Análisis Genético del Fartet

Acción A4 del Plan de Recuperación del fartet en la Región de Murcia



Ignacio Doadrio y Silvia Perea

Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva

mncn museonacionaldecienciasnaturales

UNIÓN EUROPEA

Región de Murcia
Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente

Índice

1. Introducción 3
1.1. Características generales del fartet 3
1.2. El fartet en la Región de Murcia 5
1.3. Estructura y diversidad genética del fartet 6
2.- Objetivos 7
3.- Material y Métodos 9
3.1. Poblaciones muestreadas 9
3.2. Procedimientos de laboratorio 10
3.3. Análisis bioinformático para la obtención de las regiones flanqueantes del elemento transponible candidato. 11
3.4. Genotipado de SNPs 12
3.5. Análisis filogenéticos y de estructura genética 13
4.- Resultados 15
4.1. Análisis filogenético 15
4.2. Análisis de estructura y diversidad genética 16
5.- Discusión 25
5.1. Origen de las poblaciones de fartet de la Región de Murcia 25
5.2. Estructura poblacional y unidades de conservación. 26
5.3. Diversidad Genética. 29
6.- Conclusiones y recomendaciones sobre la gestión. 32
7.-Agradecimientos 33
8.- Referencias 34

1. Introducción

1.1. Características generales del fartet

El fartet, *Apricaphanius iberus* (Valenciennes, 1846) es una de las tres especies de ciprinodontiformes endémicos de España que vive en las lagunas costeras, marjales y salinas así como en las desembocaduras de algunos ríos del litoral mediterráneo. Aunque durante mucho tiempo fue incluido en la familia Cyprinodontidae en la actualidad se incluye dentro de la familia Aphaniidae. Recientemente, las antiguas especies del género *Aphanius*: *A. iberus*, *A. baeticus* Doadrio, Carmona y Fernández-Delgado, 2002 y *A. saourensis* Blanco, Hrbek y Doadrio, 2006 endémicas de España y Argelia han sido incluidas dentro del género *Apricaphanius* Freyhoff y Yoğurtçuoğlu, 2020 (Freyhof y Yoğurtçuoğlu 2020).

El fartet es una especie de pequeño tamaño de no más de 5 cm de longitud total y con un marcado dimorfismo sexual, especialmente conspicuo en el patrón de coloración. Los machos adultos son más pequeños que las hembras y presentan un patrón de bandas verticales plateadas a lo largo del cuerpo que alcanzan la aleta caudal, en un número variable de 14 a 22. Por su parte, las hembras presentan una serie de puntos que tienden a agruparse en filas a lo largo del cuerpo. Su vistoso patrón de coloración, su pequeño tamaño y facilidad de aclimatación en acuarios hizo que esta especie fuera de interés para los aficionados a la acuariofilia. El ciclo de vida del fartet es corto, uno o dos años, alcanzando la madurez reproductiva en unos pocos meses (García-Berthou y Moreno-Amich, 1992; García-Berthou *et al*., 1999). Al igual que otras especies de peces de agua dulce adaptadas al régimen climático mediterráneo, el fartet presenta una puesta fraccionada (Oliva-Paterna *et al*., 2006).

El fartet se distribuye desde los Aiguamolls del Empordà en Gerona hasta el río y laguna de Adra en Almería. Sin embargo, esta distribución no es continua y la especie presenta poblaciones muy fragmentadas a lo largo de su área de distribución (Doadrio *et al*., 2011). En cuanto a los hábitats por los que la especie presenta preferencia, estos abarcan desde aguas dulceacuícolas hasta aguas salobres e incluso con una elevada concentración salina, superando a veces la propia salinidad del mar, siendo por tanto el fartet una especie eurihalina (Moreno-Amich *et al*., 1999; Alcaraz *et al*., 2008). La especie también es euritérmica, presentando tolerancia a altas temperaturas. El fartet habita por lo general en ambientes someros, en áreas de poca corriente, como por ejemplo lagunas y humedales litorales, y con abundante vegetación acuática (Oliva-Paterna *et al*., 2006).

Respecto a su estado de conservación el fartet se encuentra bajo la protección de la legislación local, nacional y europea en la máxima categoría de amenaza: En Peligro (Lista Roja de la IUCN),

En Peligro (Catálogo Español de Especies Amenazadas, RD 139/2011), En Peligro (Catálogo Valenciano de Especies Amenazadas, Decreto 32/2004), En Peligro (Catálogo Andaluz de Especies Amenazadas, Ley 8/2003), En Peligro (Ley 7/1995 de la Fauna Silvestre de la Región de Murcia), En Peligro (Decreto Legislativo 2/2008 por el que aprueba la ley de protección de los animales de la Comunidad Autónoma de Cataluña). La especie también se incluye en los Anexos II y III de la Convención de Berna (82/72) y en el Anexo II de la Directiva Hábitats (92/43/CEE). Las diferentes comunidades autónomas donde se distribuye el fartet han implementado programas de recuperación para esta especie En Peligro: Cataluña (LIFE de la Unión Europea de Conservación de especies prioritarias en humedales mediterráneos, 1996-2011), Comunidad Valenciana (Decreto 9/2007), Región de Murcia (LIFE04 NAT/ES/000035) y Andalucía (Plan de Recuperación de peces de agua dulce, 2012).

La fuerte sobreexplotación agrícola como consecuencia de la gran demanda y extracción de agua para regadío asociada a la enorme transformación que ha sufrido el paisaje del levante español y de la Región de Murcia, son las principales amenazas para el fartet, llevando a la progresiva desaparición de sus hábitats y a la regresión de sus poblaciones (Casas *et al*., 2011). Muchos de los hábitats naturales de la especie han sido modificados por una intensificación de la agricultura y un aumento exagerado del urbanismo asociado al turismo, dando lugar a canales y balsas de riego donde se distribuyen actualmente algunas de las poblaciones de fartet. De hecho, existen muy pocos hábitats donde se distribuía el fartet que no hayan sido modificados por la actividad humana y algunas de sus poblaciones se han extinguido localmente (Moreno-Amich *et al*., 1999). Uno de estos claros ejemplos de transformación del hábitat fue la desecación de la antigua laguna endorreica de Villena (Alicante) en el año 1803 por orden de Carlos IV, para cuyo desagüe fue construida la Acequia del Rey, donde desembocaban las aguas de la antigua laguna, de manera que la población de fartet de la laguna desapareció pero pudo colonizar la Acequia del Rey. Esta acequia ha mantenido desde el principio un caudal continuo de agua procedente de aportes de afloramientos naturales, principalmente salinos, así como aportes de agua del uso de la huerta y de la propia ciudad de Villena; ocasionalmente también presenta aportes de escorrentía del río Vinalopó. A principios de los años 90 esta población se extinguió, debido a la contaminación del agua. Parte de esta población fue mantenida en cautividad para evitar su extinción y poder ser utilizada en posteriores programas de cría en cautividad y recuperación de la especie en la Comunidad Valenciana.

La contaminación y la introducción de especies exóticas son otros de los principales factores de amenaza de la especie (Oliva-Paterna, *et al*., 2006; Doadrio *et al*., 2011). La llegada de especies invasoras a las áreas típicamente habitadas por el fartet ha dado lugar a su desplazamiento de

hábitats de agua dulce contrayéndose su distribución hacia hábitats más salinos (Caiola y De Sostoa, 2005; Alcaraz *et al*., 2008). La gambusia (*Gambusia holbrooki*), una especie de origen americano, constituye una de las principales especies que causan un impacto negativo sobre el fartet, y numerosos son los estudios que tratan de evaluar la magnitud de tal impacto. Así por ejemplo, algunos estudios sugieren una mejor capacidad natatoria de la gambusia respecto al fartet (Rubio-García *et al*., 2020).

Por otro lado, hay que tener en consideración que el fartet se distribuye por una región caracterizada por una estacionalidad climática muy fuerte y con una fuerte variabilidad interanual, de forma que en los casos extremos pueden producirse periodos de sequía intensos y prolongados en el tiempo y periodos de lluvias torrenciales que originan fuertes riadas. Estas condiciones climáticas naturales también pueden dar lugar a una alteración de la dinámica de las poblaciones de fartet, teniendo en cuenta que es una especie con un ciclo de vida que no suele superar los dos años, de manera que cualquier evento catastrófico asociado a una fuerte riada o a una sequía extrema puede dar lugar a un cambio notable en los tamaños efectivos poblacionales o en la composición de sus genotipos.

1.2. El fartet en la Región de Murcia

En la Región de Murcia existen dos núcleos identificados de fartet, la denominada Huerta de Murcia y Mar Menor y humedales adyacentes, donde se estima una regresión de sus poblaciones de al menos un 80% (Oliva-Paterna *et al*., 2002, 2006). El Mar Menor está separado del Mar Mediterráneo por una barrera de arena de 22 km que permite el intercambio de agua desde el Mar Mediterráneo principalmente a través del canal del Estacio y las marismas pseudomareales de las Encañizadas, pero también tiene entradas de agua dulceacuícola. La salinidad media del Mar Menor abarca un rango de 39-46 ppt (Pérez-Ruzafa *et al*., 1995), por tanto, las poblaciones de fartet que habitan en el Mar Menor son capaces de soportar elevadas concentraciones salinas.

Otro de los núcleos poblacionales de fartet en la Región de Murcia se ubica en la Rambla de las Moreras (Mazarrón), población hallada a principios del siglo XXI y localizada al menos hasta 2008, pero que tras fuertes riadas no volvió a encontrarse en su cauce. Sin embargo, en los años 2016 y 2017 fue localizado en dos lagunas anejas a la rambla. Junto a éste, el de Rambla Salada (Fortuna) constituye otro núcleo poblacional de la especie que ha sido descubierto recientemente (CARM, 2019).

En el río Chícamo se halló una población en el año 1998, siendo la única población de agua dulce en la Región de Murcia. Esta población desapareció tras una fuerte riada en el año 2012 y

actualmente se conservan tres stocks en cautividad en balsas o charcas particulares autorizadas por la Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente de la Región de Murcia (CARM, 2019).

Se han llevado a cabo varias medidas de conservación y refuerzos de poblaciones dentro del marco del proyecto LIFE04/NAT/E/000035 "Conservación de los stocks genéticos *de Aphanius iberus* en la Región de Murcia", entre ellas el control de especies exóticas como la gambusia o el cangrejo rojo americano y el refuerzo de la población del río Chícamo con ejemplares procedentes de programas de cría en cautividad. Dentro de las poblaciones del Mar Menor, las que presentan un mejor estado de conservación son las de las salinas de Marchamalo y de San Pedro del Pinatar. En el marco del proyecto LIFE, también se han realizado acciones de reintroducción de ejemplares en las rehabilitadas salinas del Rasall, población que desapareció en los años 90 al desecarse las salinas.

1.3. Estructura y diversidad genética del fartet

Se han identificado varios grupos genéticos de fartet de acuerdo a la presencia de variantes genéticas exclusivas de cada una de estas unidades en base al análisis de ADN mitocondrial y nuclear: Cataluña, Levante, Región de Murcia y Villena (Fernández-Pedrosa *et al*., 1995; Doadrio *et al*., 1996; García-Marín y Pla-Zanuy, 1999; Torralva y Oliva-Paterna, 2002; Araguas *et al*., 2007; González *et al*., 2018).

En general, las poblaciones de la Región de Murcia, especialmente las poblaciones del Mar Menor, han mostrado tener una menor diversidad genética que las poblaciones de Levante (González *et al*., 2018). Esta población del Mar Menor actúa como una metapoblación, es decir, como una gran población estructurada en unidades locales interconectadas entre sí, en las que se pueden dar fenómenos de extinción local y recolonizaciones periódicas. Esto explica la alta diferenciación genética hallada entre estas poblaciones del Mar Menor (González *et al*., 2018)

2.- Objetivos

El delimitar unidades de conservación sigue siendo uno de los principales objetivos de la Biología de la conservación, especialmente cuando los recursos que se pueden destinar para la preservación de las especies son limitados. Los marcadores genéticos se han mostrado como la principal herramienta para la definición de estas unidades. Hasta el momento con el fartet se han realizado trabajos de delimitación de unidades de conservación con alozimas, ADN mitocondrial y marcadores neutrales como los microsatélites, muchos de ellos realizados por el equipo que ha redactado este informe. Nunca se han realizado estudios genómicos con esta o con alguna otra especie endémica española de peces y sin embargo los datos genómicos tienen el potencial de revolucionar el estudio de la delimitación de Unidades de Conservación. Esto es debido a que se utilizan un mayor número de caracteres y se pueden descubrir genes candidatos para caracteres adaptativos que son esenciales a la hora de entender el declive de las especies y delinear estrategias de conservación. Además, conociendo la problemática del fartet en el que algunas poblaciones pueden haber sido objeto de traslocaciones, la genómica es una herramienta más potente para descubrir los efectos de las mismas.

En el presente estudio se pretende analizar la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *Apricaphanius iberus* de la Región de Murcia a través del análisis de una batería de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) a través de todo el genoma. Ello incluye caracteres neutrales y sometidos a selección, completando de esta forma el conocimiento previo sobre la estructura filogeográfica de la especie basado en análisis de ADN mitocondrial y microsatélites. Los análisis moleculares basados en SNPs permiten evaluar una mayor proporción del genoma de las especies, a través del análisis de cientos o miles de loci independientes. Por este motivo los resultados obtenidos a partir de estos análisis van a permitir entender los procesos evolutivos seguidos por las poblaciones de fartet a una escala muy detallada. Para tener una visión global robusta sobre la estructura poblacional y los parámetros de diversidad genética del fartet en la Región de Murcia se han incluido varias poblaciones a lo largo de toda el área de distribución de la especie. Esta estrategia debe permitir:

1.- Definir la estructura y Unidades de Conservación de las poblaciones de fartet de la Región de Murcia con respecto a otras poblaciones de la especie.

2.- Valorar la variabilidad genética de las poblaciones de fartet de la Región de Murcia incluidas las poblaciones mantenidas ex situ.

3.- Estudiar el origen de las poblaciones de fartet de la Región de Murcia distribuidas en pequeñas ramblas y arroyos fuera del área del Mar Menor.

3.- Material y Métodos

3.1. Poblaciones muestreadas

Se han analizado 111 individuos de 12 poblaciones a lo largo del área de distribución del fartet con el objetivo de obtener resultados de variación y variabilidad genética más robustos (Tabla 1; Figura 1). Para una de las poblaciones de fartet (Chícamo) se han analizado dos poblaciones colectadas en diferentes años, una de ellas en el río Chícamo en 2007 y otra en la población de cría en cautividad en 2019.

Tabla 1. Poblaciones de *Apricaphanius Iberus* utilizadas en este estudio.

Nº EN MAPA	POBLACIÓN	Nº DE INDIVIDUOS
1	Aiguamolls del Empordà	10
2	Albuixech	10
3	Villena	10
4	Sax	5
5	Rambla salada	5
6	Chícamo (2 poblaciones)	10 (del 2007) 7 (del 2019)
7	Vinalopó	10
8	Santa Pola	10
9	San Pedro del Pinatar	10
10	Carmolí	10
11	Rambla Moreras	7
12	Adra	8

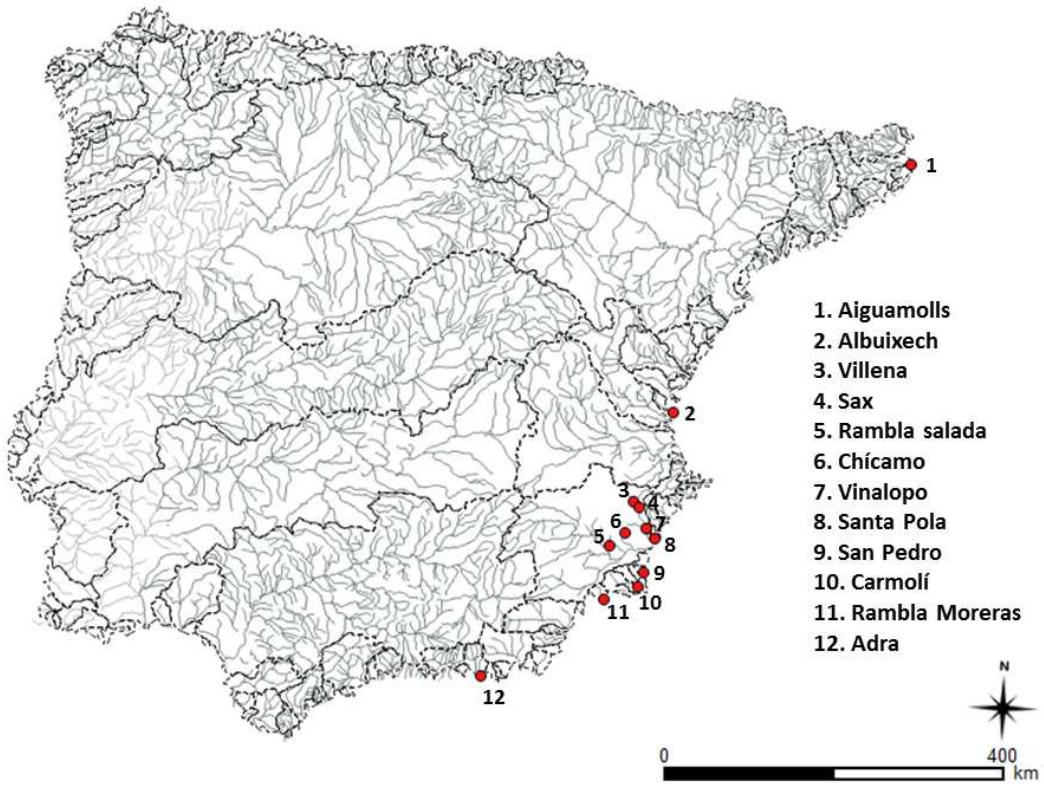


Figura 1. Localidades de muestreo. Los números están en correspondencia con la Tabla 1.

3.2. Procedimientos de laboratorio

Para cada uno de estos individuos se tomó un fragmento de aleta que se conservó en etanol absoluto (95%). El ADN total genómico de todas las muestras se extrajo utilizando el Kit de extracción de tejido y sangre de Qiagen. Se midió la concentración de ADN de cada una de las muestras y se enviaron a la empresa AllGenetics, donde se procesaron utilizando la reciente y novedosa técnica de MobiSeq (Rey-Iglesia *et al.*, 2019) con el fin de obtener la batería de SNPs.

Una de las muestras de *Apricaphanius* se eligió para secuenciar todo su genoma a baja cobertura. El ADN de esta muestra se extrajo usando el kit para extracción de ADN genómico NZY siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN fue diluido en un volumen final de 50 microlitros. Se comprobó la presencia de ADN de alto peso molecular en esta extracción a través de un gel de agarosa al 2% y se cuantificó la concentración de ADN mediante el kit Qubit dsDNA HS Assay (ThermoFisher). Se construyó una librería genómica por shotgun usando el kit TruSeq Nano DNA Library Prep (Illumina) siguiendo el protocolo del fabricante. La librería de ADN fue nuevamente cuantificada mediante el kit Qubit dsDNA HS Assay (ThermoFisher) y se comprobó el tamaño de los fragmentos de ADN de la librería mediante el kit Agilent DNA 1000 (Agilent

Technologies). La librería se secuenció en la plataforma Illumina NovaSeq 6000 PE150, obteniendo 50G gigabases de datos brutos.

3.3. Análisis bioinformático para la obtención de las regiones flanqueantes del elemento transponible candidato.

Usando estos datos brutos generados a través de la secuenciación de un genoma de baja cobertura se seleccionó el elemento transponible más adecuado para ser usado en la metodología de MobiSeq (Rey-Iglesia *et al*., 2019). El elemento transponible tiene que tener un dominio conservado al final para permitir la hibridación del primer. Por otro lado, las regiones flanqueantes del elemento transponible tienen que ser no repetitivas. También es importante que el elemento transponible aparezca en el genoma en un número adecuado.

Se evaluó la calidad de los datos brutos de secuenciación utilizando el programa FastQC 0.11.3 (Wingett y Andrews, 2018). El script clumpify.sh del programa BBmap 37.00 fue utilizado para eliminar las lecturas duplicadas exactas. El programa Trimmomatic 0.36 (Bolger *et al*., 2014) fue utilizado para eliminar los adaptadores mediante la opción ILLUMINACLIP. Las lecturas con una calidad media menor de 26 también fueron eliminadas.

