

# Memoria del Trabajo de Fin de Grao

**Elaboración do proxecto: estrutura poboacional do *Gobio lozanoi* (Doadrio & Madeira, 2004) no baixo Miño mediante análise de microsatélites e DNA mitocondriais**

**Elaboración del proyecto: estructura poboacional de *Gobio lozanoi* (Doadrio & Madeira, 2004) en el bajo Miño mediante el análisis de microsatélites y DNA mitocondriales.**

**Grant development: population structure of the *Gobio lozanoi* (Doadrio & Madeira, 2004) in the lower Miño by microsatellites and mitochondrial DNA analysis.**



# AARÓN VILAMEÁ PÉREZ

Septiembre, 2017

*Tutor Académico: Andrés Martínez Lage*

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Asn', written over a horizontal line.

Asn: Andrés Martínez Lage



## ÍNDICE

RESUMEN/RESUMO (CASTELLANO/GALEGO)

SUMMARY (ENGLISH)

Palabras clave: Alóctona, *Gobio lozanoi*, microsatélites, DNA mitocondrial, baixo Miño, ecosistema.

1. Propuesta científica.....	1-11.
1.1 Antecedentes y estado actual del tema .....	1-5.
1.2 Hipótesis de partida y objetivos generales.....	5.
1.3 Objetivos específicos.....	5.
1.4 Metodología.....	6-10.
1.5 Descripción de los medios materiales, infraestructuras y equipamientos especiales para abordar la metodología propuesta.....	10-11.
1.6 Cronograma sobre las fases e hitos previstos en relación a nuestros objetivos.....	11.
1.7 Estimación presupuestaria de la ayuda solicitada.....	11.
2. Impacto esperado de los resultados:	
2.1 Descripción del impacto que se espera de los resultados del proyecto.....	12.
2.2 Plan de difusión de los resultados .....	12-13.
3. Implicaciones éticas y de bioseguridad.....	13-14.
4. Conclusiones que se quieren alcanzar / Conclusions a acadar / Conclusions to be achieved.....	14-15.
5. Bibliografía.....	15-17.



## RESUMEN.

La introducción de especies alóctonas puede causar un impacto considerable tanto en los ecosistemas, produciendo entre otros pérdidas de biodiversidad y variaciones en las estructuras de las comunidades. Además de los daños económicos resultado de dicha introducción.

Debido a la abundancia estudiaremos el pez de agua dulce *Gobio lozanoi* un endemismo de la península ibérica que tiene carácter de introducido en la cuenca hidrográfica del bajo Miño.

Mediante el análisis de microsatélites y de DNA mitocondrialse averiguará el origen de las comunidades presentes en la cuenca mencionada para poder así cortar las vías de entrada de la especie.

Palabras clave: Alóctona, *Gobio lozanoi*, microsatélites, DNA mitocondrial, bajo Miño, ecosistema.

## RESUMO.

A introducción de especies alóctonas pode causar un impacto considerabel nos ecosistemas, producindo entre outras perdas na biodiversidade e variacións nas estruturas das comunidades. Ademáis dos danos económicos resultado de dita introducción.

Por mor da súa abundancia imos estudar o peixe de auga doce *Gobio lozanoi* un endemismo da península ibérica que ten caracter de introducido na conca hidrográfica do baixo Miño.

A través da análise de microsatélites e do DNA mitocondrial averiguarase a orixe das comunidades presentes na zona mencionada para así poder cortar as vías de entrada da especie.

Palabras chave: Alóctona, *Gobio lozanoi*, microsátelites, DNA mitocondrial, baixo Miño, ecosistema.

## SUMMARY.

The introduction of alien species can have a significant impact on ecosystems mostly resulting in loss of biodiversity and variations in community structures. Otherwise the economic damages resulting from such introduction can be problematic.

Due to the abundance we will study the freshwater fish *Gobio lozanoi* an endemism of the Iberian peninsula that has character of introduced in the watershed of the lowest Miño.

Through the analysis of microsatellites and mitochondrial DNA, the origin of the communities present in the basin will be investigated in order to cut off the entrance ways of them.

Key words: Alienspecies, *Gobio lozanoi*, microsatellites, mitochondrial DNA, lowest Miño, ecosystem.



## PROPUESTA CIENTIFICA.

### 1. Antecedentes y estado actual del tema.

La introducción de especies alóctonas puede constituir una amenaza para la biodiversidad nativa de las zonas de acogida así como para las comunidades y ecosistemas, además puede suponer un problema a nivel económico generando perdidas en este sentido. Es más, la introducción de especies está entre los 5 determinantes más importantes que provocan perdidas en la biodiversidad junto con el cambio en el uso de la tierra, la lluvia ácida, la concentración de dióxido carbono atmosférico y la formación de depósitos de nitrógeno (Sala, et al., 2000). Los ecosistemas de agua dulce pueden verse afectados especialmente por este problema.

Este problema se remonta muy atrás en el tiempo. Puede producirse de manera intencionada (Figura 1), como el caso de las que han sido introducidas con fines deportivos, para el consumo o como herramientas ornamentales y en otros casos podremos hablar de introducción accidental como las especies que llegan en las aguas de lastre de barcos (Rivas-Rodríguez, et al., 2010).

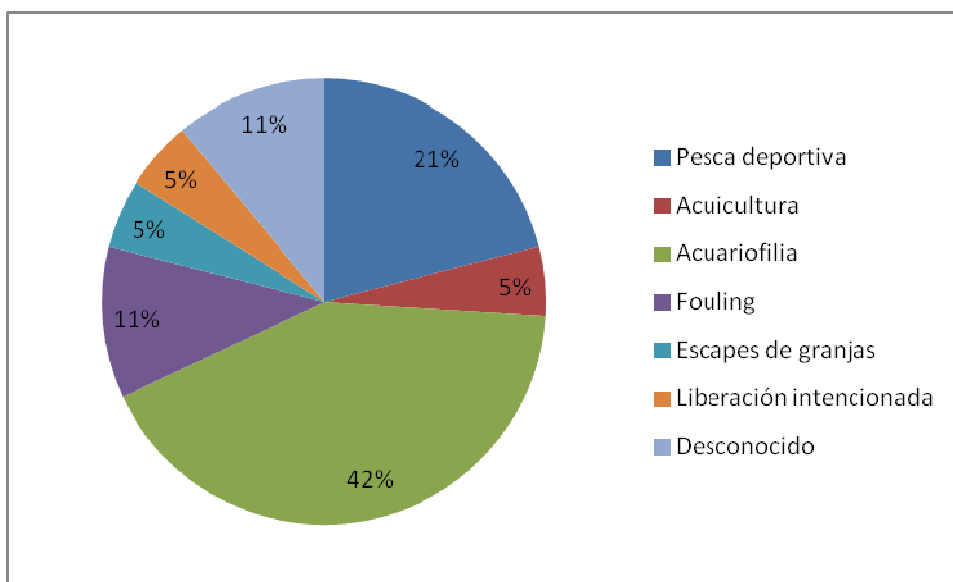


Figura1. Porcentaje de especies introducidas en el Bajo Miño según sus posibles vectores de introducción (según Rivas-Rodríguez et al., 2010).

En el caso de Galicia se reconocen 33 especies introducidas de agua dulce, cifra que es inferior a la cosechada para los mismos ecosistemas en el resto de la Península Ibérica donde se han registrado 81 especies (Cobo et al., 2010). Destaca en Galicia la zona del

bajo Miño que es una de las principales vías de entrada de especies exóticas en nuestra comunidad (Rivas et al., 2010).

El pez de agua dulce *Gobio lozanoi* (Doadrio&Madeira, 2004) de la familia Cyprinidae que anteriormente fue descrita como *Gobio Gobio* (Linnaeus, 1758) es una especie que tiene carácter de introducida en las cuencas de los ríos de la zona del bajo Miño por haber sido translocada de otras cuencas hidrográficas de la Península Ibérica. Las poblaciones Ibéricas de este Cyprinido eran consideradas hasta el trabajo de Doadrio & Madeira como comunidades de *Gobio Gobio*, ejemplares de la misma familia que tienen un amplio rango de distribución en las aguas continentales europeas. La primera cita de la especie en España se dio en la cuenca del río Duero por el ictiólogo y naturista español Lozano-rey que lo describió en su libro de 1919, "*Los peces de la fauna ibérica en la colección del museo en 1 de enero de 1919*".

La distinción entre ambas especies se realizó en base a caracteres morfológicos y genéticos, se diferencia morfológicamente de las demás especies de *G. Gobio* por las siguientes características: 36-39 escamas en la línea lateral, 3 escamas debajo de esa línea lateral, la distancia entre la aleta pectoral y ventral es mayor que la distancia entre esta última aleta y la aleta anal, la cabeza es más ancha y más corta que en *G. gobio*, la distancia preorbital es más corta; genéticamente la divergencia para el citocromo b entre *G. gobio* y *G. lozanoi* es de "p"=4.8-5.9% (Doadrio & Madeira, 2004).

En cuanto a la etimología, el primer nombre propuesto en inglés fue *Iberian gudgeon*. Posteriormente, y reconociéndolo como endémico de las cuencas de los ríos Ebro y Bidasoa en la península ibérica y del Adour en Francia, se postulo *Pyrenean gudgeon* como nombre estándar ya que muchos endemismos de nuestro país no poseen nombres estandarizados en inglés (Leunda et al., 2009).

En cuanto a su distribución nadie concreta exactamente cuál es su área de distribución original porque resulta complicado ser categórico en este apartado (Doadrio et al., 2011). Un artículo reciente acepta lo que este mismo autor definió como su hábitat natural peninsular, las cuencas del río Ebro y Bidasoa siendo una especie introducida en el resto de las cuencas hidrográficas de la península en las que se ha observado su presencia (Doadrio, 2002). También es considerado natural en la cuenca del Adour en Francia. Las dudas establecidas sobre las cuencas en las que es natural son razonables debido a su alta capacidad de adaptación y colonización de nuevos hábitats (Doadrio et al., 2011).

La distribución de esta especie en la península Ibérica es bastante amplia, en cuanto a espacio que ocupa (Figura 2.). Concretamente se puede encontrar en las cuencas de los ríos: Bidasoa, Oria, Támega, Mondego, Duero, Ebro, Tajo, Guadiana, Guadalquivir, Guadalete, Mijares, Segura, Júcar y Turia (Amat-trigo, 2015). En Galicia podemos encontrarlo en la cuenca hidrográfica del bajo Miño. Además *G. lozanoi* se incluye en la

lista de especies exóticas por ser una especie translocada de otras cuencas de la Península Ibérica, por lo tanto forma parte de la lista de 19 especies exóticas presentes en el bajo Miño (Rivas et al., 2010). En la figura 2 se especifican los posibles vectores de introducción de las especies exóticas de esta zona con sus porcentajes (Rivas-Rodríguez et al 2010). Su presencia en Galicia esta constada en los siguientes afluentes del Miño: río Furnia, río Deva, río Louro, río Hospital, río Pego, río Tea, río Tripes (Servia et al., 2010) y río Tamega (Comesaña & Ayres, 2009).



Figura 2. Mapa de distribución de *Gobio lozanoi* en la península ibérica (según wikipedia)

Los microsatélites, también llamados secuencias simples repetidas, son secuencias de DNA con un tamaño que varía entre los 2-10 pb aunque más frecuentemente en torno a los 2-6 pb que se repiten n veces en tándem, a ambos lados del motivo repetido se encuentran dos regiones flanqueantes. Estos marcadores son muy utilizados en estudios de conservación de Biodiversidad debido a su elevada tasa de polimorfismo y a la capacidad para trabajar con pequeñas cantidades (González, 2003) y (Becerra & Paredes, 2000). Estas características unidas a su co-dominancia permiten usarlos en estudios de diversidad genética entre poblaciones (Suarez-Delgado et al., 2016). Mediante este tipo de marcadores es posible medir la diversidad entre genotipos amplificando por PCR la región de DNA genómico que contenga las secuencias microsatélite o SSR (por las siglas en inglés simple sequence repeat), (Becerra

&Paredes, 2000). Estas secuencias están compuestas por DNA no codificante, no forman parte de ningún gen. Su función no está del todo definida, eso si la hipótesis más aceptada es que deben estar relacionados con el empaquetamiento y condensación del DNA en los cromosomas (Aranguren-Méndez et al., 2005), también se ha propuesto estas secuencias que se encuentran en regiones del extremo 5' no transcritas tienen una función reguladora y actúan como regiones de unión para factores de transcripción, también se ha propuesto que son hot spots (regiones con frecuencias de recombinación elevadas). Hay evidencias constatables de que estas secuencias se pueden encontrar aguas arriba de la región del promotor y que pueden regular la expresión génica en eucariotas (Oliveira et al., 2006). En la tabla 1 mostramos la clasificación que se puede hacer de las SSR.

El estudio de Suarez-Delgado et al. (2016), sienta un precedente muy interesante para nuestro proyecto ya que utiliza este tipo de marcadores para averiguar el origen genético de poblaciones de bagre de canal, introducidas en el centro occidental de México.

El DNA mitocondrial es, como su propio nombre indica, el material genético que se encuentra en las mitocondrias. Este material genético tiene la característica especial de que se reproduce a si mismo semi-autónomamente durante la división de la célula. Este material ha sido ampliamente utilizado como marcador molecular en gran medida por su condición haploide, herencia matrilineal, altas tasas de evolución y por la presencia en él de regiones conservadas y variables que facilitan la tipificación de los individuos objeto de estudio (Giraldo et al., 2010).

Tabla 1. Clasificación de los microsatélites (elaboración propia).

Tipo	Características
Puro	Solo un motivo que se repite n veces. Ej: CACACACACACACA o CA(7).
Puro interrumpido	Un motivo que se repite n veces pero que presenta uno o varios nucleótidos intercalados. Ej: CACACA adenina CACACACA o CA(3) adenina CA(4).
Compuestos	Más de un motivos que están repetidos n veces. Ej: CACACACAACACAC o CA (4) AC(3).
Compuestos interrumpidos	Más de un motivo repetidos n veces y al menos uno de ellos presenta uno o varios nucleótidos intercalados. Ej: CACACACA adenina CACAACACACAC o CA(4) adenina CA(2) AC(4).
Complejos	Combinaciones entre las clases anteriores, cualquier combinación de cualquiera de las clases sin patrón o orden definido.

## 2. Hipótesis de partida y objetivos generales.

La hipótesis de partida es que el pez objeto de estudio pertenece a una especie que tiene carácter de introducida en las cuencas hidrográficas del bajo Miño, debido a su translocación desde otras cuencas de la Península Ibérica.

El objetivo principal del estudio propuesto es averiguar el origen y analizar las relaciones genéticas de las poblaciones de *G. lozanoi* en los afluentes del margen gallego del bajo Miño.

## 3. Objetivos específicos.

Se deberá resolver una serie de objetivos de carácter más específico con el fin de poder alcanzar el objetivo principal del proyecto propuesto:

- Realización del muestreo de ejemplares de *G. lozanoi* en las cuencas de los ríos en los que su presencia ha sido contrastada, esto se llevará a cabo mediante pesca eléctrica usando un equipo Grupo de batería recargable portátil siguiendo el Protocolo de muestreo de fauna ictiológica en ríos publicado en el BOE en 2015.
- Sedación de los peces recogidos con el fin de obtener las muestras necesarias para nuestro estudio genético.
- Diseño de microsatélites para la especie sobre la que se realiza el estudio (en colaboración con la empresa *All Genetics*, asociada a la UDC).
- Llevar a cabo el análisis del DNA mitocondrial y de los microsatélites con el fin de establecer el origen más probable de las comunidades gallegas de *G. lozanoi*.
- Análisis de la variabilidad genética de las poblaciones estudiadas en las distintas cuencas para la consecución del objetivo anterior.

#### 4. Metodología.

Se puede hacer una separación de las zonas de muestreo en dos, los ríos “problema” que son los situados en la cuenca hidrográfica del bajo Miño, y los ríos originales de las poblaciones de *G. lozanoi* que serán el resto que están distribuidos por la península ibérica. A pesar de que en muchos de los ríos no está considerado como autóctono realizaremos los muestreos sin hacer distinciones entre los ríos que puedan ser los puntos de origen de las poblaciones introducidas en Galicia. Los ríos a muestrear (Figura 3) serán los siguientes: afluentes del Miño (representados en las Figuras 4 y 5) ríos Tamega, Pego, Hospital, Furnia, Louro, Tea y Deva así como los ríos desde los que la especie ha podido ser translocada que son el Bidasoa, Ebro, Mijares, Turia, Júcar, Segura, Guadalete, Guadiana, Tajo, Mondego, Duero y Guadalquivir.

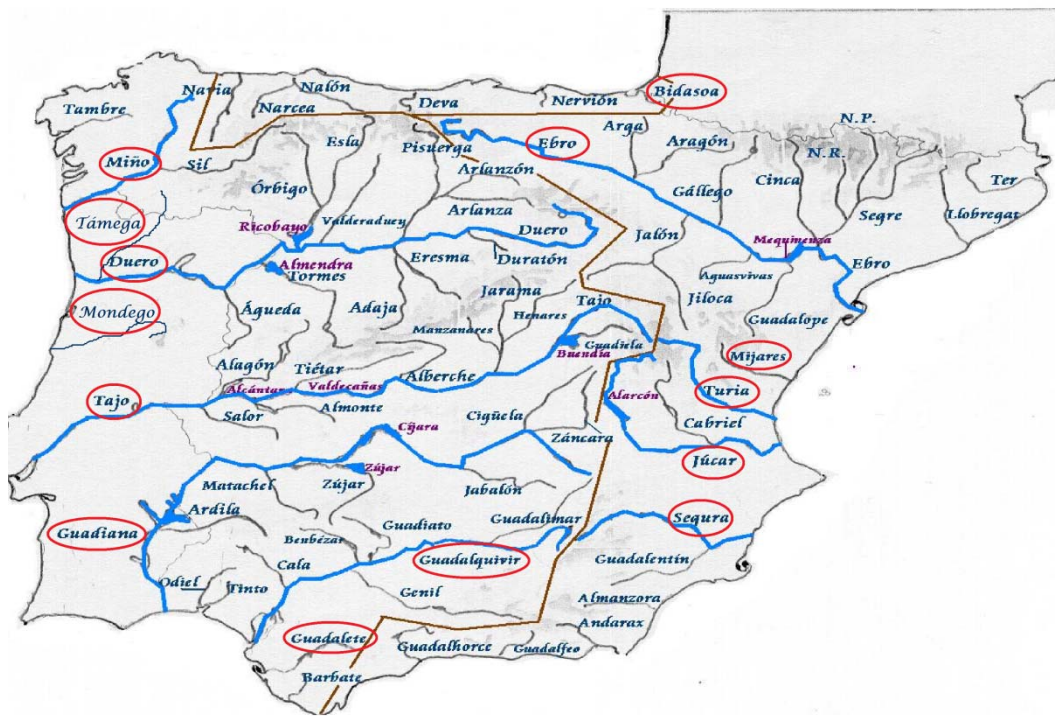


Figura 3. Ríos donde la presencia de *G. lozanoi* ha sido constatada y que se van a muestrear.

No se especifican coordenadas exactas de muestreo ya que para la localización de los ejemplares se requerirá la ayuda de un experto en fauna ictiológica de la península que nos asista en la elección de las zonas de los distintos ríos donde podamos encontrar ejemplares del pez objeto de estudio.

Para el muestreo se seguirá el método de pesca eléctrica. Este método se basa en el uso de un generador de electricidad, al cerrar el circuito en el agua se atrae a los peces hacia el ánodo y estos sufrirán entonces una relajación muscular que facilitará en gran

medida su extracción con las sacaderas. Como ya se ha indicado anteriormente para llevar a cabo este objetivo se seguirá el Protocolo de muestreo de fauna ictiológica en ríos publicado en el BOE en 2015.

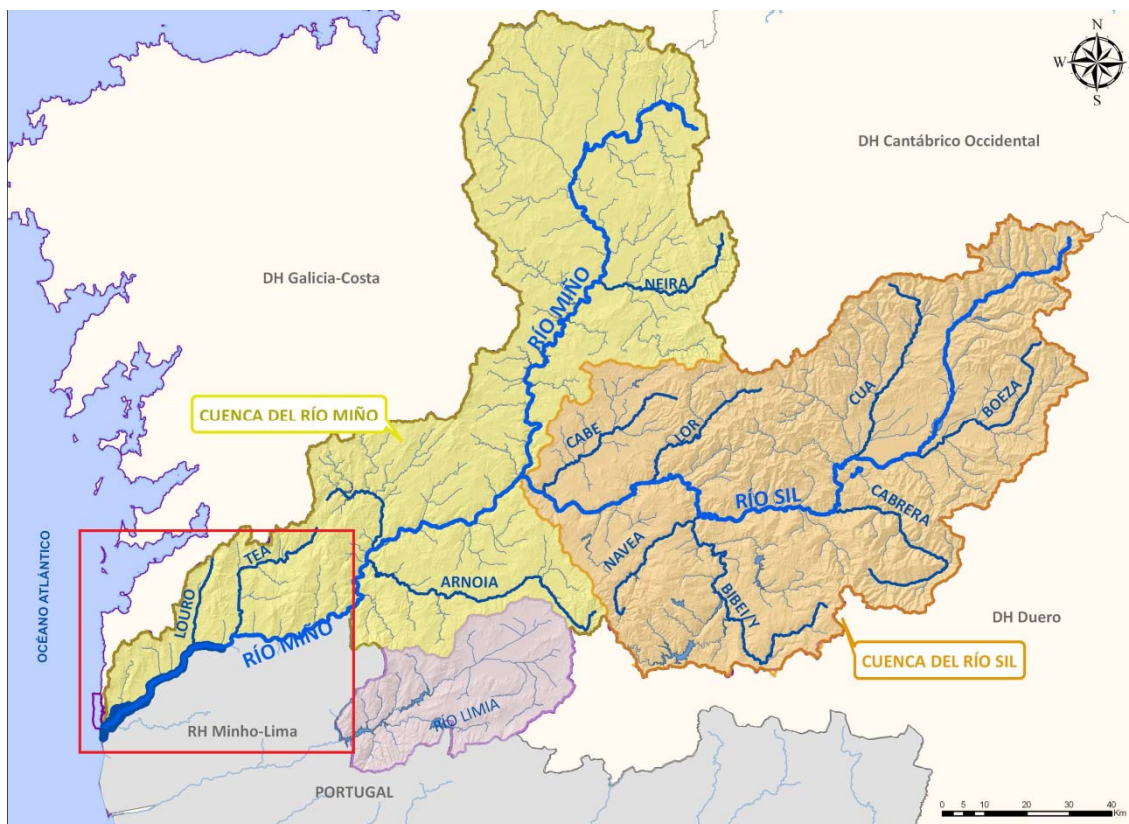


Figura 4. Zona de muestreo de los ríos denominados problema. Margen español del Baixo Miño.

Tras la pesca de los ejemplares se mantendrán en cubos con agua para evitar su estrés y serán anestesiados mediante inmersión en solución acuosa, utilizando como anestésico el Metasulfonato de triclaína (10-30mg/L), como las soluciones generadas con este compuesto son de carácter ácido se recomienda añadir un tampón hasta la saturación (González-Mantilla, 2010). Es importante que el agua donde se realice la sedación tenga unas características físico-químicas que aproximen a las óptimas de la especie. En inmersiones en soluciones anestésicas hay que tener en cuenta que se puedan desarrollar condiciones de hipoxia, cuantos más peces sean introducidos en nuestra solución mayor será el descenso de la saturación de oxígeno en el mismo.

Para hacer frente a las posibles contingencias que surjan de esta característica de la metodología propuesta dispondremos de aireación suplementaria que podrá aplicarse mediante contacto directo con la boca y branquias del individuo que atraviese esas condiciones de hipoxia. Para estos dos pasos además de lo que se haya especificado cabe indicar que se pedirá la colaboración de un veterinario que llevará a cabo la



sedación y que estará disponible para intentar solucionar los problemas que puedan surgir con los peces durante la realización de los métodos descritos.

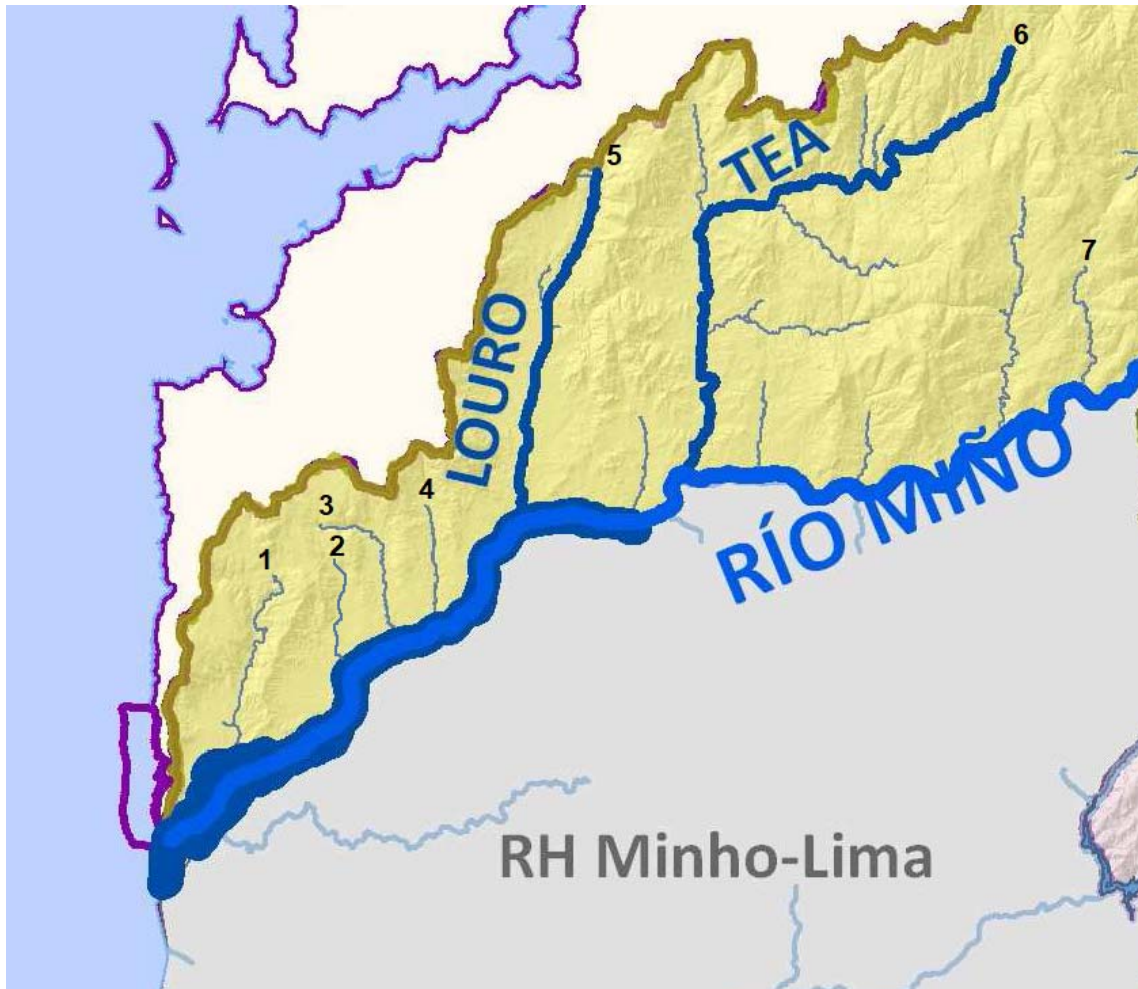


Figura 5. Ríos problema donde la especie ha sido introducida. 1: río Tamega, 2: río Pego, 3: río Hospital, 4: río Furnia, 5: río Louro, 6: río Tea y 7: río Deva.

Una vez los peces hayan sido sedados se extraerán las muestras necesarias para la realización de los estudios genéticos propuestos. Los peces que sean muestreados en la zona gallega del bajo Miño y que tienen allí carácter de introducidos serán devueltos al río o sacados según la administración considere oportuno, la intención sería retirarlos ya que se trata de una especie alóctona pero se seguirán las pautas dictadas por la administración y su personal cualificado en el tema.

Las muestras serán sacadas de la aleta caudal de los peces extraídos, entre 200-300mg, se depositarán en micro-tubos Eppendorf con etanol absoluto para después conservarlos por medio de la congelación (Lopera-Barrero, 2008). Las muestras así conservadas serán sometidas a un protocolo de extracción modificado con sal común propuesto por Lopera-Barrero en 2008.



A partir del DNA extraído de este modo se construirá una genoteca de enriquecimiento en colaboración con la empresa *All Genetics* (A Coruña, España) siguiendo el siguiente método:

Primero someteremos la muestra a la digestión del DNA usando Rsa 1 (Roche) durante tres horas a una temperatura de 37°C, purificar el DNA con el Real Clean Matrix Kit, llevaremos a cabo el ligado a los adaptadores 21-mer ( 5'CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA 3') y 25-mer ( 5'p TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A3'), tras esto se realizará la purificación con el Real Clean Matrix Kit de nuevo. Se hibridarán al DNA ligado 5 oligonucleotidos marcados con biotina correspondientes a los motivos microsatélite (AC)<sub>10</sub>, (AG)<sub>10</sub>, (AAC)<sub>8</sub>, (CG)<sub>10</sub> y (AGG)<sub>8</sub> a la temperatura de 56°C y 65°C durante 10 min, todo esto tras un paso previo de desnaturalización. El proceso de enriquecimiento se completará con Dynabeads. El DNA enriquecido que resultará si amplificará con el primer 21-mer durante 30 ciclos (30 s a 94°C, 56°C / 65°C durante 45 s y 2.5 min a 68°C). Los productos de la PCR serán purificados usando el PCR Extract Mini Kit ( 5 Prime), y la concentración de los productos purificados resultantes de la PCR se realizará en la NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). (Perina et al., 2017). La secuenciación será llevada a íntegramente por la empresa *All Genetics*.

Para el análisis de la información que nos proporcionarán los microsatélites se evaluará el contenido de información polimórfica (PIC) que sirve para medir los polimorfismos que se encuentran debido a la distribución de alelos en una población, también se observará la probabilidad de exclusión individual (PE-I) con el cual es posible observar la probabilidad de encontrar en una población un individuo que escogido al azar presente el mismo genotipo en un locus determinado.

También estimaremos las heterocigosidades observadas (Ho) así como las esperadas (He) para cada locus con el que se trabaje y cada población en la que realicemos el muestreo. La estructura genética se determinará mediante el test de análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffier et al., 2005) ya que nos permite estudiar la variación molecular dentro de una especie y además puede contener suposiciones evolutivas sin que la estructura del análisis que se quiere llevar a cabo se vea modificada, lo que es una diferencia interesante con el ANOVA y además no requiere que se suponga que los datos siguen una distribución normal.

También mediremos varios test F (Wright, 1920), estimaremos los índices de fijación ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$ ) que describen distintas variaciones genéticas; concretamente la variación genética a nivel interno de la población, entre poblaciones y la variación total, respectivamente.

Para la evaluación del origen genético se utilizará un método que asignará a cada individuo a una población de referencia (entendiendo como población de referencia cualesquiera de las poblaciones de las cuencas hidrográficas analizadas que no

pertenezcan al bajo Miño) basándose en la probabilidad estimada a partir de los genotipos (Suarez-Delgado, 2016).

#### 5. Descripción de los medios materiales, infraestructuras y equipamientos especiales necesarios para abordar la metodología propuesta.

Para la pesca necesitaremos un equipo de pesca eléctrica conformado por un generador eléctrico (grupo de batería recargable portátil) compuesto por: un rectificador de corriente que permita controlar los valores de la corriente, tanto la intensidad como el voltaje así como que permita convertir la corriente alterna generada en corriente continua; también consta de un cátodo que está conectado al convertidor mediante un cable eléctrico que se meterá en el río y actuará como polo negativo para que se genere el campo eléctrico y un ánodo que se conecta de la misma forma que el cátodo al generador y que además está conectado a una pértiga, constituye el elemento móvil y es el polo positivo que permite cerrar el circuito (Protocolo de muestreo de fauna ictiológica en ríos, 2015). También necesitaremos unas sacaderas para coger los peces que hayamos podido aturdir así como un cubo para transportarlos en un medio con agua a la zona de extracción de muestras sin que sufran estrés.

Un cubo de mayor tamaño para realizar la solución anestésica que se realizará con Metasulfonato de triclaína (MS-222) y tampón para contrarrestar la acidificación del medio que provoca este compuesto, micro-tubos Eppendorf y etanol absoluto para la conservación de las muestras, recipientes adecuados para el transporte de las muestras y unos frigoríficos para el mantenimiento en refrigeración.

Es necesario disponer de ciertos medios y materiales para garantizar la seguridad tanto del personal que llevara a cabo el proyecto como de los animales que serán utilizados en el mismo. Por la seguridad del personal durante se tomarán todas las medidas propuestas en el Protocolo de muestreo de la fauna ictiológica en ríos (BOE, 2015).

Para la seguridad de los ejemplares de *G. lozanoi* necesitaremos una piedra difusora para poder hacer frente a condiciones de hipoxia que se puedan generar durante la manipulación y el anestesiado, además necesitaremos productos de desinfección para nuestros materiales y así evitar el transporte y dispersión de propágulos o de individuos o especies a otros hábitats o comunidades. En relación a los recursos humanos el proyecto necesita de la colaboración de un veterinario así como de biólogos colaboradores en las labores de muestreo y demás trabajos que se han de ser realizados para la consecución del objetivo que aquí se plantea.

Para evitar que surjan dificultades en la identificación de los ejemplares se solicitará la colaboración del doctor Ignacio Doadrio, uno de los descubridores de la especie.

6. Cronograma sobre las fases e hitos previstos en relación a nuestros objetivos.

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
MUESTREO	■	■	■	■								
DESARROLLO DE MICROSATÉLITES					■	■						
ANALISIS ESTADISTICOS							■					
PUBLICACION DE LOS RESULTADOS								■	■	■	■	■

Las fechas de publicación de los resultados podrían verse ampliadas en función de las fechas que aparezcan de simposios, conferencias, Workgroups que quieran contar con la participación de los autores del estudio.

7. Estimación presupuestaria de la ayuda solicitada.

Concepto	Año 2018
Equipamiento científico- técnico	7740
Material bibliográfico indispensable	1500
Material fungible	27350
Ayudas por desplazamientos	3800
Ayudas para la realización de estadios de investigación (máximo 10% de la cantidad solicitada)	3000
Gastos de publicación en Open Acces e informáticos	3000
Dietas (incluye comidas y alojamientos en los desplazamientos para el muestreo)	2500
Costes o gastos generales que reglamentariamente exige la Universidad al grupo solicitante (máximo 20%)	7380
Total	56270

Material fungible incluye lo necesario para el correcto desarrollo del proyecto, equipo de pesca eléctrica, síntesis de primers, Real Clean Matrix Kit, anestésicos, etc.

Todo el material que pueda ser suministrado por la administración pública a modo de préstamo será descontado del presupuesto final.

## **IMPACTO ESPERADO DE LOS RESULTADOS.**

1. Descripción del impacto que se espera de los resultados del proyecto.

Esperamos que nuestro proyecto sirva para poder poner fin a la invasión de *G. lozanoi* en las cuencas del margen gallego del bajo Miño se pondrá en conocimiento de los gobiernos autonómico y central para que tengan la información necesaria para poder cortar la vía de entrada de la especie en las cuencas hidrográficas mencionadas y para, si ellos lo consideran, poder retirar la especie introducida de las cuencas de las que no es autóctona. Esperamos que económicamente la realización del proyecto sirva para delimitar el impacto que esta especie como invasora pueda tener.

2. Plan de difusión de los resultados.

La difusión de los resultados se realizara por distintas vías:

- 1) De acuerdo a la ley de la Ciencia todos los resultados serán publicados en Open Access y en RUC de la UDC.
- 2) Se les comunicará a los gobiernos central y autonómico para su conocimiento y la toma de medidas con respecto a las poblaciones gallegas de la especie objeto de estudio.

- 3) Las secuencias de DNA que sean amplificadas en este proyecto serán subidas a las bases de datos del NCBI.
- 4) Difusión de los resultados en Congresos, Workshops y Simposiums sobre genética tanto a nivel nacional como internacional, como pueden ser los asociados a la SEG (Sociedad Española de Genética), también sobre ecología debido a la utilidad que nuestros estudios pueden tener como base para una aplicación en ese campo, por ejemplo congreso europeo de ecología de la fundación biodiversidad, sobre conservación de la biodiversidad como puede ser el Congreso de biodiversidad y conservación de la naturaleza propuesto por la Universidad de Almería, y muchos otros relacionados especialmente con estos dos campos.
- 5) Publicación de artículos originales en revistas relacionadas con genética molecular y ecología.
- 6) Realización de charlas divulgativas en colaboración con la Xunta de Galicia para la concienciación de los problemas que supone la introducción de especies a partir de nuestro proyecto, y para difusión de los resultados obtenidos sobre el origen de las poblaciones de *G. lozanoi* en el bajo Miño.

## **IMPLICACIONES ETICAS Y DE BIOSEGURIDAD.**

El proyecto será sometido a la revisión del comité ético de la UDC. Todo el desarrollo del mismo será llevado a cabo siguiendo los protocolos y legislaciones vigentes.

Para el muestreo se seguirá el Protocolo de muestreo de la fauna ictiológica en ríos, además cabe indicar que se tomarán las medidas oportunas para reducir el impacto de la metodología propuesta en los animales con los que estamos trabajando: los peces serán sedados, los medios en los que se realizan las sedaciones tendrán unas características físico-químicas que se acerquen en la mayor medida que sea posible a las de su medio natural, evitando así, que se magnifiquen las condiciones de estrés.

Se tendrá especial cuidado con las condiciones de hipoxia que se puedan generar en el medio donde se realiza la sedación y contaremos con la presencia de personal veterinario para resolver las posibles contingencias que surgieran.

También se tendrá especial cuidado para evitar contaminaciones cruzadas entre los distintos lugares donde se realiza el muestreo, se desinfectará todo el material utilizado para evitar la transmisión de propágulos y se eliminará cualquier tipo de material orgánico que se pudiera transferir mediante el autoclavado del material usado en los muestreos.

### **CONCLUSIONES QUE SE QUIEREN ALCANZAR / CONCLUSIONS A ACADAR / CONCLUSIONS TO BE ACHIEVED.**

Conclusiones.

Con este proyecto buscamos discriminar el origen de las poblaciones de *G. lozanoi* en el margen español del bajo Miño, para así poder cortar las vías de entrada de dicha especie y acabar con los problemas que su presencia, como la de cualquier especie introducida, puedan conllevar a nivel tanto de ecosistema como económico.

La aportación principal que busca alcanzar el proyecto es la de demostrar mediante análisis genéticos que *G. lozanoi* es una especie introducida en la cuenca hidrográfica del Baixo Miño infiriendo a su vez el origen de dicha introducción.

También se obtendrán las secuencias de microsatélites específicos de la especie lo que puede resultar interesante y útil para trabajos posteriores que se realicen con la especie en cuestión.

Conclusión.

Con este proxecto buscamos discriminar a orixe das poboacións de *G. lozanoi* en o margen española do Baixo Miño coa fin de cortar as vías de entrada da devandita especie e acabar así cos problemas que a súa presenza pode causar, como calquera especie introducida, a nivel do ecosistema así como a nivel económico.

A aportación principal que pretende acadar o proxecto é a de demostrar mediante análises xenéticos que *G. lozanoi* é unha especie introducida na conca hidrográfica do baixo Miño inferindo á vez a orixe de dita introducción.

Tamén se obterán as secuencias de microsatélites específicos da especie en cuestión o que pode resultar moi interesante e útil para traballos posteriores que se leven a cabo cá devandita especie.

Conclusions.

With this project we seek to discriminate the origin of the populations of *G. lozanoi* in the Spanish margin of the lowest Miño, in order to be able to cut the entrance ways of

this species and to end the problems that their presence, like any introduced species, can lead to at both, ecosystem and economic levels.

The main contribution that the project seeks to achieve is to demonstrate through genetic analysis that *G. lozanoi* is a species introduced in the lowest Miño river basin, inferring in turn the origin of this introduction.

Species microsatellite sequences will also be obtained, which may be interesting and useful for subsequent work with the species in question.

## **BIBLIOGRAFIA.**

- Amat-Trigo F. (2015). *Gobio – Gobio lozanoi*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Cobo F.; Vieira-Ianero R.; Rego E. & Servia M. J. (2010). Temporal trends in non-indigenous freshwater species records during the 20th century: a case study in the Iberian Peninsula. *Biodiversity and Conservation*, 19: 3471-3487.
- Comesaña J. & Ayres C. (2009). New data distribution of pumpkinseed *Lepomis gibbosus* and largemouth bass *Micropterus salmoides*, and of non endemic Iberian gudgeon *Gobio lozanoi* in the Galicia region (NW Spain). *Aquatic Invasions*, 4: 425-427.
- Doadrio, I. (2002). *Atlas y libro rojo de los peces continentales en España*. Dirección general de conservación de la naturaleza, museo nacional de ciencias naturales, Madrid. P: 190-191.
- Doadrio I. & Madeira M.J. A new species of the genus *Gobio* Cuvier, 1816 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Iberian Peninsula and southwestern France. (2004). *Graellsia*, 60: 107-116.
- Doadrio, I. ; Perea, S. ; Garzon-Heydt, P. & González, J. L. (2011). *Ictiofauna continental. Bases para su seguimiento*. Dirección general Medio Natural y Política forestal. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino, Madrid. 616p.

- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis.
- González E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59: 377-388.
- González-Mantilla J. F. (2010). Farmacología, terapéutica y anestesia de peces. Men. Conf. Interna Med. Aprovech. Fauna Silv. Exót. Conv, 6. <http://www.veterinarios.org/>
- Leunda P. M.; Elvira B.; Ribeiro F.; Miranda R.; Oscoz J.; Alves M. J. & Collares-Pereira M. J. (2009). International standardization of common names for iberian endemic freshwater fishes. *Limnetica*, 28: 189-202.
- Lopera-Barrero N. M.; