</sup> , AY521291 <sup>k</sup>		2	S20, S21   .   .
Vransko jezero, Island Cres, HR		AY667111 <sup>j</sup>	1	.   c10   C8
Waldbach, Jadersdorf – Grünburg, Hermagor, AT		AY667112 <sup>j</sup>	1	.   c10   C9
Wiesenbach, Jadersdorf – Grünburg, Hermagor, AT		AY667118 <sup>j</sup>	1	.   c10   C9
Yunquera, Málaga, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
Zucaina, Valencia, ES	HM622595 <sup>i</sup>	HM622601 <sup>i</sup>	3	S22   c33   C28
<i>Procambarus clarkii</i>	JN991197		1	
<i>Procambarus clarkii</i>	JX316743		1	
<i>Procambarus fallax</i>	KC107813		1	
<i>Austropotamobius pallipes</i>	AF237599 <sup>f</sup>		1	
<i>Austropotamobius pallipes</i>	AF237598 <sup>f</sup>		1	
<i>Austropotamobius torrentium</i>	JF293396 <sup>i</sup>		1	
<i>Austropotamobius torrentium</i>	JF293397 <sup>i</sup>		1	
<i>Austropotamobius torrentium</i>	JF293399 <sup>i</sup>		1	

**Tabla T2.** Información de las secuencias de *Austropotamobius* incluidas en los análisis sobre inferencias taxonómicas. En las columnas se detalla la localidad o el cuerpo de agua en el que se muestreó, el país de procedencia, los marcadores moleculares con los números de acceso y el número de cangrejos secuenciados por los diferentes autores. Los países identificados por el código ISO son: AT: Austria, CH: Suiza, DE: Alemania, ES: España, IT: Italia, FR: Francia, GR: Grecia, HR: Croacia, PT: Portugal, SI: Eslovenia. En la última columna se especifican los haplotipos que se incluyen en cada conjunto de datos separados por una línea vertical: 16S | COI (I) | COI (II). En esta columna los puntos (.) indican ausencia de resultados en ese set de datos. Los superíndices junto a los números de acceso referencian los trabajos donde se identificaron los haplotipos: <sup>a</sup> Bertocchi et al. 2008a, <sup>b</sup> Callejas et al. 2007, <sup>c</sup> Cataudella et al. 2010, <sup>d</sup> Chiesa et al. 2011, <sup>e</sup> Fratini et al. 2005, <sup>f</sup> Grandjean et al. 2000c, <sup>g</sup> Iaconelli 2001, <sup>h</sup> Largiadè et al. 2000, <sup>i</sup> Pedraza – Lara et al. 2010, <sup>j</sup> Trontelj et al. 2005, <sup>k</sup> Zaccara et al. 2004, <sup>l</sup> Klobočar et al. 2011, <sup>m</sup> presente trabajo.

## Métodos

En cada conjunto de datos las secuencias se alinearon usando el algoritmo CLUSTAL W (Thompson et al. 1997) incluido en BioEdit V.7.0.9.0 (Hall 1999). La longitud de secuencia a analizar se decidió intentando alcanzar un compromiso entre incluir el mayor número de haplotipos posible y examinar el mayor número de bases por secuencia, para recoger la máxima cantidad posible de información sobre las distintas poblaciones.

La reconstrucción filogenética se realizó, en primer lugar, mediante la elaboración de redes de unión de medianas (*Median – Joining network*, MJ) con el programa Network v.4.6 (<http://www.flexus – engineering.com>). Las redes de los sets 16S y COI (I) se obtuvieron con la configuración por defecto de los distintos parámetros que ofrece el programa, puesto que su modificación conducía a redes cada vez más complicadas y difícilmente interpretables. Para obtener una red lo más sencilla posible a partir del conjunto de datos COI (II) fue necesario otorgar distintos pesos a las mutaciones en función de su frecuencia de aparición (peso 10 en las que aparecían entre 0 y 4 veces, 9 si se presentaba 2 veces, 8 si estaba presente 3 veces, etc.) y mayor peso a las transversiones frente a las transiciones (3:1), como recomiendan los autores del programa. Para tratar de muestrear la mayor cantidad posible de árboles, también se probaron distintos valores del parámetro  $\epsilon$ , una medida ponderada de la distancia genética pero, o bien las redes se volvían tan complejas que ni siquiera el tratamiento posterior de los resultados permitía interpretarlas, o bien se superaban los límites del programa y no se obtenían resultados.

En segundo lugar, se construyeron árboles filogenéticos mediante los métodos del vecino más próximo (NJ) con las distancias de Kimura 2 parámetros (K2P), máxima parsimonia (MP) e inferencia bayesiana (BI), con los programas Mega v.5 (Tamura et al. 2011), TNT v.1.1 (Goloboff et al. 2003) y Mr. Bayes (Huesenbeck & Ronquist 2001) respectivamente. En los métodos NJ y MP se ha evaluado la robustez de las ramas que separan los distintos grupos de haplotipos mediante 1000 réplicas de *bootstrap*. En los árboles BI, la convergencia de la topología entre las cadenas se evaluó con el parámetro SDSF (*standard deviation of split frequencies*) asegurando que en todos los análisis fuese inferior a 0,01. En los demás parámetros, se evaluó el PSRF (*potential scale reduction factor*) para verificar que era próximo a 1. Además, se examinó la estabilidad de las probabilidades posteriores obtenidas con el programa Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond 2009). Para llevar a cabo la selección estadística de los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustasen a los conjuntos de datos, se utilizó jModeltest v.3.5 (Posada et al. 1998, 2001). Los modelos seleccionados mediante AIC

(*Akaike Information Criterion*, Akaike 1974) fueron GTR para los conjuntos de datos 16S y COI (I) y HKY para el conjunto COI (II).

Los árboles BI han servido para datar el periodo de divergencia de las especies, siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad para evaluar los resultados obtenidos. En estos árboles se han incluido secuencias del género *Procambarus* como fuera de grupo (Tabla 2). En aquellos nodos donde las probabilidades posteriores eran superiores a 0,95, se ha calculado el tiempo transcurrido desde el evento de divergencia, usando las tasas de sustitución publicadas en decápodos. Los rangos de las tasas de sustitución (divergencia por millón de años, MA) empleados oscilan entre 0,8% (Schubart et al. 1998) y 1,6% (Stillman & Reeb 2001) en el marcador 16S y entre 1,66% (Knowlton et al. 1993) y 2,3% (Knowlton et al. 1998) en el gen COI.

Se han obtenido matrices de distancias genéticas K2P entre todos los haplotipos de la muestra comparados de dos en dos, así como dentro y entre los grupos con el programa Mega v.5 (Tamura et al. 2011). Estas distancias se han elegido porque son precisas y se han usado ampliamente en las investigaciones sobre crustáceos y en concreto decápodos, por lo que es posible compararlas con estudios anteriores. Se han considerado como grupos distintos los linajes, especies o subespecies de *Austropotamobius* definidos por diferentes autores. Así pues, el primer paso ha consistido en relacionar los haplotipos adscritos a las distintas subespecies de *A. italicus* analizando el gen 16S con los haplotipos que definen los linajes de este mismo organismo mediante el estudio del marcador COI. Para ello, se han tenido en cuenta las poblaciones del presente y otros trabajos donde se ha detectado una sola subespecie o linaje con ambos marcadores. Estas poblaciones, y sus correspondientes haplotipos, han servido entonces para identificar haplogrupos y grupos genéticos y relacionarlos con la clasificación vigente. Así, *A. pallipes* s. e. se ha identificado gracias a los haplotipos 16S y COI encontrados en el Torrente Nenno (Génova, Italia), una población de referencia para esta especie (Chiesa et al. 2011; Fratini et al. 2005). Entre las subespecies – linajes de *A. italicus*, *A. italicus italicus* se ha definido gracias a que en este estudio disponíamos de las secuencias COI y 16S, en los mismos individuos, procedentes de numerosas poblaciones españolas y también de Pistoia, Prato y Florencia en Italia, ambas regiones dentro del rango de distribución de esta subespecie. La relación entre los haplotipos COI (Chiesa et al. 2010) y 16S (Grandjean et al. 2002a, b) en *A. i. carsicus* y *A. i. carinthiacus* se ha establecido en

base a la población de Rio Valturcana (Belluno, Italia) y Rio Gabieri (Verbania, Italia), respectivamente.

A partir de las distancias genéticas K2P se llevaron a cabo análisis de coordenadas principales (PCoA) (Gower 1966) con el paquete de programas NTSYSpc v2.10q (Rohlf 2000), para visualizar las relaciones entre los haplotipos mitocondriales de *Austropotamobius* y determinar las principales tendencias de variación.

Para confirmar si los marcadores moleculares empleados son útiles para los estudios de taxonomía molecular (Costa et al. 2007; Meier et al. 2008; Puillandre et al. 2011; Wiemers & Fiedler 2007, entre otros) se ha descrito que ha de aparecer un hueco o *gap* separando el conjunto de las distancias genéticas intraespecíficas del conjunto de las interespecíficas. Por ello se han representado las distancias genéticas K2P en diagramas de barras, con ambos marcadores, dado que éstos se emplean habitualmente como herramientas taxonómicas en el estudio del género *Austropotamobius*.

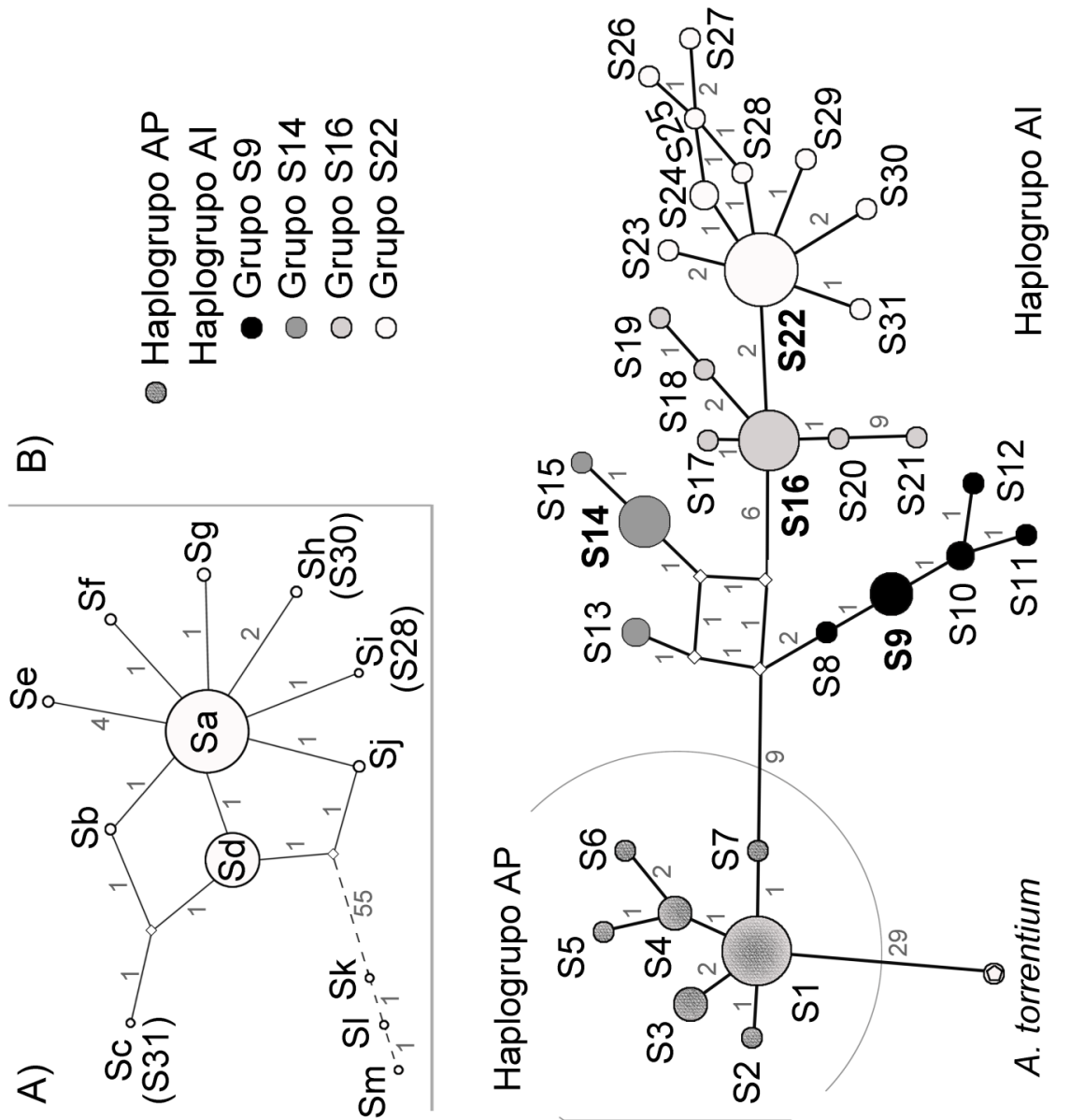
En este mismo contexto se ha usado la aplicación en línea ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>, Puillandre et al. 2011) para delimitar las posibles especies presentes en el complejo de especies *Austropotamobius pallipes*. Éste es un método descrito recientemente para separar los haplotipos en especies candidatas sin que sea necesario disponer a priori de una hipótesis sobre qué grupo de individuos constituye una especie. A partir de los tres conjuntos de datos, y basándose en los modelos de evolución disponibles, Jukes – Cantor (JC69) y K80 de Kimura, el programa infiere un límite de divergencia intraespecífica teniendo como referencia un umbral de variabilidad intraespecífica (P). A continuación, detecta el primer hueco o *gap* significativo en la distribución de las distancias genéticas tras el límite previamente establecido (P), que utilizará para dividir los haplotipos en especies propuestas. La inferencia del límite de divergencia y la detección del hueco se repiten entonces dentro de cada uno de los grupos de haplotipos identificados, hasta que no es posible obtener más particiones de los datos. Para llevar a cabo la asignación de haplotipos a especies hipotéticas, el usuario debe especificar dos valores: P (límite de la diversidad intraespecífica) y X (anchura mínima del hueco o *gap*). Para evaluar el efecto de estos dos parámetros, se han comprobado valores de P entre 0,001 – 0,20 y de X entre 0,5 – 2 con cada uno de los marcadores.

## Resultados

### I) Análisis del conjunto de datos 16S

En las poblaciones españolas de *A. italicus* aquí estudiadas, se han analizado 1317 bases del gen 16S. Por primera vez se ha detectado variabilidad genética con este marcador en los cangrejos de río de nuestro país, ocho haplotipos (Sa – Sh, Figura T1a), de los cuales dos están ampliamente distribuidos, uno por el norte (Sd) y el otro, el más frecuente, por las demás regiones (Sa). De estos ocho haplotipos, siete son exclusivos de las muestras ibéricas. En las dos poblaciones italianas estudiadas se han encontrado dos haplotipos exclusivos (Si y Sj) y uno (Sa) también presente en España. En la muestra francesa se han encontrado tres haplotipos exclusivos de población (Sk, Sl y Sm). Con estos 13 haplotipos se ha elaborado una red MJ (Figura T1a) que refleja la estrecha relación de los haplotipos italianos con el haplotipo Sa, el más común en España, pues se diferencian en 1 – 4 SNP. En cambio, los tres haplotipos detectados en la población francesa se separan de los haplotipos españoles e italianos por, al menos, 67 mutaciones y es necesaria la aparición de nodos intermedios para conectarlos.

Para poder comparar nuestros resultados con los datos de otras poblaciones europeas, la longitud de la secuencia a analizar se restringió a 464 pb. En los 638 especímenes incluidos en el set 16S se han detectado 71 SNP, de los cuales 27 son informativos bajo parsimonia. Esta variación ha permitido identificar 32 haplotipos, 31 pertenecientes a *Austropotamobius pallipes* s. l. y 1 haplotipo característico de *A. torrentium*. La variabilidad haplotípica, Hd, del género es  $0,593 \pm 0,022$  y la variabilidad nucleotídica  $\pi$ ,  $0,012 \pm 0,0008$ . Al elaborar la red MJ con estos 32 haplotipos (Figura T1b), se aprecia que la especie *A. torrentium* se separa del complejo de especies *A. pallipes* por, al menos, 29 SNP. En *A. pallipes* s. l., se han encontrado 49 SNP, 27 de ellos parsimónicos, siendo los valores de Hd y  $\pi$  de  $0,591 \pm 0,022$  y  $0,011 \pm 0,0007$ , respectivamente. Los 31 haplotipos 16S de *A. pallipes* s. l., se dividen en dos grandes conjuntos, o dos grandes haplogrupos, separados por once mutaciones y que hemos denominado AP y AI respectivamente (Figura T1). Hay que destacar el paralelismo de estos dos haplogrupos con las dos especies de cangrejos propuestas dentro de *A. pallipes* s. l.: *A. pallipes* y *A. italicus*.



**Figura T1.** Redes de unión de medianas (MJ) de haplotipos del género *Austropotamobius*. A) Red con los 13 haplotipos encontrados al analizar 1317pb de este marcador en 24 poblaciones españolas, 4 italianas y 1 francesa. Sobre la línea discontinua se sitúan los haplotipos del haplogrupo AP. B) Red con los 32 haplotipos reunidos en el conjunto de datos 16S. Los rombos señalan la presencia de haplotipos no muestreados o extintos. En negrita aparecen los haplotipos que dan nombre a los grupos genéticos dentro del haplogrupo AI.

La red MJ (Figura T1) muestra que el número de SNP que separa *A. torrentium* de *A. pallipes* s. l. es mucho mayor que el que diferencia los haplogrupos AP y AI. La Tabla T3 refleja que el número de SNP y, en particular, el número de transversiones desciende conforme comparamos entre sí *A. torrentium* con *A. pallipes* s. l., los haplogrupos AP y AI o los dos grupos genéticos detectados en el haplogrupo AI (ver más adelante).

	SNP	Ts	Tv
<i>A. torrentium</i> – <i>A. pallipes</i> s. l.	29	19	10
Haplogrupo AP – Haplogrupo AI	9	6	3
(S8 – S15) – (S16 – S31) *	6	5	1

**Tabla T3.** Número de SNP, desglosado en transiciones (Ts) y transversiones (Tv), encontrado entre las distintas agrupaciones genéticas comprendidas en el género *Austropotamobius*. (\* Grupos genéticos detectados dentro del haplogrupo AI formados por dos conjuntos de haplotipos, ver análisis de coordenadas principales).

La división en dos grandes haplogrupos de la variabilidad genética encontrada en *A. pallipes* s. l. con el marcador 16S, está apoyada por elevados valores de *bootstrap* (100) y de probabilidades posteriores (1,00) en los árboles construidos mediante MP y BI respectivamente, aunque en el árbol de NJ este nodo está menos apoyado (*bootstrap* < 80).

Cabe destacar que los ocho haplotipos 16S encontrados en España (Sa – Sh) y los dos de Italia (Si y Sj) (Figura T1A) quedan reducidos a cuatro cuando solo consideramos 464 pb de las 1317 pb secuenciadas. Todos ellos se engloban en el haplogrupo AI. Más concretamente, los haplotipos Sa, Sb, Sd – Sg y Sj quedan englobados en S22, el haplotipo Sc en S31, el haplotipo Sh en S30 y el Si en S28 (Figura T1B). Los tres haplotipos franceses, en cambio, se reducen a un solo haplotipo (S3) y se incluyen en el haplogrupo AP. Analizando más en detalle el haplogrupo AI (Figuras T1A y T2.1), es posible diferenciar cuatro grupos de secuencias, separados entre ellos por, al menos, dos sustituciones, y designados con el nombre del haplotipo más frecuente en cada grupo: S9 (haplotipos S8 a S12), S14 (haplotipos S13 a S15), S16 (haplotipos S16 a S21) y S22 (haplotipos S22 a S31). Estos agrupamientos en la red MJ están apoyados por valores de *bootstrap* y probabilidades posteriores elevadas, en todos los casos, mayores de 76 y 0,78, respectivamente, en los árboles filogenéticos.

En la Tabla T4 se detallan los porcentajes de divergencia K2P, observándose que el mayor valor,  $9,85 \pm 1,69\%$ , se encuentra entre las dos especies reconocidas del género, *A.*

*torrentium* y *A. pallipes* s.l. En esta última especie las distancias entre los haplogrupos AP y AI varían entre 3,67% y 4,88%, con un promedio de  $4,50 \pm 0,86\%$ . La variación intra – haplogrupo es menor, un  $1,00 \pm 0,25\%$  en AP, y entre 0,56% – 3,65% en AI.

		TOR	AP	AI			
				S9	S14	S16	S22
AP		9,13±1,54	1,00±0,25				
	S9	9,61±1,60	3,77±0,90	0,56±0,24			
AI	S14	8,93±1,54	3,67±,86	2,00±0,61	0,68±0,33		
	S16	10,04±1,58	4,88±0,96	3,64±0,83	2,85±0,69	1,24±0,23	
	S22	10,71±1,70	4,86±1,00	3,65±0,87	3,50±0,83	1,88±0,48	0,73±0,23

**Tabla T4.** Estimación de las distancias genéticas K2P (en porcentaje) entre la especie *A. torrentium* (TOR), el haplogrupo AP y los grupos genéticos encontrados en el haplogrupo AI (S9, S14, S16 y S22). En la diagonal se muestran las estimas de la divergencia evolutiva promedio dentro de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar.

Es posible asignar un marco temporal a estas divergencias genéticas K2P empleando las distancias patrísticas obtenidas del árbol filogenético BI. La separación más clara es la que se refiere a las especies *A. torrentium* y *A. pallipes* s.l., que pudo tener lugar hace unos 23,9 – 13,2 millones de años (MA) (Tabla T5 y nodo A en la Figura T2), dependiendo de la tasa de sustitución por millón de años empleada, 0,8% o 1,6%. El último evento de divergencia, ocurrido entre los grupos S16 y S22 del haplogrupo AI (Nodo D en Figura T2) pudo suceder hace 4,6 – 2,5 Ma.

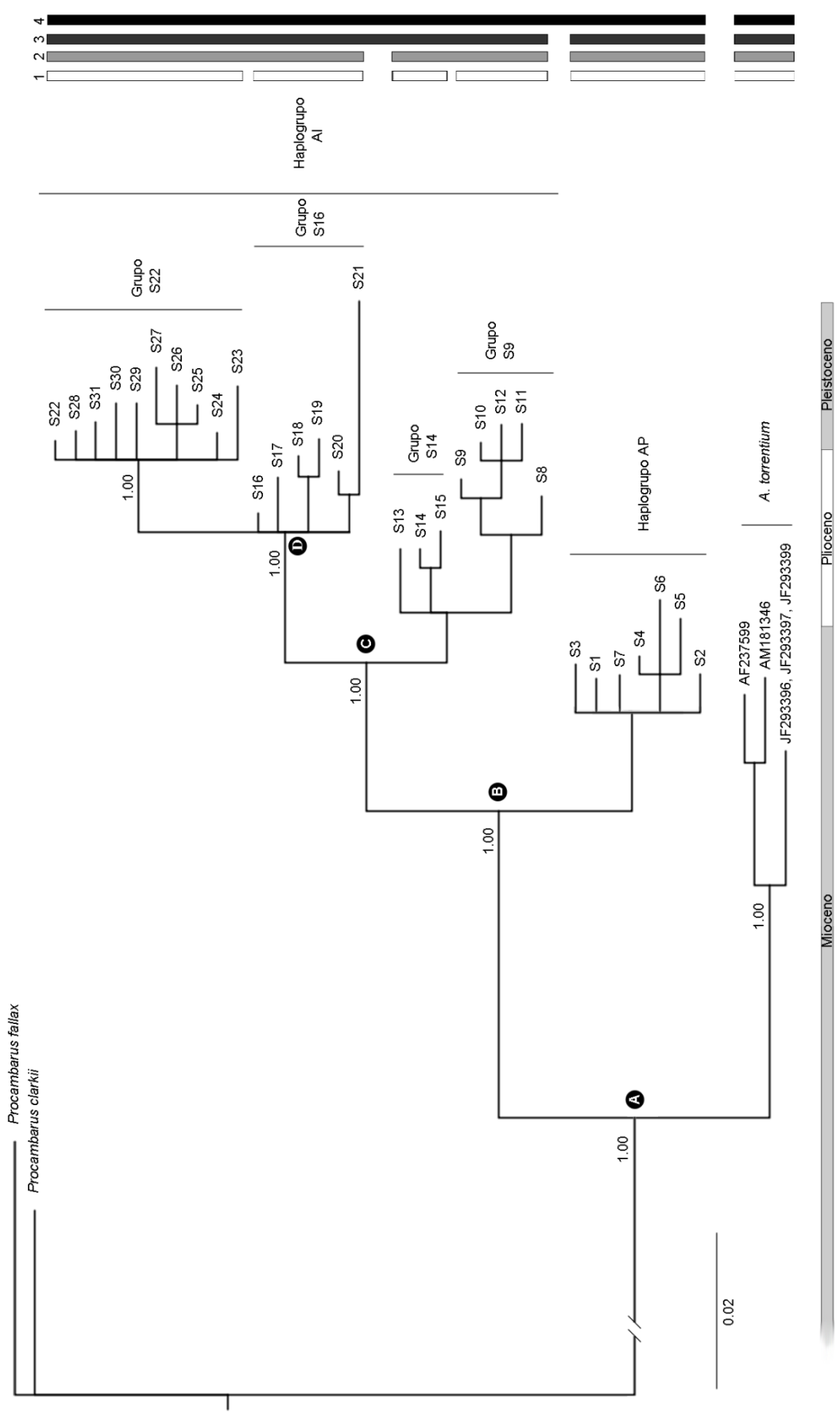
Evento	Tasa de sustitución (%)	Tiempo de divergencia (MA)
A	0,8	23,9
	1,6	13,2
B	0,8	14,2
	1,6	8,2
C	0,8	6,7
	1,6	3,7
D	0,8	4,6
	1,6	2,5

**Tabla T5.** Estimaciones del tiempo transcurrido en millones de años (MA) desde los diferentes eventos de divergencia en el género *Austropotamobius*. Los eventos A, B, C y D se indican en la Figura T2.

Para profundizar en las relaciones entre los haplotipos y determinar las principales tendencias de variación, se llevaron a cabo varios análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figuras T2.2 y T3) a partir de las distancias K2P.

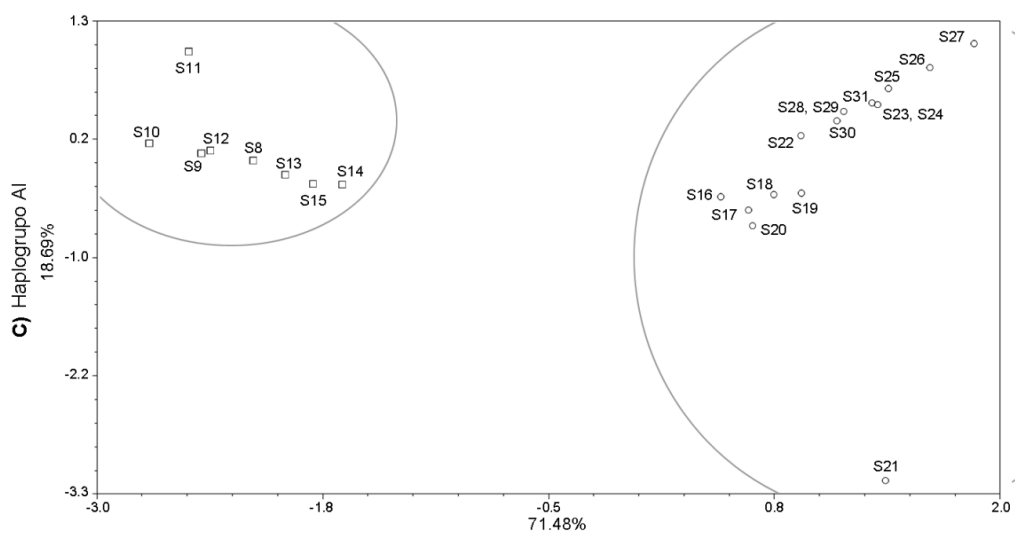
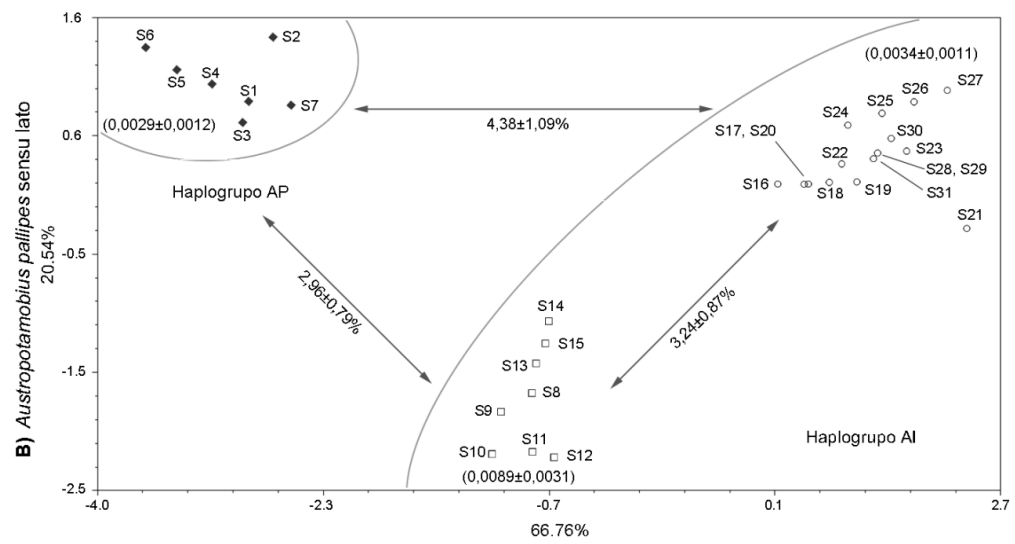
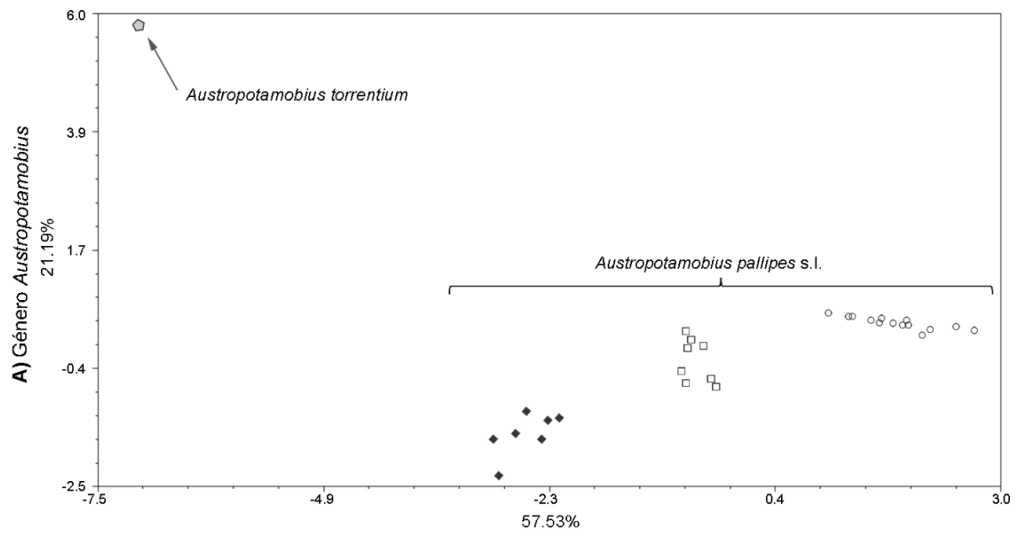
En la figura T3A se incluyen todos los haplotipos del género *Austropotamobius*. Los primeros dos ejes explican el 57,53% de la varianza y se aprecia la clara separación entre las especies *A. torrentium* y *A. pallipes* s. l., al igual que sucedía en las reconstrucciones filogenéticas. En la Figura T3B, se puede apreciar con más detalle la existencia de subestructura genética en los haplotipos 16S de *A. pallipes* s. l. Los dos primeros ejes del análisis, que absorben el 87,30% de la variación, diferencian 3 conjuntos de haplotipos. El primero con todos los haplotipos del haplogrupo AP (S1 – S7), el segundo con los haplotipos S8 – S15 y el tercero, con los haplotipos S16 – S31 (Figura T1).

Para descartar la influencia del haplogrupo AP, genéticamente más homogéneo, se realizó un tercer análisis de coordenadas principales sólo con el haplogrupo AI (Figura T3C). En él, se mantiene la estructura de los conjuntos del haplogrupo AI antes descritos, es decir, se pueden distinguir dos grupos de secuencias (haplotipos S8 – S15 y haplotipos S16 – S31) y no cuatro, como sucedía en la red MJ y el árbol BI (Figuras T1, T2.1 y T2.2).



**Figura T2.** (Página anterior) Árbol filogenético construido mediante inferencia bayesiana con las secuencias del marcador 16S. Las estimas de los tiempos de los nodos A, B, C y D se especifican en la Tabla T4. Las barras verticales se corresponden con los grupos haplotípicos identificados siguiendo: 1. Las reconstrucciones filogenéticas (NJ, BI y red MJ), 2. Los análisis PCoA, 3. La herramienta ABGD, 4. Las distancias genéticas K2P y el método del *barcoding gap*.

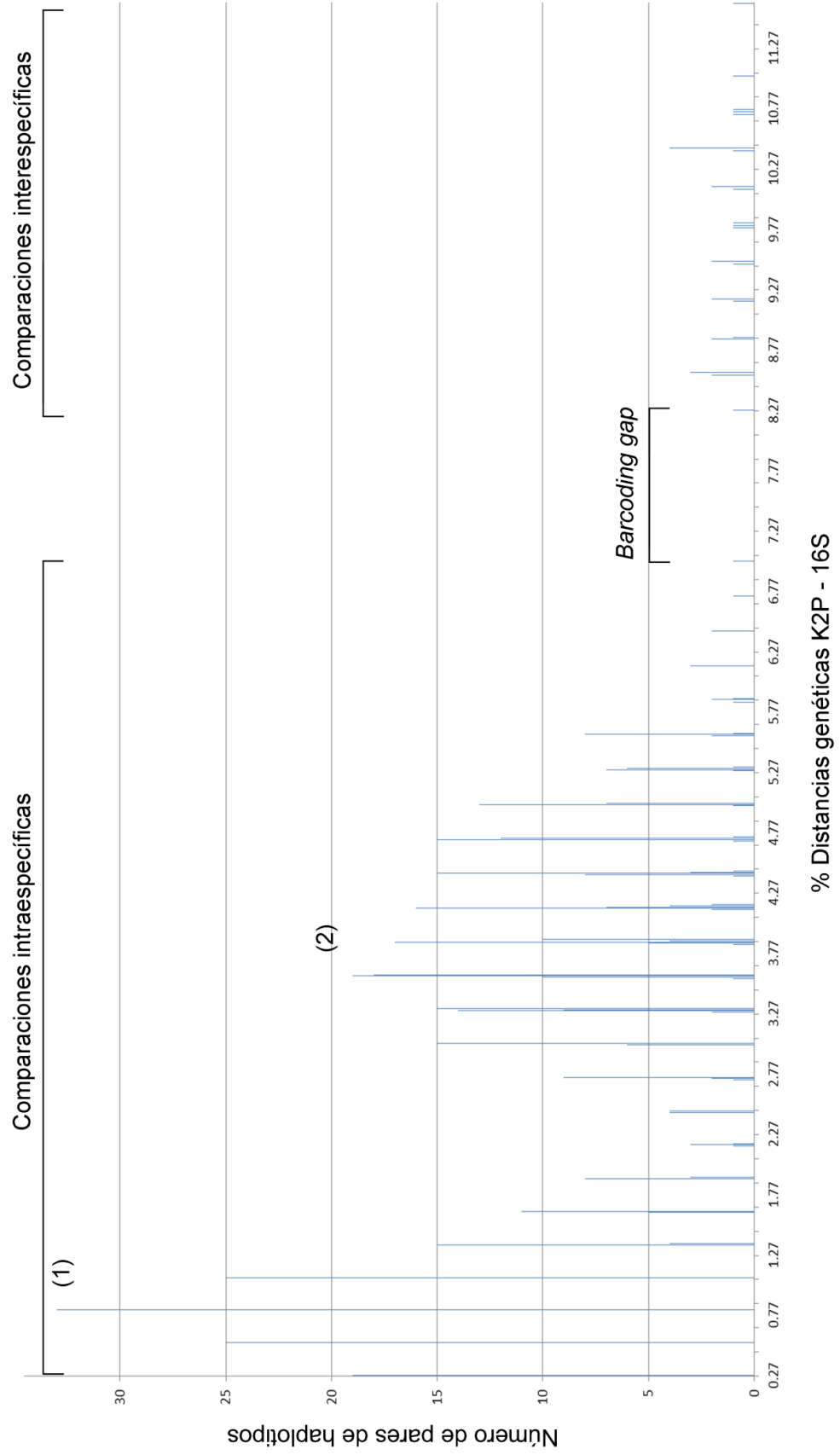
**Figura T3.** (Página siguiente) Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias K2P entre los haplotipos detectados en el conjunto de datos 16S. Los gráficos muestran los PCoA de: A) los 32 haplotipos identificados en el género *Austropotamobius*, B) los 31 haplotipos de *A. pallipes* sensu lato donde se indican la divergencia genética media ( $K2P \pm$  desviación estándar) entre y dentro (entre paréntesis) de los conjuntos genéticos detectados y C) los haplotipos del haplogrupo AI.



Se ha propuesto que al representar en un diagrama de barras las distancias K2P entre pares de haplotipos frente al número de haplotipos comparados, aparece un hueco o *barcoding gap* separando las distancias intra e interespecíficas, y por tanto, la variabilidad dentro de las especies de la variabilidad entre las mismas. En la Figura T4 es posible apreciar dos grupos de haplotipos bien diferenciados separados por un hueco. A la izquierda del mismo se sitúan los valores de distancias más pequeños, que oscilan entre 0,27% y 7,02% (media  $\pm$  SD = 1,58 $\pm$ 0,72%) e incluyen todas las comparaciones entre secuencias de la misma especie, como los haplotipos de *A. pallipes* sensu lato entre sí. A la derecha del hueco se sitúan los mayores valores de divergencia genética, que varían entre 8,27% y 11,64% (media  $\pm$  SD = 9,62 $\pm$ 1,70%) y corresponden a las comparaciones interespecíficas *A. pallipes* s.l. – *A. torrentium*. En esta gráfica queda patente que el marcador 16S tiene la capacidad de discriminar las dos especies antes mencionadas, pero no los distintos grupos genéticos en *A. pallipes* s. l. puestos de manifiesto con otros análisis de este capítulo, si bien la distribución bimodal indica que existe una gran variabilidad dentro del grupo de comparaciones intraespecíficas. En particular se encuentran las comparaciones entre los haplotipos de un mismo grupo (1), como entre los conjuntos de secuencias del haplogrupo AI descritos en los análisis PCoA, y las comparaciones entre haplotipos de conjuntos distintos (2).

En resumen, este método es capaz de distinguir con claridad las dos especies reconocidas del género *Austropotamobius*, *A. torrentium* y *A. pallipes* sensu lato y en menor medida, se aprecian los dos haplogrupos, AP y AI, identificados en análisis previos de este conjunto de datos (Figuras T4 y T2.4).

**Figura T4.** Diagrama de barras que representa, en abscisas, las estimas de las distancias genéticas K2P por pares (expresadas en porcentaje) entre los 32 haplotipos identificados en el género *Austropotamobius* analizando el conjunto de datos 16S y, en ordenadas, las frecuencias absolutas o número de comparaciones entre pares de haplotipos que presentan esas distancias.



Usando los ajustes estándar en la aplicación ABGD se observa que los haplotipos analizados se distribuyen en dos particiones o especies candidatas, una correspondiente a *A. torrentium* y otra a *A. pallipes* sensu lato. Cuando el valor del parámetro X (anchura relativa del *barcode gap*) se ajusta a los valores observados en nuestra muestra, se produjeron los mismos resultados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el método de distancias (Figuras T2.3 y T4), son independientes del modelo elegido (Jukes – Cantor y Kimura) y no están afectados por los cambios en la variabilidad intraespecífica fijada a priori.

Cuando se fijan valores muy bajos en los parámetros ( $X < 1,0$  y variabilidad intraespecífica  $< 0,006$ ), la herramienta ABGD también detecta los grupos genéticos descritos en los análisis PCoA. En estos casos las particiones más probables son las correspondientes a los haplogrupos AP y AI. Sin embargo, ABGD no consigue discriminar entre los cuatro grupos genéticos identificados con la red MJ (S9, S14, S16 y S22 en la Figura T1).

Para tener una visión global de la distribución geográfica de la variabilidad genética de este complejo de especies, se han dispuesto los haplotipos sobre mapas físicos de Europa (Figuras T5 y T6). Los mapas se pueden visitar en las direcciones [https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsgg.k\\_akhKmad0KA](https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsgg.k_akhKmad0KA) y <https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsgg.kAOpHxk9Ypfk>. Cada marca del mapa corresponde a una de las poblaciones detalladas en la Tabla T2 y despliega información sobre el haplotipo identificado tras analizar 464 nucleótidos del marcador 16S, el número de acceso en GenBank, el número de ejemplares incluidos en la muestra, la referencia del artículo original y el estatus taxonómico propuesto por Grandjean et al. (2000b; 2002a) y Fratini et al. (2005).

Integrando esta información genética en mapas físicos se aprecia que el haplogrupo AP (haplotipos S1 – S7) se localiza en Francia, noroeste de Italia (Piamonte y Liguria) y norte de Suiza. El haplogrupo AI se distribuye por un área más extensa. En concreto, el grupo S9 se extiende por el norte de Italia (Lombardía, Trentino Alto Adige, Véneto y Friuli Venecia Giulia). El grupo S14 se localiza principalmente en el sur de Italia (Toscana y Calabria) y Eslovenia, aunque uno de los haplotipos de este grupo se ha encontrado, de manera puntual, en el noreste de España (Cataluña). El grupo S16 está presente en el norte de Italia (Lombardía y Piamonte). Por último, el grupo genético S22 está ampliamente distribuido por España y parte del norte de Italia (Emilia – Romaña y Toscana).



#### Padrones de Bureba, Burgos, ES

Haplotype S22 (Sd)  
 EF489427  
 (n = 10)  
 Assignment in the present work: *A. i. italicus*  
 Callejas et al. Direct Submission,

#### Rosandra, Rosandra, IT

Haplotype S12  
 AY611186  
 (Approximate location) (n = 2)  
 Assignment in the present work: *A. i. carsicus*  
 Previously assigned to: *A. i. carsicus*  
 Fratini et al. 2005 Heredity 94, 108-118

**Figura T5.** Distribución geográfica de los haplotipos 16S del complejo de especies *A. pallipes* sensu lato. Los haplotipos del haplogrupo AP aparecen en rojo. Los haplotipos del haplogrupo AI se muestran con distintos colores, siguiendo la subestructura genética detectada en los análisis. Así, el grupo S9 se muestra en naranja, S14 en amarillo, S16 en azul claro y S22 en azul oscuro. Cuando se clic en una marca del mapa, que se puede visitar en la dirección [https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsgg.k\\_akhKmad0KA](https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsgg.k_akhKmad0KA), se despliega información acerca del punto de muestreo como se puede ver en las dos capturas de pantalla bajo el mapa.

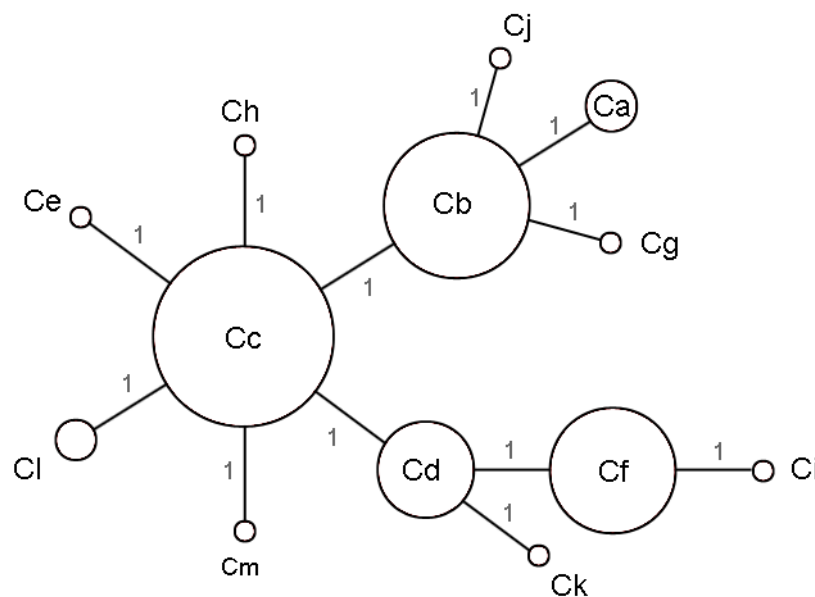


<p><b>Padrones de Bureba, Burgos, ES</b></p> <p>Haplotype S22 (Sd)          EF489427          (n = 10)          Assignment in the present work: <i>A. i. italicus</i>          Callejas et al. Direct Submission,</p>	<p><b>Rosandra, Rosandra, IT</b></p> <p>Haplotype S12          AY611186          (Approximate location) (n = 2)          Assignment in the present work: <i>A. i. carsicus</i>          Previously assigned to: <i>A. i. carsicus</i>          Fratini et al. 2005 Heredity 94, 108-118</p>
---	---

**Figura T6.** Distribución geográfica de los grupos genéticos 16S identificados en el complejo de especies *A. pallipes* sensu lato. El haplogrupo AP aparece en rojo. El haplogrupo AI se representa con dos colores, diferenciando los dos subgrupos genéticos detectados en los análisis. Así, los subgrupos S9 y S14 se muestran en naranja, y los subgrupos S16 y S22 en azul. En el mapa, que se puede visitar en la dirección [https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsqg.k\\_akhKmad0KA](https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsqg.k_akhKmad0KA), cada marca despliega información acerca de la muestra, como se puede ver en las dos capturas de pantalla inferiores.

## II) Análisis del conjunto de datos COI (I)

El análisis de 1184 pb del marcador COI en nuestras muestras ha permitido la identificación de 13 haplotipos (Figura T7). De ellos, 4 son mayoritarios en España, dos en el norte (Cd y Cf) y dos (Cb y Cc) en las restantes áreas de distribución del cangrejo de río. Los demás haplotipos encontrados son específicos de población. Las muestras italianas fueron monomórficas para el haplotipo Cc, uno de los más frecuentes en las poblaciones del centro de la Península Ibérica. En la red MJ de la Figura T5 se aprecia que estas 13 secuencias se diferencian por 1 – 5 mutaciones y que no aparecen haplotipos no muestreados.

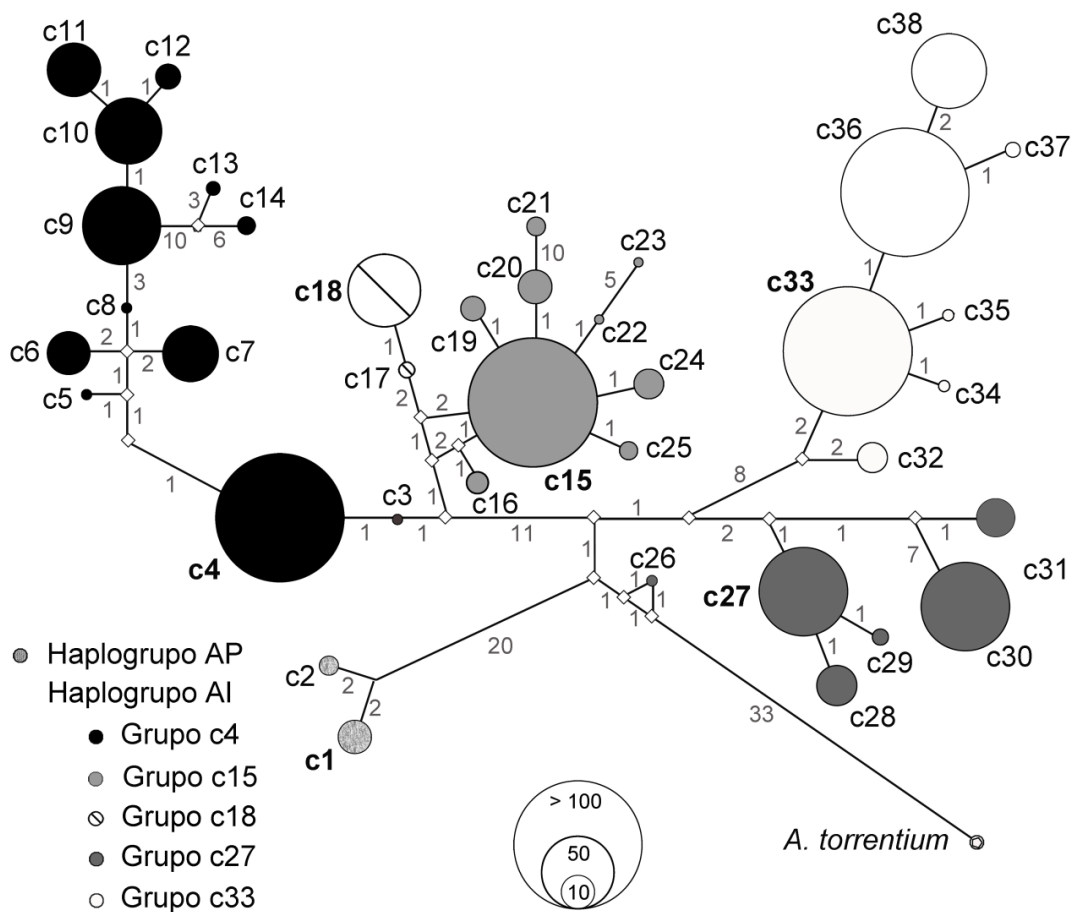


**Figura T7.** Red MJ de los haplotipos identificados analizando 1184 pb del marcador COI en 24 poblaciones españolas y 4 italianas.

Para poder incluir en nuestros análisis la máxima cantidad posible de las secuencias de *Austropotamobius* disponibles en las bases de datos, la longitud final estudiada se restringió a 360 pb. Analizando las secuencias procedentes de más de 2.000 cangrejos se han detectado 81 SNP, de los cuales 70 son informativos bajo parsimonia. Esta variabilidad permite identificar 39 haplotipos, 38 asignados a *Austropotamobius pallipes* s. l. y 1 a la especie *A. torrentium*. La variabilidad haplotípica (Hd) del género es  $0,821 \pm 0,005$  y la variabilidad nucleotídica  $\pi$ ,  $0,032 \pm 0,0005$ . En la red MJ generada, las secuencias de *A. torrentium* y *A. pallipes* s.l. aparecen separadas por un mínimo de 33 mutaciones (Figura T8). Considerando solamente los

ejemplares de *A. pallipes* s. l., el número de SNP ha sido 72, 69 de ellos parsimónicos, y su diversidad haplotípica y nucleotídica  $0,821\pm 0,005$  y  $0,032\pm 0,0004$ , respectivamente.

En la Figura T8 se aprecia que en las secuencias del complejo de especies *A. pallipes* se distinguen dos grandes haplogrupos, de nuevo denominados AP (c1 y c2) y AI (resto de haplotipos), separados al menos por 22 mutaciones. Esta división también se observa en los árboles filogenéticos MP, NJ y BI, apoyada por elevados valores de *bootstrap* (>99) y probabilidades posteriores (1,00).



**Figura T8.** Red MJ realizada con el conjunto de datos COI (I). El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos que presentan cada haplotipo. Los rombos simbolizan secuencias no muestreadas o extintas. Las poblaciones incluidas en este análisis pueden consultarse en la Tabla T2. En negrita aparecen los haplotipos que identificarán los distintos grupos de secuencias del haplogrupo AI.

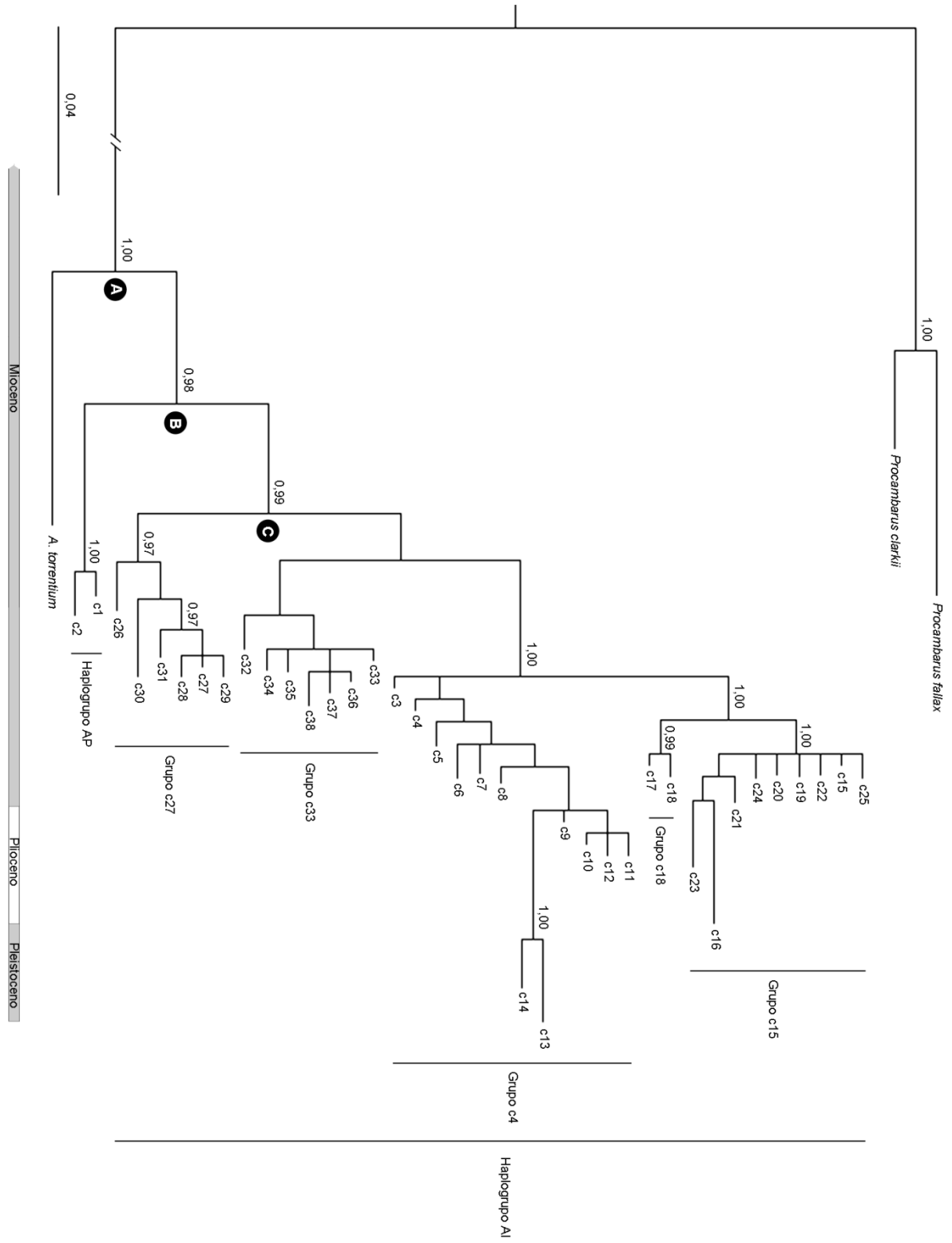
A su vez, en la red MJ se aprecian cuatro grupos principales de secuencias dentro del haplogrupo AI, separados al menos por cuatro sustituciones (Figura T8). Estos conjuntos se han designado con el nombre del haplotipo más frecuente en cada grupo, c4, c15, c27 y c33. Además, separado por, al menos, 4 mutaciones se puede distinguir un quinto grupo, c18, estrechamente relacionado con c15. Esta subestructura del haplogrupo AI se observa también en los árboles filogenéticos, apoyada por valores de bootstrap y probabilidades posteriores superiores a 70 y 0,75, respectivamente. En esta red los trece haplotipos que hemos identificado en las Penínsulas Ibérica e Itálica (Figura T7), al analizar 360 pb de las 184 pb secuenciadas, se reducen a uno solo (c33) que se incluye en el haplogrupo AI (Figura T8).

En la Tabla T6 se detallan las divergencias genéticas K2P entre grupos de haplotipos, correspondiendo el valor promedio más elevado,  $12,02 \pm 1,67\%$ , a la comparación de las especies *A. torrentium* y *A. pallipes* s.l. Las distancias entre los haplogrupos AP y AI alcanza un promedio de  $8,39 \pm 1,14\%$ , y oscilan entre  $7,88 \pm 1,39\%$  y  $9,82 \pm 1,65\%$ . En la tabla también se muestra que las distancias genéticas K2P entre los grupos pertenecientes al haplogrupo AI varían entre  $2,04\%$  (c15 – c18) y  $6,57\%$  (c15 – c33).

		TOR	AP	AI				
				c4	c15	c18	c27	c33
AP		$11,87 \pm 1,80$	$1,12 \pm 0,53$					
	c4	$12,27 \pm 1,81$	$9,67 \pm 1,52$	$2,44 \pm 0,46$				
	c15	$12,94 \pm 1,86$	$9,76 \pm 1,62$	$3,59 \pm 0,73$	$1,42 \pm 0,32$			
AI	c18	$11,90 \pm 1,81$	$9,82 \pm 1,65$	$2,97 \pm 0,69$	$2,04 \pm 0,62$	$0,28 \pm 0,27$		
	c27	$11,60 \pm 1,179$	$7,95 \pm 1,35$	$5,56 \pm 0,98$	$5,98 \pm 1,14$	$5,62 \pm 1,11$	$1,78 \pm 0,41$	
	c33	$10,87 \pm 1,76$	$7,88 \pm 1,39$	$6,00 \pm 1,14$	$6,57 \pm 1,28$	$5,68 \pm 1,19$	$4,18 \pm 0,88$	$0,88 \pm 0,27$

**Tabla T6.** Estimación de las distancias genéticas K2P (en porcentaje) entre la especie *A. torrentium* (TOR), el haplogrupo AP y los grupos genéticos encontrados en el haplogrupo AI (c4, c15, c18, c27 y c33). En la diagonal se muestran las estimas de la divergencia evolutiva promedio dentro de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar.

**Figura T9.** (Página siguiente) Árbol filogenético construido mediante inferencia bayesiana (BI) con las secuencia del set de datos COI (I). Las estimas de los tiempos de los nodos A, B y C se detallan en la Tabla T6.



A partir de las distancias patrísticas del árbol BI, se estima que la divergencia entre *A. torrentium* y *A. pallipes* s.l. pudo suceder hace unos 21,6 – 13,1 MA, dependiendo de la tasa de sustitución usada, 1,66% o 2,75% por MA (Tabla T7 y nodo A en la Figura T7). A continuación, se produciría la separación de los haplogrupos AP y AI hace unos 17,8 – 10,7 MA (Tabla T7 y nodo B en la Figura T9).

Evento	Tasa de sustitución (%)	Tiempo de divergencia (MA)
A	1,66	21,6
	2,75	13,1
B	1,66	17,8
	2,75	10,7
C	1,66	14,7
	2,75	8,86

**Tabla T7.** Estimaciones del tiempo transcurrido en millones de años (MA) en los eventos de divergencia en el género *Austropotamobius*. Los eventos A, B y C se indican en la Figura T9.

Para determinar las principales tendencias de variación en este set de datos, se llevaron a cabo varios análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura T10) a partir de las distancias K2P.

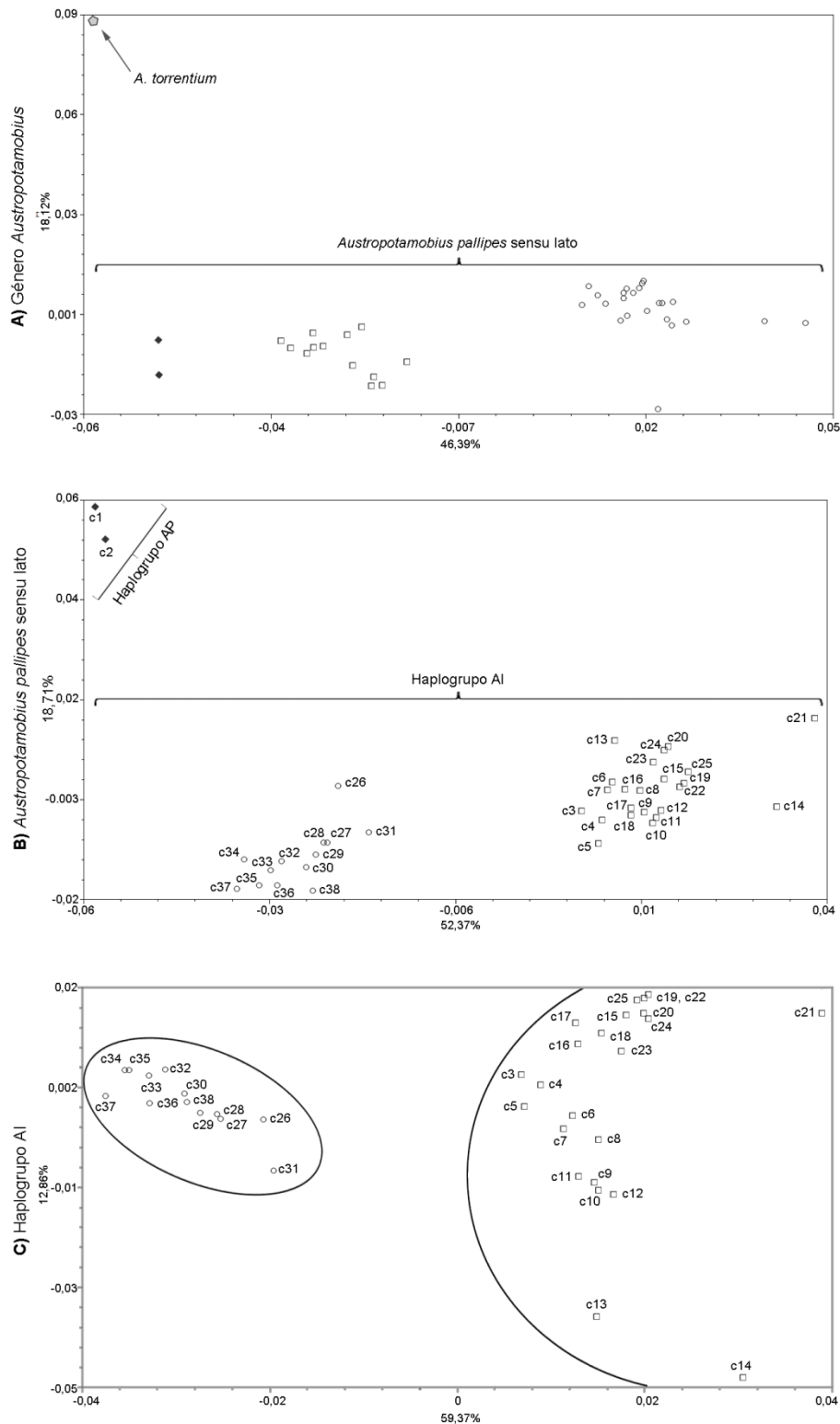
En la figura T10A se incluyen todos los haplotipos del género *Austropotamobius*. Los dos primeros ejes absorben un 64,51% de la variabilidad y se aprecia claramente la separación de las especies *A. torrentium* y *A. pallipes* s.l. La Figura T10B muestra, de manera similar a la estructura encontrada con las reconstrucciones filogenéticas, la existencia de subestructura genética en *A. pallipes* s.l. Los dos primeros ejes explican el 71% de la variación y es posible distinguir los haplogrupos AP y AI. Finalmente, considerando sólo los haplotipos del haplogrupo AI en el análisis, los dos primeros ejes explican alrededor del 72% de la varianza y distinguen dos conjuntos de secuencias, el primero formado por los haplotipos c3 – c25 y el segundo por c26 – c38 (Figura T10C).

Al representar gráficamente las distancias K2P entre pares de haplotipos frente al número de haplotipos comparados, no es posible apreciar un hueco o *gap* entre las especies *A. torrentium* y *A. pallipes* s. l. (Figura T11). Es decir, no se puede distinguir la variabilidad intraespecífica de la variación interespecífica.

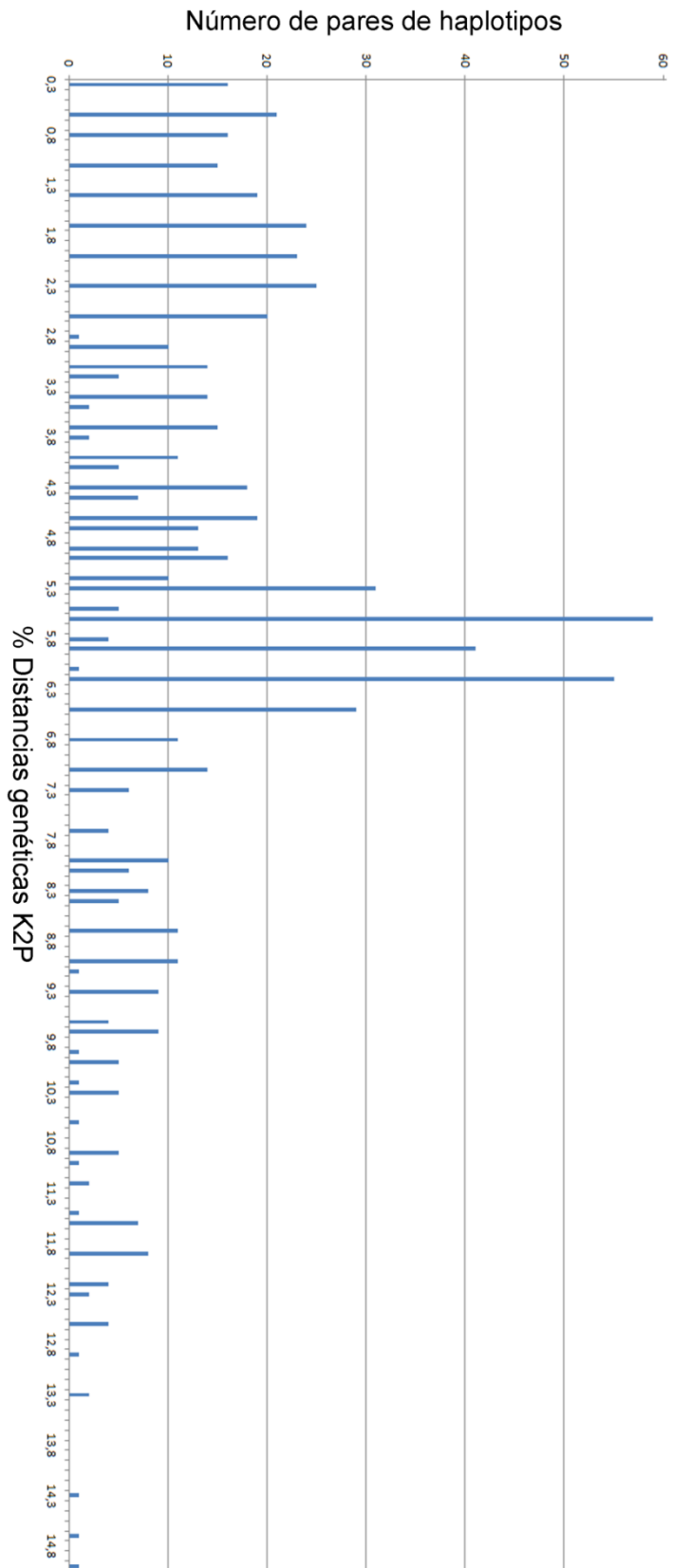
Con la aplicación en línea ABGD se obtiene como resultado más probable una sola partición, es decir, todas las secuencias pertenecerían a la misma especie. Cuando asignamos valores muy bajos a los parámetros X (anchura relativa del barcode *gap*) y P (variabilidad intraespecífica), se obtienen dos particiones en el conjunto de haplotipos COI (I) que corresponderían a las especies *A. torrentium* y *A. pallipes* s.l.

La distribución geográfica de la variación genética en *Austropotamobius pallipes* s.l. encontrada en este conjunto de secuencias se ha representado en mapas físicos (Figuras T12 y T13. Los mapas están disponibles en los enlaces <https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsqg.kC9LrjZIM1Mk> y [https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsqg.kki\\_7GVjJLTY](https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsqg.kki_7GVjJLTY). Cada marca corresponde a una de las poblaciones detalladas en la Tabla T2 y despliega información acerca del haplotipo identificado al analizar 360 bases del gen COI, el número de acceso en GenBank, el número de ejemplares secuenciados, la referencia del artículo original y el linaje propuesto por Trontelj et al. (2005).

En los mapas físicos, se observa que el haplogrupo AP se extiende por el oeste de Alemania, Francia y noroeste de Italia (Liguria) mientras que el haplogrupo AI tiene un rango de distribución más amplio. En el haplogrupo AI, el grupo c9 se encuentra en Austria, Croacia (donde también se distribuye el grupo c18), Eslovenia y noreste de Italia (Friuli Venezia Giulia, Trentino Alto Adige y Veneto). El grupo c15 se localiza, principalmente, en el centro y sur de Italia (Abruzzo, Basilicata, Calabria, Lazio, Marche y Toscana) aunque, puntualmente, también está en el noroeste de Italia (Piemonte) y noroeste de España (Cataluña). El área de distribución del grupo c27 solapa parcialmente con los anteriores en Eslovenia y noreste de Italia (Veneto y Friuli Venezia Giulia) pero también se extiende por el noroeste y centro de Italia (Lombardía y Marche). Finalmente, el grupo c33 se distribuye por el sur de Suiza, la mitad septentrional de Italia (Emilia – Romaña, Liguria, Lombardía, Piemonte y Toscana) y ampliamente por España.



**Figura T10.** (Página anterior) Análisis de coordenadas principales de las distancias K2P entre los haplotipos encontrados en el conjunto COI (I). Los gráficos muestran los PCoA de: A) los 39 haplotipos identificados en el género *Austropotamobius*, B) los haplotipos de *A. pallipes sensu lato* y C) los haplotipos del haplogrupo AI.



**Figura T11.** (Página siguiente) Diagrama de barras que representa, en abscisas, las estimas de las distancias genéticas K2P por pares (expresadas en porcentaje) entre los 32 haplotipos del género *Austroptomobius* identificados en el conjunto de datos COI (I) y, en ordenadas, las frecuencias absolutas o número de pares de haplotipos que presentan esas distancias.



### Padrones de Bureba, ES

Haplotype c33  
 FJ897843, JF430570  
 (n = 10)  
 Assignment in the present work: *A. i. italicus*  
 Matallanas et al.

### Jezero Modro Oko, Ploče, HR

Haplotype c6  
 AY667116, AY667106  
 (Approximate location) (n = 2)  
 Assignment in the present work: *A. i. carsicus*  
 Previously assigned to: *A. i. carsicus*/ SEA-WB  
 lineage  
 Trontelj et al. 2005 Molecular Phylogenetics and

**Figura T12.** Distribución geográfica de los haplotipos COI (I) del complejo de especies *A. pallipes* sensu lato. Los haplotipos del haplogrupo AP aparecen en rojo. Los haplotipos del haplogrupo AI se muestran con distintos colores, siguiendo la subestructura genética detectada en los análisis. Así, el grupo c4 se muestra en naranja, c15 en verde lima, c18 en amarillo, c27 en morado y c33 en azul. Cuando se selecciona una marca del mapa, que se puede visitar en la dirección <https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsog.kC9LrjZIM1Mk>, se despliega información acerca del punto de muestreo como se puede ver en las dos capturas de pantalla inferiores.



**Padrones de Bureba, ES**

Haplotype c33  
 FJ897843, JF430570  
 (n = 10)  
 Assignment in the present work: *A. i. italicus*  
 Matallanas et al.



**Jezero Modro Oko, Ploče, HR**

Haplotype c6  
 AY667116, AY667106  
 (Approximate location) (n = 2)  
 Assignment in the present work: *A. i. carsicus*  
 Previously assigned to: *A. i. carsicus*/ SEA-WB  
 lineage  
 Trontelj et al. 2005 Molecular Phylogenetics and



**Figura T13.** Distribución geográfica de los grupos genéticos COI (I) identificados en el complejo de especies *A. pallipes* sensu lato. El haplogrupo AP aparece en rojo. El haplogrupo AI se representa con dos colores, diferenciando los dos subgrupos genéticos detectados en los análisis. Así, los subgrupos c4, c15 y c18 se muestran en naranja, y los subgrupos c27 y c33 en azul. En el mapa, que se puede visitar en la dirección [https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsqq.kki\\_7GVjJLTy](https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsqq.kki_7GVjJLTy), cada marca despliega información acerca de la muestra, como se puede ver en las dos capturas de pantalla inferiores.

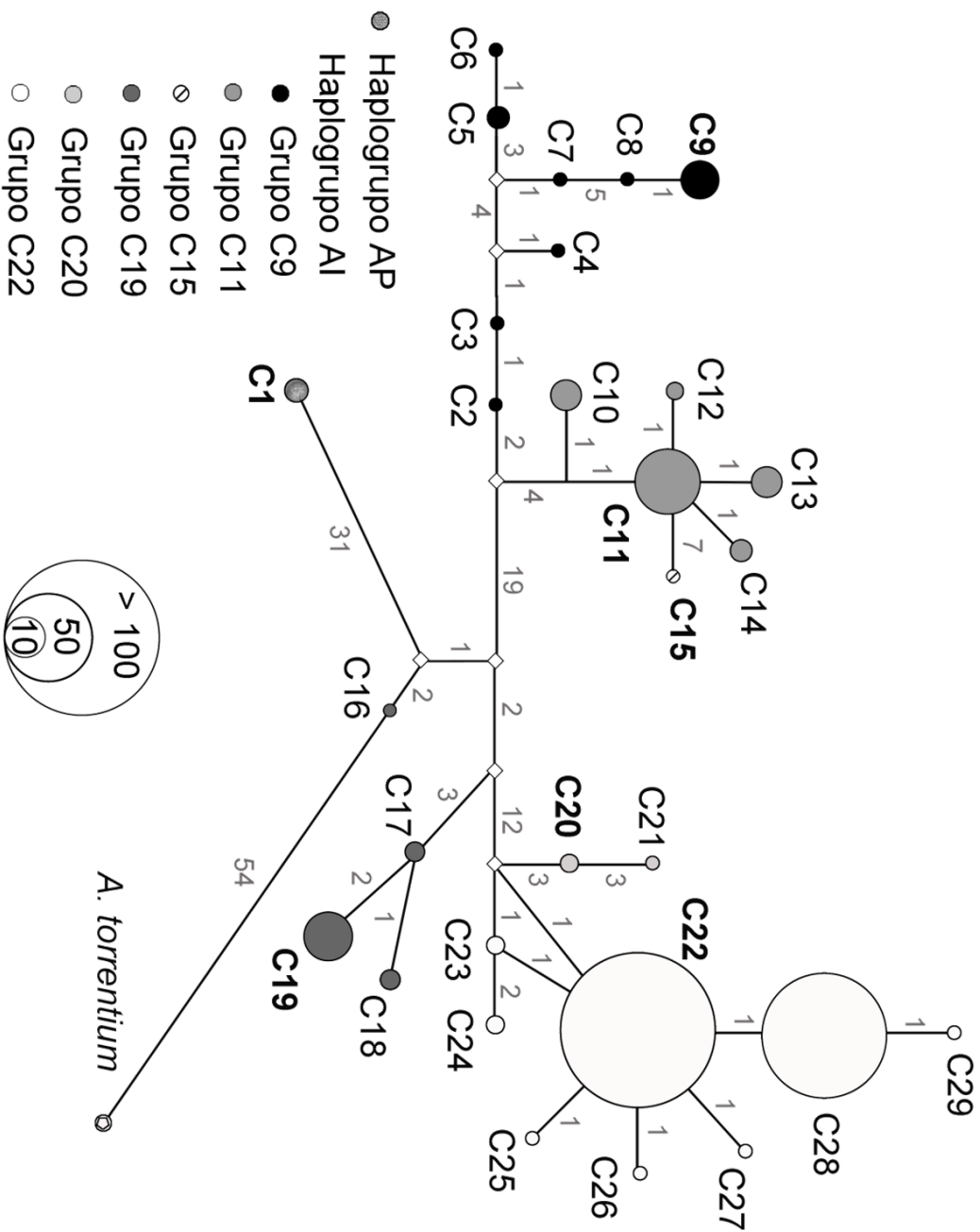
### III) Análisis del conjunto de datos COI (II)

Para estos análisis se han seleccionado un subconjunto de haplotipos del conjunto de datos COI (I) que permiten analizar una mayor cantidad de nucleótidos.

La longitud final de la secuencia es de 533 pb y el alineamiento contiene información acerca de 54 secuencias de 551 cangrejos en 110 poblaciones. Se han encontrado un total de 100 SNP, de los que 62 son informativos bajo parsimonia. Esta variabilidad hace posible distinguir 35 haplotipos, 34 de los cuales se pueden asignar a *Austropotamobius pallipes* s. l. y 1 a la especie *A. torrentium*. En el género, la diversidad haplotípica es de  $0,582 \pm 0,022$  y la nucleotídica  $0,01803 \pm 0,00158$ . Considerando sólo los haplotipos del complejo de especies *A. pallipes*, el número de sitios polimórficos es 77, de ellos 51 parsimónicos, y los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica  $0,579 \pm 0,022$  y  $0,01735 \pm 0,00152$ , respectivamente.

En la red MJ (Figura T14), se aprecia que la especie *A. torrentium* difiere de *A. pallipes* s. l. en 54 SNP. Al igual que en las redes anteriores, en *A. pallipes* se observan dos grandes haplogrupos, AP y AI, separados por al menos 33 sustituciones. Esta separación también se observa en los árboles filogenéticos y está apoyada por valores de *bootstrap* (en MP y NJ) y de probabilidades posteriores (BI) superiores a 83 y 0,90, respectivamente.

A su vez, en la red se distinguen 5 grupos de secuencias en el haplogrupo AI, separados por 4 mutaciones o más y nombrados como C9, C11, C19, C20 y C22. Esta distinción de 5 grupos genéticos también se aprecia en los árboles filogenéticos de NJ, MP y BI, apoyada por valores altos de *bootstrap* y probabilidades posteriores (73 – 100 y 0,76 – 0,95, respectivamente). Los grupos con menos soporte estadístico son C19 y C15, que en el conjunto de datos COI (II) están representados por menos secuencias que en el set COI (I). Los 13 haplotipos identificados en nuestras muestras españolas (Ca – Cm) e italianas (Cc) (Figura T7), se reducen a 4 y se incluyen en el haplogrupo AI, de manera que los haplotipos Ca, Cb y Cg se engloban en C22, el haplotipo Ci en C25, los haplotipos Cc – Cf, Ch y Cl – Cm en C28 y el haplotipo Cj en C29.



**Figura T14.** Red de haplotipos realizada con el conjunto de datos COI (II). Los círculos representan haplotipos y el área es proporcional a su frecuencia de aparición. Los rombos representan haplotipos no muestreados o extintos. Las poblaciones que se hallan representadas en cada haplotipo pueden consultarse en la Tabla T2. En negrita aparecen los haplotipos que dan nombre a los grupos genéticos dentro del haplogrupo AI.

En la red MJ (Figura T14) se observa que el número de SNP que separa *A. torrentium* de *A. pallipes* s. l. es mucho mayor que el que diferencia los haplogrupos AP y AI. En la Tabla T8 se puede observar que el ratio transición – transversión es mucho menor entre *A. torrentium* – *A. pallipes* s. l. que entre los haplogrupos AP y AI o, especialmente, entre los grupos genéticos detectados en el haplogrupo AI (ver más adelante).

	COI (II)		
	SNP	Ts	Tv
<i>A. torrentium</i> – <i>A. pallipes</i> s. l.	54	39	15
Haplogrupo AP – Haplogrupo AI	33	26	7
(C2 – C15) – (C20 – C29)*	26	25	1

**Tabla T8.** Número de SNP, desglosado en transiciones (Ts) y transversiones (Tv), encontrado entre las distintas agrupaciones genéticas comprendidas en el género *Austropotamobius*. (\* Grupos genéticos detectados dentro del haplogrupo AI formados por dos conjuntos de haplotipos, ver análisis de coordenadas principales).

En la Tabla T9 se muestran los porcentajes de divergencia genética K2P entre los grupos genéticos detectados con el set de datos COI (II). El mayor valor de divergencia promedio,  $12,23 \pm 1,49\%$ , corresponde a la comparación entre las especies *A. torrentium* y *A. pallipes* s. l. Considerando sólo las secuencias de *A. pallipes* s.l., las distancias entre los haplogrupos AP y AP oscilan entre 7,13% y 8,48%, con un promedio de  $7,24 \pm 1,14\%$ . En la tabla también se observa que la divergencia entre los grupos genéticos del haplogrupo AI es menor, oscilando entre 0,80% y 6,40%.

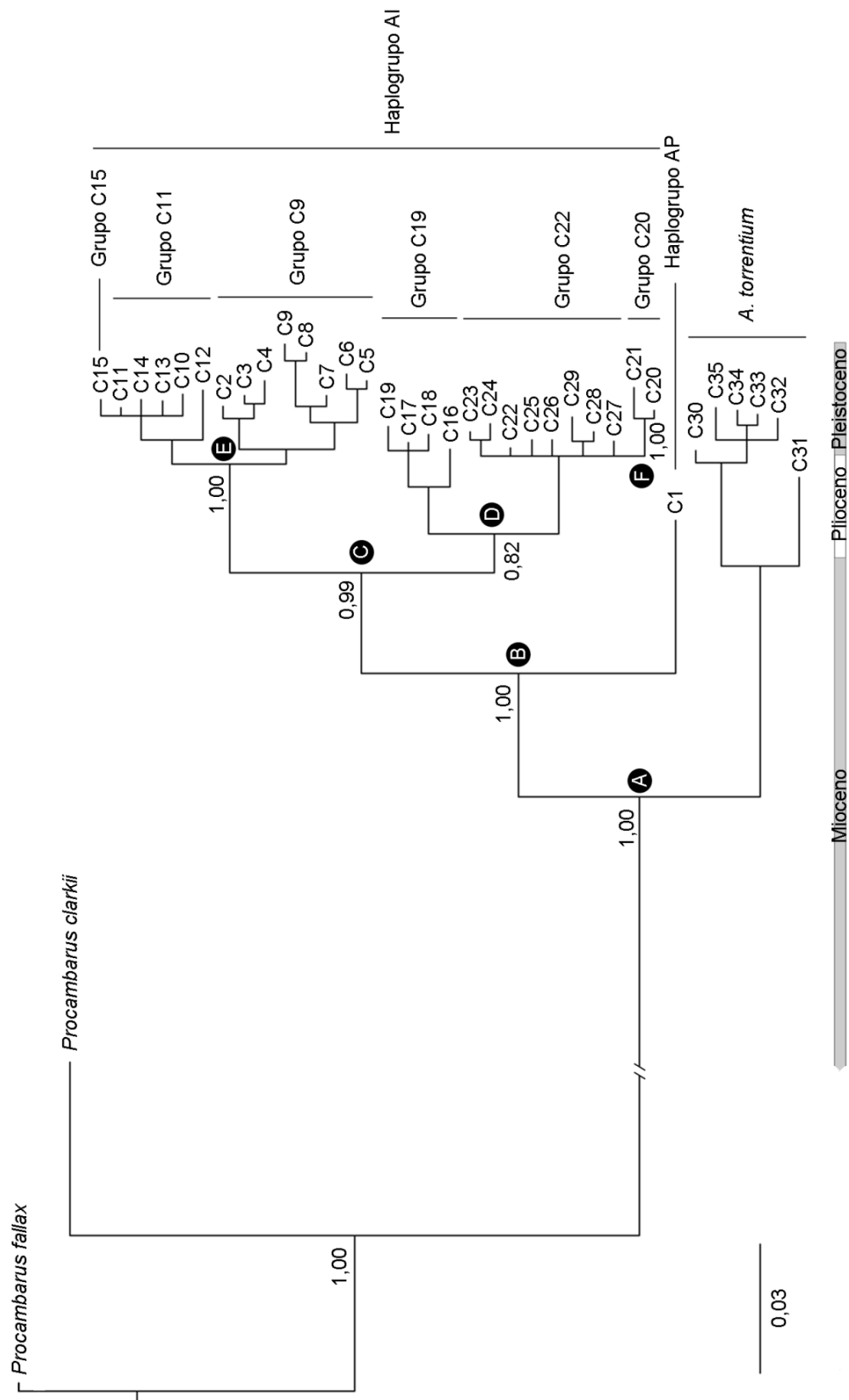
	TOR	AP	AI					
			C9	C11	C15	C19	C20	C22
AP	11,99±1,51	0						
AI	C9	12,89±1,57	7,99±1,19	0,97±0,25				
	C11	13,59±1,62	7,79±1,20	2,13±0,51	0,16±0,07			
	C15	13,34±1,63	8,48±1,27	2,67±0,62	1,42±0,51	0		
	C19	12,72±1,60	7,52±1,16	5,29±0,96	5,50±1,00	6,13±1,08	0,32±0,11	
	C20	11,41±1,42	7,61±1,23	6,03±1,05	6,18±1,14	6,40±1,16	3,68±0,81	0
	C22	12,05±1,49	7,13±1,18	5,42±0,98	5,30±1,04	5,51±1,06	3,33±0,74	0,80±0,36

**Tabla T9.** Distancias genéticas K2P (en porcentaje) entre la especie *A. torrentium*, el haplogrupo AP y los grupos genéticos encontrados en el haplogrupo AI (C9, C11, C15, C19, C20 y C22) en el conjunto de datos COI (II). En la diagonal se muestran las estimas de la divergencia evolutiva promedio dentro de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar.

Como en los conjuntos de datos anteriores, las dataciones estimadas a partir de las distancias patrísticas obtenidas con el árbol BI, indican que las especies *A. torrentium* y *A. pallipes s.l.* divergieron en el Mioceno, al igual que los haplogrupos AP y AI de *A. pallipes s.l.*, (Tabla T10, nodos A y B en la Figura T15). La diferenciación del haplogrupo AI en, los grupos genéticos C9, C11, C15 por una parte y los grupos C19, C20, C22 por otra, se situaría entre el Mioceno y el Plioceno (Tabla T10, nodo C en la Figura T15). El resto de las bifurcaciones que dan origen a los grupos descritos en la red MJ son plio – o pleistocénicas, siendo la más reciente la que separa los grupos C20 y C22 hace unos 2,04 – 1,23 MA, dependiendo de la tasa de sustitución empleada para los cálculos (Tabla T10, evento F en la Figura T15).

Evento	Tasa de sustitución (%)	Tiempo de divergencia (MA)
A	1,66	12,6
	2,75	7,6
B	1,66	9,2
	2,75	5,5
C	1,66	6,3
	2,75	3,8
D	1,66	5,3
	2,75	3,2
E	1,66	3,3
	2,75	2,0
F	1,66	2,0
	2,75	1,2

**Tabla 10.** Estimaciones del tiempo de divergencia transcurrido en millones de años (MA) en el género *Austropotamobius*. Los eventos A – F se indican en la Figura T15.



**Figura T15.** Árbol filogenético construido mediante inferencia bayesiana (BI). Las estimas de los tiempos en los nodos A – F se detallan en la Tabla T10.

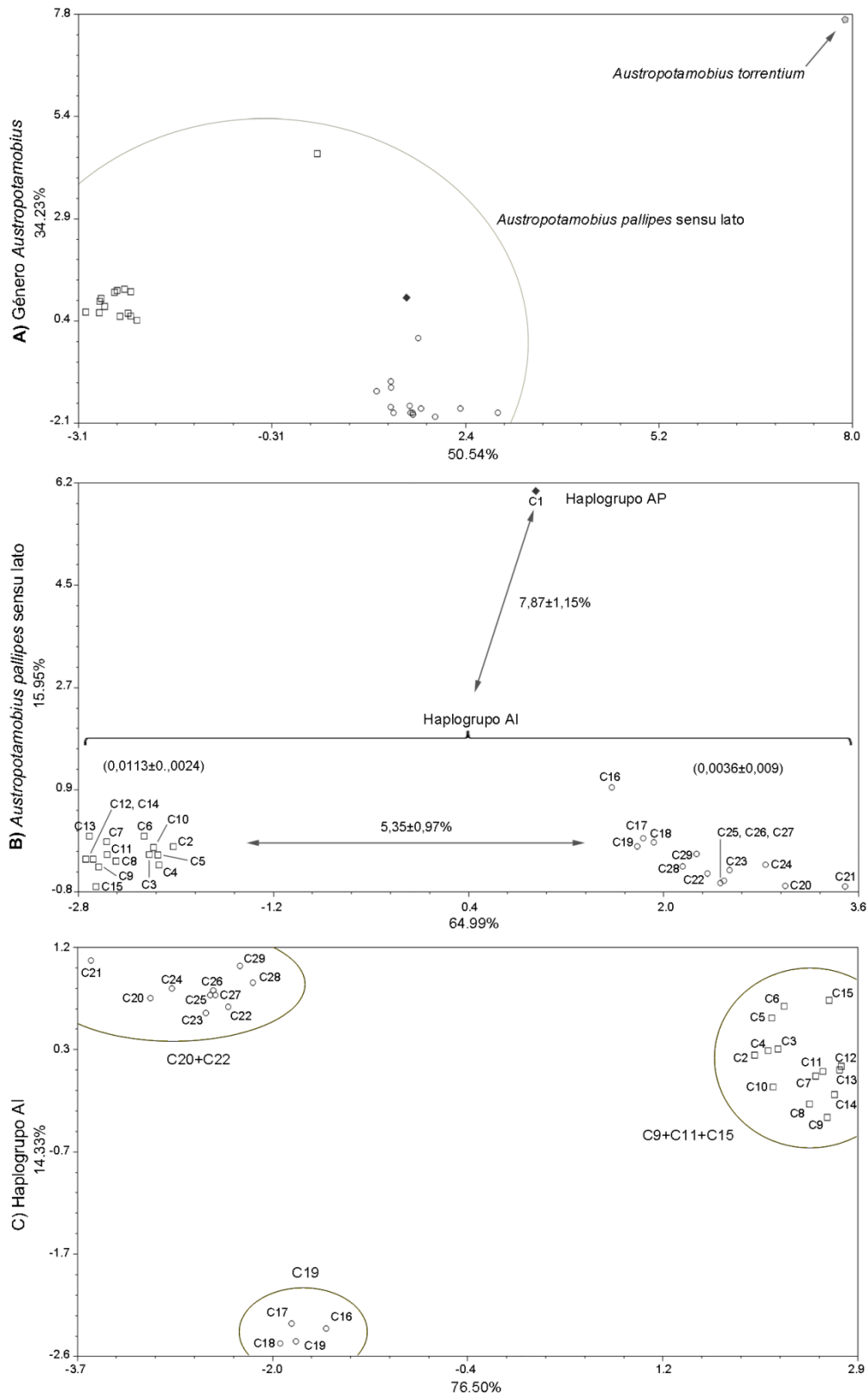
Para profundizar en las relaciones entre los haplotipos que forman el conjunto de haplotipos COI (II) y determinar las principales tendencias de variación, se llevaron a cabo varios de análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura T16) a partir de las distancias K2P.

En el análisis de la Figura T16A con todos los haplotipos del set COI (II), los dos primeros ejes explican casi el 85% de la varianza y separan claramente a las dos especies reconocidas dentro del género, *A. torrentium* y *A. pallipes*.

En la Figura T16B, se puede apreciar con más detalle la existencia de subestructura genética en los haplotipos COI (II) de *A. pallipes* s. l. Los dos primeros ejes del análisis, que absorben el 80,94% de la variación, diferencian 3 conjuntos de haplotipos. El primero corresponde al haplogrupo AP y en los otros dos se encuentran las secuencias del haplogrupo AI.

En el último PCoA (Figura T16C) que sólo incluye secuencias pertenecientes al haplogrupo AI, el primer eje absorbe más del 75% de la varianza y separa dos conjuntos de secuencias, los haplotipos C2 – C15 de los haplotipos C16 – C29. El segundo eje (14,33%) además, permite distinguir variabilidad en este último conjunto, diferenciando los haplotipos C16 – C19 de los haplotipos C20 – C29.

**Figura T16.** (Página siguiente) Análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en las distancias K2P entre los haplotipos del conjunto de datos COI (II). Los gráficos muestran los dos primeros ejes de los PCoA de: A) los 32 haplotipos identificados en el género *Austropotamobius*, B) los haplotipos de *A. pallipes* s. l., indicándose la divergencia genética media ( $K2P \pm$  desviación estándar) entre y dentro (paréntesis) de los conjuntos, C) los grupos genéticos pertenecientes al haplogrupo AI.

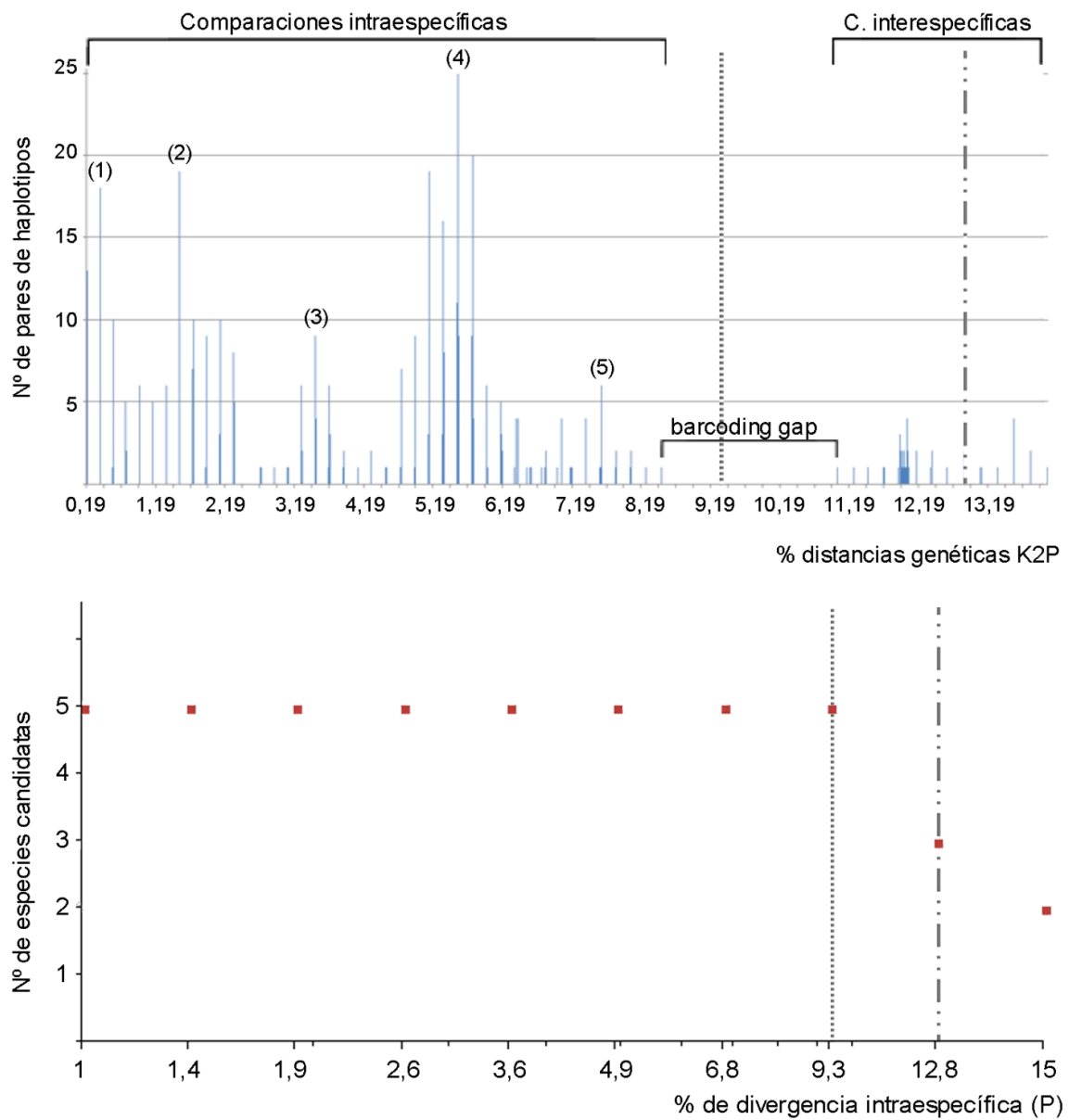


Como se comentó en Métodos, se ha descrito que al representar las distancias K2P entre pares de haplotipos frente al número de haplotipos comparados en un diagrama de barras aparece un hueco o gap. El gap permite distinguir la variabilidad dentro de las especies de la variabilidad entre las mismas. Por ello, se ha representado las distancias genéticas K2P obtenidas del conjunto COI (II) en un nuevo diagrama de barras con el objetivo de averiguar si con un fragmento mayor del marcador COI se podría llegar a distinguir la variabilidad intra de la interespecífica.

En la Figura T17A se observa claramente un hueco (8,5 – 10,8%) en la representación de las distancias, por lo que se pueden diferenciar perfectamente las dos especies, *A. torrentium* y *A. pallipes* sensu lato. A la derecha del mismo se sitúan los mayores valores de divergencia, entre 10,8% – 14,8% (media  $\pm$  SD = 12,08 $\pm$ 1,59%), y corresponden a las comparaciones interespecíficas *A. pallipes* s.l. – *A. torrentium*. A la izquierda del hueco se sitúan los valores de distancias más pequeños, en el rango 0,2% – 8,5% (media  $\pm$  SD = 3,74 $\pm$ 0,92%) e incluyen todas las comparaciones entre secuencias de la misma especie. En definitiva, con el método de distancias es posible distinguir con claridad en el set COI (II) *A. torrentium* y *A. pallipes* s. l., las especies establecidas en el género, y en menor medida, hasta cuatro grupos genéticos en el complejo de especies *A. pallipes*, lo que hace un total de cinco particiones (Figura T17B).

La aplicación en línea ABGD, al usar los ajustes estándar, separa en dos particiones o especies candidatas los haplotipos de este conjunto de datos COI (II): *A. torrentium* y *A. pallipes* s.l.

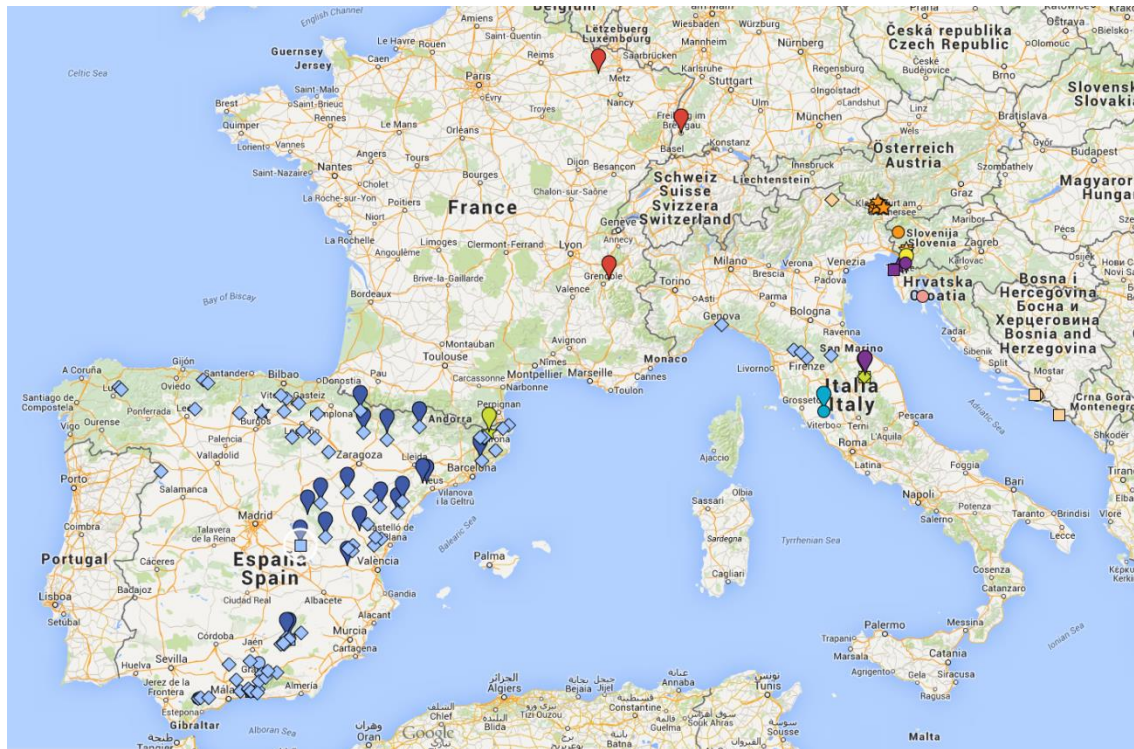
Cuando se asignan a los parámetros anchura del *gap* y diversidad intraespecífica los valores estimados con los métodos de distancias, el programa ABGD identifica dos posibles huecos. El primero, con un valor umbral en torno al 12,5% de divergencia genética, serviría para distinguir tres especies candidatas: *A. torrentium* y los haplogrupos AP y AI de *A. pallipes* s.l. (Figura T17B). El segundo hueco, con un valor límite de variabilidad de alrededor del 9,3% originaría cinco particiones: *A. torrentium*, el haplogrupo AP y dentro del haplogrupo AI, el conjunto de haplotipos C2 – C15, los haplotipos C16 – C19 y el conjunto C9 – C20.



**Figura T17.** Representación de los análisis en el conjunto de datos COI (II): La gráfica superior corresponde al diagrama de barras que representa, en abscisas, las estimas de las distancias genéticas K2P por pares (en porcentaje) entre los haplotipos y, en ordenadas, las frecuencias absolutas o número de pares de haplotipos que presentan esas distancias. En la gráfica inferior, se representa el número de especies candidatas que identifica la aplicación ABGD al introducir los parámetros estimados de anchura del hueco y diversidad intraespecífica.

De nuevo, para tener una visión global de la distribución geográfica de la variabilidad genética de este complejo de especies con el set COI (II), se han dispuesto los haplotipos sobre mapas físicos de Europa (Figuras T18 y T19. Visitar los enlaces <https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsqg.k7yK6FI30pVo> y <https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsqg.kk3WBUAY6CzA>). Cada marca del mapa corresponde a una de las poblaciones detalladas en la Tabla T2 y despliega información sobre el haplotipo identificado tras analizar 533 nucleótidos del gen COI, el número de acceso en GenBank, el número de cangrejos analizados, la referencia del artículo original y el estatus taxonómico propuesto por Trontelj et al (2005).

Al integrar esta información genética en mapas físicos se aprecia que el haplogrupo AP se extiende por Francia y Alemania. El haplogrupo AI se encuentra ampliamente distribuido por Europa. En detalle, el grupo genético C9 se encuentra en Austria, Croacia, Eslovenia y noreste de Italia (Trentino Alto Adige), solapando, con el grupo C15 en Croacia. El grupo C11 está, principalmente, en el centro de Italia (Marches) aunque también está presente en el noreste de España (Cataluña). La distribución del grupo C19 coincide con la del C9 en Eslovenia, y con la del C11 en el centro de Italia (Marches). El resto de los haplotipos identificados en este set de datos (C20 – C29) se encuentran en poblaciones de España y parte de Italia. En concreto, el grupo C20 se restringe al centro de Italia (Toscana) mientras que el grupo C22 además de en esta región también está en el noroeste de Italia (Liguria) y en todo el área de distribución del cangrejo de río en España.



### Padrones de Bureba, ES

Haplotype C28  
 FJ897843  
 (n = 9)  
 Assignment in the present work: *A. i. italicus*  
 Matallanas et al.

### Jezero Modro Oko, Ploče, HR

Haplotype C6  
 AY667106  
 (Approximate location) (n = 2)  
 Assignment in the present work: *A. i. carsicus*  
 Previously assigned to: *A. i. carsicus* / SEA-WB  
 lineage  
 Trontelj et al. 2005 Molecular Phylogenetics and  
 Evolution 34, 212-226

**Figura T18.** Distribución geográfica de los haplotipos COI (II) del complejo de especies *A. pallipes* sensu lato. Los haplotipos del haplogrupo AP aparecen en rojo. Los haplotipos del haplogrupo AI se muestran con distintos colores, siguiendo la subestructura genética detectada en los análisis. Así, el grupo C9 se muestra en naranja, C11 en verde lima, C15 en amarillo, C19 en morado, C20 en azul claro y C22 en azul oscuro. Cuando se clica en una marca del mapa, que se puede visitar en la dirección <https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClcLpKWsgg.kk3WBUAY6CzA>, se despliega información acerca del punto de muestreo como se puede ver en las dos capturas de pantalla bajo el mapa.



**Padrones de Bureba, ES**

Haplotype c25  
 JF430570  
 (n = 1)  
 Assignment in the present work: A. i. italicus  
 Matallanas et al.

**Jezero Modro Oko, Ploče, HR**

Haplotype C5  
 AY667116  
 (Approximate location) (n = 2)  
 Assignment in the present work: A. i. carsicus  
 Previously assigned to: A. i. carsicus / SEA-WB  
 lineage  
 Trontelj et al. 2005 Molecular Phylogenetics and  
 Evolution 34, 212-226

**Figura T19.** Distribución geográfica de los grupos genéticos COI (II) identificados en el complejo de especies *A. pallipes* sensu lato. El haplogrupo AP aparece en rojo. El haplogrupo AI se representa con dos colores, diferenciando los dos subgrupos genéticos detectados en los análisis. Así, los subgrupos C9, C11 y C15 se muestran en naranja, y los subgrupos C19, C20 y C22 en azul. En el mapa, que se puede visitar en la dirección <https://www.google.com/maps/d/edit?mid=z9ClLpKWsg.k7yK6FI30pVo>, cada marca despliega información acerca de la muestra, como se puede ver en las dos capturas de pantalla inferiores.

## RESUMEN DE RESULTADOS

Para tener una visión global de los resultados obtenidos en este capítulo, a continuación se presenta un resumen de los análisis llevados a cabo en los tres conjuntos de datos, 16S, COI (I) y COI (II).

	16S	COI (I)	COI (II)
Longitud de la secuencia	464 nucleótidos	360 nucleótidos	533 nucleótidos
Ejemplares	637	2317	551
Poblaciones	158	182	110
SNP en el género <i>Austropotamobius</i> (parsimoniosos)	71 (27)	81 (70)	100 (62)
Haplotipos en el género <i>Austropotamobius</i>	32	39	35
Diversidad haplotípica del género <i>Austropotamobius</i>	0,593±0,022	0,821±0,005	0,582±0,022
Diversidad nucleotídica del género <i>Austropotamobius</i>	0,012±0,0008	0,032±0,005	0,018±0,0016
SNP en <i>Austropotamobius pallipes</i> s. l. (parsimoniosos)	49 (27)	72 (69)	77 (51)
Haplotipos en <i>Austropotamobius pallipes</i> s. l.	31	38	34
Diversidad haplotípica en <i>Austropotamobius pallipes</i> s. l.	0,591±0,022	0,821±0,005	0,579±0,022
Diversidad nucleotídica en <i>Austropotamobius pallipes</i> s. l.	0,11±0,0007	0,032±0,0004	0,017±0,001

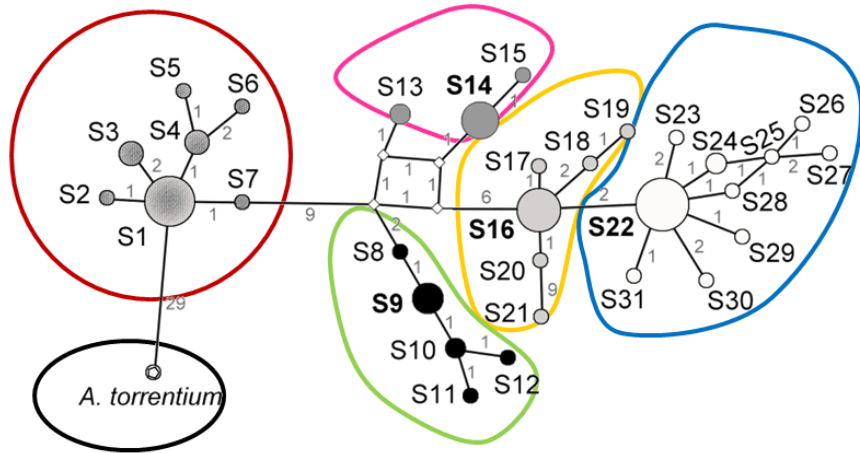
**Tabla TR1.** Resumen de los datos analizados en los tres conjuntos, 16S, COI (I) y COI (II).

**Figura TR1.** (Página siguiente) Representación conjunta de las redes de unión de medianas (redes MJ) obtenidas con los conjuntos de datos 16S, COI (I) y COI (II) (Figuras T1, T9 y T14, respectivamente en el texto). Un mismo color identifica el mismo grupo genético:

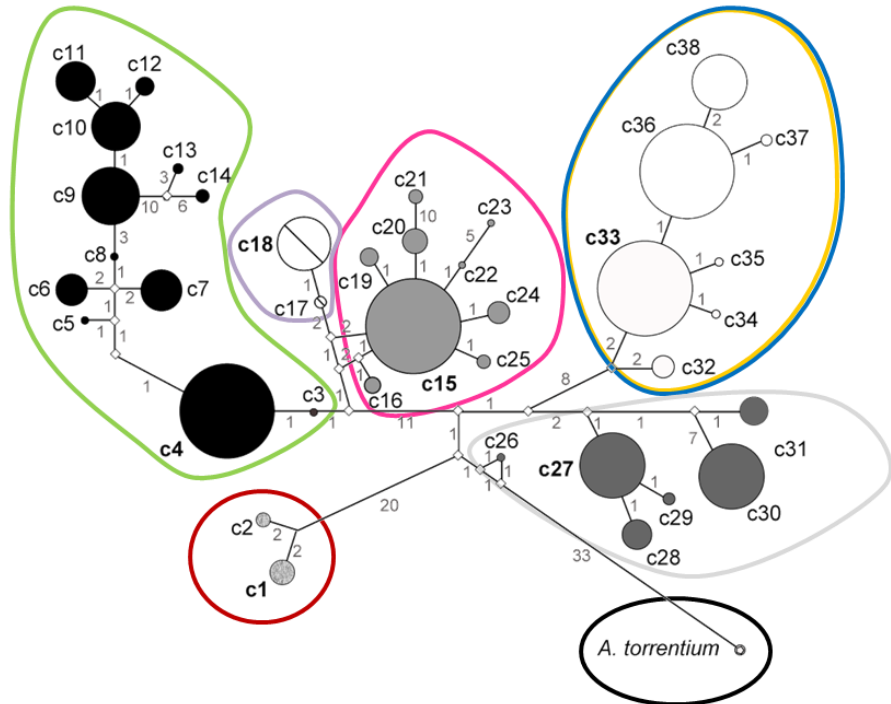
Grupo genético	16S	COI (I)	COI (II)	Color
<i>A. torrentium</i>				Negro
<i>A. pallipes</i>	Haplogrupo AP	Haplogrupo AP	Haplogrupo AP	Rojo
	S1	c1	C1	
<i>A. italicus</i>	Haplogrupo AI	Haplogrupo AI	Haplogrupo AI	
<i>A. i. carsicus</i>	S9	c4	C9	Verde
<i>A. i. meridionalis</i>	S14	c15	C11	Rosa
<i>A. i. carinthiacus</i>	S16	c33	C20	Amarillo
<i>A. i. italicus</i>	S22		C22	Azul
Linaje Istra 1	–	c27	C19	Gris
Linaje Istra 2	–	c18	C15	Morado

En la figura correspondiente al set de datos COI (I) (Figura T6 en el texto principal) los grupos S16|c33|C20 y S22|c33|C22 son coincidentes por lo que los colores que los identifican (amarillo y azul) aparecen solapados.

16S



COI (I)



COI (II)

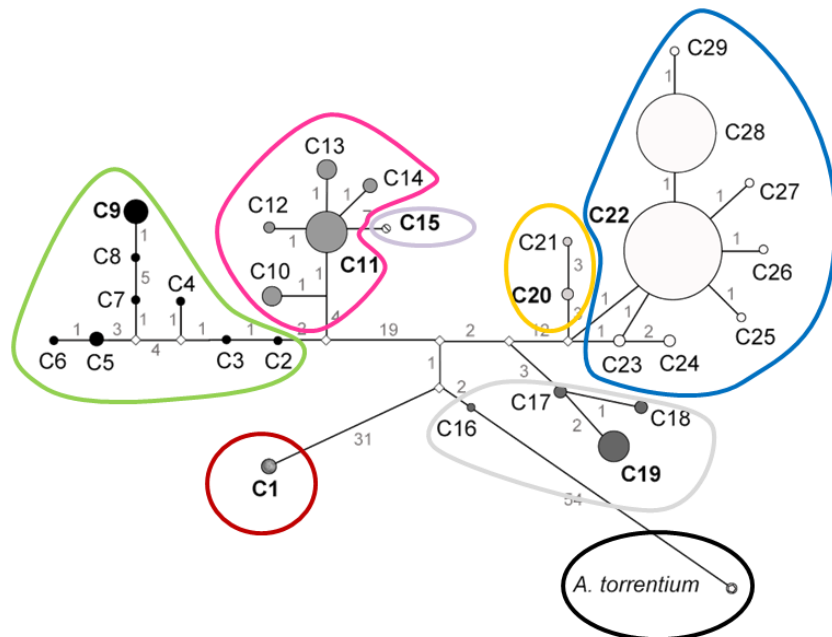


Figura TR1.

16S		TOR	AP	AI			
				S9	S14	S16	S22
AI	AP	9,13±1,54	1,00±0,25				
	S9	9,61±1,60	3,77±0,90	0,56±0,24			
	S14	8,93±1,54	3,67±,86	2,00±0,61	0,68±0,33		
	S16	10,04±1,58	4,88±0,96	3,64±0,83	2,85±0,69	1,24±0,23	
	S22	10,71±1,70	4,86±1,00	3,65±0,87	3,50±0,83	1,88±0,48	0,73±0,23

COI (I)		TOR	AP	AI				
				c4	c15	c18	c27	c33
AI	AP	11,87±1,80	1,12±0,53					
	c4	12,27±1,81	9,67±1,52	2,44±0,46				
	c15	12,94±1,86	9,76±1,62	3,59±0,73	1,42±0,32			
	c18	11,90±1,81	9,82±1,65	2,97±0,69	2,04±0,62	0,28±0,27		
	c27	11,60±,179	7,95±1,35	5,56±0,98	5,98±1,14	5,62±1,11	1,78±0,41	
	c33	10,87±1,76	7,88±1,39	6,00±1,14	6,57±1,28	5,68±1,19	4,18±0,88	0,88±0,27

COI (II)		TOR	AP	AI					
				C9	C11	C15	C19	C20	C22
AI	AP	11,99±1,51	0						
	C9	12,89±1,57	7,99±1,19	0,97±0,25					
	C11	13,59±1,62	7,79±1,20	2,13±0,51	0,16±0,07				
	C15	13,34±1,63	8,48±1,27	2,67±0,62	1,42±0,51	0			
	C19	12,72±1,60	7,52±1,16	5,29±0,96	5,50±1,00	6,13±1,08	0,32±0,11		
	C20	11,41±1,42	7,61±1,23	6,03±1,05	6,18±1,14	6,40±1,16	3,68±0,81	0	
	C22	12,05±1,49	7,13±1,18	5,42±0,98	5,30±1,04	5,51±1,06	3,33±0,74	0,80±0,36	0,09±0,06

**Tabla TR2.** Distancias genéticas K2P (en porcentaje) entre la especie *A. torrentium*, el haplogrupo AP y los grupos genéticos encontrados en el haplogrupo AI. En la diagonal se muestran las estimas de la divergencia evolutiva promedio dentro de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar. (Tablas T3, T5 y T7 en el texto principal).

**Figura TR2.** (Página anterior) Análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en las distancias K2P entre los haplotipos. Los gráficos muestran los dos primeros ejes de los PCoA de: Gráficas superiores: los haplotipos identificados en el género *Austropotamobius*, Gráficas intermedias: los haplotipos dentro de *A. pallipes* s. l. y, Gráficas inferiores: los grupos pertenecientes al haplogrupo AI. Estas gráficas se corresponden con las Figuras T3, T10 y T16 en el texto principal.

Códigos de colores:

	16S	COI (I)	COI (II)	
<b>Gráficas superiores:</b>				
<i>A. torrentium</i>				Negro
<i>A. pallipes</i> s. l.				Gris
<b>Gráficas intermedias:</b>				
<i>A. pallipes</i> s. e.	Haplog AP (S1)	Haplog AP (c1)	Haplog AP (C1)	Rojo
<i>A. italicus</i>	Haplogrupo AI	Haplogrupo AI	Haplogrupo AI	Azul
<b>Gráficas inferiores:</b>				
<i>A. i. carsicus</i>	S9	c4	C9	Verde
<i>A. i. meridionalis</i>	S14	c15	C11	
<i>A. i. carinthiacus</i>	S16	c33	C20	Amarillo
<i>A. i. italicus</i>	S22		C22	
Linaje Istra 1	–	c27	C19	–
Linaje Istra 2	–	c18	C15	Gris

Haplog: haplogrupo.

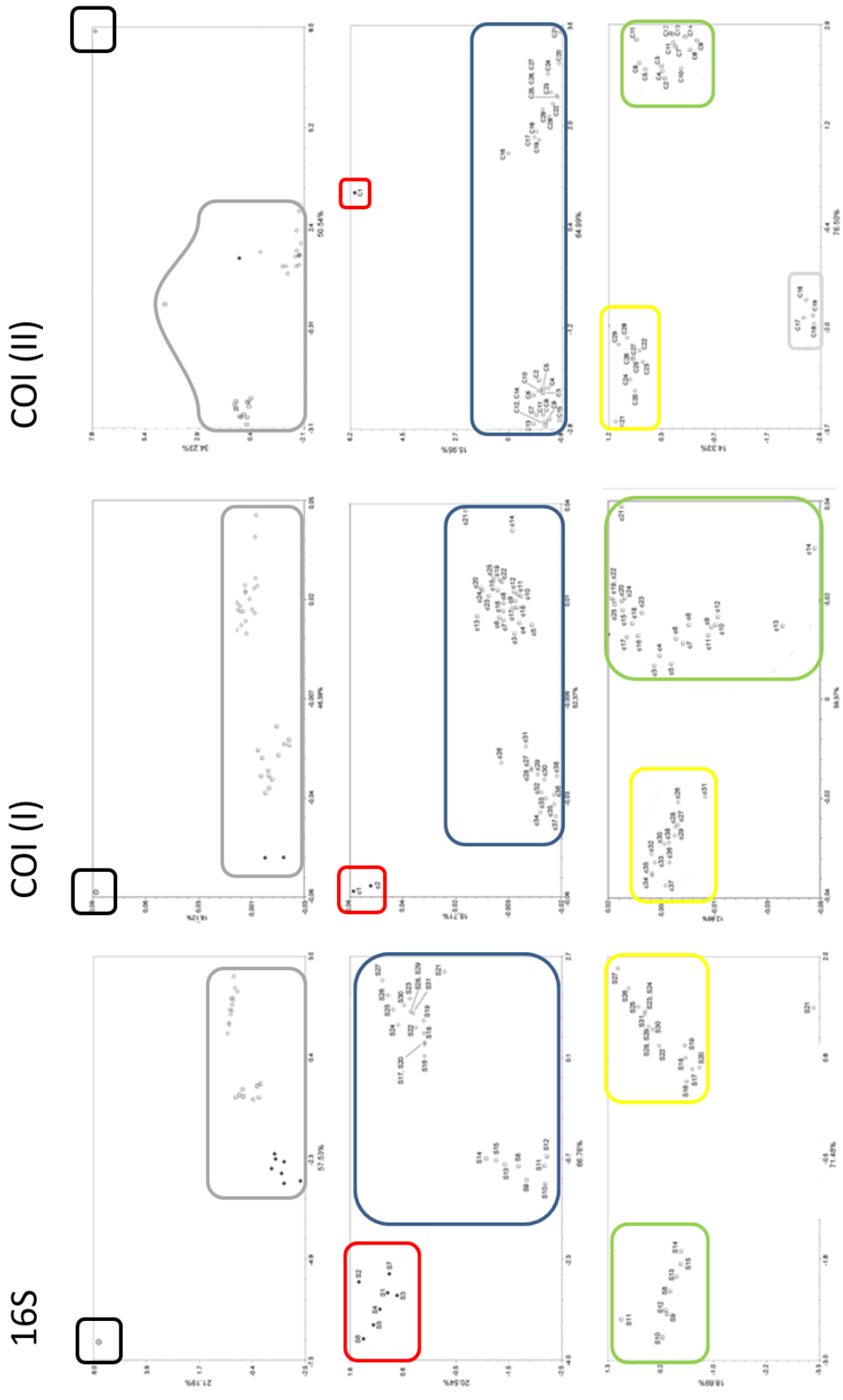


Figura TR2.

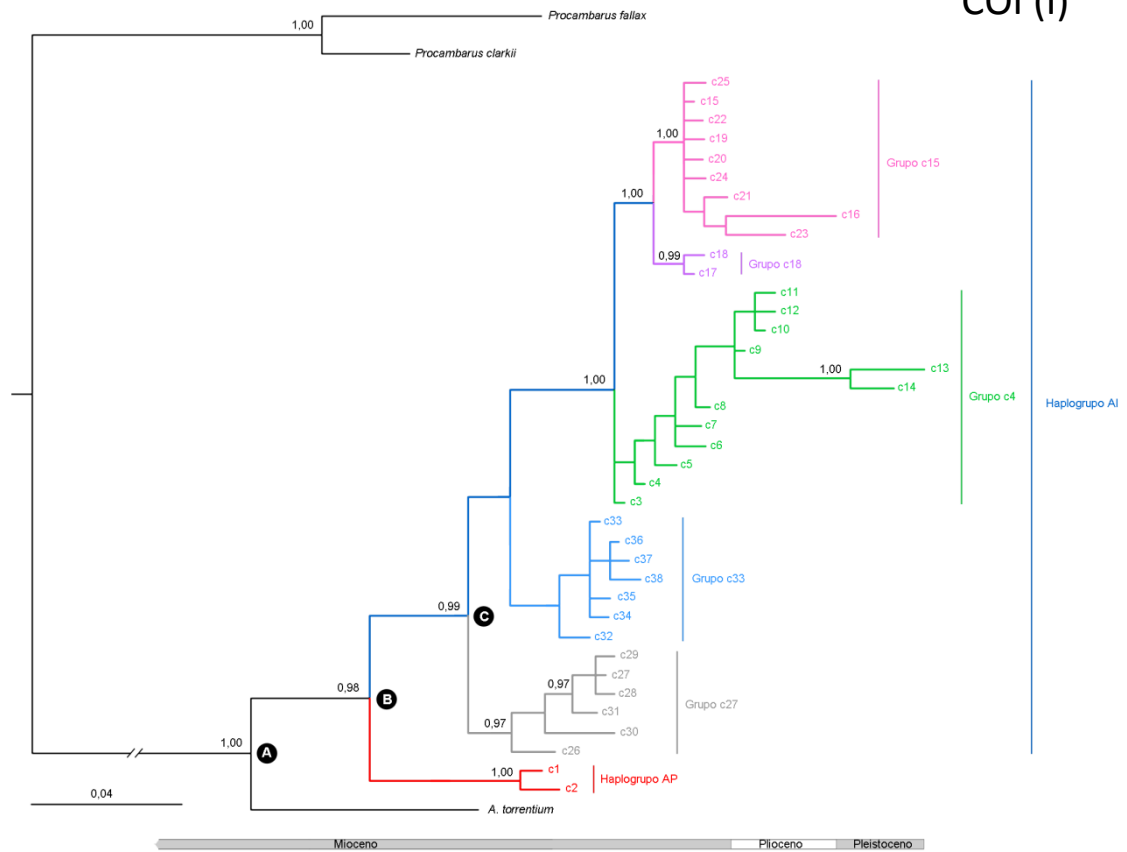
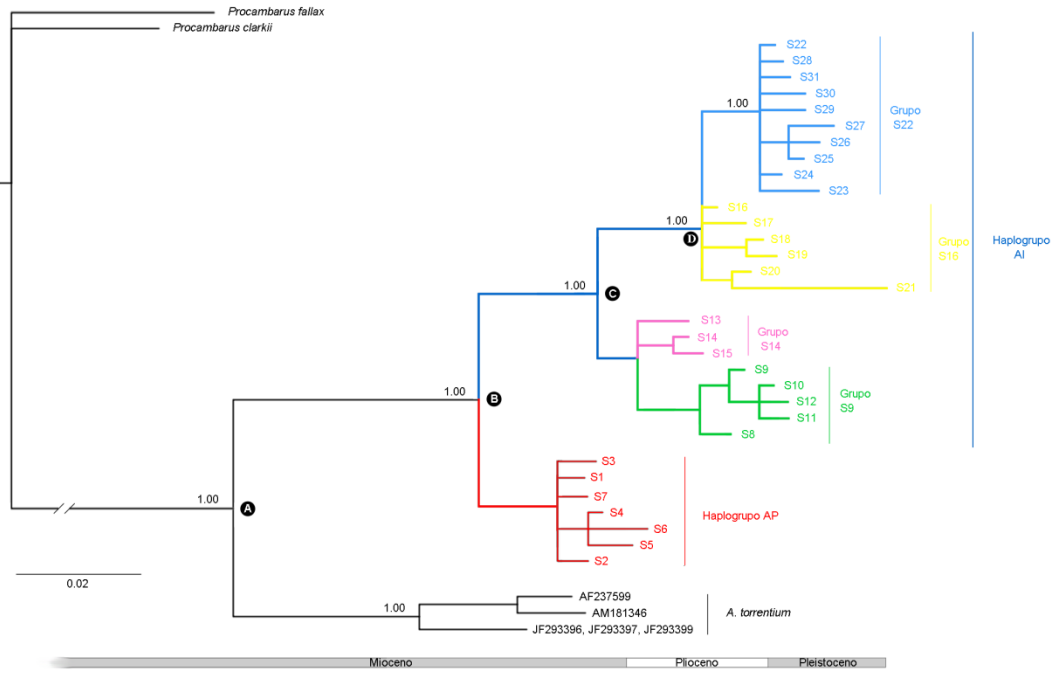
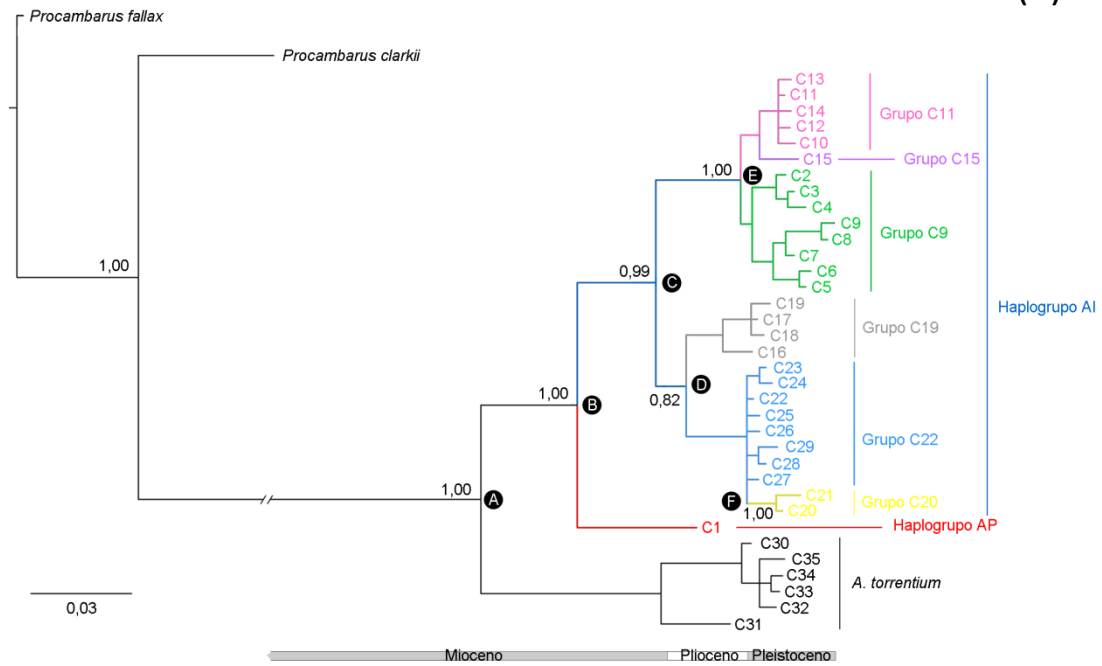


Figura TR3 (continúa)

## COI (II)



**Figura TR3.** Árboles filogenéticos construidos mediante inferencia bayesiana (BI) (Figuras T2, T9 y T15 en el texto).

Códigos de colores:

	16S	COI (I)	COI (II)	
<i>A. torrentium</i>				Negro
<i>A. pallipes</i>	Haplogr. AP (S1)	Haplog. AP (c1)	Haplog. AP (C1)	Rojo
<i>A. italicus</i>	Haplogrupo AI	Haplogrupo AI	Haplogrupo AI	Azul oscuro
<i>A. i. carsicus</i>	S9	c4	C9	Verde
<i>A. i. meridionalis</i>	S14	c15	C11	Rosa
<i>A. i. carinthiacus</i>	S16	c33	C20	Amarillo
<i>A. i. italicus</i>	S22		C22	Azul claro
Linaje Istra 1	–	c27	C19	Gris
Linaje Istra 2	–	c18	C15	Morado

Haplog.: haplogrupo.

Las estimas de los tiempos de divergencia se detallan en Tabla TR3.

16S	Evento	Tasa de sustitución (%)	Tiempo de divergencia (MA)
A		0,8	23,9
		1,6	13,2
B		0,8	14,2
		1,6	8,2
C		0,8	6,7
		1,6	3,7
D		0,8	4,6
		1,6	2,5

COI (I)	Evento	Tasa de sustitución (%)	Tiempo de divergencia (MA)
A		1,66	21,6
		2,75	13,1
B		1,66	17,8
		2,75	10,7
C		1,66	14,7
		2,75	8,86

COI (II)	Evento	Tasa de sustitución (%)	Tiempo de divergencia (MA)
A		1,66	12,6
		2,75	7,6
B		1,66	9,2
		2,75	5,5
C		1,66	6,3
		2,75	3,8
D		1,66	5,3
		2,75	3,2
E		1,66	3,3
		2,75	2,0
F		1,66	2,0
		2,75	1,2

**Tabla TR3.** Estimaciones del tiempo transcurrido (en millones de años, MA) desde los eventos de divergencia en el género *Austropotamobius*. Estas tablas se corresponden a las Tablas T4, T6 y T8 en el texto principal.

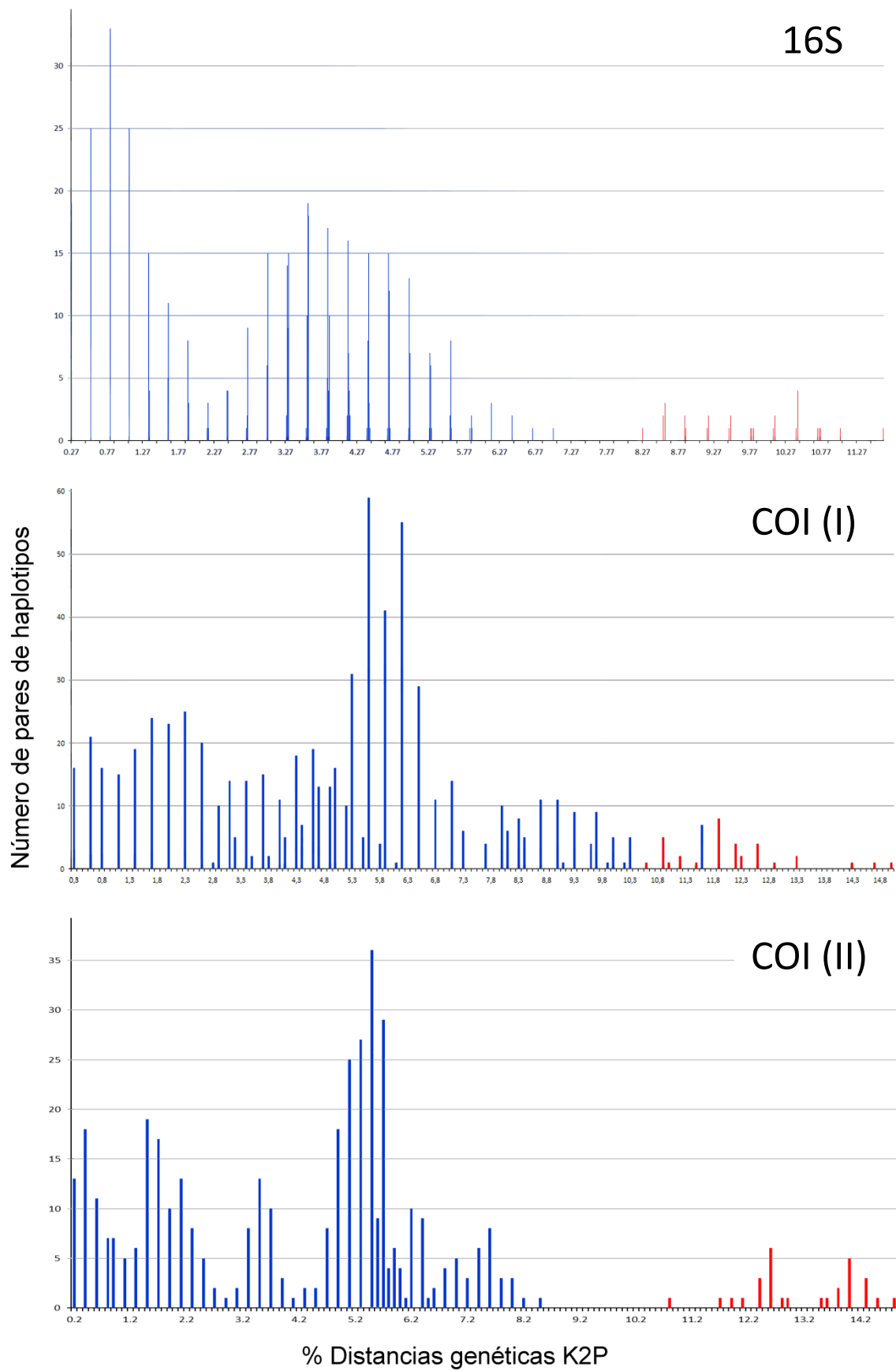


Figura TR4.

**Figura TR4.** Diagramas de barras que representan, en abscisas, las estimas de las distancias genéticas K2P por pares (expresadas en porcentaje) entre los haplotipos y, en ordenadas, las frecuencias absolutas o número de pares de haplotipos que presentan esas distancias. En el texto principal corresponden con las Figuras T4, T11 y T17.

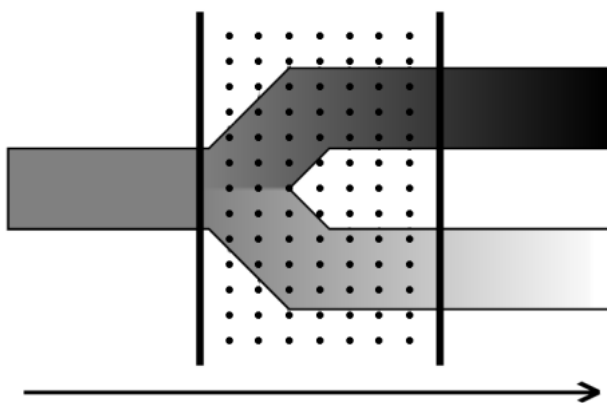
Las barras de las comparaciones intraespecíficas se muestran en azul y las comparaciones interespecíficas aparecen en rojo.

## Discusión

Una de las preguntas fundamentales aún por responder en la taxonomía de los cangrejos de río europeos del género *Austropotamobius* es ¿cuántas especies y subespecies existen?

Teniendo como marco de referencia el concepto unificado de especie, las especies se definen como linajes de metapoblaciones que evolucionan de manera separada, o más específicamente, segmentos de tales linajes (De Queiroz 1998; 1999; 2005 a, b, c). En este concepto unificado de especie los conceptos anteriores, como el biológico o el filogenético entre otros, no se excluyen, sino que las características que subyacen a cada uno de ellos son criterios para poder decidir en qué momento del proceso de especiación se encuentran los organismos objeto de estudio.

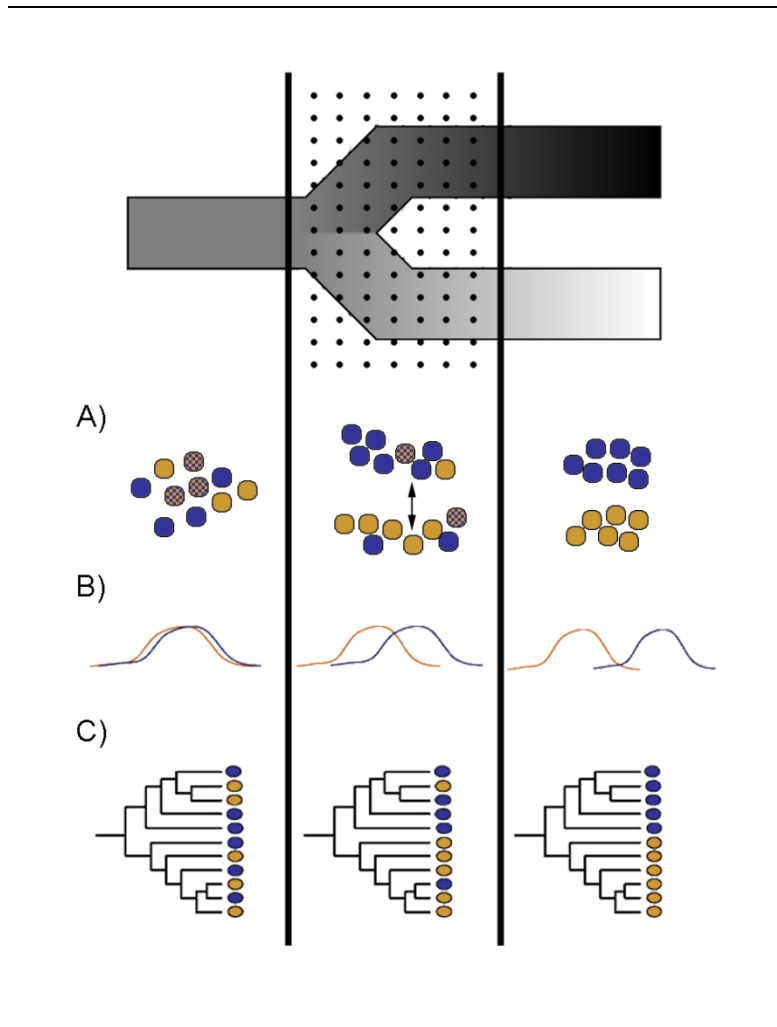
Bajo este concepto unificado, la Figura T20 muestra, simplificada, el proceso de divergencia de linajes, es decir la especiación. Las ramas (con escala de grises) representarían linajes hermanos, que van diferenciándose genéticamente con el paso del tiempo (en la dirección de la flecha), ya sea por selección o deriva, según alcanzan la monofilia recíproca o la incompatibilidad reproductiva, entre otras características. En la figura cada una de estas características aparece como líneas de puntos. Antes de la adquisición de la primera de las propiedades que permitirían distinguirlos (línea continua izquierda), se aceptaría que se trata de una sola especie y tras adquirir la última (línea continua derecha), de dos.



**Figura T20.** Esquema simplificado de la divergencia (especiación) de un linaje (especie) para formar dos. Basado en de Queiroz 2007.

Hay que tener en cuenta que la divergencia de los linajes, medida a través de las características que hemos mencionado, también varía cuantitativamente en el tiempo. Por

ejemplo, el aislamiento reproductivo puede variar de ausente a completo, la distribución de las frecuencias alélicas en dos poblaciones de unimodal a bimodal, el grado de ordenación de los linajes de débil a fuerte, etc. Así pues, se pueden analizar estas características para saber en qué momento del proceso de especiación se encuentra un linaje (Figura T21) (Nosil et al. 2009).



**Figura T21.** Representación del proceso de especiación. (A) El grado de aislamiento reproductivo puede oscilar entre ausente y completo, (B) la distribución de las frecuencias alélicas en dos poblaciones de unimodal a bimodal o (C) el grado de ordenación de los linajes de débil a fuerte. Adaptado de: de Queiroz 2007 y Nosil et al. 2009.

La taxonomía del género *Austropotamobius* es controvertida desde hace casi un siglo y en las últimas décadas el número de especies que le atribuyen ha variado considerablemente. De hecho, en los últimos años mediante, en su mayoría, datos moleculares, no se ha alcanzado una clasificación que satisfaga a todos los investigadores que trabajan en este campo (ver introducción de este capítulo).

Actualmente se acepta que el género *Austropotamobius* comprende dos especies, *A. torrentium* y *A. pallipes*. Ambas se diferencian morfológicamente, tienden a ocupar distintos hábitats y son alopátridas.

Todos los resultados de este trabajo empleando los marcadores mitocondriales 16S y COI, apoyan su distinción. En los árboles filogenéticos (Figuras T2, T9 y T15 o TR3) y en los análisis PCoA (Figuras T3, T10 y T16 o TR2) aparecen claramente diferenciadas. La aparición de un hueco o gap claro entre las distancias genéticas de ambas especies con el gen COI (Figura T17), nos permite proponer un umbral de divergencia genética del 12,5% para diferenciarlas, un valor similar al calculado entre especies del mismo género de la familia *Parastacidae* ( $11,02\% \pm 0,08\%$ , da Silva et al. 2011), aunque inferior al nivel medio de divergencia encontrado entre las especies conespecíficas de crustáceos ( $17,16\% \pm 0,18\%$ , Costa et al. 2007). En relación con el marcador 16S, son escasos los datos referentes a otros crustáceos y, en algunos casos, poco concluyentes. La menor tasa de evolución del 16S comparada con la del gen COI, hace que los umbrales propuestos para diferenciar especies sean tan bajos, que en la práctica, en algunos casos podrían verse comprometidos por los errores experimentales (Lefèbure et al. 2006). El umbral de diferenciación que hemos calculado mediante el marcador 16S es del 7,6%, valor que está en el rango observado por Fratini et al. (7,6% – 8,1%, 2005) para este gen entre *A. torrentium* y *A. pallipes*.

Considerando tasas de mutación conservadoras, menores del 2%, la divergencia encontrada entre *A. torrentium* y *A. pallipes* s. l. sugiere que el momento de la diferenciación pudo producirse hace unos 13,2 MA (datación con el gen 16S, Tabla T4 y Figura T2), o unos 12,6 MA (datación con el marcador COI, Tabla T10 y Figura T15). A la luz de estos resultados parece probable que ambas especies hayan estado evolucionando independientemente desde la segunda mitad del Mioceno. Estas estimas concuerdan con las publicadas por otros autores tras analizar un fragmento del gen COI (8 – 12 MA, Trontelj et al. 2005) y con la información obtenida al concatenar haplotipos del gen 16S y COI (7,85 – 17,30 MA, Klobočar et al. 2011)

Aun cuando el acuerdo sobre el estatus taxonómico de *A. torrentium* y *A. pallipes* es unánime, la sistemática de estas dos especies es compleja. Tradicionalmente se ha aceptado que *A. torrentium* constituye una única especie, si bien los últimos estudios moleculares llevados a cabo, apuntan a que puede estar formada por siete filogrupos distintos, morfológicamente indistinguibles (Klobočar et al. 2011; Trontelj et al. 2005).

En *A. pallipes* se ha descrito una variabilidad intraespecífica muy superior a la observada en otras especies de decápodos, por lo que se la define como un complejo de especies (Souty – Grosset et al. 2006). Oficialmente se reconoce una sola especie, *A. pallipes*, pero en la práctica, al hablar de sus poblaciones en Europa, se diferencia entre *A. pallipes* sensu estricto y *A. italicus*, refiriéndose a ambas de manera conjunta como *A. pallipes* sensu lato. Esta controversia se debe, fundamentalmente, a que los datos morfológicos, e incluso los genéticos, han proporcionado evidencias filogenéticas ambiguas.

En cuanto a los estudios morfométricos, éstos tienen la limitación obvia de que, para ser eficaces, deben considerar la plasticidad fenotípica asociada a las características ambientales de los sitios de origen de las poblaciones de cangrejos estudiados (Ghia et al. 2006). Bertocchi et al. (2008b) identificaron varios caracteres que discriminarían *A. pallipes* s.e. de *A. italicus*, mientras que Scalici y Bravi (2011) encontraron que la variación morfológica es tal, que no pueden diferenciar ambos linajes. La aparente contradicción entre ambas investigaciones parece radicar en el bajo número de poblaciones estudiadas en el primer trabajo, de manera que las diferencias morfológicas encontradas se deberían a la variabilidad del carácter y no a las diferencias entre *A. pallipes* s. e. y *A. italicus*, tal como argumentan los autores del segundo estudio. Es posible que en ambos trabajos la localización geográfica muestreada haya influido en los resultados, dado que en los dos casos los ejemplares *A. pallipes* s. e. proceden de Liguria y Piamonte. Estas regiones constituyen el área de distribución de *A. pallipes* s.e. en Italia y en ellas también se encuentran ampliamente distribuidas poblaciones de *A. italicus* (Figuras T5, T6, T12, T13, T18 y T19 o visitar links; Fratini et al. 2005). Así pues, antes de sacar conclusiones definitivas sobre la presencia o ausencia de variación morfológica en *A. pallipes* s. l., parece necesario disponer de datos referentes a *A. pallipes* sensu estricto de áreas menos ‘problemáticas’, como Francia, el sur de Alemania o las islas Británicas, donde no está presente *A. italicus*.

De otra parte, no se ha detectado en condiciones naturales la presencia de híbridos en las regiones donde habitan los dos linajes, incluso en sintopía (Ghia et al. 2006; Nascetti et al. 1997). Pero en experimentos de reproducción en condiciones controladas se ha descartado el aislamiento precigótico y se ha comprobado que los cigotos híbridos son viables, por lo que tampoco parece haber aislamiento postcigótico aunque, de momento, no se dispone de datos sobre la fertilidad de la descendencia híbrida (Ghia et al. 2011).

Con respecto a los datos moleculares, en este trabajo se observa en las redes MJ la existencia de dos grupos genéticos diferentes a nivel mitocondrial en *A. pallipes* s.l., que hemos denominado AP y AI (Figuras T1, T8 y T14 o TR1). En las demás reconstrucciones filogenéticas realizadas, los altos valores de *bootstrap* y probabilidades posteriores de las ramas (Figuras T2, T9 y T15 o TR3), así como los métodos de ordenación (PCoA, Figuras T3, T10 y T16 o TR2), también evidencian esta diferenciación genética.

El cálculo de distancias genéticas es un abordaje muy empleado para la delimitación taxonómica de linajes y se ha usado con profusión en una gran cantidad de organismos y más en concreto, en los crustáceos decápodos. Así, recientemente se ha propuesto en este orden un valor máximo de divergencia del 4,6% como umbral para delimitar especies a partir de la secuenciación del gen COI (da Silva et al. 2011). Con el marcador 16S no se dispone de datos de divergencia que abarquen a los decápodos en su conjunto, aun así dentro del género *Orconectes* (*Astacoidea: Cambaridae*) se han calculado umbrales del 4 – 6%, variación que se ha considerado suficiente para el reconocimiento de especies hermanas dentro de este género y que la taxonomía clásica no había detectado (Crandall 1996).

La distancia genética calculada entre los haplogrupos AP y AI con el gen COI es de  $7,24 \pm 1,14\%$ , valor en el rango descrito por otros autores para diferenciar *A. pallipes* s. e. de *A. italicus* ( $5.6 \pm 0.13\%$  Bertocchi et al. 2008a;  $11.3 \pm 0.9\%$  Diéguez – Uribeondo et al. 2008;  $7 \pm 1\%$ , Trontelj et al. 2005). El marcador 16S arroja valores de divergencia menores entre ambos haplogrupos,  $4,50 \pm 0,86\%$ , como es esperable en un gen menos variable, aunque también en el rango descrito en trabajos previos ( $3.5 \pm 0.73\%$  Fratini et al. 2005;  $4.6 \pm 0.9\%$  Grandjean et al. 2000c;  $4.78 \pm 0.71\%$  Zaccara et al. 2004).

Considerando estos valores de distancias publicados, la divergencia mitocondrial que hemos estimado entre los dos linajes supera el límite para la discriminación de especies en el orden *Decapoda* en general y, el descrito en las especies de los géneros *Cherax* y *Orconectes*, pertenecientes a familias cercanas, en particular (Costa et al. 2007; Crandall 1996). Aunque al representar las distancias genéticas K2P en diagramas de barras, no es posible apreciar un hueco que separe las distancias intra e interespecíficas, o lo que es lo mismo, las distancias dentro y entre los haplogrupos AP y AI (Figuras T4, T11 y T17 o Figura TR4). No obstante, este solapamiento se ha convertido en ‘norma’ en lugar de una ‘rara excepción’ (Wiemers & Fiedler 2007) y no excluye necesariamente la identificación de nuevas especies o linajes (Collins & Cruickshank 2013). De hecho, el solapamiento de las distancias intra e interespecíficas parece ser un aspecto común en radiaciones recientes, es decir, en linajes en proceso de especiación,

como han señalado algunos estudios empíricos con amplios muestreos en varios grupos taxonómicos (Chapple & Ritchie 2013; Dinca et al. 2010; Elias et al. 2007; Jorger et al. 2013; Meyer & Paulay 2005; Robinson et al. 2009) apoyando las predicciones teóricas (Hickerson et al. 2006; van Velzen et al. 2012).

Además de las distancias genéticas, la clasificación incompleta de linajes ha sido otra de las cuestiones ampliamente discutidas al hablar de la taxonomía de este grupo. Algunos autores argumentan que existe una ordenación incompleta de estos dos linajes en algunas de las reconstrucciones filogenéticas publicadas. En ellas los haplotipos asignados a los haplogrupos AP y AI, o *A. pallipes* s. e. y *A. italicus* para otros, no se separan completamente, lo que apoyaría que *Austropotamobius pallipes* constituye una sola especie (Chiesa et al. 2011; Trontelj et al. 2005). En este capítulo, tras recopilar el máximo de información posible de los bancos de datos genéticos y analizarla junto con nuestros datos, hemos observado que todos los árboles filogenéticos muestran una clasificación u ordenamiento completo de los haplogrupos AP y AI (Figuras T2, T9 y T15 o TR3), lo que apoyaría la existencia de dos linajes distintos.

La divergencia entre ambos linajes pudo empezar hace unos 8,2 MA (datación con el gen 16S, Tabla T5 y Figura T2) o unos 9,2 MA (datación con el marcador COI, Tabla T10 y Figura T15), es decir en el Mioceno tardío. A pesar de las discrepancias en la taxonomía del grupo, varios autores coinciden en señalar este periodo como el más probable para situar la divergencia de los linajes presentes en *A. pallipes* s. l. (Chiesa et al. 2011; Trontelj et al. 2005).

Por el contrario, los análisis del DNA nuclear de *A. pallipes* sensu lato mediante AFLP parecen descartar la diferenciación entre *A. pallipes* s. e. y *A. italicus* (Chiesa et al. 2010, 2011). Sólo un 9% de las bandas polimórficas encontradas resultaron ser diagnósticas, lo que sugiere una escasa diferenciación nuclear de ambos linajes, en contraste con la diferenciación encontrada en otras especies hermanas de artrópodos, donde alrededor de un 30% de las bandas resultan ser altamente diagnósticas (Ming & Wang 2006) y en concreto, en otros crustáceos, donde los AFLP han ayudado a resolver el estatus taxonómico de distintas especies o subespecies (Lu et al. 2000; Tryantaphyllidis et al. 1997). En trabajos teóricos, bajo coalescencia neutral, se han calculado unas 4 – 7 Ne generaciones para alcanzar la monofilia recíproca en un par de especies, en el 50% de los genes nucleares muestreados (donde Ne es el tamaño efectivo histórico de la población de cada uno de los taxones descendientes) y de 9 a 12 Ne generaciones para el 95% de esos genes (Hudson & Coine 2002). Aunque los tamaños poblacionales históricos o actuales rara vez se conocen, es bastante probable que la monofilia

recíproca en la mayoría de los genes nucleares se alcance mucho después que en los genes mitocondriales, ya que éstos pueden considerarse como una sola unidad de ligamiento y así considerada, su tasa de mutación es mayor que la del DNA nuclear.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones y retomando el concepto unificado de especie, es posible que los linajes que componen *A. pallipes* sensu lato aun no hayan completado el proceso de especiación (se encontrarían en la región delimitada por líneas continuas en la Figura T20). Por ello es relevante cualquier característica o línea de evidencia, ya sea genética, morfológica o ecológica, que proporcione o no alguna prueba de la separación de los linajes. Desde este punto de vista creemos que sería necesario reunir más datos morfológicos sobre *A. pallipes* s. e. de regiones fuera del área de distribución de *A. italicus*. Si bien encontrar caracteres distintivos en dos linajes tan relacionados parece complicado en un grupo que aparentemente carece de caracteres clave (Füreder & Machino 2002). También sería deseable disponer de más información sobre la descendencia híbrida de estos linajes, aunque que no se hayan detectado híbridos en la naturaleza es significativo. Genéticamente hemos visto que a nivel nuclear no es posible diferenciar a los dos linajes, pero a nivel mitocondrial podemos distinguir *A. pallipes* s. e. y *A. italicus* claramente. Entre ellos existe una distancia genética estimada del 7,24% con el gen COI y del 4,50% con el marcador 16S, ambas suficientes para considerarlas especies distintas en el orden *Decapoda*. En los árboles filogenéticos aparecen como grupos monofiléticos y en las redes MJ como grupos genéticos diferenciados. En conjunto, estos datos indican que *A. pallipes* s. e. y *A. italicus* no han completado el proceso de especiación y por tanto, no descartan que estén evolucionando independientemente. La divergencia en época reciente, junto con su proceso de adaptación alopátrida a las distintas condiciones ambientales donde habitan ambos linajes, indicaría que todavía se están especiando, por lo que las diferencias que se están acumulando en ambos grupos, son detectadas por los marcadores mitocondriales, que evolucionan de forma más rápida que los marcadores nucleares.

Pero la controversia acerca de *A. pallipes* sensu lato va más allá de si está compuesto por uno o dos linajes. Algunos autores defienden su escisión en dos especies (Fratini et al. 2005; Grandjean & Souty - Grosset 2000b; Grandjean et al. 2002a), ya que al analizar el gen 16S encontraron una mayor variabilidad genética en *A. italicus* que en *A. pallipes* s. e. Postulando además, que *A. italicus* alberga, a su vez, cuatro subespecies: *A. i. italicus*, *A. i. carinthiacus*, *A. i. carsicus* y *A. i. meridionalis*. Además, calcularon un límite de alrededor de un

3% (entre  $2,01\pm 0,59\%$  y  $3,07\pm 0,77\%$ ) de divergencia entre las subespecies de *A. italicus* (Grandjean et al. 2000c, 2002 a, b).

Sin embargo, esta propuesta no es aceptada por toda la comunidad científica que estudia astácidos. En el primer trabajo de envergadura con el gen COI en poblaciones europeas de cangrejo de río (Trontelj et al. 2005) también encontró mucha variabilidad genética en *A. pallipes* s. l. Pero los autores consideraron que no era suficiente como para establecer distintas subespecies y en su lugar, definieron varios linajes todos ellos formando parte de la misma especie *A. pallipes*. Además, estos linajes no son equiparables a las subespecies propuestas con el 16S por Grandjean et al. (2000c, 2002 a, b) ya que, en algunos casos una misma 'subespecie – 16S' puede contener más de un 'linaje – COI' y en otros casos, un mismo 'linaje – COI' reúne dos 'subespecies – 16S' diferentes.

En el presente trabajo se han realizado una serie de análisis en las secuencias del haplogrupo AI con el fin de arrojar luz en esta clasificación compleja, y hasta cierto punto confusa. Todos los análisis llevados a cabo muestran que existe una gran variabilidad dentro de este haplogrupo. En las gráficas de diagramas de barras que representan las distancias genéticas K2P por pares entre los haplotipos analizados se puede apreciar una distribución multimodal en las comparaciones de las distancias intraespecíficas (Figuras T4 y T17). En concreto en el conjunto de datos COI (II) se pueden distinguir hasta 5 grupos de valores (Figuras T17). Confrontando estos resultados con los obtenidos en la red MJ y los PCoA (Figuras T16 y T17), se puede identificar qué comparaciones entre grupos genéticos dan lugar a esa distribución multimodal. Con el porcentaje de divergencia más alto entre las comparaciones intraespecíficas, se engloban las comparaciones entre los haplogrupos AP y AI (señalado como (5) en la Figura T17). Alrededor de un máximo de divergencia genética del 5,5% se encuentran las comparaciones de los haplotipos C2 – C15 con los haplotipos C16 – C29 (Figura T16 y marcado como (4) en la Figura T17). En tercer lugar aparecen, principalmente, las comparaciones de las secuencias del grupo C19 con los demás grupos que forman el haplogrupo AI (Figura T14 y (3) en la Figura T17). A continuación, en torno a una estima de 1,5%, se hallan las comparaciones de las secuencias que forman parte del mismo conjunto descrito en los análisis PCoA, como las comparaciones entre los haplotipos C2 – C15 (Figura T16 y (2) en la Figura T17). Por último, se encuentran las comparaciones entre los haplotipos pertenecientes a cada uno de los grupos descritos en la reconstrucción filogenética, como por ejemplo, entre los haplotipos del grupo C9 (Figuras T14 y (1) en la Figura T17).

A continuación se discutirán de manera detallada los resultados obtenidos para el haplogrupo AI y se relacionarán con las subespecies y linajes propuestos por otros autores. Para facilitar la discusión, la Tabla T11 sintetiza la relación entre la clasificación de Grandjean (2000c; 2002a, b) y Fratini (2005) estudiando el gen 16S, los linajes propuestos por Trontelj (2005) estudiando el marcador COI y los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

16S <sup>1</sup>	COI <sup>2</sup>	16S	COI(II)
<i>A. pallipes</i> s. e.	W	Haplogrupo AP (S1)	Haplogrupo AP (C1)
<i>A. italicus</i>		Haplogrupo AI	Haplogrupo AI
<i>A. italicus italicus</i>		AI (S22)	AI (C22)
<i>A. italicus carinthiacus</i>	NW – IT	AI (S16)	AI (C20)
<i>A. italicus carsicus</i>	SEA – WB	AI (S9)	AI (C9)
<i>A. italicus meridionalis</i>	APP	AI (S14)	AI (C11)
	ISTRA 1		AI (C19)
	ISTRA 2		AI (C15)

Tabla T11. Grupos taxonómicos propuestos tras analizar (<sup>1</sup>) el gen 16S (Grandjean et al. 2000c, 2002a, b; Fratini et al. 2005) y (<sup>2</sup>) el marcador COI (Trontelj et al. 2005). Las siglas identifican los linajes: *Western* (W), *North – Western Italy* (NW – IT), *Southeastern Alps – Western Balkans* (SEA – WB) y *Apennines* (APP). Las dos últimas columnas relacionan los grupos genéticos identificados en este capítulo con los propuestos en *A. pallipes* s. l. por los autores anteriores.

Nos referiremos a los distintos grupos genéticos encontrados en el haplogrupo AI con un código asignado al marcador 16S primero, y luego, al gen COI, separados por una línea vertical, por ejemplo S9|C9.

En primer lugar, la designación de la subespecie *A. i. carinthiacus* se fundamenta en dos trabajos realizados por el equipo de Grandjean empleando el gen 16S. El primero (Grandjean et al. 2000c), basa la clasificación de *A. i. carinthiacus* en una pequeña muestra de especímenes del lago Plansee (Tirol, Austria). En el segundo (Grandjean et al. 2002a), se reexaminan los haplotipos anteriores junto con otros 4 procedentes de un trabajo anterior (Largiadèr et al. 2000). Grandjean et al. (2002) determinaron que una distancia, entre poblaciones de *A. i. carinthiacus* y *A. i. italicus*, del 0,7±0,4% es suficiente para considerarlos dos subespecies. Esta conclusión es sorprendente ya que los mismos autores habían propuesto

un límite de, al menos, un 3% para diferenciar subespecies dentro de *A. italicus* (Grandjean et al. 2000c, 2002a, b). El estatus taxonómico de las poblaciones austríacas es muy discutible, ya que parece que estas muestras provienen de regiones repobladas con cangrejos procedentes de Italia a principios del siglo XX (Füreder & Machino 1998). Por ello las conclusiones filogenéticas que pueden obtenerse de su estudio son muy limitadas. En investigaciones posteriores, la distinción entre *A. i. italicus* y la nueva subespecie, *A. i. carinthiacus*, o no se sostiene (Pedraza – Lara et al. 2010; Zaccara et al. 2004) o está apoyada por bajos valores de bootstrap (Fratini et al. 2005). Los resultados encontrados al analizar el gen COI tampoco parecen confirmar esta diferenciación, ya que las estimas de distancias genéticas entre ambos son muy bajas y los dos grupos se engloban dentro del mismo linaje, NW – IT (Trontelj et al. 2005).

En el presente trabajo, la incorporación en los análisis de un mayor número de haplotipos con una procedencia geográfica extensa, nos ha permitido realizar un análisis más sólido, por lo que la información filogenética que hemos obtenido es más completa. En un intento por rastrear esta subespecie propuesta por Grandjean (2000c, 2002a) hemos encontrado que el grupo S16|C20 se correspondería con *A. i. carinthiacus*. Pero, en los análisis PCoA (Figuras T3 y T16) el grupo genético S16|C20 no se puede diferenciar del grupo S22|C22, donde se incluyen los haplotipos característicos de *A. i. italicus*. En las redes de haplotipos ambos grupos genéticos, o son indistinguibles (Figura T8) o se diferencian por pocos pasos mutacionales (Figuras T1 y T14) y en los árboles filogenéticos se sitúan, poco apoyados, en las ramas más externas (Figuras T2, T9 y T15 o TR3). Además, las distancias genéticas K2P llegan a adquirir valores especialmente bajos en las comparaciones entre estos dos grupos ( $1,88\pm 0,48\%$  (16S) y  $0,80\pm 0,36\%$  (COI), Tablas T4 y T9). Por tanto, a la luz de los resultados, parece que considerar estos dos subgrupos genéticos, S22|C22 y S16|C20 o *A. i. italicus* y *A. i. carinthiacus*, como subespecies diferentes es dudoso y proponemos que ambos queden englobados dentro de *A. italicus italicus*, el primer nombre que se asignó.

En segundo lugar, la descripción de *A. i. meridionalis* como una subespecie de cangrejos se debe al análisis de unas muestras del centro – sur de Italia con el marcador 16S (Fratini et al. 2005). Puesto que las distancias genéticas entre estas muestras y otras poblaciones italianas de *A. italicus* estaban en el rango propuesto para distinguir subespecies de *A. italicus*, elevaron su estatus al de subespecie. Estudios posteriores con ese marcador

(Pedraza – Lara et al. 2010) o con el gen COI (Chiesa et al. 2011), no apoyan esta distinción taxonómica.

En este capítulo hemos podido identificar los haplotipos designados como *A. i. meridionalis*, en el clúster genético S14|C11, si bien los análisis PCoA agrupan estos haplotipos junto con los del grupo S9|C9 (Figuras T3 y T16) donde se incluyen los haplotipos de otra de las subespecies propuestas, *A. i. carsicus*. En las redes de medianas estos dos grupos genéticos, S14|C11 y S9|C9, están muy relacionados (Figuras T8 y T14) y en los árboles filogenéticos ambos se sitúan en ramas externas, con valores de bootstrap y probabilidades posteriores muy variables (Figuras T2 y T15). En cuanto a las distancias genéticas calculadas entre ambos (Tablas T4 y T9) no superan el límite del 3% propuesto para distinguir subespecies en *A. italicus* (Grandjean et al. 2000c, 2002a, b). Teniendo en cuenta estos resultados, parece que designar a los grupos S9|C9 y S14|C11 como dos subespecies o linajes distintos, *A. i. carsicus* y *A. i. meridionalis*, es arriesgado y ambos deberían quedar incluidos en *A. italicus carsicus*, por ser el primer nombre establecido.

En definitiva, las reconstrucciones filogenéticas (Figuras T1 y T14), las distancias genéticas (Tablas T4 y T9) y los análisis PCoA (Figuras T3 y T16) permiten distinguir claramente dos grupos dentro del haplogrupo AI o *A. italicus*, el formado por S22|C22 y S16|C20 frente al formado por S9|C9 y S14|C11. Incluso los análisis ABGD, al disminuir los parámetros de anchura de *gap* y diversidad intraespecífica, permitiendo así una mayor división de los datos, distinguen estos dos grupos genéticos. Por tanto, la distinción genética de *A. i. italicus* (englobando a *A. i. italicus* y *A. i. carinthiacus*) y *A. i. carsicus* (englobando a *A. i. carsicus* y *A. i. meridionalis*) sí se aprecia con claridad.

En este punto es importante recordar que son escasas otras evidencias que pudieran ayudar a dirimir el estatus de los dos grupos genéticamente diferenciados en el haplogrupo AI. En los estudios morfológicos realizados, la variabilidad encontrada parece deberse a adaptaciones locales. Aunque en un trabajo reciente tanto los análisis fenéticos como los filogenéticos también tienden a distinguir *A. i. italicus* de *A. i. carsicus*, tal y como se definen en este trabajo (Scalici & Bravi 2012). En cambio, los resultados del análisis del DNA nuclear mediante AFLP no arrojan diferencias entre los grupos y sugieren la existencia de un intenso contacto secundario entre ellos (Chiesa et al. 2010; 2011).

Por último, nos referiremos a los dos linajes descritos por Trontelj (2005) tras analizar varias muestras de la Península de Istra, área propuesta como centro primario de radiación de *A. pallipes* s. l. (Chiesa et al. 2011; Pedraza – Lata et al. 2010; Scalici & Bravi 2012; Trontelj et al. 2005). Estos linajes, ISTR A 1 e ISTR A 2, en principio no parecen tener una clara correspondencia en la clasificación propuesta según los resultados del gen 16S, aunque se ha planteado la relación existente entre el linaje ISTR A 1 y *A. i. carsicus* (Cataudella et al. 2010; Chiesa et al. 2011).

Cuando analizamos nuestros conjuntos de datos vemos que los haplotipos típicos de ISTR A 1 forman parte del grupo C19, pero las distancias entre éste y los grupos genéticos S22|C22 y S16|C20 son muy pequeñas (Tabla T9). En la red MJ, C19 aparece como un linaje basal respecto a éstos (Figura T14), al igual que en la publicación de referencia de este linaje (Trontelj et al. 2005). En los análisis PCoA este grupo se engloba junto con las secuencias de los grupos genéticos S22|C22 y S16|C20, aunque es posible diferenciarlo (Figura T15). En conjunto, los resultados apuntan a que es posible diferenciar dos grupos genéticos con distinta distribución geográfica S22|C22 y S16|C20 (NW – IT) e C19 (ISTR A 1), si bien formarían parte del mismo linaje, *A. italicus italicus*.

Trontelj et al. también describieron el linaje ISTR A 2, estrechamente relacionado con los linajes SEA – WB y APP. En el set de datos COI (II) los haplotipos de ISTR A 2 se sitúan en el grupo C15, estrechamente relacionado con los grupos genéticos S9|C9 y S14|C11. En la red MJ están separados por pocos pasos mutacionales (Figuras T1 y T14) y en los árboles filogenéticos las ramas que los separan están apoyadas por *bootstrap* y probabilidades posteriores muy bajas (muchos de ellos inferiores a 50 y 0,70 respectivamente). Además, en los análisis PCoA (Figuras T3 y T16) los haplotipos de los grupos C15, S9|C9 y S14|C11 forman un solo conjunto. En resumen, todos los resultados indican que el grupo C15 no parece tener la suficiente entidad genética como para distinguirlo de los grupos S9|C9 y S14|C11, que aquí hemos denominado *A. i. carsicus*. Aun así, la cantidad de variabilidad genética presente en este conjunto de haplotipos permite reconocer dos grupos genéticos, S14|C11 y C15 (APP y ISTR A 2) de un lado y S9|C9 (SEA – WB) de otro, con distintos rangos de distribución.

A lo largo de esta discusión hemos expuesto las evidencias que apoyarían o refutarían la existencia de varias especies y subespecies en *A. pallipes* s. l. Si revisamos la bibliografía científica, aparecen los problemas subyacentes a todos los artículos basados en el análisis de los genes 16S y COI: la longitud de los fragmentos y el número de ejemplares analizados, parámetros clave en los estudios con secuencias de DNA. Los trabajos en los que se discute la

clasificación de este grupo de astácidos analizan alrededor de 450 bases de un solo marcador y normalmente un ejemplar por población. En el set de datos COI (I) el número de cangrejos muestreados (2052) y el número de haplotipos detectados, 76, es muy superior al del conjunto COI (II), 54 haplotipos. En el primer caso, a pesar de la ingente cantidad de información de partida, la longitud de la secuencia es bastante reducida, 360 nucleótidos y como consecuencia, los resultados de algunos análisis no son concluyentes. El conjunto de datos COI (II), con secuencias de DNA más largas (533 nucleótidos) y menos ejemplares incluidos (551), es más informativo y las conclusiones obtenidas son más robustas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los tres conjuntos de datos, y especialmente, con COI (I) y COI(II), es posible que las discrepancias en los estudios taxonómicos publicados se deban, en parte, al muestreo sesgado del grupo y a los cortos segmentos de DNA analizados, generalmente, procedentes de un solo marcador.

Por tanto, tras recopilar la práctica totalidad de la información disponible en las bases de datos, los análisis genéticos que hemos llevado a cabo con los marcadores mitocondriales 16S y COI, indican que el género *Austropotamobius* alberga tres especies, *A. torrentium* y los haplogrupos AP y AI o, *A. pallipes* y *A. italicus*. Los valores de divergencia más elevados se observan entre *A. torrentium* y *A. pallipes* s. l., mientras que la divergencia estimada entre *A. pallipes* s. e. y *A. italicus* supera el umbral establecido para diferenciar especies en los decápodos, por lo que se les podría considerar dos linajes conespecíficos divergentes y potencialmente correspondientes a especies incipientes. Los tres linajes se diferencian claramente en los árboles filogenéticos, con ramas apoyadas por altos valores de *bootstrap* y probabilidades posteriores. Las redes MJ permiten observar que el número de pasos mutacionales que separan *A. torrentium* y *A. pallipes* s. l. es mucho mayor que entre *A. pallipes* sensu estricto y *A. italicus*. Cabe destacar también que el número de transversiones encontradas entre *A. torrentium* y *A. pallipes* s. l. es mayor que entre *A. pallipes* s. e. y *A. italicus*. Se ha descrito que la proporción de transiciones generalmente va descendiendo, conforme se asciende en la escala taxonómica, pues se acumulan múltiples transversiones en función del tiempo que ha transcurrido desde la divergencia de los taxones (Callejas 1998).

Al comparar nuestros resultados con la clasificación taxonómica propuesta por otros autores se puede establecer un paralelismo entre el haplogrupo AP, el linaje WESTERN y la especie propuesta *A. pallipes* sensu estricto. Este haplogrupo se localiza en Francia, oeste de Alemania, noroeste de Italia (Piamonte y Liguria) y norte de Suiza.

El haplogrupo AI parece tener mayor variabilidad genética que el haplogrupo AP, pero proponer que a su vez está formado por cuatro subespecies resulta atrevido. Por el contrario, al menos a nivel mitocondrial, existen claras evidencias para distinguir dos linajes con varios grupos genéticos en el haplogrupo AI. El primero, *A. i. italicus*, estaría formado por los grupos genéticos S16|C20, S22|C22 y C19, englobando lo que algunos han venido llamando linajes NW – IT e ISTR A 1 o subespecies *A. i. italicus*, *A. i. carinthiacus*. Este grupo se distribuiría por España y parte de Italia, fundamentalmente por su cuenca tirrénica. Por otra parte, *A. i. carsicus* estaría formado por los grupos genéticos S9|C9, S14|C11 y C15, englobando lo que algunos autores han llamado linajes SEA – WB, APP e ISTR A 2 o subespecies *A. i. carsicus* y *A. i. meridionalis*. Este segundo grupo se encontraría ampliamente distribuido en los alrededores de la cuenca adriática, tanto en su vertiente italiana como en la eslovena y croata, en menor medida en Austria, y de manera puntual en España.

En definitiva nuestros datos apuntan a que el género *Austropotamobius* está compuesto por tres especies, *A. torrentium*, *A. pallipes* sensu estricto y *A. italicus*, albergando, a su vez, esta última dos subespecies a las que proponemos nombrar *A. i. italicus* y *A. i. carsicus*.

## Discusión general

---



El análisis simultáneo de marcadores mitocondriales y nucleares en el presente trabajo, ha permitido aprovechar las ventajas que ambos ofrecen para profundizar en el conocimiento de los niveles de variabilidad y la estructura genética de las poblaciones del cangrejo de río, *Austropotamobius italicus*, en España. Se trata, además, del primer estudio que recoge información de diez cuencas hidrográficas diferentes.

Mediante la secuenciación de dos fragmentos mitocondriales (1184 pb de COI y 1317 pb de 16S) hemos identificado 19 haplotipos en las poblaciones españolas de esta especie (Tabla M3). Analizando el gen COI, el más variable de los dos marcadores utilizados, se han encontrado 11 SNP que permiten definir 13 haplotipos. Por primera vez se ha detectado diversidad genética en la secuencia del gen 16S de las poblaciones españolas, en concreto 8 SNP que permiten diferenciar 8 haplotipos. Este hallazgo es especialmente relevante puesto que en investigaciones previas no se detectó diversidad genética (Grandjean et al. 2002a) o fue muy reducida (Pedraza – Lara et al. 2010). En conjunto, la especie exhibe en nuestro país una diversidad haplotípica de 0,77 y una diversidad nucleotídica de 0,0011 (Tabla M5).

A nivel nuclear todos los loci microsatélites estudiados son polimórficos (Figura N3), incluso aquellos que no muestran variabilidad en otras poblaciones europeas de *A. italicus* (Bertocchi et al. 2008a). La heterocigosis media observada estimada es de 0,186 (Tabla N4).

Estos niveles de variabilidad genética en el cangrejo de río ibérico, aunque reducidos, se encuentran dentro de los rangos descritos en las poblaciones de otros países europeos estudiadas con diferentes marcadores moleculares (Attard & Pasteur 1984; Attard & Vianet 1985; Diéguez – Uribeondo et al. 2008; Gouin et al. 2001, 2003; Grandjean et al. 2001; Lörtscher et al. 1997, 1998; Santucci et al. 1997; Trontelj et al. 2005; Zarazaga 1993).

Aun cuando la especie muestra en la Península Ibérica cierto nivel de variabilidad genética, de las veinticuatro poblaciones analizadas, ocho son monomórficas a nivel mitocondrial, aunque para distintos haplotipos. En concreto, los más frecuentes en cada gen (Sa y Sd en el marcador 16S y Cb, Cc, Cd y Cf en el COI, Tablas M4 y M5). Las dieciséis restantes son polimórficas, aunque por lo general presentan un haplotipo mayoritario y los demás a bajas frecuencias. A nivel nuclear, en estas poblaciones encontramos en todos los loci un alelo muy frecuente y a menudo, un exceso de homocigotos (Tabla N3 y Figura N3).

Los reducidos niveles de variabilidad genética encontrados pueden atribuirse al importante declive de las poblaciones de cangrejo de río. Durante los últimos años su distribución y abundancia se ha reducido enormemente como consecuencia de diferentes factores. Entre ellos cabe destacar el deterioro de los hábitats, la sobrepesca y la competencia

por los recursos con especies exóticas de cangrejos de río. Sin olvidar diversas enfermedades, entre las que se puede destacar la plaga del cangrejo causada por el hongo oomiceto *Aphanomices astaci*, y finalmente, el efecto fundador consecuencia de las repoblaciones activas mediadas por el ser humano (Alonso 2012; Alonso et al. 2010; Diéguez – Uribeondo et al. 1997a; Galindo et al. 2003; Rallo et al. 2004; Torre & Rodríguez 1964). Por tanto, los niveles de variación genética de *Austropotamobius* en España se han visto afectados por sucesivos y drásticos cuellos de botella y, en definitiva, por la acción de la deriva genética y la consanguinidad, inevitable en poblaciones pequeñas.

A pesar de lo expuesto anteriormente, algunas de las poblaciones estudiadas presentan unos niveles de variación genética moderados. Por ejemplo, en la muestra de Barranco de Salt hemos identificado tres haplotipos mitocondriales, uno de ellos exclusivo y a frecuencias intermedias, así como alelos nucleares exclusivos. Esta población se localiza en un barranco de difícil acceso, por lo que quizá ha podido eludir enfermedades presentes en otras regiones y evitar la sobrepesca, lo que le habría permitido mantener un alto número efectivo.

En cuanto a las poblaciones de las dos astacifactorías, los niveles de variabilidad genética encontrados son diferentes. En ambas podemos encontrar el haplotipo mitocondrial 16S Sa, el más frecuente en España, así como dos de los haplotipos más comunes de COI, Cb y Cc. Pont de Suert, la astacifactoría más septentrional, alberga además haplotipos exclusivos que no se han detectado en el resto de las muestras (Sf y Ca) (Tabla M3). No obstante, el análisis de los loci SSR nucleares detecta valores de heterocigosis muy reducidos y al mismo tiempo, coeficientes de fijación  $F_{IS}$  elevados, especialmente en la población de Rillo de Gallo (Tabla N4). En conjunto las poblaciones de astacifactoría albergan recursos genéticos valiosos para la especie en España si bien resultaría beneficioso el aporte externo de nuevas fuentes de variabilidad genética.

Dada la actual situación de riesgo de la especie en toda su área de distribución, la variabilidad encontrada en ciertas poblaciones ibéricas ofrece alguna esperanza para la especie desde el punto de vista de su conservación.

La distribución geográfica de esta variabilidad genética no es homogénea. De la información mitocondrial y nuclear se infiere que en España existen dos grandes grupos genéticos, 'Norte' y 'Centro', tal y como se observa, entre otros, en los análisis de agrupación llevados a cabo con ambos tipos de marcadores (Figuras M6 y N11). El primero de ellos, grupo 'Norte', comprende las poblaciones del norte peninsular, especialmente las de Burgos, Navarra

y País Vasco, y el segundo, grupo 'Centro', englobaría el resto de la península (Tablas M7 y N6 y Figuras M7, M8, N4, N5, N6 y N7). Cabe señalar además, que en algunas poblaciones de la cuenca del Ebro parecen converger las características de estos dos grandes grupos genéticos, pudiendo encontrar tanto los haplotipos mitocondriales como las particularidades nucleares características de ambos (Figuras M6 y N11). La distribución de los haplotipos mitocondriales más frecuentes coincide con los dos grandes grupos ancestrales detectados con marcadores nucleares: haplotipos H1 y H8 y grupo nuclear KA en 'Norte' y haplotipos H15 y H17 y grupo nuclear KB en 'Centro'. Pero un análisis más detallado de los loci microsatélites revela la existencia de cuatro grupos genéticos ancestrales, K1, K2, K3 y K4. Esta agrupación nuclear también tiene su reflejo a nivel mitocondrial puesto que los haplotipos más habituales en España (H1 y H8) tienen aproximadamente la misma distribución geográfica que la de los grupos genéticos nucleares ancestrales con un mayor rango de distribución (K1 y K2). Asimismo, podemos encontrar que los alrededores del Sistema Ibérico y la Cordillera Cantábrica albergan haplotipos mitocondriales distintivos (H4 y H15, respectivamente) que tienen su reflejo a nivel nuclear (K3 y K4).

Trabajos previos ya habían apuntado una estructuración de la diversidad genética en las poblaciones ibéricas. Diéguez – Uribeondo et al. (2008) estudiando un pequeño fragmento del gen mitocondrial COI descubrieron dos haplotipos, diferenciados por un SNP, uno en el norte y otro en el resto de la Península. A nivel nuclear lamentablemente no existe otro estudio en España que haya utilizado SSR para estudios poblacionales, pero el patrón aquí encontrado concuerda a grandes rasgos con el detectado mediante marcadores RAPD en estas poblaciones (Beroiz et al. 2008), que también diferenciaba a parte de las poblaciones del norte peninsular del resto.

Uno de los factores que parece haber contribuido a moldear esta estructura genética de las poblaciones españolas es la migración. En las estimas de flujo génico ( $Nm$  en las Tablas M6 y N7 y tasas medias de migración calculadas con el programa GeneClass en Tabla N8) con ambos marcadores se observa la misma tendencia, las poblaciones tienen un mayor intercambio genético intragrupo que con las poblaciones del otro clúster. Al fijarnos en el flujo intergrupo, encontramos que la mayor parte del flujo génico se dirige desde el 'Centro' al 'Norte'. Además, dentro de cada uno, el flujo se dirige preferentemente de oeste a este, es decir desde las cabeceras a las desembocaduras de los ríos, sobre todo en la vertiente mediterránea, de la que tenemos más información. Este tipo de movimientos es explicable por migraciones naturales, ya que los cangrejos son capaces de cubrir distancias relativamente largas en un mismo curso de agua y en ausencia de obstáculos (Gouin et al. 2002).

En determinados casos, las tasas de migración estimadas entre poblaciones muy alejadas o de diferentes cuencas parecen ajustarse a un movimiento de los ejemplares de origen antropogénico, particularmente por el interés económico y social del cangrejo de río en nuestro país. Este interés se pone de manifiesto en la documentación sobre la dispersión antropogénica de este macroinvertebrado no solo en España (Alonso et al. 2000; De la Hoz 1997; Pardo 1942; Torre & Rodríguez, 1964) sino también en el resto de Europa (Grandjean et al. 1997a; Lörtscher et al. 1997; Santucci et al. 1997; Swahn 2004).

Pero la distribución actual de la variabilidad genética también parece ser reflejo de los cambios climáticos pasados, especialmente las glaciaciones pleistocénicas (Hewitt 1996, 2004; Schmitt et al. 2006, 2007). A este respecto, los dos grandes grupos genéticos detectados en las poblaciones españolas de cangrejo de río se localizan en regiones con altos niveles de biodiversidad y endemismos, que han sido propuestas como refugios pleistocénicos de especies de peces, anfibios, reptiles, plantas y mamíferos durante la última época glacial (ver Gómez & Lunt, 2007 y sus referencias).

Analizando en concreto las poblaciones del grupo 'Centro', estimamos una expansión poblacional hace unos 14.000 años. En el grupo 'Norte' el crecimiento parece haber sucedido con posterioridad, hace unos 10.000 años, dado el valor de  $\tau$  calculado en la distribución de mismatch. Estos resultados parecen guardar relación con el calentamiento asincrónico de la Península Ibérica (Cacho et al. 2010). Tras el último glacial máximo (30.000 – 35.000 años, Hughes & Woodward 2008; Moreno et al. 2010) se produjo una mejora paulatina del clima favoreciendo las condiciones necesarias para la supervivencia del cangrejo de río, primero en el tercio centro peninsular y más tarde en el tercio norte (Palacios et al. 2011, 2012; González – Sampériz et al. 2006). Las poblaciones españolas en su conjunto, sufrieron una expansión poblacional anterior hace unos 25.000 años (Figura M9).

Sin embargo, la presencia de los cangrejos de agua dulce en la Península Ibérica aparece citada en numerosas publicaciones científicas como una introducción antropogénica desde Italia durante el s. XIX (Clavero & Villero 2013; Grandjean et al. 2001, 2002b; Trontelj et al. 2005 entre otros). Esta hipótesis, si bien no se aporta documentación histórica que la acredite, la sustentan en el monomorfismo genético detectado en poblaciones ibéricas en los primeros trabajos con DNAMt, en su similitud genética con algunas poblaciones italianas y en las asiduas translocaciones de cangrejos en el continente europeo. Por el contrario, nuestras dataciones genéticas indican que la especie estaría presente en España, al menos, desde finales del Pleistoceno. La información obtenida del genoma mitocondrial por otros autores

(Pedraza – Lara et al. 2010) indica que las poblaciones españolas e italianas de este astácido habrían empezado a divergir hace unos 35.000 años. Este dato apoya nuestros resultados sobre el tiempo que lleva establecida la especie en la Península Ibérica, si bien dada la semejanza encontrada entre parte de las poblaciones italianas y algunas poblaciones españolas podrían haber tenido un contacto secundario, aunque es difícil precisar cuándo.

De la clasificación de *Austropotamobius* como especie autóctona o alóctona en España puede depender que se mantenga en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, y por tanto, se mantengan las medidas en curso orientadas a su protección y conservación (Diéguez – Uribeondo et al. 2008).

Con estos fines, las poblaciones de cangrejo de río de España deberían considerarse como una ESU (*Evolutionary Significant Unit*) diferenciada (Moritz et al. 1994), ya que alberga haplotipos exclusivos, difiere de las poblaciones italianas en las frecuencias alélicas de los loci SSR y parece llevar largo tiempo establecida en la Península Ibérica. A su vez esta ESU albergaría dos MU (*Management Units*) distintas (Moritz 2002) correspondientes a los grupos genéticos que hemos definido como ‘Norte’ y ‘Centro’ y cuya estructura genética, además, no es homogénea: las poblaciones de los Montes Vascos y las de la Cordillera Cantábrica en el grupo ‘Norte’ y las poblaciones de la cuenca del Ebro y las restantes, en el grupo ‘Centro’.

Dada esta distribución de la diversidad genética del cangrejo de río en España, parece aconsejable emplear poblaciones locales para los propósitos de restauración. Sería conveniente que los ejemplares criados en cautividad procedentes de las astacifactorías de Rillo de Gallo y Pont de Suert sean empleados en el tercio centro peninsular, dada la relación genética encontrada. Para futuras sueltas, resultaría beneficiosa la creación de un nuevo centro, o la adaptación de las instalaciones en los existentes, que albergue muestras de los recursos genéticos de las poblaciones del norte peninsular.

En este contexto, la puesta a punto de la técnica de PCR – RFLP para la rápida identificación de haplotipos mitocondriales, una técnica sencilla y económica, facilita la inclusión de información genética en la gestión de las poblaciones de cangrejo de río. Analizando los cangrejos con la endonucleasa HpaI es posible asignarlos a uno de los dos grandes grupos genéticos detectados, ‘Norte’ o ‘Centro’. La digestión con las dos enzimas de restricción (HpaI y CviAI) permite obtener además información acerca del subgrupo genético (Cordillera Cantábrica y Montes Vascos en el grupo ‘Norte’ y cuenca del Ebro y resto de las cuencas en el grupo ‘Centro’) al que pertenecen. Por tanto, el análisis mediante PCR – RFLP de

los ejemplares destinados a repoblaciones y reintroducciones podría ayudar a mantener la diversidad genética que caracteriza a cada una de las MU.

Por último, dada la controversia que aún existe sobre el estatus taxonómico del complejo de especies *Austropotamobius pallipes*, hemos realizado una reevaluación taxonómica analizando nuestros datos junto con la práctica totalidad de la información disponible sobre los genes COI y 16S depositada en las bases de datos genéticas.

Hasta ahora, en este cangrejo de río los datos disponibles sobre los niveles de diversidad genética y su distribución se basan en el análisis de fragmentos cortos de un gen mitocondrial, ya sea 16S (Bertocchi et al. 2008a; Fratini et al. 2005; Grandjean et al. 2000c) o COI (Trontelj et al. 2005; Zaccara et al. 2005), pero no existe ningún estudio a gran escala que integre la información con ambos marcadores.

En el presente trabajo, hemos analizado la mayoría de las secuencias disponibles sobre este organismo en las bases de datos genéticas con los marcadores 16S y COI junto con nuestros datos. Hemos visto que a nivel mitocondrial podemos distinguir claramente las especies *A. pallipes* s. e. y *A. italicus*, estimando una distancia genética entre ambas de 7,24% (gen COI, Tabla T9) o de 4,50% (16S, Tabla T4). En el orden *Decapoda* estos valores son suficientes para considerarlas especies distintas (Costa et al. 2007; da Silva et al. 2011). En las redes MJ aparecen como grupos genéticos diferenciados (Figuras T1 y T10) y en los árboles filogenéticos muestran una ordenación completa de linajes (Figuras TR3). La divergencia entre ambas pudo empezar hace unos 8,2 MA – 9,2 MA, según el marcador empleado (16S o COI respectivamente, Tablas T5 y T10 y Figuras T2 y T15), en el Mioceno tardío, periodo que varios autores también señalan como el más probable para situar el origen de su divergencia (Chiesa et al. 2011; Trontelj et al. 2005).

Recordemos que oficialmente sólo se reconoce una especie, *A. pallipes* (Füreder et al. 2010), clasificación apoyada por algunos trabajos moleculares que estudian la secuencia del gen COI o analizan mediante AFLP el genoma nuclear (Chiesa et al. 2011; Trontelj et al. 2005). En cambio oficiosamente, la clasificación más aceptada se ha establecido mediante el análisis de RFLP del genoma mitocondrial (Grandjean et al. 1998) y se ha completado con el análisis de las secuencias del gen mitocondrial 16S (Fratini et al. 2005; Grandjean et al. 2000c, 2002a, b), distinguiendo dos especies, *A. pallipes* y *A. italicus*.

A este respecto, todos nuestros resultados parecen indicar que *A. pallipes* s. e. y *A. italicus* estarían evolucionando independientemente, adaptándose a las distintas condiciones ambientales donde ambos habitan, en un proceso de especiación alopátrida que aún no habría concluido.

Pero la controversia va más allá de si *A. pallipes* sensu lato está compuesto por una o dos especies. Analizando el gen 16S se ha encontrado una gran variabilidad genética en *A. italicus* y algunos autores han descrito cuatro subespecies: *A. i. italicus*, *A. i. carinthiacus*, *A. i. carsicus* y *A. i. meridionalis* (Fratini et al. 2005; Grandjean et al. 2000c, 2002a, b), con una divergencia genética de, al menos, el 3% para distinguirlos. Sin embargo, otros autores analizando el gen COI consideraron que los niveles de variabilidad genética detectados en *A. pallipes* sensu lato no eran suficientes para definir subespecies y establecieron seis linajes: APP (Apennines), NW – IT (North – Western Italy), SEA – WB (Southeastern Alps – Western Balkans), ISTR A 1, ISTR A 2 y W (Western) (Trontelj et al. 2005).

En el presente trabajo, la incorporación a nuestros análisis de la práctica totalidad de los haplotipos disponibles en las bases de datos, con una procedencia geográfica extensa, nos ha permitido discutir teniendo una visión más amplia de la variabilidad genética existente en el grupo, obteniendo conclusiones más robustas. En definitiva, las reconstrucciones filogenéticas, las distancias genéticas y los métodos de agrupamiento llevados a cabo apuntan a que *A. italicus* alberga dos grupos genéticos.

El primero, al que proponemos designar *A. i. italicus*, estaría formado por dos subgrupos genéticos S16|C20 – S22|C22 y C19, que algunos autores han llamado NW – IT e ISTR A 1 y otros *A. i. italicus* y *A. i. carinthiacus*. La diversidad genética que hemos encontrado entre ellos es muy inferior al límite del 3% propuesto para diferenciar subespecies en este organismo con el gen 16S (Tabla T4). Aun menor es la diversidad encontrada con el gen COI (Tabla T9). Ambos subgrupos genéticos están presentes en Italia, fundamentalmente en su cuenca tirrénica. En España está ampliamente distribuido el subgrupo S22|C22.

El segundo clúster genético, al que proponemos designar *A. i. carsicus*, también alberga subestructura genética pudiendo distinguir los subgrupos S9|C9 y S14|C11 – C15, denominados en otros estudios, SEA – WB y APP e ISTR A 2 o *A. i. carsicus* y *A. i. meridionalis*. En este caso, las distancias genéticas entre ellos también son muy inferiores al umbral para diferenciar subespecies (Tablas T4 y T9) por lo que pensamos que forman parte del mismo linaje. *A. i. carsicus* se encontraría ampliamente distribuido en los alrededores de la cuenca

adriática, tanto en su vertiente italiana (S14|C11) como en la eslovena y croata (S9|C9 y C15), en menor medida en Austria (S9|C9 y C15), y de manera puntual en España (S14|C11).

En conjunto, el análisis de la práctica totalidad de la información disponible de los marcadores mitocondriales 16S y COI muestra que *A. italicus* comprende dos grandes grupos genéticos que albergan una notable heterogeneidad genética, quizá como resultado de adaptaciones locales.

En resumen, el análisis combinado de marcadores mitocondriales y nucleares ha demostrado ser de gran utilidad en el estudio filogeográfico del cangrejo de río en nuestro país. Su estudio ha revelado unos niveles reducidos de variabilidad genética pudiendo distinguir cuatro subgrupos genéticos englobados en los grupos ‘Norte’ y ‘Centro’. También ha permitido obtener información acerca del flujo génico, que se dirige, predominantemente, del centro al norte y del oeste al este de la Península. Los niveles de variabilidad genética y su patrón de distribución así como la historia demográfica inferida, señalan que el cangrejo de río lleva un largo periodo de tiempo establecido en España, al menos, desde finales del Pleistoceno. De los análisis se desprende que las poblaciones españolas forman una ESU diferenciada, a su vez formada por dos MU, todo lo cual resulta de una extraordinaria importancia en la gestión de esta especie en peligro. El análisis exhaustivo de estas poblaciones también ha llevado a la puesta a punto de una metodología, PCR – RFLP, para identificar haplotipos, con relativa rapidez y sencillez. Los conocimientos que se pueden derivar de su aplicación pueden ser de gran ayuda en el desarrollo de programas de conservación eficaces para esta especie emblemática en nuestro país.

Por último, hemos evaluado el estatus taxonómico de *A. pallipes* sensu lato mediante el análisis de la mayoría de las secuencias disponibles de los marcadores mitocondriales 16S y COI. Los resultados muestran que *A. pallipes* sensu lato está compuesta por dos especies, *A. pallipes* sensu estricto y *A. italicus*. A su vez, *A. italicus* comprende dos linajes: *A. i. italicus* (grupos genéticos S16|C20 – S22|C22 y C19) y *A. i. carsicus* (S9|C9 y S14|C11 – C15).

En conclusión, creemos que la información genética obtenida resulta de gran valor para la gestión y recuperación del cangrejo de río de patas blancas en los ecosistemas fluviales de nuestro país.

## Conclusiones

---



Los resultados obtenidos al analizar las poblaciones españolas del cangrejo de río con loci microsatélites nucleares y secuencias mitocondriales, nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Los marcadores mitocondriales y nucleares empleados han demostrado su eficacia en la determinación de la cantidad de variabilidad genética y el conocimiento de su patrón de distribución en las poblaciones de cangrejo de río en España.
- Con los marcadores mitocondriales 16S y COI se han identificado 21 haplotipos en los 250 ejemplares analizados, 19 haplotipos en las 24 poblaciones españolas y dos haplotipos en la población italiana.
- Todos los loci microsatélites estudiados son polimórficos en el conjunto de las poblaciones españolas, incluso aquellos que resultaron ser monomórficos en poblaciones de otros países europeos.
- El análisis de estos marcadores ha revelado la existencia de una cierta variabilidad genética en las poblaciones muestreadas, que indicaría un pequeño tamaño efectivo y/o consanguinidad, probablemente como consecuencia de múltiples cuellos de botella y, en definitiva, de los efectos de la deriva genética.
- Se pueden diferenciar dos grupos genéticos en las poblaciones españolas: grupo 'Norte' que comprende las poblaciones del norte peninsular, especialmente las de Burgos, Navarra y País Vasco, y grupo 'Centro' que englobaría el resto de la península.
- En el grupo 'Norte', a su vez, podemos diferenciar las poblaciones de los alrededores de la Cordillera Cantábrica de las poblaciones de los Montes Vascos y en el grupo 'Centro', las poblaciones de la cuenca del Ebro de las restantes.
- Entre ambos grupos existe un marcado flujo genético asimétrico desde el 'Centro' al 'Norte' y, dentro de cada grupo, del oeste al este peninsular.
- La estructura genética actual de estas poblaciones podría estar influenciada por cambios climáticos pasados, especialmente la última glaciación, y también por factores actuales, tales como las migraciones – naturales o antropogénicas – y los cuellos de botella causados por enfermedades o alteraciones del hábitat.
- Las poblaciones españolas e italianas analizadas muestran distintos haplotipos mitocondriales y frecuencias alélicas en los loci SSR estudiados.

- El estudio del genoma mitocondrial mediante los genes 16S y COI indica que el cangrejo de río lleva largo tiempo establecido en el país, al menos desde el Pleistoceno y por tanto, apoyaría el origen autóctono de la especie en España.
- Con fines de conservación, las poblaciones españolas parecen constituir una ESU diferenciada. Esta ESU estaría compuesta por dos MU correspondientes a los grupos genéticos 'Norte' y 'Centro', cuya estructura genética no es homogénea.
- Dada la estructura genética detectada, parece aconsejable emplear poblaciones locales para repoblaciones y reintroducciones. Sería conveniente que los ejemplares procedentes de las astacifactorías Rillo de Gallo y Pont de Suert se empleen en el rango de distribución del grupo genético 'Centro'.
- La puesta a punto de la técnica de PCR – RFLP facilita la inclusión de información genética en la gestión de las poblaciones de cangrejo de río. El análisis del DNA de estos cangrejos con dos enzimas de restricción, HpaI y CviAII, permite asignarlos a una de las dos MU propuestas y además, identificar el subgrupo genético al que pertenecen.
- El análisis conjunto de las secuencias mitocondriales 16S y COI en el género *Austropotamobius* permite diferenciar claramente dos especies *A. torrentium* y *A. pallipes* sensu lato, con un umbral de diferenciación entre ambas del 7,6% con el gen 16S y del 12,5% con el gen COI.
- Tras recopilar y analizar la práctica totalidad de la información disponible en las bases de datos, *A. pallipes* sensu lato parece estar compuesto por dos especies, *A. pallipes* sensu estricto y *A. italicus*, cuya diferenciación habría comenzado hace unos 9,2 – 8,2 MA, en el Mioceno tardío.
- *A. italicus* parece albergar a su vez dos grupos genéticos, *A. i. italicus* y *A. i. carsicus* con un marcado patrón de distribución geográfico.

## Bibliografía

---



- Abdo Z & Golding GB (2007) A step toward barcoding life: a model – based, decision – theoretic method to assign genes to preexist species groups. *Syst Biol* 56: 44 – 56.
- Acaso E (2006) El fenómeno glaciario cuaternario en la Península Ibérica. *Enseñanzas de las Ciencias de la Tierra*. 13.3: 242 – 251.
- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716 – 723.
- Albrecht H (1982) Das system der europäischen flusskrebse (Decapoda, Astacidae): vorschlag und begründung. *Mitt Hamburg Zool Museum Inst* 79: 187 – 210.
- Aldabe J, Esquizabel JI, Fernández MJ, Irurzun JC, Mendía F, Rueda A, Yoldi B (1991) Estudio de distribución y abundancia de las especies de cangrejos presentes en los ríos navarros. Documento interno del Servicio de Medio Ambiente del Gobierno de Navarra. Pamplona.
- Alderman DJ & Polglase JL (1986) *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *Journal of Fish Diseases*, 9, 367-379.
- Allendorf FW & Luikart GH (2007) *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts.
- Alonso F & Martínez R (2003) Characterisation of white – clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) populations in Cuenca, Central Spain. Libro de resúmenes del Workshop "The endangered native crayfish *Austropotamobius pallipes*: Bioindicator and heritage species". CRAYNET, Kilkenny (Irlanda).
- Alonso F & Martínez R (2010) La dispersión de los cangrejos rojo y señal por Castilla – La Mancha: ¿son válidas las medidas de gestión de especies invasoras a nivel geográfico de comunidad autónoma? *Foresta* 47 – 48: 244 – 252.
- Alonso F (2012) *Austropotamobius pallipes*. En: VV.AA., Bases ecológicas preliminares para la conservación de las especies de interés comunitario en España: Invertebrados. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. 69 pp.
- Alonso F, Temiño C, Diéguez – Uribeondo J (2000) Status of the white – clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858), in Spain distribution and legislation. *Bull Fr Pêche Piscic* 356: 31 – 54.
- Altschul SF, Madden TL, Chaffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI – BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleid Acids Res* 25: 3389 – 3402.

- Angers B & Bernatchez L (1997) Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Mol Biol Evol* 14: 230 – 238.
- Armitage V (2000) Observations of radio tracked crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in a northern British river. *Proceedings of the Crayfish Conference, Leeds*, 63 – 69.
- Astanev I, Gosling E, Wilson J, Powell E (2005) Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Mol Ecol* 14: 1655 – 1666.
- Attard J & Pasteur N (1984) Variabilité et différenciation génétiques chez cinq espèces d'écrevisses astacidae. *Biochem Syst Ecol* 12: 109 – 117.
- Attard J & Vianet R (1985) Variabilité génétique et morphologique de cinq populations de l'écrevisse européenne *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858) (Crustacea, Decapoda). *Can J Zool* 63: 2933 – 2939.
- Aung O, Nguyen TTT, Poompuang S, Kamonrat W (2010) Microsatellite DNA markers revealed genetic population structure among captive stocks and wild populations of mrigal, *Cirrhinus cirrhosus* in Myanmar. *Aquaculture* 299: 37 – 43.
- Avise JC & Hamrick JL (1996) *Conservation genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall, Nueva York.
- Avise JC (1992) *Molecular Population Structure and the Biogeographic History of a Regional Fauna: A Case History with Lessons for Conservation Biology*. *Oikos* 63: 62 – 76.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Massachusetts, USA: Harvard University Press.
- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* (2ª Edición). Sinauer, Sunderland, MA. 684 pp.
- Avise JC, Arnold J, Martin Ball R, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intra-specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 489 – 522.
- Azuma M, Usio N, Korenaga T, Koizumi I, Takamura N (2011) Genetic population structure of the invasive signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in Japan inferred by newly developed microsatellite markers. *Plankton Benthos Res* 6: 187 – 194.

- Balloux F & Lugon – Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol* 11: 155 – 165.
- Baric S, Höllrigl A, Füreder L, Dalla Via J (2005a) Mitochondrial and microsatellite analyses of *Austropotamobius pallipes* populations in South Tyrol (Italy) and Tyrol (Austria). *Bull Fr Pêche Piscic* 376 – 377: 99 – 612.
- Baric S, Höllrigl A, Füreder L, Petutschnig J, Dalla Via J (2006) First analysis of genetic variability in Carinthian populations of the white – clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Bull Fr Pêche Piscic* 380 – 381: 977 – 990.
- Baric S, Höllrigl A, Kerschbamer C, Füreder L, Dalla Via J (2005b) Update of the molecular phylogeny of the *Austropotamobius pallipes* species complex by including specimens from south Tyrol (Italy) and Carinthia (Austria). *Bull Fr Pêche Piscic* 376 – 377: 627 – 636.
- Berli P & Felsenstein J (1999) Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152: 763 – 773.
- Berli P & Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4563 – 4568.
- Berli P (2006) Comparison of Bayesian and maximum likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics* 22: 341 – 345.
- Berli P (2008) MIGRATE documentation (version 3.0). Technical Report (<http://popgen.sc.fsu.edu>)
- Berli P (2009) How to use MIGRATE or why are Markov chain Monte Carlo programs difficult to use? En: G. Bertorelle, M. W. Bruford, H. C. Hauffe, A. Rizzoli y C. Vernesi (Eds). *Population Genetics for Animal Conservation (Conservation Biology, Vol. 17)*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bernatchez L (2001) The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55: 351 – 379.
- Beroiz B (2004) Caracterización morfológica y genética de las poblaciones españolas de cangrejo de río *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) mediante el uso de marcadores moleculares. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid

- Beroiz B, Callejas C, Alonso F, Ochando MD (2008) Genetic structure of Spanish white – clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) populations as determined by RAPD analysis: reasons for optimism. *Aquat Conserv* 18: 190 – 201.
- Bertocchi S, Brusconi S, Gherardi F, Buccianti A, Scalici M (2008b) Morphometrical characterization of the *Austropotamobius pallipes* complex. *J Nat Hist* 42: 2063 – 2077.
- Bertocchi S, Brusconi S, Gherardi F, Grandjean F, Souty – Grosset C (2008a) Genetic variability of the threatened crayfish *Austropotamobius italicus* in Tuscany (Italy): implications for its management. *Fundam Appl Limnol* 173 – 2: 153 – 164.
- Bichain JM, Boisselier MC, Bouchet P, Samadi S (2007) Delimiting species in the genus *Bythinella* (Mollusca: Caenogastropoda: Rissooidea): molecular and morphometric approaches. *Malacologia* 49: 291 – 311.
- Blaxter ML (2004) The promise of a DNA taxonomy. *Phil Trans R Soc Lond B* 359: 669 – 679.
- Bolea L (1995) El cangrejo de río común en Aragón. Diputación General de Aragón. Zaragoza, 64 p.
- Bott R (1950) Die flüssekrebsse europas (*Decapoda, Astacidae*). *Proc Senckenberg Nat Soc* 483: 1 – 36 –
- Bott R (1972) Besiedlungsgeschichte und systematik der Astacieden West – Europas unter besonderer beruchksichtigung der shweizt. *Rev Suisse Zool* 79: 387 – 408 –
- Brodsky SY (1983) On the systematics of paleartic crayfishes (*Crustacea, Astacidae*). *Freshwater Crayfish* 5: 464 – 470.
- Buhay JE (2009) COI – like sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *J Crust Biol* 29: 96 – 110.
- Burnham Q & Dawkins KL (2013) The Role of Molecular Taxonomy in Uncovering Variation within Crayfish and the Implications for Conservation. *Freshwater Crayfish* 19: 29 – 37.
- Cacho I, Valero B, González – Sampéris P (2010) Revisión de las reconstrucciones paleoclimáticas en la península ibérica desde el último periodo glacial. En: Pérez F. Fiz y Boscolo Roberta (Eds). *Clima en España: pasado, presente y futuro*. 9 – 24 pp.
- Callejas C & Ochando MD (2002) Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (*Pisces, Cyprinidae*) shown by RAPD markers. *Heredity* 89: 36 – 43.

- Callejas C (1998) Establecimiento de relaciones filogenéticas mediante marcadores moleculares en las especies del género *Barbus* (Pisces, Cyprinidae) en la Península Ibérica. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- Callejas C, Beroiz B, Alonso F, Vivero A, Matallanas B, Ochando MD (2009) Preserving the biodiversity of freshwater ecosystems in a scenario of increasing desertification: Lesson from genetics. En: Edelstein A (ed) Handbook of Environmental Research. Nova Science Publishers, Inc., pp. 261 – 291
- Cassens I, Mardulyn P, Milinkovitch MC (2005) Evaluating Intraspecific “Network” Construction Methods Using Simulated Sequence Data: Do Existing Algorithms Outperform the Global Maximum Parsimony Approach? Syst Biol 54: 363 – 372.
- Cataudella R, Paolucci M, Delaunay C, Ropiquet A, Hassanin A, Balsamo M, Grandjean F (2010) Genetic variability of *Austropotamobius italicus* in the Marches region: implications for conservation. Aquat Conserv 20: 261 – 268.
- Cavalli – Sforza LL & Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. Am J Hum Genet 19: 233 – 257.
- Cerenius L & Söderhäll K (1992) Crayfish diseases and crayfish as vectors for important diseases. Finnish Fish. Res. 14: 125 – 133.
- Chambers PA, Mark Hanson J, Burke J M (1990) The impact of the crayfish *Orconectes virilis* on aquatic macrophytes. Freshwater Biol 24: 81 – 91.
- Changeux T (2003) Évolution de la répartition des écrevisses en France métropolitaine selon les enquêtes nationales menées par le Conseil Supérieur de la Pêche. Bull Fr Pêche Piscic 370 – 371: 17 – 41.
- Chapple DG & Ritchie PA (2013) A retrospective approach to testing DNA barcoding Method. PLOS One 8: e77882.
- Chapuis MP & Stoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Mol Biol Evol 24: 621 – 631.
- Chiesa S, Maldini M, Scalici M, Marzano FN, Gibertini G (2010) Assessment of genetic differentiation in Italian populations of *Austropotamobius pallipes* species complex: taxonomic and management implications. Studi Trent Sci Nat 87: 77 – 82.

- Chiesa S, Scalici M, Negrini R, Gibertini G, Nonnis Marzano F (2011) Fine – scale genetic structure, phylogeny and systematics of threatened crayfish species complex. *Mol Phylogenet Evol* 61: 1 – 11.
- Claros MG & von Heijne G (1994) TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *CABIOS* 10: 685 – 686.
- Clary DO & Wolstenholm DR (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J Mol Evol* 22: 252 – 271.
- Clavero M & Villero D (2013) Historical Ecology and Invasion Biology: Long – Term Distribution Changes of Introduced Freshwater Species. *BioScience* DOI: [10.1093/biosci/bit014](https://doi.org/10.1093/biosci/bit014)
- Collins RA & Cruickshank RH (2013) The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 13: 969 – 975.
- Colwell RK (2009) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8.2. (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates/>)
- Cook BD, Pringle CM, Hughes JM (2008) Phylogeography of an Island Endemic, the Puerto Rican Freshwater Crab (*Epilobocera sinuatifrons*). *J Hered* 99: 157 – 164.
- Costa FO, deWaard JR, Boutillier J, Ratnasingham S, Dooh RT, Hajibabaei M, Hebert PDN (2007) Biological identifications through DNA barcodes: the case of *Crustacea*. *Can J Fish Aquat Sci* 64: 272 – 295.
- Crandall KA & Buhay JE (2008) Global diversity of crayfish (*Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae – Decapoda*) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 295 – 301.
- Crandall KA & Fitzpatrick JF Jr (1996) Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Syst Biol* 45: 1 – 26.
- Crandall KA, Bininda – Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol Evol* 15: 290 – 295.
- Cserzo M, Eisenhaber F, Eisenhaber B, Simon I (2002) On filtering false positive transmembrane protein predictions. *Protein Eng* 15: 745 – 752.
- Cuellar L & Coll M (1983) Epizootiology of the crayfish plague (*Aphanomices astaci*) in Spain. *Freshwater crayfish* 5: 545 – 548.

- Da Silva JM, Creer S, dos Santos A, Costa AC, Cunha MR, Costa FO, Carvalho GR (2011) Systematics and evolutionay insights derived from mtDNA COI barcode diversity in the Decapoda (*Crustacea: Malacostraca*). Plos One 6: e19449.
- Dasmahapatra KK & Mallet J (2006) DNA barcodes: recent successes and future prospects. Heredity 97: 254 – 255.
- De Grave S, Pentcheff ND, Ahyong ST, Chan T-Y, Crandall KA, Dworschak PC, Felder DL, Feldmann RM, Fransen CHJM, Goulding LYD, Lemaitre R, Low MEY, Martin JW, Ng PKL, Schweitzer CE, Tan SH, Tshudy D & Wetzer R (2009) A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. Raffles Bull Zool Suppl 21: 1 – 109.
- De la Hoz J (1997) Informe sobre la situación actual en Asturias de las poblaciones de cangrejo de río autóctono (*Austropotamobius pallipes*) y cangrejo americano de las marismas (*Procambarus clarkii*) con actualización de inventario de presencia. Internal report of the Consejería de Agricultura del Principado de Asturias, Oviedo, Spain
- de Queiroz K (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. En: D. J. Howard, and S. H. Berlocher (Eds). Endless forms: Species and speciation. Oxford University Press, New York. 57 – 75 pp.
- de Queiroz K (1999) The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. En: R. A. Wilson (Ed). Species: New interdisciplinary essays. MIT Press, Cambridge, Massachusetts. 49 – 89 pp.
- de Queiroz K (2005a) Ernst Mayr and the modern concept of species. Proc Natl Acad Sci USA 102: 6600 – 6607.
- de Queiroz K (2005b) A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. Proc Calif Acad Sci 56: 196 – 215.
- de Queiroz K (2005c) Different species problems and their resolution. BioEssays 27: 1263 – 1269.
- de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. Syst Biol 56: 879 – 886.
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB (1977) Maximun likelihood from incomplete data via EM algorithm. J R Stat Soc Series B Stat Methodol 39: 1 – 38.

- Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural, Generalitat de Catalunya. <http://www20.gencat.cat/> Fitxa del cranc de riu autòcton <http://www20.gencat.cat/portal/site/DAR/menuitem.5fbcc9934b5f463053b88e10b031e1a0/?vgnextoid=eadd8a1d9d393310VgnVCM2000009b0c1e0aRCRD&vgnnextchannel=eadd8a1d9d393310VgnVCM2000009b0c1e0aRCRD&vgnnextfmt=default>
- DeSalle R, Egan ME, Sidall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil Trans R Soc Lond B* 360: 1905 – 1916.
- Diéguez – Uribeondo J & Múzquiz JL (1999) Plan de recuperación del cangrejo autóctono, *Austropotamobius pallipes*, en Navarra. *Trofeo Pesca* 52: 76 – 78.
- Diéguez – Uribeondo J, Pinedo – Ruiz J, Muzquiz JL (1997c) *Thelohania contejeani* in the province of Alava, Spain. *Bull Fr Pêche Piscic* 347: 749 – 752.
- Diéguez – Uribeondo J, Royo F, Souty – Grosset C, Ropiquet A, Grandjean F (2008) Low genetic variability of the white – clawed crayfish in the Iberian Peninsula: its origin and management implications. *Aquat Conserv* 18: 19 – 31.
- Diéguez – Uribeondo J, Rueda A, Castien E, Bascones JC (1997b) A plan of restoration in Navarra for the native freshwater crayfish species of Spain, *Austropotamobius pallipes*. *Bull Fr Pêche Piscic* 347: 625 – 637.
- Diéguez – Uribeondo J, Temiño C, Múzquiz JL (1997a) The crayfish plague fungus in Spain. *Bull Fr Pêche Piscic* 347: 753 – 763.
- Dinca V, Zakharov EV, Hebert PDN, Vila R (2010) Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proc Roy Soc Lond B* 278: 347 – 355.
- Dixo M, Metzger JP, Morgante JS, Zamudioc KR (2009) Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biol Cons* 142: 1560 – 1569.
- Downie DA (2000) Patterns of genetic variation in native grape phylloxera on two sympatric host species. *Mol Ecol* 9: 505 – 514.
- Elias M, Hill RI, Willmott KR, Dasmahapatra KK, Brower AV, Mallet J, Jiggins CD (2007) Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proc R Soc Lond B* 274: 2881 – 2889.

- Estoup A & Angers B (1998) Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and experimental considerations. En: Carvalho GR (Ed). *Advances in Molecular Ecology*. IOS Press, Amsterdam, Netherlands, pp. 55 – 86
- Evanno G, Regnaut S, Goudet G (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611 – 2620.
- Evans LH & Edgerton BK (2002) Pathogens, parasites, and commensals. En: D.M. Holdich (Ed). *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, Oxford.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47 – 50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479 – 491.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567 – 1587.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1995) Testing significance of incongruence. *Ladistics* 10: 315 – 319.
- Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- Fergusson JWH (2002) On the use of genetic divergence for identifying species. *Biol J Linn Soc* 75: 509 – 516.
- Fernández S, Fuentes N, Carrión JS, González – Sampériz P, Montoya E, Gil G, Vega – Toscano G, Riquelme JA (2007) The Holocene and Upper Pleistocene pollen sequence of Carihuela Cave, southern Spain. *Geobios* 40: 75 – 90.
- Fetzner JW Jr & Crandall KA (2001) Genetic Variation. En: D. Holdich (Ed). *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science Ltd., Oxford, England. 291 – 326.
- Fletcher WJ & Sánchez Goñi MF (2008) Orbital – and sub – orbital – scale climate impacts on vegetation of the western Mediterranean basin over the last 48,000 yr. *Quaternary Res* 70: 451 – 464.

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 294 – 299.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fraser JC & Bernatchez L (2005) Allopatric origins of sympatric brook charr populations: colonization history and admixture. *Mol Ecol* 14: 1497 – 1509.
- Fratini S, Zaccara S, Barbaresi S, Grandjean F, Souty – Grosset C, Crosa G, Gherardi F (2005) Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: implications for its taxonomy and conservation. *Heredity* 64: 108 – 118.
- Frézal L & Leblois R (2008) Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infect Genet Evol* 8: 727 – 736.
- Fu Y – X (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915 – 925.
- Füreder L & Machino Y (1998) Record of the white – clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858) from Plansee (Tyrol, Austria). *Ber nat med Verein Innsbruck* 82: 241 – 246.
- Füreder L & Machino Y (2002) A revised determination key of freshwater crayfish in Europe 2002. *Ber nat med Verein Innsbruck* 89: 169 – 178 .
- Füreder L, Gherardi F, Holdich D, Reynolds J, Sibley P, Souty – Grosset C (2010) *Austropotamobius pallipes*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- Galindo FJ, Alonso F, Diéguez – Uribeondo J (2014) Cangrejo de río: la ciencia es aval de su carácter nativo. *Quercus* 342: 74 – 79.
- Galindo J, Monzó J, Sancho V (2000) El declive del cangrejo de río en la Comunidad Valenciana. *Quercus*: 173: 12 – 16.
- Galindo J, Nebot B, Delgado JC, Chirrosa M (2003) Alarma tras la primera radiografía del cangrejo de río en Andalucía. *Quercus* 206: 50 – 51.
- Garassino A (1997) The macruran decapod crustacean of the Lower Cretaceous of las Hoyas. *Atti Soc it Sci nat Museo civ Stor nat Milano* 137: 101 – 126.

- Garza JC & Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* 10: 305 – 318.
- Gerber AS, Loggins R, Kumar S, Dowling TE (2001) Does non – neutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genome? *Annu Rev Genet* 35: 539 – 566.
- Ghia D, Fea G, Bernini F, Nardi PA (2011) Reproduction experiment on *Austropotamobius pallipes* complex under controlled conditions: Can hybrids be hatched? *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 401:16 DOI: [10.1051/kmae/2011036](https://doi.org/10.1051/kmae/2011036)
- Ghia D, Nardi PA, Negri A, Bernini F, Bonardi A, Fea G, Spairani (2006) Syntopy of *A. pallipes* and *A. italicus*: genetic and morphometrical investigations. *Bull Fr Pêche Piscic* 380 – 381: 1001 – 1018.
- Gil – Sánchez JM & Alba – Tercedor J (1998) El cangrejo de río autóctono en la provincia de Granada. *Quercus* 144: 14 – 15.
- Gil – Sánchez JM & Alba – Tercedor J (2000) Mejora de la situación del cangrejo de río en Granada. *Quercus* 173: 17.
- Gil – Sánchez JM (1999) Situación, biología y conservación del cangrejo de río autóctono (*Asutropotamobius pallipes*) en la provincia de Granada. PhD Thesis, University of Granada, Granada, Spain.
- Gobierno de Navarra (2011) Normas de pesca. <http://www.navarra.es/NR/ronlyres/ACF581F9 - C847 - 4537 - 9679 - 4023E21EF5F8/179072/2011Normasdepesca1.pdf>
- Goldstein PZ & DeSalle R (2010) Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery and description. *BioEssays* 33: 135 – 147.
- Goloboff P, Farris J, Nixon K (2003) T.N.T.: Tree Analysis Using New Technology. *Syst Biol* 54: 176 – 178.
- Gómez A & Lunt DH (2007) Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: Weiss S, Ferrand N (Eds). *Phylogeography of southern European refugia*. Springer, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer. 155 – 188 pp.
- Gómez A, Wright PJ, Lunt DH, Cancino JM, Carvalho GR, Hughes RN (2007) Mating trials validate the use of DNA barcoding to reveal cryptic speciation of a marine bryozoan taxon. *Proc R Soc Lond B* 274: 199 – 207.

- González – Sampérez P, Valero – Garcés BL, Moreno A, Jalut G, García – Ruiz JM, Martí – Bono C, Delgado – Huertas A, Navas A, Otto T, Dedoubat JJ (2006) Climate variability in the Spanish Pyrenees during the last 30,000 yr revealed by the El Portalet sequence. *Quaternary Res* 66: 38 – 52.
- Goodman SJ (1998) Patterns of extensive genetic differentiation and variation among European harbour seals (*Phoca vitulina vitulina*) revealed using Microsatellite DNA polymorphisms. *Mol Biol Evol* 15: 104 – 118.
- Gopurenko D, Hughes JM, Keenan CP (1999) Mitochondrial DNA evidence for rapid colonisation of the Indo – West Pacific by the mud crab *Scylla serrata*. *Mar Biol* 134: 227 – 233.
- Gouin N, Grandjean F, Souty – Grosset C (2000) Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (*Astacidae*) and their potential use in other decapods. *Mol Ecol* 9: 629 – 644.
- Gouin N, Grandjean F, Bouchon D, Reynolds JD, Souty – Grosset C (2001) Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*, assessed using RAPD markers. *Heredity* 86: 1 – 8.
- Gouin N, Grandjean F, Pain S, Souty – Grosset C, Reynolds J (2003) Origin and colonization history of the white – clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*, in Ireland. *Heredity* 91: 70 – 77.
- Gouin N, Grandjean F, Souty – Grosset C (2006) Population genetic structure of the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in France based on microsatellite variation: biogeographical inferences and conservation implications. *Freshw Biol* 51: 1369 – 1387.
- Gouin N, Souty – Grosset C, Bórquez J, Bertin A, Grandjean F (2011) Disentangling the impact of demographic factors on population differentiation of an endangered freshwater crayfish (*Austropotamobius pallipes*) using population density and microsatellite data. *Freshw Biol* 56: 2105 – 2118.
- Gouin N, Souty – Grosset C, Ropiquet A, Grandjean F (2002) High dispersal ability of *Austropotamobius pallipes* revealed by microsatellite markers in a French brook. *Bull Fr Pêche Piscic* 367 6: 81 – 689.
- Gower JC (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325 – 338.

- Grandjean F & Souty – Grosset C (1996) Isolation and Characterisation of Mitochondrial DNA from the endangered white – clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*, Lereboullet, 1858. Bull Fr Pêche Piscic 343: 175 – 182.
- Grandjean F & Souty – Grosset C (2000a) Genetic variation in the endangered crayfish species, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) (*Crustacea, Astacidae*) from the Poitou – Charentes region (France). Aquat Sci 62: 01 – 19.
- Grandjean F & Souty – Grosset C (2000b) Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the white – clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*. Conserv Genet 1: 309 – 319.
- Grandjean F, Bouchon D, Souty – Grosset C (2002b) Systematic of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (*Decapoda: Astacidae*) with a re – examination of the status of *Austropotamobius berndhauseri*. J Crustacean Biol 22: 677 – 681.
- Grandjean F, Frelon – Raimond M, Souty – Grosset C (2002a) Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius*: one species or several? Bull Fr Pêche Piscic 367: 671 – 680.
- Grandjean F, Gouin N, Frelon M, Souty – Grosset C (1998) Genetic and morphological systematic studies on the crayfish *Austropotamobius pallipes* (*Decapoda: Astacidae*). J Crustacean Biol 18: 549 – 555.
- Grandjean F, Gouin N, Souty – Grosset C, Diéguez – Uribeondo J (2001) Drastic bottlenecks in the endangered crayfish species, *Austropotamobius pallipes* in Spain with inference to its colonization history. Heredity 88: 1 – 8.
- Grandjean F, Harris FDJ, Souty – Grosset C, Crandall KA (2000c) Systematic of the European endangered crayfish species, *Austropotamobius pallipes* (*Decapoda: Astacidae*). J Crustacean Biol 20: 522 – 529.
- Grandjean F, Souty – Grosset C, Holdich DM (1997b) Mitochondrial DNA variation in four British populations of the white – clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*: implications for management. Aq Living Resour 10: 121 – 126.
- Grandjean F, Souty – Grosset C, Raimond R, Holdich DM (1997a) Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white – clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. Freshw Biol 37: 493 – 501.

- Grandjean F, Tan MH, Gan HY, Gan HM, Austin CM (2015) The complete mitogenome of the endangered white-clawed freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) (Crustacea: Decapoda: Astacidae). *Mitochondrial DNA* 4: 1 – 2.
- Grimaldi MC & Crouau – Roy B (1997) Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences. *J Mol Evol* 44: 336 – 340.
- Gross R, Palm S, Koiv K, Prestegard T, Jussila J, Paaver T, Geist J, Kokko H, Karjalainen, Edsman L (2013) Microsatellite markers reveal clear geographic structuring among threatened noble crayfish (*Astacus astacus*) populations in Northern and Central Europe. *Conser Genet* 14: 809 – 821.
- Habsburgo – Lorena AS (1979) Present situation of exotic species of crayfish introduced to Spanish continental waters. *Freshwater Crayfish* 4: 175 – 184.
- Habsburgo – Lorena AS (1986) The status of the *Procambarus clarkii* populations in Spain. *Freshwater Crayfish* 6: 131 – 133.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet* 23: 167 – 172.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95 – 98.
- Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T, Seidman M, Stollar BD (1984) Characterization of genomic poly (dT – dG) poly (dC – dA) sequences: Structure, organization, and conformation. *Mol Cell Biol* 4: 2610 – 2621.
- Harrison JS (2004) Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16s and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa* (Decapoda: Pinnotheridae). *Mol Phylogenet Evol* 30: 743 – 754.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard J (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313 – 321.
- Hebert PND, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLOS Biol* 2: e312.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biol J Linn Soc Lond* 58: 247 – 276.

- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans R Soc Lond B* 359: 183 – 195.
- Hickerson MJ, Meyer CP, Moritz C (2006) DNA Barcoding Will Often Fail to Discover New Animal Species over Broad Parameter Space. *Syst Biol* 55: 729 – 739.
- Hirokawa T, Boon – Chieng S, Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378 – 379.
- Hofmann K & Stoffel W (1993) TMbase – A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe – Seyler* 374: 166.
- Holdich DM (1987) The dangers of introducing alien animals with particular reference to crayfish. *Freshwater Crayfish* 7: 15 – 30.
- Holdich DM (2002) Background and functional morphology. En: D.M. Holdich (Ed). *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, Oxford. 1 – 29 pp.
- Holdich DM, Reynolds JD, Souty – Grosset C, Sibley PJ (2009) A review of the ever increasing treat to European crayfish from non – indigenous crayfish species. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 394 – 395: 11 DOI: [10.1051/kmae/2009025](https://doi.org/10.1051/kmae/2009025)
- Holland BS, Dawson MN, Crow GL, Hofmann DK (2004) Global phylogeography of *Cassiopea* (*Scyphozoa: Rhizostomeae*): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Mar Biol* 145: 1119 – 1128.
- Hoobs HH Jr (1991) Crayfish Distribution, Adaptive Radiation and Evolution. En: Holdich, D. M. and Lowery, R. S. (Eds). *Freshwater Crayfish: Biology Management and Exploitation*. Editores: London and Sydney: Croom Helm. 52 – 82 pp.
- Huang T, Cerenius L, Söderhäll K (1994) Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* 126: 1 – 10.
- Hudson RR & Coyne J (2002) Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution* 56: 1557 – 1565.
- Hudson RR (1990) Gene genealogies and the coalescent process. En *Oxford Surveys en Evolutionary Biology*, volumen 7. 1 – 44 pp.
- Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155: 2011 – 2014.

- Huesenbeck JP & Ronquist F (2001) Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754 – 755.
- Hughes PD & Woodward JC (2008) Timing of glaciation in the Mediterranean mountains during the last cold stage. *J Quaternary Sci* 23: 575 – 588.
- Iaconelli M (2001) Struttura genetica del gambero di fiume *Austropotamobius italicus* e strategie di conservazione della specie in Italia centrale con particolare riguardo all'Abruzzo: dottorato di ricerca in scienze ambientali: ambiente e uomo in Appennino: curriculum: ecologico-ecologia delle acque interne. Tesi di dottorato. Università degli studi de L'Aquila.
- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brown MAD (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction – amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9436 – 9440.
- Jorger KM, Norenberg JL, Wilson NG, Schrodler M (2013) Barcoding against a paradox? Combined molecular species delineations reveal multiple cryptic lineages in elusive meiofaunal sea slugs. *BMC Evol Biol* 12: 245.
- Karaman MS (1963) Studie der *Astacidae* (*Crustacea, Decapoda*). *Hydrobiologia* 22: 111 – 132.
- Kingman JFC (1982) On the Genealogy of Large Populations. *J App Probab* 19: 27 – 43.
- Klobučar GIV, Podnar M, Jelić M, Franjević D, Faller M, Štambuk A, Gottstein S, Smić V, Maguire I (2013) Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Fresh Biol* 58: 1089 – 1105.
- Knowlton N & Weight LA (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc R Soc Lond B* 265: 2257 – 2263.
- Knowlton N, Weight LA, Solorzano LA, Mills DK, Bermingham E (1993) Divergence in proteins, mitochondrial DNA and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260: 1629 – 1631.
- Koskinen MT, Nilsson J, Veselov A, Potutkin AG, Ranta E, Primmer CR (2002) Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, *Salmonidae*. *Heredity* 88: 391 – 401.
- Kouba A, Petrusek A, Kozák P (2014) Continental – wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowl Manag Aquat Ec* 413: 05. DOI: [10.1051/kmae/2014007](https://doi.org/10.1051/kmae/2014007)

- Krogh A, Larsson B, von Hiejne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567 – 580.
- Largiadèr CR, Herger F, Lörtscher M, Scholl A (2000) Assessment of natural and artificial propagation of the white – clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* species complex) in the Alpine region with nuclear and mitochondrial markers. *Mol Ecol* 9: 25 – 37.
- Laurent PJ (1988) *Austropotamobius pallipes* and *A. torrentium*, with observations on their interaction with other species in Europe. En: Holdich, D.M. and Lowery, R.S. (Eds). *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Croom – Helm, London. 341 – 364 pp.
- Lefébure T, Douady CJ, Gouy M, Gibert J (2006) Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within *Crustacea*: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Mol Phylogenet Evol* 40: 435 – 447.
- Leonardi S, Piovani P, Scalfi M, Piotti A, Giannini R, Menozzi P (2012) Effect of Habitat Fragmentation on the Genetic Diversity and Structure of Peripheral Populations of Beech in Central Italy. *J Hered* 103: 408 – 417.
- Librado P & Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451 – 1452.
- Lin H, Downie DA, Walker MA, Granett J, English – Loeb G (1999) Genetic structure in native populations of grape phylloxera (*Homoptera: Phylloxeridae*). *Ann Entomol Soc Am* 92: 376 – 381.
- Lindqvist O (1988) Restoration of native European crayfish stocks. *Freshwater Crayfish* 7: 6 – 12.
- Lörtscher M, Clalüna M, Scholl A (1998) Genetic population structure of *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858) (*Decapoda: Astacidae*) in Switzerland, based on allozyme data. *Aquat Sci* 60: 118 – 129.
- Lörtscher M, Stucki TP, Claluna M, Scholl A (1997) Phylogeographic structure of *Austropotamobius pallipes* populations in Switzerland. *Bull Fr Pêche Piscic* 347: 649 – 661.
- Lu R, Qui T, Xiang C, Chaomei XH, Zhang J (2000) RAPD and AFLP techniques for the analysis of genetic relationships in two genera of *Decapoda*. *Crustaceana* 73: 1027 – 1036.

- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 5: 153 – 165.
- Machino Y, Füreder L, Laurent PJ, Petutchnig J (2004) Introduction of the white – clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* in Europe. *Ber. nat. – med. Verein Innsbruck* 91: 187 – 212.
- Maguire I, Podnar M, Jelić M, Štambuk A, Schrimpf A, Schulz H, Klobučar G (2013) Two distinct evolutionary lineages of the *Astacus leptodactylus* species complex (*Decapoda: Astacidae*) inferred by phylogenetic analyses. *Invertebrate systematics* 28: 117 – 123.
- Maldonado I, Galindo FJ, Aranda F, Nebot B (2008) Historia y evolución en la distribución del cangrejo de río autóctono en Andalucía y resto de España. Interpretación en base a la caracterización genética disponible para las poblaciones ibéricas. XIV Congreso Asociación Ibérica de Limnología. Programa final y libro de Resúmenes.
- Martin JW, Crandall KA, Felder DL (2009) *Decapod crustacean phylogenetics*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis/ CRC
- Mathews LM, Adams L, Anderson E, Basile M, Gottardi E, Buckholt MA (2008) Genetic and morphological evidence for substantial hidden biodiversity in a freshwater crayfish species complex. *Mol Phylogenet Evol* 48: 126 – 135.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16: 404 – 405.
- Meglecz E, Petenian F, Danchin E, Coeur d’Acier A, Rasplus JY, Faure E (2004) High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Mol Ecol* 13: 1693 – 1700.
- Meier R, Zhang G, Ali F (2008) The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. *Syst Biol* 57: 809 – 813.
- Meyer CP & Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling *PLOS Biol* 3: 2229 – 2238.
- Ming QL, Wang CZ (2006) Genetic differentiation of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. Assulta* (Guenée) (*Lepidoptera: Noctuidae*) based on AFLP markers. *Insect Sci* 13: 437 – 444.

- Misof B, Anderson CL, Buckley TR, Erpenbeck D, Rickert A, Misof K (2002) An empirical analysis of mt 16S rRNA covariation – like evolution in insects: site – specific rate variation is clustered and frequently detected. *J Mol Evol* 55: 460 – 469.
- Momot WT (1995) Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science* 3: 33 – 63.
- Momot WT, Gowing H, Jones P D (1978) The dynamics of crayfish and their role in ecosystems. *Am Midl Nat* 99: 10 – 35.
- Moñino AV, Perán JA, Urbano J, Pérez L, Martínez S, Tomás A, Jover M (2003) Características poblacionales del cangrejo de río autóctono (*Austropotamobius pallipes*) en la cuenca del río Turia en Valencia. *AquaTic* 18: 15 – 24.
- Moreno A, Valero – Garcés BL, Jiménez – Sánchez M, Domínguez MJ, Mata P, Navas A, González – Sampérez P, Stoll H, Farias P, Morellón M, Corella JP, Rico M (2010) The last deglaciation in the Picos de Europa National Park (Cantabrian Mountains, Northern Spain). *J Quaternary Sci* 25: 1076 – 1091.
- Moritz C & Cicero C (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLOS Biol* 2: e354.
- Moritz C (1994) Defining ‘Evolutionary Significant Units’ for conservation. *Trends Ecol Evol* 9: 373 – 375.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Syst Biol* 51: 238 – 254.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263 – 273.
- Muñoz G (1988) Crónica piscícola continental hispana. ICONA. Serie técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 193 p.
- Nagel KO (2000) Testing hypotheses on the dispersal and evolutionary history of freshwater mussels (*Mollusca: Bivalvia, Unionidae*). *J Evol Biol* 13: 854 – 865.
- Nascetti G, Andreani P, Santucci F, Iaconelli M, Bullini L (1997) Struttura genetica di popolazioni italiane di gambero di fiume (*Austropotamobius pallipes*) e strategie per la sua conservazione. *S It E Atti* 18: 205 – 208.

- Nayak S & Umadevi K (2012) In silico comparative molecular phylogeny of mitochondrial 16S RNA and COI genes of the spiny lobster genus *Panulirus* (*Decapoda: Palinuridae*). *Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research* 3: 364 – 373.
- Negri M, Pileggi LG, Mantelatto FL (2012) Molecular barcode and morphological analyses reveal the taxonomic and biogeographical status of the stripedlegged hermit crab species *Clibanarius sclopetarius* (Herbst, 1796) and *Clibanarius vittatus* (Bosc, 1802) (*Decapoda : Diogenidae*). *Invertebr Syst* 26: 561 – 571.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583 – 590.
- Nei M (1983) Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. En: Nei M y Koehn RK (Eds). *Evolution of genes and Proteins*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 165 – 190 pp.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nguyen TTT (2008) Population structure in the highly fragmented range of *Tor douronensis* (*Cyprinidae*) in Sarawak, Malaysia revealed by microsatellite DNA markers. *Freshw biol* 53: 924 – 934.
- Nielsen R & Matz M (2006) Statistical approaches for DNA barcoding. *Syst Biol* 55: 162 – 169.
- Nosil P, Harmon LJ, Seehausen O (2009) Ecological explanation for (incomplete) speciation. *Trends in ecology and Evolution* 24: 145 – 156.
- O'Brien SJ & Evermann JF (1988) Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends Ecol Evol* 3: 254 – 259.
- Olsen TM & Lodge DM (1991) Mechanisms of impact of an introduced crayfish (*Orconectes rusticus*) on littoral congeners, snails and macrophytes. *Canadian J Fish Aquat Sci* 48: 1853 – 1861.
- Owen CL, Bracken – Grissom H, Stern D, Crandall KA (2015) A synthetic phylogeny of freshwater crayfish: insights for conservation. *Phil Trans R Soc Lond B* 370: 20140009. DOI: 10.1098/rstb.2014.0009.
- Paetkau D & Strobeck C (1995) The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Mol Ecol* 4: 519 – 520.

- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real – time estimation of migration rate: a simulation – based exploration of accuracy and power. *Mol Ecol* 13: 55 – 65.
- Paetkau D, Waits LP, Clarkson PL, Craighead L, Strobeck C (1997) An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (*Ursidae*) populations. *Genetics* 147: 1943 – 1957.
- Palacios D, de Andrés N, de Marcos J, Vázquez – Selem L (2012) Glacial landforms and their paleoclimatic significance in Sierra de Guadarrama, Central Iberian Peninsula. *Geomorphology* 139 – 140: 67 – 78.
- Palacios D, de Marcos J, Vázquez – Selem L (2011) Last Glacial Maximum and deglaciation of Sierra de Gredos, central Iberian Peninsula. *Quatern Int* 233: 16 – 26.
- Pardo L (1942) Astacicultura elemental. Ministerio de Agricultura, Madrid
- Pardo L (1950 – 1951) Apuntes para la historia de la pesca continental española. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid
- Pascual M, Aquadro CF, Soto V, Serra L (2001) Microsatellite variation in colonizing and Palearctic populations of *Drosophila subobscura*. *Mol Biol Evol* 18: 731 – 740.
- Pasini G & Garassino A (2011) Unusual scaled preservation samples on freshwater decapods (Crustacea, Decapoda) from the Pleistocene (Late Cenozoic) of Turkey and Kazakistan. *Atti Soc it Sci nat Museo civ Stor nat Milano* 152: 13 – 18.
- Pedraza – Lara C, Alda F, Carranza S, Doadrio I (2010) Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white – clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). *Mol Phylogenet Evol* 57: 327 – 342.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, kau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GeneClass2: a software for genetic assignment and first generation migrants detection. *J Hered* 95: 536 – 539.
- Posada D & Crandall KA (1998) Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817 – 818.
- Posada D & Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol Evol* 16: 37 – 45.
- Pretzmann G (1987) A contribution to a historic analysis of Mediterranean freshwater decapods chorology. *Invest Pesq* 51: 17 – 25.

- Primmer CR, Ellegren H, Saino N, Moller AP (1996) Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nature Genet* 13: 391 – 393.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 – 959.
- Puillandre N, Lambert A, Broouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol* 21: 1864 – 1877.
- Puillandre N, Macpherson E, Lambourdière J, Cruaud C, Boisselier – Dubayle MC, Samadi S (2011) Barcoding type specimen helps to identify synonyms and an unnamed new species in *Eumunida* Smith, 1883 (*Decapoda: Eumunididae*). *Invertebr Syst* 25: 322 – 333.
- Puillandre N, Modica MV, Zhang Y, Sirovich L, Boisselier M – C, Cruaud C, Holford M, Samadi S (2011) Large – scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Mol Ecol* 21: 2671 – 2691.
- Purugganan M & Gibson G (organizers) (2003) Genes in Ecology (special issue). *Mol Ecol* 12: 1109 – 1337.
- Rach J, Desalle R, Sakar IN, Schierwater B, Hadrys H (2008) Character – based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in *Odonata*. *Proc Biol Sci* 275(1632): 237 – 247.
- Rallo A, García – Arberas L, Antón A (2004) Cambios en las condiciones Físicas, químicas y faunísticas de un sistema fluvial (río Oma, Bizkaia), y desaparición de una población de cangrejo autóctono (*Austropotamobius pallipes*): ¿causa y/o efecto? *Limnetica* 23: 229 – 240.
- Rambaut A & Drummond AJ (2009) Tracer v1.5 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.
- Rambaut A (2010) FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.
- Ramos – Onsins SE & Rozas J (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol* 19: 2092 – 2100.
- Rannala B & Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9197 – 9201.

- Raymond M & Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248 – 249.
- Reed DH & Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv Biol* 17: 230 – 237.
- Reidys C, Stadler PF, Schuster P (1997) Generic properties of combinatory maps. Neutral networks of RNA secondary structure. *Bull Math Biol* 59: 339 – 397.
- Reynolds JD (2002) Growth and reproduction. En: D.M. Holdich (Ed). *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, Oxford. 152 – 191 pp.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223 – 225.
- Robinson CA, Thom TJ, Lucas MC (2000) Ranging behaviour of a large freshwater invertebrate, the white – clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Fresh Biol* 43: 1 – 13.
- Robinson EA, Blagoev GA, Hebert PDN, Adamowicz SJ (2009) Prospects for using DNA barcoding to identify spiders in species – rich genera. *ZooKeys* 16: 27 – 46.
- Rode AL & Babcock LE (2003) Phylogeny of fossil and extant freshwater crayfish and some closely related nephropid lobsters. *J Crustacean Biol* 23: 418 – 435.
- Rogers AR & Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552 – 569.
- Rogers AR (1995) Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49: 608 – 615.
- Rohlf FJ (2000) NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.10q, Exeter Publishing, Ltd., Setauket, NY
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2011) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61: 539 – 542.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecol Evol* 1: 9 – 10.
- Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanski I (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly population. *Nature* 392: 491 – 494.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbour – joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406 – 425.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain – terminating inhibitors. Proc Nat Acad Sci USA 89: 6575 – 6579.
- Santucci F, Iaconelli M, Andreani P, Cianchi R, Nascetti G, Bullini L (1997) Allozyme diversity of European crayfish of the genus *Austropotamobius*. Bull Fr Pêche Piscic 347: 663 – 676.
- Scalici M & Bravi R (2012) Solving alpha – diversity by morphological markers contributes to arranging the systematic status of a crayfish species complex (*Crustacea, Decapoda*). J Zool Syst Evol Res 50: 89 – 98
- Schmitt T (2007) Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. Front Zool 4:11. DOI: [10.1186/1742-9994-4-11](https://doi.org/10.1186/1742-9994-4-11)
- Schmitt T, Hewitt GM, Müller P (2006) Disjunct distributions during glacial and interglacial periods in mountain butterflies: *Erebia epiphron* as an example. J Evol Biol 19: 108 – 113.
- Schneider S & Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. Genetics 152: 1079 – 1089.
- Schubart CD, Diesel R, Hedges SB (1998) Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. Nature 393: 363 – 365.
- Schütze S, Stein H, Born O (1999) Radio telemetry observations on migration and activity patterns of restocked noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in the small River Sempt, North – East of Munich, Germany. Freshwater Crayfish 12: 688 – 695.
- Shinde D, Lai YL, Sun FZ, Arnheim N (2003) Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasilikelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. Nucleic Acids Res 31: 974 – 980.
- Simberloff DS (1972) Properties of the rarefaction diversity measurement. Am Nat 106: 414 – 418.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, Weighting and Phylogenetic utility of the mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann Entomol Soc Am 87: 651 – 701.
- Slatkin M & Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. Genetics 129: 555 – 562.
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. Annu Rev Ecol Syst 16: 393 – 430.

- Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. En: Real LA (Ed). Ecological genetics. Princeton, NJ: Princeton University Press. 3 – 17 pp.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457 – 462.
- Smith GP (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191: 528.
- Smith MA, Fisher BL, Hebert PDN (2005) DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Phil Trans R Soc Lond B* 360: 1825 – 1834.
- Smith MA, Poyarkov NA Jr, Hebert PDN (2008) COI DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Mol Ecol Resour* 8: 35 – 246.
- Sneath PHA & Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. W. H. Freeman and Co., San Francisco
- Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *PNAS* 105: 13486 – 13491.
- Sourdis J & Krimbas C (1987) Accuracy of phylogeographic trees estimated from DNA sequence data. *Mol Biol Evol* 4: 159 – 166.
- Souty – Grosset C & Reynolds JD (2009) Current ideas on methodological approaches in European crayfish conservation and restocking procedures. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 394 – 395: 01. DOI: [10.1051/kmae/2009021](https://doi.org/10.1051/kmae/2009021)
- Souty – Grosset C, Grandjean F, Raimond R, Frelon M, Debenest C, Bramard M (1997) Conservation genetics of the white – clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*: the usefulness of the mitochondrial DNA marker. *Bull Fr Pêche Piscic* 347: 677 – 692.
- Souty – Grosset C, Holdich DM, Noël PY, Reynolds JD, Haffner P (eds.) (2006) Atlas of Crayfish in Europe, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, Patrimoines Naturels, 64.
- Starobogatov YI (1995) Taxonomy and geographical distribution of crayfishes of Asia and East Europe (*Crustacea: Decapoda: Astacidae*). *Arthropoda Selecta* 4: 3 – 25.
- Stefani F, Zaccara S, Delmastro GB, Buscarino M (2009) The endangered white – clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* (*Decapoda, Astacidae*) east and west of the Maritime Alps: a result of human translocation? *Conserv Genet* 12: 51 – 60.

- Stillman JH & Reeb CA (2001) Molecular Phylogeny of Eastern Pacific Porcelain Crabs, Genera *Petrolisthes* and *Pachycheles*, Based on the mtDNA 16S rDNA Sequence: Phylogeographic and Systematic Implications. *Mol Phylogenet Evol* 19: 236 – 245.
- Stoeckle M (2003) Taxonomy, DNA and the bar code of life. *BioScience* 53: 2 – 3.
- Swahn JO (2004) The cultural history of crayfish. *Bull Fr Pêche Piscic* 372 – 373: 243 – 251.
- Swofford DL (2002) PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585 – 595.
- Takahata N & Slatkin M (1990) Genealogy of neutral genes in two partially isolated populations. *Theor Popul Biol* 38: 331 – 350.
- Takahata N (1988) The coalescent in two partially isolated diffusion populations. *Genet Res* 52: 213 – 22.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731 – 2739.
- Tateno Y, Nei M, Fajima F (1982) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. I. Distantly related species. *J Mol Evol* 18: 387 – 404.
- Temíño C & Sáez – Royuela M (1998) Resumen de los inventarios de cangrejo autóctono *Austropotamobius pallipes* realizados en la provincia de Burgos entre 1984 y 1997. Documento interno del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Burgos. Burgos.
- Templeton AR, Shaw K, Routman E, Davis SK (1990) The Genetic Consequences of Habitat Fragmentation. *Ann Missouri Bot Gard* 77: 13 – 27.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876 – 4882.
- Torre M & Rodríguez P (1964) El cangrejo de río. Servicio Nacional de Pesca Fluvial y Caza. Ministerio de Agricultura. Madrid.

- Trontelj P, Machino Y, Sket B (2005) Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 34: 212 – 226.
- Tryantaphyllidis GV, Criel GRL, Abatzopoulos TJ, Thomas KM, Peleman J, Beardmore JA, Sorgeloos P (1997) International study on *Artemia*. LVII. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. *Mar Biol* 129: 477 – 487.
- Tusnády GE & Simon J (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17: 849 – 850.
- Unruth TR & Wooly JB (1999) Molecular methods in classical biological control. En: T. Fisher, Thomas Bellows, L. Caltagirone, D. Dahlsten, Carl Huffaker, G. Gordh (Eds). *Handbook of Biological Control. Principles and Applications of Biological Control*. Academic Press. 1046 pp.
- Van der Peer Y, Neefs JM, De Rijk P, De Wachter R (1993) Reconstructing evolution from eukaryotic small – ribosomal – subunit RNA sequences: calibration of the molecular clock. *J Mol Evol* 37: 221 – 232.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO – CHEKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4: 535 – 538.
- van Velzen R, Weitschek E, Felici G, Bakker FT (2012) DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. *PLOS ONE* 7: e30490. doi:10.1371/journal.pone.0030490
- Wares JP & Cunningham CW (2001) Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 55: 2455 – 2469.
- Weir BS & Cockerham CC (1984) Estimating F – statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358 – 1370
- Wiemers M & Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? A case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Front Zool* 4: 8.
- Wiens JJ (2007) Species Delimitation: New Approaches for Discovering Diversity. *Syst Biol* 56: 875 – 878.

- Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M Jr, Gyllensten UB, Helmbychowski M, Higushi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol J Linn Soc Lon* 26: 375 – 400.
- Wilson GA & Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163: 1177 – 1191.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114 – 138.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15: 323 – 354.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F – statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395 – 420.
- Wright S (1969) *Evolution and Genetics of Populations, vol.2, The theory of gene frequencies.* University of Chicago Press, Chicago.
- Xiao J – H, Wang N – X, Li Y – W, Murphy RW, Wan D – G, Niu L – M, Hu H – Y, Fu Y – G, Huang D – W (2010) Molecular approaches to identify cryptic species and polymorphic species within a complex community of fig wasps. *PLoS ONE*: DOI: 10.1371/journal.pone.0015067
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1997) POPGENE, the user – friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Zaccara S, Stefani F, Crosa G (2005) Diversity of mitochondrial DNA of the endangered white – clawed crayfish (*Austropotamobius italicus*) in the Po River catchment. *Freshwater Biol* 50: 1262 – 1272.
- Zaccara S, Stefani F, Galli P, Nardo PA, Crossa G (2004) Taxonomic implications in conservation Management of White – clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in Northern Italy. *Biol Conserv* 120: 1 – 10.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: A review. *Mol Ecol* 11: 1 – 16.
- Zarazaga M (1993) *Estudios genéticos de poblaciones astacícolas españolas.* Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. 271p.