El contenido de repeticiones del elemento transponible fue reconstruido utilizando DNApipeTE (https://github.com/clemgoub/dnaPipeTE) usando los parámetros por defecto. Este pipeline usa Trinity (Grabherr *et al*., 2011) para ensamblar los elementos transponibles y RepeatMasker 4.0.7 para anotarlos. Se obtuvieron un total de 22382 *contigs*, de los cuales 12776 fueron anotados usando la base de datos RepBase y 9606 no fueron anotados. Una vez que los elementos transponibles fueron reconstruidos, las lecturas se mapearon contra los *scaffolds* obtenidos y se seleccionaron aquellas que tuvieron un emparejamiento de al menos 30 pares de bases. De esta manera, se identificaron en los *scaffolds* generados áreas que incluían regiones conservadas donde el primer pudiera hibridar. Este paso se realizó usando el *kmercountexact* script del programa BBmap 37.00 en cada *scaffold* independientemente para buscar *kmers* de 22 pares de bases en las regiones de emparejamiento cuantificando su abundancia. Posteriormente se filtraron los kmers que no hibridaban con el primer, por ejemplo, aquellos con un contenido en CG menor del 40-60% o aquellos incluyendo homopolímeros o microsatélites, así como aquellos que no superaban una abundancia de 1000. En total 36 contigs mostraron un adecuado *kmer* con abundancia significativa.

Posteriormente se llevó a cabo un análisis de regiones flanqueantes. Para ello se utilizó el programa cutadapt 1.18 (Martin, 2011) para extraer las regiones flanqueantes de cada *kmer* candidato permitiendo un *mismatch*. Con todas estas lecturas se estimó el número de loci que

se recuperarían agrupando las regiones flanqueantes *kmer* utilizando el módulo ustacks del programa STACKS (Catchen *et al*., 2013) usando los parámetros por defecto. Las regiones flanqueantes también fueron inspeccionadas visualmente evaluando la presencia de lecturas altamente repetitivas usando Geneious 10.2.2 (Kearse *et al*., 2012).

El último paso fue diseñar *primers* que hibridaran en las regiones candidatas y testar la presencia de dímeros y la temperatura de annealing. Esto finalmente permitió recuperar aproximadamente 10.000 loci en el genoma de *Apricaphanius iberus* de baja cobertura secuenciado.

3.4. Genotipado de SNPs

Una vez obtenidos estos loci se procedió al genotipado de los SNPs en todos los 111 individuos. En primer lugar, se construyeron las librerías genómicas MobiSeq (Rey-Iglesia *et al*., 2018) para cada uno de los individuos, de manera que se cuantificó la cantidad de ADN de cada una de las muestras utilizando el kit Qubit dsDNA HS Assay (ThermoFisher Scientific). El ADN fue fragmentado en porciones de aproximadamente 500 pares de bases, y un subconjunto de estos fragmentos genómicos fue amplificado por PCR usando el primer diseñado descrito en el apartado anterior para comprobar la presencia de la región candidata seleccionada. Las librerías fueron indexadas para el posterior proceso de demultiplexado (ordenamiento y separación de muestras) y cuantificadas con el kit Qubit dsDNA HS Assay (ThermoFisher Scientific) para incluirlas en una mezcla equimolecular que fue posteriormente secuenciado mediante Illumina NovaSeq 6000 PE150, obteniendo un total de 110 gigabases.

Posteriormente se evaluó la calidad de los datos de secuenciación, archivos Fastq R1 (*forward*) y R2 (*reverse*), utilizando el programa FastQC 0.11.3 (Wingett y Andrews, 2018), cuyos outputs fueron analizados en conjunto utilizando el programa Multiqc (Ewels *et al*., 2016). El script clumplify.sh del programa BBmap 37.00 fue utilizado para eliminar las lecturas duplicadas idénticas forward y reverse. Mediante el programa Trimmomatic 0.36 (Bolger *et al*., 2014) fue usado para eliminar los adaptadores (opción ILLUMINACLIP) y truncar las lecturas a 140 pb. Las lecturas más cortas de esta longitud y con una calidad menor de 26 fueron eliminadas de los siguientes análisis. El programa Cutadapt 1.3 (Martin, 2011) fue utilizado para eliminar las lecturas sin el sitio de unión a los *primers*.

Posteriormente se llevó a cabo el genotipado de los SNPs mediante el programa STACKS (Catchen et al., 2013). En primer lugar, se utilizó el módulo process radtags para realizar un filtrado extra de la calidad de las lecturas para comprobar que no quedasen lecturas de baja

calidad o con *missing data* (opciones –q y -c). Posteriormente se utilizó el *pipeline* denovo_map.pl (módulos ustacks, cstacks y sstacks) fue utilizado para construir y genotipar *de novo* los loci. Se testaron diferentes parámetros de M, m y n y finalmente se decidió fijar los valores de estos parámetros en M=3, m=3 y n=5, obteniendo un número de loci genotipados entre 200.000 y 400.000 para cada una de las poblaciones, de los cuales finalmente se filtró un número de SNPs variables de 1905 y de SNPs fijos de 89.

El programa *populations* incluido en STACKS (Catchen *et al*., 2013) fue usado para extraer los SNPs de los loci genotipados para cada una de las poblaciones de fartet, utilizando el parámetro –r 0.8 (mínimo número de individuos de una población en la que un locus debe aparecer). Este programa también se utilizó para estimar los principales parámetros de diversidad genética entre las poblaciones.

3.5. Análisis filogenéticos y de estructura genética

Mediante el programa *populations* de STACKS (Catchen *et al*., 2013) se obtuvieron los archivos input para correr un análisis de estructura genética y de relaciones filogenéticas.

Los análisis filogenéticos se basaron en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud. La Inferencia Bayesiana se realizó mediante el programa MrBayes (Ronquist et al., 2012) y en un modelo de evolución GTR. Para ello se corrieron dos análisis simultáneos 5 millones de generaciones, cada uno basado en cuatro cadenas MCMC y muestreando cada 100 generaciones. Después de descartar el 10% de generaciones se obtuvo el árbol consenso basada en la regla del 50% de la mayoría. Los valores de apoyo estadístico de Inferencia Bayesiana se estimaron en base a probabilidades posteriores. El análisis de Máxima Verosimilitud se basó en el programa RaxML en el servidor online Trex (Stamatakis, 2006) usando el modelo de evolución GTR. Los valores de apoyo estadístico de los árboles basados en un algoritmo rápido de *bootstrap* se estimaron utilizando 1000 réplicas (Stamatakis et al. 2007). Para los análisis filogenéticos se utilizó la matriz de 89 SNPs fijados en las poblaciones.

Para analizar la estructura genética de fartet se utilizó el conjunto de SNPs variables (1905 SNPs) con el fin de analizar la distribución de estos SNPs en cada una de las poblaciones. Para ello se corrieron 10 simulaciones independientes para cada valor de K testado (desde K=1 hasta K=12, de acuerdo al número de poblaciones), con una longitud de *burn-in* de 50.000 seguida de 50.000 iteraciones y el modelo de *admixture*. El programa Clumpak (Kopelman *et al*., 2015) fue utilizado para integrar todos los análisis de structure independientes y seleccionar el valor de K más adecuado en base al estadístico ΔK. Paralelamente se llevó a cabo un segundo análisis de

estructura genética con el programa sNMF (Frichot y François, 2014), que es una función del programa LEA de R. Este programa infiere los coeficientes de ancestría de cada uno de los individuos analizados para diferentes valores de K. En este caso, la elección del valor de K más adecuado se basa en el criterio de entropía cruzada, de manera que el valor de K que presenta el valor más bajo de entropía es el que mejor refleja la estructura genética de las poblaciones analizadas. Así mismo, se estimaron los valores de FST en comparaciones dos a dos entre las poblaciones de fartet. Finalmente, la presencia de estructura genética también se determinó mediante un análisis de componentes principales (PCA), con el fin de estimar la agrupación de las distintas poblaciones en función de la varianza genética explicada por los SNPs analizados.

Paralelamente, se evaluó la presencia de loci potencialmente bajo selección utilizando el programa BayeScan 2.1 (Foll y Gaggiotti, 2008), que determina la probabilidad de que un locus esté sujeto a selección analizando las diferencias de las frecuencias alélicas mediante un análisis bayesiano en el que se contrastan dos modelos alternativos, el modelo neutral y el modelo de selección, estimando la probabilidad posterior de cada modelo para cada locus. Para ello se consideró una probabilidad previa para el modelo neutral de 1:10 y se corrieron 20 pruebas piloto para entrenar el modelo, con un tamaño de dilución de 10 y 50.000 iteraciones adicionales de *burn-in*. La tasa de falso descubrimiento se fijó en el 5%.

Para estimar el flujo génico entre las poblaciones, tanto su magnitud como su dirección, en base a la batería de SNPs analizada se empleó una aproximación Bayesiana utilizando el programa MIGRATE-N v.4.4.3 (Beerli 2009). Debido al elevado tiempo computacional de este análisis se tomó al azar un número representativo de 121 SNPs. De esta forma, se llevaron a cabo simulaciones de cadenas de Markov (MCMC), que consistieron en una cadena de longitud larga y 12 cadenas de longitud corta que se corrieron de forma paralela, con unas temperaturas de inicio de 1.0, 1.5, 3.0, 100000.0 y considerando el algoritmo de adaptive-bound heating. Las búsquedas finales de MCMC usaron 2500000 iteraciones con un incremento de 100, descartando el primer 10% de generaciones como burn-in. Los parámetros iniciales fueron ajustados a Θ (0.0–0.1) y M (0.0–5000.0).

4.- Resultados

4.1. Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos demostraron la presencia de varios linajes evolutivos de fartet (Figura 2). De esta forma, se identificaron dos grandes linajes (los colores azul y naranja del árbol están en correspondencia con los colores del análisis de poblaciones del Structure). Uno de estos linajes agrupó las poblaciones de la Región de Murcia y Alicante: Chícamo, Rambla Salada, Rambla de las Moreras, Vinalopó, Santa Pola, poblaciones del Mar Menor (Carmolí y Salinas de San Pedro), Villena y Sax. En este linaje las poblaciones de Sax y Villena fueron muy divergentes con respecto al resto de las poblaciones. Un segundo linaje evolutivo incluyó las poblaciones de Cataluña, Valencia y Andalucía: Aiguamolls, Albuixech y Adra, en este linaje, las poblaciones de Albuixech y Adra fueron un grupo hermano con respecto a Aiguamolls.

Dentro de cada uno de estos dos linajes, en general todas las poblaciones formaron clados independientes con alto apoyo estadístico excepto las poblaciones del río Chícamo que se agruparon junto a Rambla Salada, las poblaciones de Villena y de Sax que también formaron un clado independiente y las de Carmolí y Salinas de San Pedro que formaron el clado del Mar Menor.

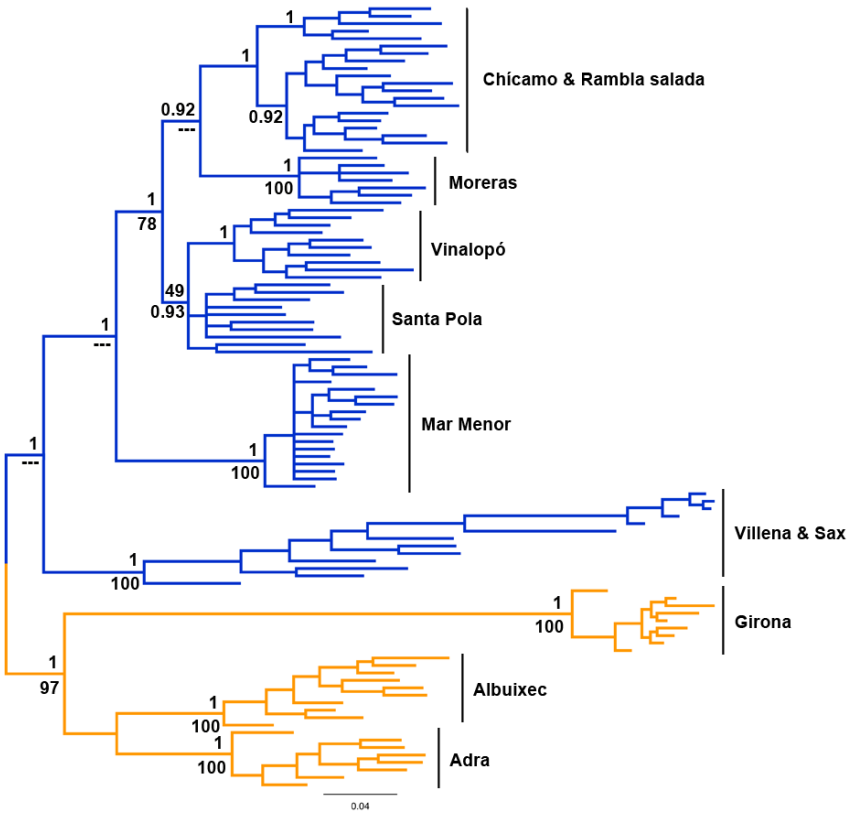


Figura 2. Árbol filogenético mostrando las relaciones evolutivas.

4.2. Análisis de estructura y diversidad genética

Los análisis del programa Structure revelaron una estructura genética significativa para K=2, agrupando por un lado las poblaciones de Adra, Albuixech y Aiguamolls por un lado (Figura 3, color naranja) y el resto de poblaciones por el otro (Figura 3, color azul). La población de Villena presentó una cierta introgresión del linaje más septentrional (Adra, Albuixech y Aiguamolls).



Figura 3. Análisis de Structure de las poblaciones de fartet. K=2.

Analizando de forma independiente cada uno de estos dos grupos genéticos se observa la diferenciación genética de la mayoría de las poblaciones de fartet, siendo estos resultados congruentes con los análisis filogenéticos (Figura 4 y 5), aunque algunas de estas poblaciones presentan cierto grado de introgresión genética. Este es el caso de la población del río Adra, en la que los análisis de Structure sugieren introgresión genética desde la población de Albuixech.

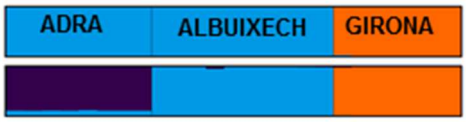


Figura 4. Análisis de Structure de las poblaciones de fartet del grupo septentrional para una K=2 (arriba) y K=3 (abajo**)**

La población de Villena presenta algunas particularidades genéticas propias, pero comparte muchas características con la población de Sax (Figura 5). Lo mismo ocurre con la población de Rambla de las Moreras, con cierta influencia de las poblaciones de Sax/Villena y del Mar Menor, o la población de Santa Pola, que presenta genotipos de la población de Vinalopó. Las poblaciones del Mar Menor constituyen un grupo genético bien diferenciado (Figura 5). Así mismo, las poblaciones del río Chícamo y de Rambla Salada comparten genotipos. Adicionalmente se observa una pérdida de diversidad genética en la población del río Chícamo,

ya que la población Chícamo 2 (2019) aparece más homogénea desde el punto de vista genético que la población más antigua (Chícamo 1,2007).

Los análisis de estructura genética basados en el programa sNMF (Figura 6) mostraron un patrón congruente con los análisis de Structure. El valor de K=5 fue el seleccionado como más adecuado de acuerdo al criterio de entropía cruzada, separando las poblaciones de Adra y Albuixech por un lado, las cuales aparecen posteriormente diferenciadas si se considera una K=6; las poblaciones del Mar Menor por otro lado, y las poblaciones del río Chícamo y Rambla Salada constituyendo un grupo diferenciado. Este análisis también mostró la presencia de introgresión genética en la población de Villena, con una fuerte influencia de la población de Sax, pero también desde otras poblaciones. La población de Rambla de las Moreras presenta cierta introgresión de la población de Sax/Villena. Finalmente, las poblaciones de Santa Pola y Vinalopó comparten genotipos, al igual que se observaba en el análisis de Structure.

Estos grupos genéticos identificados por los análisis de Structure y sNMF fueron apoyados por el análisis de PCA (Figura 7). Este análisis mostró la diferenciación genética de la población de los Aiguamolls en Girona del resto de poblaciones. Sin embargo, la población de Adra se agrupó junto con la de Albuixech. Las poblaciones de Villena, Rambla de las Moreras y Sax constituyeron grupos independientes cuando se comparó el PC1 con el PC2, mientras que las poblaciones del Mar Menor, Vinalopó, Santa Pola, Rambla Salada y las dos poblaciones del río Chícamo se agruparon juntas. Cuando se comparó el PC1 con el PC3, se diferenciaron en grupos distintos las poblaciones del Mar Menor, las poblaciones de Santa Pola – Vinalopó, y las poblaciones del río Chícamo – Rambla Salada. Por su parte, cuando se compararon estos dos últimos componentes principales (PC1 y PC3), las poblaciones de la Rambla de las Moreras y de Sax se agruparon, siendo este resultado congruente con los análisis de Structure y sNMF (Figuras 5 y 6) que muestran por un lado la diferenciación genética de la población de la Rambla de las Moreras (al igual que la comparación del PC1 con el PC2), y la introgresión genética de la población de la Rambla de las Moreras desde la población de Sax, por el otro lado.

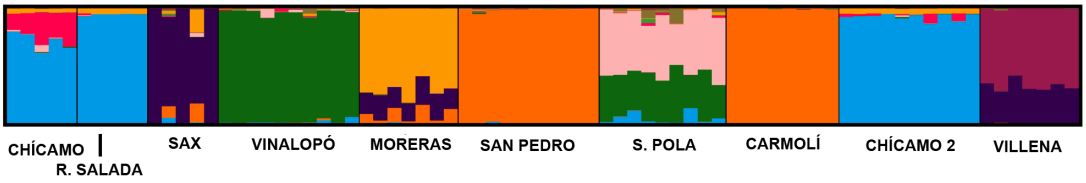


Figura 5. Análisis de Structure de las poblaciones de fartet para K=8

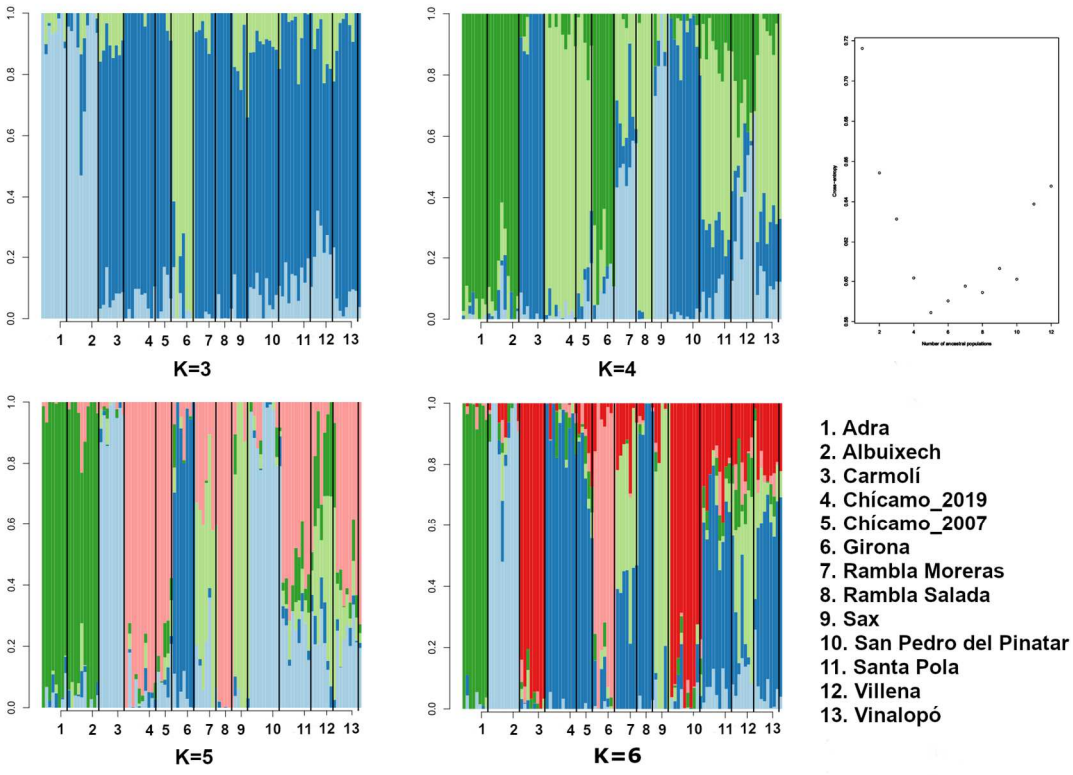


Figura 6. Análisis de estructura genética de las poblaciones de fartet basado en el programa sNMF. Se muestran los resultados desde K=3 hasta K=6. Arriba a la derecha se muestra el gráfico de entropía cruzada, cuyo valor más bajo se da para K=5.

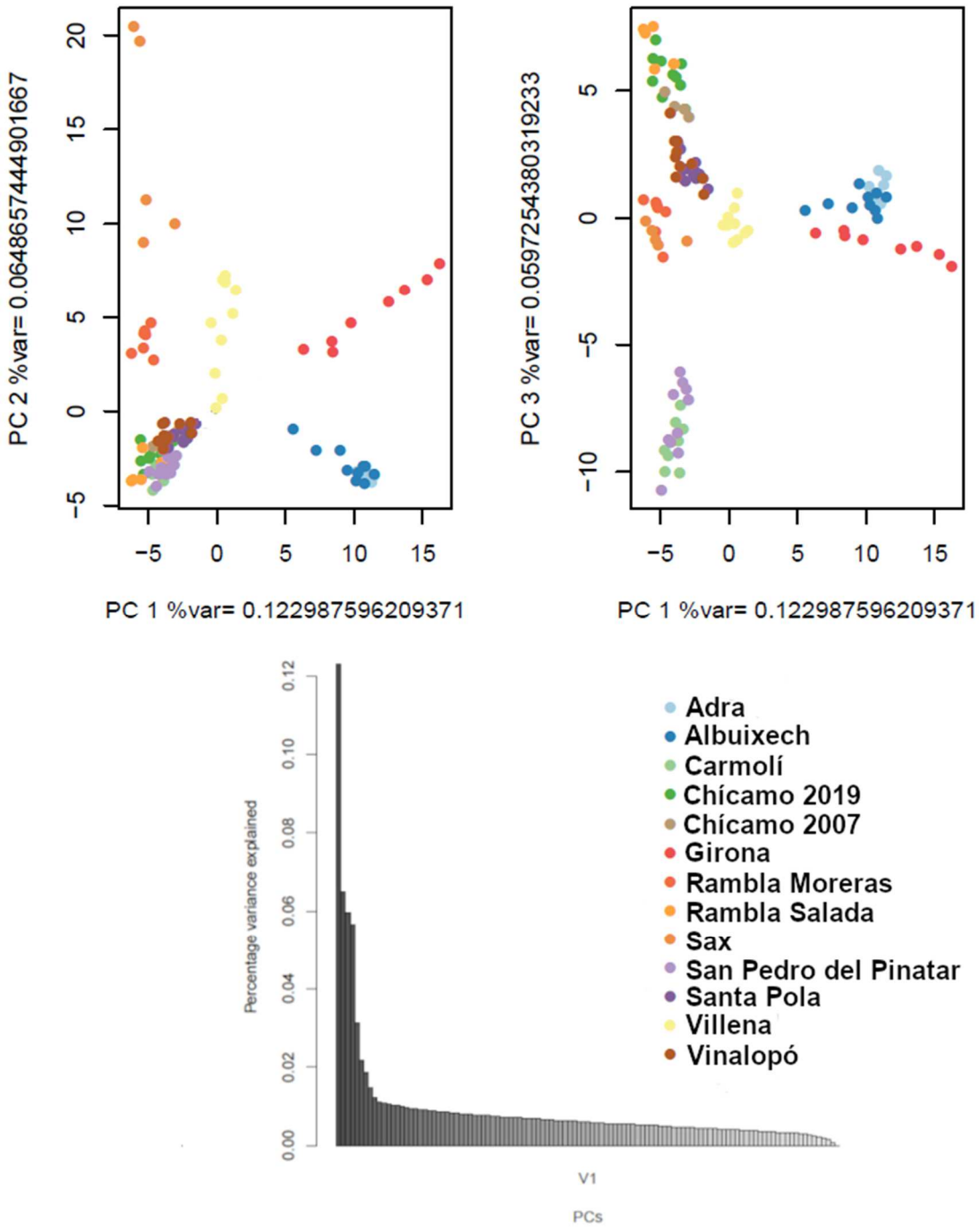


Figura 7. PCA mostrando la estructura genética de las poblaciones de fartet para las comparaciones del PC1 con los PC2 y PC3. En la gráfica de abajo se muestra el porcentaje de varianza genética explicada por cada uno de los eigenvectores. Cada eigenvector corresponde a una lista de SNPs determinada.

Los valores de FST (Tabla 2, Figura 8) fueron en general altos para todas las comparaciones dos a dos de las poblaciones de fartet. Los valores más altos fueron los presentados por la población de los Aiguamolls en las comparaciones enfrentadas con el resto de poblaciones, que variaron en un rango entre 0.661 y 0.827. Los valores de FST para el resto de comparaciones variaron entre 0.061 (San Pedro del Pinatar y Carmolí) y 0.559 (Albuixech y Carmolí). La población de Albuixech presentó en general valores de FST altos en las comparaciones pareadas con el resto de poblaciones, siendo el valor más bajo el de la comparación con la población de Adra (0.335).

Tabla 2. Valores de FST para las comparaciones dos a dos de las poblaciones de fartet

	Adra	Albuixech	Carmolí	Chicamo_2019	Chicamo_2007	Girona	Rambla Moreras	Rambla Salada	Sax	San Pedro	Santa Pola	Villena	Vinalopó
Adra		0.335	0.559	0.467	0.486	0.675	0.459	0.501	0.678	0.530	0.422	0.460	0.445
Albuixech			0.540	0.470	0.492	0.661	0.452	0.484	0.680	0.524	0.422	0.443	0.435
Carmolí				0.414	0.436	0.770	0.347	0.437	0.657	0.061	0.346	0.500	0.372
Chicamo_2019					0.102	0.702	0.224	0.037	0.572	0.386	0.162	0.420	0.201
Chicamo_2007						0.709	0.263	0.134	0.595	0.397	0.178	0.434	0.226
Girona							0.677	0.722	0.827	0.752	0.667	0.674	0.677
Rambla Moreras								0.256	0.393	0.315	0.191	0.324	0.224
Rambla Salada									0.607	0.404	0.185	0.436	0.231
Sax										0.636	0.523	0.400	0.538
San Pedro											0.318	0.472	0.346
Santa Pola												0.367	0.116
Villena													0.381
Vinalopó													

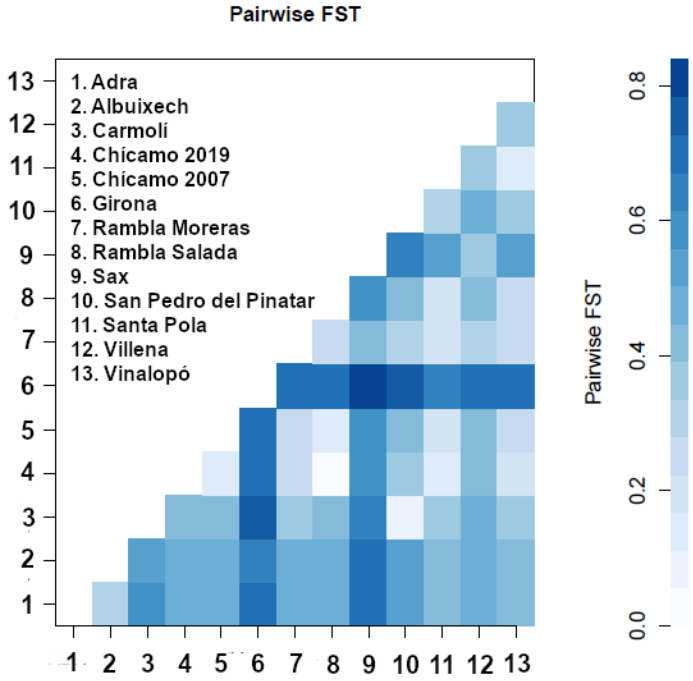


Figura 8. Comparaciones pareadas de FST de las poblaciones de fartet.

Los valores de migración estimados por el programa Migrate-n mostraron valores de Nm (número efectivo de migrantes por generación) menores de 1, denotando una migración histórica muy baja entre las poblaciones de fartet (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de Nm (número efectivo de migrantes por generación) estimadas a partir del programa Migrate-n. Sobre la diagonal se estima la migración desde las poblaciones señaladas como 2 a las poblaciones señaladas como 1. Debajo de la diagonal se estima la migración desde las poblaciones marcadas como 1 a las poblaciones marcadas como 2. En la última columna se representan los valores de Theta (tamaño de población efectivo escalado por la tasa de mutación)

	Adra_2	Chícamo "2007"_2	Rambla salada_2	Sax_2	Vinalopo_2	Albuixech_2	Rambla Moreras_2	San pedro_2	Santa pola_2	Carmolí_2	Chícamo "2019"_2	Aiguamolls_2	Villena_2	Theta
Adra_1	-	0.008	0.027	0.016	0.041	0.093	0.030	0.011	0.026	0.024	0.020	0.022	0.009	0.00163
Chícamo "2007"_1	0.020	-	0.029	0.013	0.042	0.022	0.050	0.017	0.027	0.040	0.021	0.010	0.025	0.00126
Rambla salada_1	0.031	0.014	-	0.022	0.017	0.012	0.098	0.016	0.032	0.037	0.005	0.027	0.024	0.00143
Sax_1	0.035	0.022	0.005	-	0.009	0.039	0.030	0.011	0.033	0.005	0.021	0.013	0.026	0.00129
Vinalopo_1	0.027	0.019	0.024	0.014	-	0.015	0.017	0.020	0.038	0.018	0.013	0.013	0.025	0.00182
Albuixech_1	0.033	0.020	0.030	0.014	0.029	-	0.037	0.021	0.031	0.033	0.028	0.014	0.018	0.00181
Rambla Moreras_1	0.028	0.016	0.013	0.012	0.034	0.021	-	0.021	0.018	0.042	0.038	0.027	0.021	0.00184
San pedro_1	0.025	0.021	0.023	0.012	0.031	0.031	0.009	-	0.033	0.033	0.027	0.022	0.015	0.00156
Santa pola_1	0.017	0.014	0.031	0.016	0.025	0.014	0.018	0.023	-	0.019	0.032	0.001	0.017	0.00191
Carmolí_1	0.024	0.005	0.019	0.018	0.018	0.017	0.019	0.029	0.023	-	0.022	0.022	0.019	0.00180
Chícamo "2019"_1	0.031	0.018	0.002	0.023	0.017	0.017	0.021	0.023	0.022	0.028	-	0.028	0.023	0.00201
Aiguamolls_1	0.031	0.024	0.025	0.009	0.018	0.020	0.037	0.023	0.034	0.019	0.034	-	0.018	0.00149
Villena_1	0.024	0.013	0.025	0.019	0.040	0.025	0.020	0.024	0.045	0.010	0.022	0.026	-	0.00139

Respecto a la diversidad genética de las poblaciones de fartet (Tabla 4), en general se observan valores moderados de diversidad genética y bajos valores de consanguinidad. La población que presentó el menor valor de diversidad genética fue la de los Aiguamolls, mientras que el resto de poblaciones presentan valores similares de diversidad nucleotídica. Las poblaciones que presentan el mayor número de alelos privados son las poblaciones de Aiguamolls (Girona), Albuixech y Adra, sugiriendo la mayor diferenciación genética de estas poblaciones. En las poblaciones de la Región de Murcia fueron las dos poblaciones del Mar Menor las que mostraron valores más bajos de variabilidad genética. Las poblaciones del río Chícamo

mostraron bajos valores de variabilidad genética similares para las dos muestras. Los valores de consanguinidad de Fis no fueron significativos en todas las poblaciones. Sin embargo, la población de Sax cuyo origen está en parte en la población cautiva de Villena mostró un valor negativo indicando un exceso de heterocigotos que puede ser debido a un cuello de botella reciente o por mezcla de los ejemplares naturales y los soltados en el plan de recuperación de la especie, pero esto debe ser objeto de otro estudio.

Tabla 4. Valores de diversidad genética para las poblaciones de fartet. Pi: diversidad nucleotídica; Fis: Coeficiente de consanguineidad.

Población	Diversidad Nucleotídica	Desviación Estándar Pi	Nº sitios polimórficos	Heterocigosidad Observada	Hetererocigosidad Esperada	Fis
Chícamo "2019"	0,15625	0,01008	783	0,32757	0,39539	0,045
Chícamo "2007"	0,15698	0,00369	946	0,31143	0,3409	0,087
Rambla Salada	0,15853	0,00875	776	0,3707	0,40113	0,189
San Pedro	0,11047	0,00259	797	0,27563	0,2976	0,065
Carmolí	0,08228	0,00479	735	0,28492	0,32917	0,141
Rambla Moreras	0,19421	0,00695	1003	0,36551	0,3832	0,047
Sax	0,09494	0,02198	600	0,26452	0,2994	-0,089
Vinalopó	0,15558	0,00395	1050	0,27246	0,31518	0,021
Albuixech	0,13589	0,00387	847	0,34085	0,3583	0,008
Santa Pola	0,18528	0,00489	1127	0,23286	0,31669	0,117
Aiguamolls	0,05651	0,00288	357	0,25658	0,9167	0,226
Villena	0,19836	0,00673	980	0,2892	0,39194	0,057
Adra	0,14108	0,004	755	0,34949	0,37099	0,024

Las diferencias de las frecuencias alélicas entre poblaciones analizadas a través del método bayesiano mostraron la presencia de 52 loci potencialmente sujetos a selección (Figura 9) que deben investigarse para ver cuál es su relación con los caracteres biológicos y adaptativos de la especie.

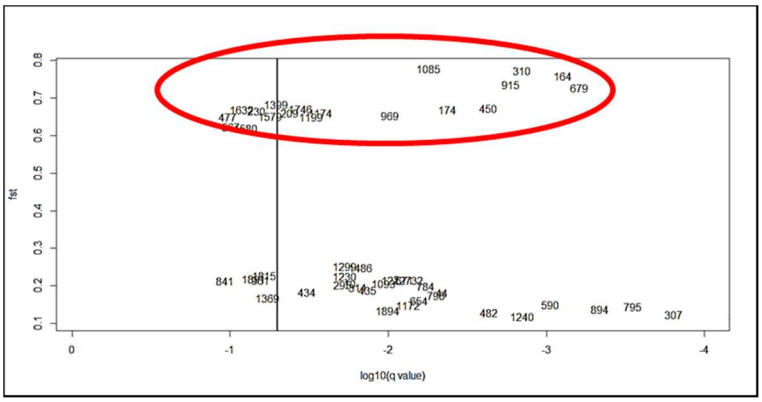


Figura 9. Gráfica representando los loci susceptibles de hallarse bajo selección, rodeados por un círculo rojo.

5.- Discusión

El fartet se distribuye en una región cuyos hábitats han sido profundamente transformados por la agricultura y el urbanismo destinado al turismo, y por esta razón sus poblaciones se encuentran fuertemente amenazadas de extinción. Considerando además la fluctuación climática en el mediterráneo español, que puede dar lugar a sequías extremas o lluvias torrenciales, las poblaciones de fartet son especialmente vulnerables a los cambios del uso del suelo. Aunque también debe tenerse en cuenta la introducción de especies exóticas, como la gambusia, que compiten en algunos de los hábitats más estables, para las especies de agua dulce del litoral mediterráneo, como son los Ullals o manantiales, tal y como ha sido puesto de manifiesto en trabajos previos (Perea y Doadrio, 2015).

En la Región de Murcia, riadas ocurridas en periodos históricos recientes han llevado a la práctica desaparición de aquellas poblaciones con un menor número de efectivos, es el caso del río Chícamo y de la Rambla de las Moreras. Algunas de estas poblaciones, en concreto la existente en la Rambla de las Moreras después de un periodo aparente de extinción ha reaparecido surgiendo la duda sobre su origen natural o introducido. El deterioro del Mar Menor también pone en peligro el flujo genético entre las poblaciones existentes en esta laguna, y es bien conocido el efecto de la fragmentación como aceleradora de los procesos de extinción (Frankham et al., 2002; Schönhuth et al., 2003). Por estas razones la Consejería competente en materia de Medio Ambiente de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia ha encargado este informe con el fin de conocer el origen de las poblaciones de su Comunidad y su estado de conservación.

Aunque sobre el fartet (*Apricaphanius iberus*) han sido realizados numerosos trabajos con marcadores moleculares como alozimas, ADN mitocondrial y microsatélites, hasta el momento no se habían realizado estudios con las modernas técnicas de secuenciación de nueva generación, como el que se ha realizado en este trabajo y que proporciona una mayor y más exacta información sobre las relaciones y origen de las poblaciones del fartet.

5.1. Origen de las poblaciones de fartet de la Región de Murcia

El resultado más relevante de este estudio es que las poblaciones de fartet de la Región de Murcia no son introducidas desde otras poblaciones analizadas, ya que mantienen su identidad genética y no muestran signos de migración desde otras poblaciones. Además, nuestro árbol filogenético mostró unas relaciones que fueron consistentes con la distribución geográfica

actual de las poblaciones lo que soporta también este origen autóctono sin traslocaciones. Sin embargo, nuestro trabajo si fue suficientemente sensible como para detectar estas traslocaciones en otras poblaciones. Así en la población de Adra (Almería) se detectó migración desde la población de Albuixech como representante en nuestro estudio de las poblaciones de la Comunidad de Valencia. Actualmente la población de Albuixech está extinta en la naturaleza, pero se mantiene en cautividad desde que desapareció su hábitat natural. También, aparece migración entre las poblaciones procedentes de cría en cautividad de la provincia de Alicante (Sax y Villena), así como entre las poblaciones de Santa Pola y Vinalopó.

La población de la Rambla de las Moreras situada al sur de la Región de Murcia muestra ciertas características genéticas compartidas con la población interior de Sax/Villena, sin embargo, esta introgresión es muy pequeña y con gran probabilidad debida a fenómenos antiguos de contacto entre ambas poblaciones y retención de polimorfismo ancestral, no a una introducción actual de ejemplares de Sax/Villena. De hecho, el análisis realizado con MIGRATE ($Nm < 1$) no detectó migración entre ambas poblaciones. Además, en los individuos analizados de la Rambla de las Moreras existen genotipos que no se encuentran en las otras poblaciones estudiadas indicando su origen autóctono. Por otra parte, los ejemplares recolectados previamente a su desaparición en el curso de la rambla, ya presentaban esas características genéticas de Sax/Villena y así fue señalado en el estudio realizado con microsatélites (González et al., 2018). La población de la Rambla de las Moreras, de confirmarse el origen introducido del fartet en Adra, sería la población más meridional de la especie y guarda un especial interés para la conservación de la variación genética y geográfica del fartet. Este origen introducido de la población de Adra viene soportado por nuestros datos genéticos, pero debido a las consecuencias desde el punto de vista de la gestión que puede tener esta conclusión creemos necesario analizar más poblaciones situadas en el levante español entre Albuixec y los Aiguamolls como son las poblaciones del Delta del Ebro, Peñíscola, Cabanes, etc. que no fueron objeto de este estudio.

En el caso de las muestras del río Chícamo y Rambla Salada, ambas pueden considerarse como pertenecientes a la misma población y esta no muestra ningún signo de migración o introducción de individuos foráneos. En este caso no se encontró con los SNPs señales de cierta introgresión de Sax/Villena como ocurre en la Rambla de las Moreras, aunque sí fue detectado en el estudio realizado con microsatélites (González et al., 2018).

5.2. Estructura poblacional y unidades de conservación.

El hábitat tan fragmentado de las poblaciones de *Apricaphanius iberus* a consecuencia de actividades antrópicas (Oliva-Paterna et al., 2006) ha facilitado la interrupción del flujo génico

favoreciendo el mantenimiento de su estructura genética para la mayoría de las poblaciones. El mantenimiento de la estructura y diversidad genética es uno de los principales objetivos de los planes de conservación de especies amenazadas. Por tanto, el conocimiento de estos parámetros genéticos en las poblaciones de fartet es indispensable para futuros planes y medidas de conservación de la especie.

A diferencia con trabajos previos nuestro estudio ha puesto en evidencia una estructura poblacional con dos grandes unidades evolutivas en las poblaciones del fartet, una septentrional y una meridional, separadas por el accidente geográfico del cabo de la Nao. Al sur de este cabo se distribuyen las poblaciones de la Región de Murcia pero también la mayoría de las poblaciones de la provincia de Alicante, incluyendo las de las aguas interiores (Villena y Sax). Aunque los estudios con ADN mitocondrial mostraron una mayor diferenciación de las poblaciones de Villena y Sax (Perdices et al., 2001) los estudios realizados con ADN nuclear tanto con microsatélites (González et al., 2018) como con SNPs (este informe) muestran una diferenciación muy acusada de las poblaciones interiores pero dentro de la gran unidad evolutiva de las poblaciones meridionales de la Región de Murcia y Alicante.

Esto puede explicarse como un aislamiento antiguo de la laguna de Villena pero con posterior flujo genético con las poblaciones litorales, ya sea por procesos históricos naturales o por las obras de desecación de la laguna de Villena y la construcción de la acequia del Rey que comunica con el río Vinalopó.

Nosotros encontramos en las poblaciones de la Región de Murcia estudiadas tres Unidades de Conservación: Rambla Moreras; Mar Menor y Chícamo-Rambla Salada (Figura 10).

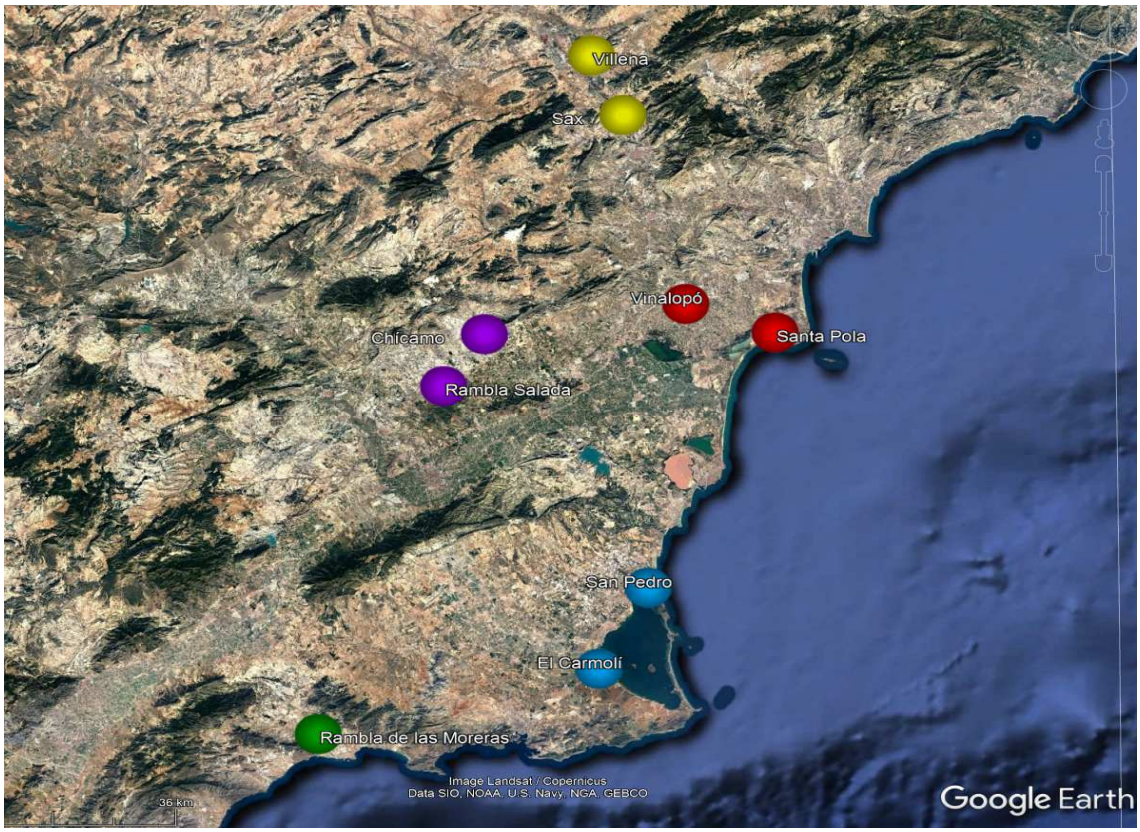


Figura 10. Unidades de Conservación encontradas con SNPs para la Región de Murcia y para la provincia de Alicante. En violeta Chícamo/Rambla Salada, en verde Rambla de las Moreras, en azul Mar Menor, en amarillo Villena/Sax y en rojo Vinalopó-Santa Pola.

Estas Unidades de Conservación difieren ligeramente de las encontradas previamente por nosotros con marcadores microsatélites. Así las dos poblaciones estudiadas del Mar Menor (Carmolí y San Pedro) que fueron encontradas para pertenecer a dos grupos diferentes en nuestro trabajo previo con microsatélites (González et al., 2018) no fueron recuperadas con SNPs y pertenecieron al mismo grupo genético. Pero hay que advertir que en el estudio precedente (González et al., 2018) se analizó la mayoría de las poblaciones del Mar Menor y ello puede tener alguna incidencia en nuestra falta de diferenciación entre las dos poblaciones del Mar Menor. Sin embargo, la Rambla de las Moreras apareció bien diferenciada de Chícamo-Rambla Salada y deben ser consideradas como dos unidades de conservación diferentes. Esta última unidad de conservación (Chícamo-Rambla Salada) también mostró en el estudio realizado con microsatélites una cierta introgresión de Villena/Sax, como ocurre con la Rambla de las Moreras, algo que este estudio con SNPs no ha encontrado.

Respecto al resto de poblaciones analizadas en este estudio fuera de la Región de Murcia, los SNPs permiten identificar como Unidades de Conservación diferenciadas las poblaciones de

Alicante de Villena-Sax y las poblaciones de Vinalopó-Santa Pola (Figura 10). Por otro lado, las poblaciones de Aiguamolls y Albuixec deberían ser considerados como Unidades de Conservación independientes, así como la población de Adra hasta que sean analizadas las otras poblaciones de levante (Figura 11).

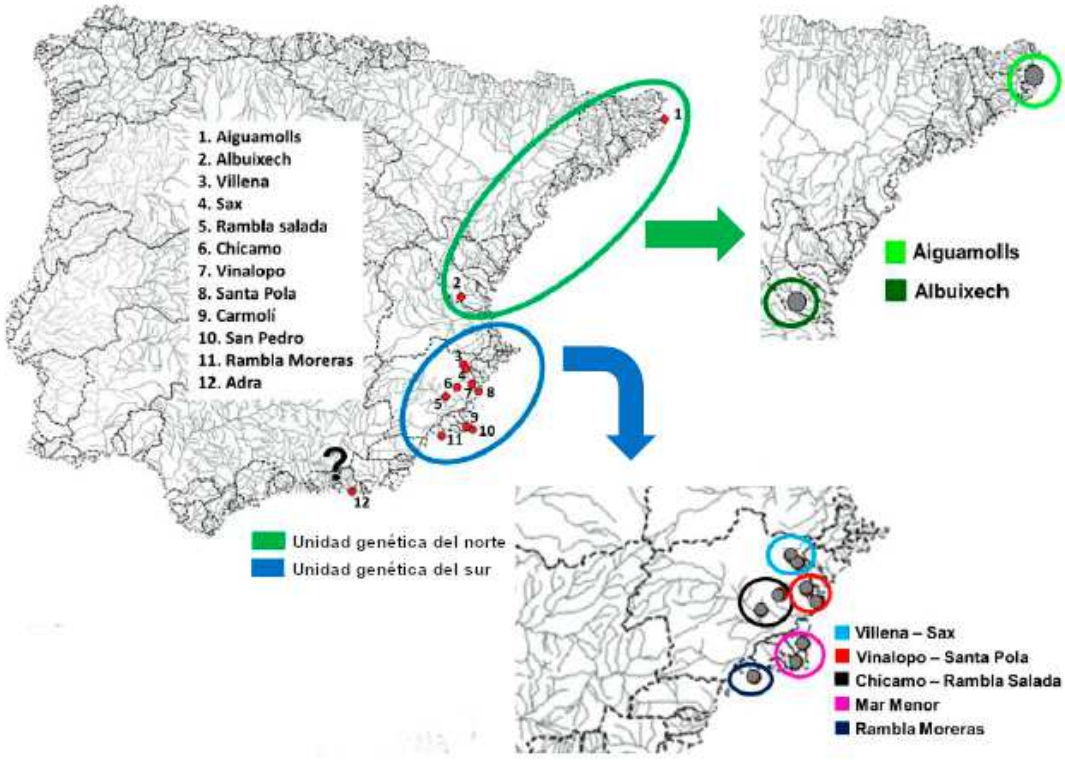


Figura 11. Resumen de las Unidades de Conservación identificadas para el fartet en base al análisis de SNPs.

5.3. Diversidad Genética.

Trabajos previos muestran bajos valores de diversidad genética en las poblaciones de la Región de Murcia de fartet, especialmente las poblaciones del Mar Menor, respecto al resto de poblaciones (González *et al*., 2018). Los resultados presentados aquí respecto a la diversidad genética son similares, muestran una diversidad nucleotídica semejante para todas las poblaciones, pero con valores más bajos para las poblaciones del Mar Menor así como la población reintroducida en Sax (Alicante) y, especialmente baja en los Aiguamolls (Gerona).

La menor variabilidad genética encontrada en las poblaciones del Mar Menor ha sido explicada como consecuencia de vivir en zonas de alto estrés debido a las elevadas condiciones de salinidad y temperatura en que viven (Doadrio et al., 1996).

Efectivamente estas condiciones climáticas pueden tener una repercusión muy importante en las poblaciones, especialmente esas que viven en explotaciones salineras o en ambientes muy fluctuantes donde puede haber alta mortalidad pudiendo producirse fenómenos de cuello de botella que favorecen a la larga una reducción de la diversidad genética y la fijación de determinados alelos. Esto puede explicar la pérdida de variabilidad genética hallada en las poblaciones del Mar Menor. Esta reducción de variabilidad genética muchas veces puede llevar asociado un aumento de la endogamia, sin embargo, este no parece ser el caso de las poblaciones del fartet de acuerdo a nuestros datos. Esta especie tiene unos ciclos de vida muy cortos, y por tanto con un rápido cambio en sus generaciones, por lo que puede verse afectada en menor medida por procesos de endogamia que especies con tiempos generacionales más largos. La recuperación de las condiciones naturales del Mar Menor es esencial para que las poblaciones de fartet puedan recolonizar áreas donde ha desaparecido y aumentar la variabilidad genética de las poblaciones a través de la dispersión de individuos incrementando así el flujo genético.

No encontramos una pérdida de variabilidad genética significativa entre las dos poblaciones del río Chícamo estudiadas 2007 y 2019. Sólo a través del Structure se pudo ver una ligera pérdida de variabilidad en la población de 2019.

Por otro lado, la pérdida de variabilidad puede estar asociada a la presencia de adaptaciones locales en las poblaciones de fartet. Es bien conocido que la variación adaptativa es importante, y aunque se han detectado 52 loci potencialmente bajo selección en las poblaciones de fartet se necesitan futuros estudios más específicos para comprender estos fenómenos de adaptación. El número de loci potencialmente sujetos a selección es relativamente alto en comparación a los hallados con el mismo tipo de análisis para otras especies. Sin embargo, el fartet es una especie con una extraordinaria capacidad de vivir en ambientes muy variables, tanto de temperatura como de salinidad (Oliva-Paterna y Torralva, 2008), por lo que su capacidad de adaptación a condiciones ambientales muy diferentes debe ser explorada.

Debe tenerse en cuenta que algunos de estos loci pueden estar ligados a adaptaciones a diversas condiciones ambientales como salinidad y temperatura.

En cautividad algunas poblaciones pueden tener una variabilidad genética elevada, tanto como la población fuente, pero puede haber pérdida alelos que les den ventajas adaptativas frente a determinados cambios ambientales, debido a una selección más relajada. Por esto, es muy importante la investigación futura sobre esos caracteres adaptativos, y en ausencia de estos estudios no mantener las poblaciones mucho tiempo en cautividad. El éxito de las

reintroducciones tiene una relación muy estrecha con la presencia de estos caracteres adaptativos. En el fartet el alto número de genes candidatos es una razón más para su estudio.

6.- Conclusiones y recomendaciones sobre la gestión.

De acuerdo a los resultados del presente estudio todas las poblaciones de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia deben ser consideradas autóctonas y se recomienda que continúen los programas de restauración de sus hábitats y los programas de cría en cautividad.

Estos programas de conservación deben tener en cuenta las tres Unidades de Conservación y gestión que se señalan en este informe.

En la Unidad de Conservación Chícamo/Rambla Salada debe continuar la cría en cautividad, una vez restaurado su hábitat y con esfuerzos realizados para disminuir las especies alóctonas de este río se deben hacer programas de reintroducción, no manteniendo la misma población durante mucho tiempo en cautividad para prevenir efectos negativos de una selección relajada.

La existencia de una población en la Rambla Salada puede favorecer la recuperación de la especie y si se viera una baja variabilidad genética en las poblaciones cautivas del Chícamo y/o la pérdida de alelos relacionados con la adaptación a ciertos ambientes, se podría recurrir a ella para disminuir la pérdida de alelos introduciendo ejemplares en las poblaciones cautivas.

En ausencia de estudios sobre los loci adaptativos encontrados, no parece que sea necesario por el momento recurrir a la población de Rambla Salada.

En la Unidad de Conservación Rambla de las Moreras debe también hacerse algún programa de conservación y cría en cautividad para proteger sus singularidades genéticas en una población única que probablemente es la más meridional de las poblaciones autóctonas del fartet.

En el caso de la Unidad del Mar Menor, la conservación de las poblaciones pasa por la restauración del Mar Menor y que pueda existir flujo entre las poblaciones. De no ser así habría que valorar la posibilidad de realizar ese flujo entre poblaciones de manera artificial teniendo en cuenta el trabajo de microsatélites previo. Pero previamente habría que hacer un estudio de viabilidad e impacto teniendo en cuenta el estudio de los genes adaptativos candidatos encontrados en este informe.

7.-Agradecimientos

Este informe fue financiado por la Dirección General de Medio Ambiente y Mar Menor de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Queremos agradecer a Emilio Aledo Olivares y a Ester Cerezo Valverde todas las facilidades y esfuerzos para la realización de este informe. Juan Jiménez y Pilar Risueño proporcionaron el material de la Comunidad Valenciana. LLuís Benajam y Emili García-Berthou nos proporcionaron el material e los Aiguamolls. Juan Carlos Nevado Ariza nos envió las muestras de Adra. Queremos también agradecer a nuestros compañeros de laboratorio Andrea Corral Lou y Lourdes Alcaraz su ayuda en el procesado de las muestras.

8.- Referencias

-Alcaraz C, Bissaza A, García-Berthou E. 2008. Salinity mediates the competitive interactions between invasive mosquitofish and an endangered fish. *Oecologia*, 155: 205-213.

-Alcaraz C, Pou-Rovira Q, García-Berthou E. 2007. Use of a flooded salt marsh habitat by an endangered cyprinodontid fish (.*Aphanius iberus*). *Hydrobiologia*, 600: 177-185.

-Araguas RM, Roldán MI, García-Marín JL, Pla C. 2007. Management of gene diversity in the endemic killifish Aphanius iberus: revising Operational Conservation Units. *Ecology of Freshwater Fish*, 16(2): 257-266.

-Beerli P. 2009. How to use MIGRATE or why are Markov chain Montecarlo programs difficult to use? In: *Population Genetics for Animal Conservation* (eds Bertorelle G, Bruford MW, Hauffe HC, Rizzoli A, Vernesi C), pp. 42–76. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

-Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics, btu170.

-Caiola N, De Sostoa A. 2005. Possible reasons for the decline of two native toothcarps in the Iberian Peninsula: evidence of competition with the introduced Eastern mosquitofish. *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 358-363.

-Casas JJ, Sánchez-Oliver JS, Sanz A, Furné M, Trenzado C, JM, Paracuellos M, Suárez MD, Fuentes F, Gallego I et al. 2011. The paradox of the conservation of an endangered fish species in a Mediterranean region under agricultural intensification. *Biological Conservation*, 144: 253-262.

-Catchen J, Hohenlohe PA, Bassham S, Amores A, Cresko WA. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11): 3124-3140.

- CARM 2019. Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente. Dirección General de Medio Natural. Región de Murcia. Seguimiento Biológico de fartet (Aphanius iberus) en la Región de Murcia 2017-2018. www.murcianatural.carm.es

-Doadrio I, Perdices A, Machordom A. 1996. Allozymic variation of the endangered killifish Aphanius iberus and its application to conservation. *Environmental Biology of Fishes*, 45: 259-271.

-Doadrio I, Perea S, Garzón-Heydt, P, González JL. 2011. Ictiofauna Continental Española. Bases para su seguimiento. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.

- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, *32*(19), 3047-3048.

-Fernández-Pedrosa V, González A., Planelles M, Moya A. 1995. Mitochondrial DNA variability in three Mediterranean populations of *Aphanius iberus*. *Biological Conservation*, 72: 251-256.

-Foll M, Gaggiotti OE. 2008. A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics*, 180: 977-993.

-Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.

-Freyhof, J, Yoğurtçuoğlu, B. 2020. A proposal for a new generic structure of the killifish family Aphaniidae, with the description of *Aphaniops teimorii* (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Zootaxa* 4810 (3): 421-451.

-García-Berthou E, Fernández-Delgado C, Pou Q, Boix D, Moreno-Amich R. 1999. Edad y crecimiento del fartet, *Lebias ibera* Valenciennes, 1846: comparación entre las poblaciones del Ampurdán (Cataluña) y del río Guadalquivir (Andalucía). En: Planelles M (ed.). *Peces Ciprinodóntidos Ibéricos: Fartet y Samaruc*. Monografía. Generalitat Valenciana. Valencia. España. pp: 235-251.

-García-Berthou E, Moreno-Amich R. 1992. Age and growth of an Iberian cyprinodont, *Aphanius iberus* (Cuv. & Val.), in its most northerly population. *Journal of Fish Biology*, 40(6): 929-937.

-García-Marín JL, Pla-Zanuy C. 1999. Conservación de la diversidad genética en el fartet, *L. ibera*. En: Planelles M (ed.). *Peces Ciprinodóntidos Ibéricos: Fartet y Samaruc*. Monografía. Generalitat Valenciana. Valencia. España. pp: 169-187.

-González EG, Cunha C, Ghanavi H, Oliva-Paterna FJ, Torralva M, Doadrio, I. 2018. Phylogeography and population genetic analyses in the Iberian toothcarp (*Aphanius Iberus* Valenciennes, 1846) at different time scales. *Journal of Heredity*, 109(3): 253-263.

-Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindbland-Toh K, Friedman N, Regev A. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat, Biotechnolo. 29 (7): 644-652.

-Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meinties P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an

integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649.

-Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5): 1179-1191.

-Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, 17(1), pp 10-12.

-Moreno-Amich R, Planelles M, Fernández-Delgado C, García-Berthou E. 1999. Distribución geográfica de los ciprinodontiformes en la Península Ibérica. En: Planelles M (ed.). *Peces Ciprinodóntidos Ibéricos: Fartet y Samaruc.* Monografía. Generalitat Valenciana. Valencia. España. pp: 33-57.

-Oliva-Paterna FJ, Andreu A, Miñano PA, García-Rodríguez J, Torralva M. 2002. Unidades de Conservación del fartet, *Aphanius iberus*, en la Región de Murcia: Amenazas y aplicación regional de las categorías IUCN. *Dugastella*, 3: 29-35.

-Oliva-Paterna FJ, Torralva M. 2008. *El fartet en la región de Murcia: biología y conservación*. Comunidad Autónoma de Murcia.

-Oliva-Paterna FJ, Torralva M, Fernández-Delgado C. 2006. Threatened Fishes of the World: *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) (Cyprinodontidae). *Environmental Biology of Fishes*, 75: 307-309.

-Perdices A, Carmona JA, Fernández-Delgado C, Doadrio I. 2001. Nuclear and mitochondrial data reveal high genetic divergence among Atlantic and Mediterranean populations of the Iberian killifish Aphanius iberus (Teleostei: Cyprinodontidae). *Heredity*, 87: 314-324.

-Perea S, Doadrio, I. 2015. Phylogeography, historical demography and habitat suitability modelling of freshwater fishes inhabiting seasonally fluctuating Mediterranean river systems: a case study using the Iberian cyprinid *Squalius valentinus*. *Molecular Ecology* 24(14):3706-3722.

-Pérez-Ruzafa A, Fernández AI, Marcos C, Gilabert J, Quispe JI, García-Charton JA. 2005. Spatial and temporal variations of hydrological conditions, nutrients and chlorophyll in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, Spain). *Hydrobiologia*, 550: 11-27.

-Pritchard JK, Stephens M, Donelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.

-Torralva M, Oliva-Paterna FJ. 2002. Problemática de los Ciprinodóntidos en el Sureste Peninsular: Criterios y Estrategia de Recuperación. En: Doadrio I (ed.). *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. CSIC y Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. pp: 313-320.

-Rey-Iglesia A, Gopalakrishan S, Carøe C, Alquezar-Planas D-E, Nielsen AA., Röder T, Pedersen LB, Næsborg-Nielsen C, Sinding, M-H S, Rath MF, Li Z, Petersen B, Gilbert TM, Bunce M, Mourier T, Hansen AJ. 2019. MobiSeq: De Novo SNP Discovery in model and non-model species through sequencing the flanking region of transposable elements. *Molecular Ecology Resources*, 19(2): 512-525.

-Rubio-García F, García-Berthou E, Latorre D, Moreno-Amich E, Srean P, Luo Y, Vila-Gispert A. 2020. Differences in swimming performance and energetic costs between an endangered native toothcarp (*Aphanius iberus*) and an invasive mosquitofish (*Gambusia holbrookii*). *Ecology of Freshwater Fish*, 29(2): 230-240.

- Schönhuth S, Luikart G, Doadrio I (2003) Effects of a founder event and supplementary introductions on genetic variation in a captive breeding population of the endangered Spanish killifish. *Journal of Fish Biology* 63:1538–1551

-Stamatakis A. 2006. RaxML-VI-HPC. Maximum likelihood based phylogenetic analysis with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21): 2688-2690.

-Stamatakis A, Blagojevic F, Nikolopoulos D, Antonopoulos C. 2007. Exploring new search algorithm and hardware for phylogenetics: RaxML Meets the IBM Cell. *The Journal of VLSI Signal Processing*, 48: 271-286.

-Wingett SW, Andrews S. FastQC Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res.7*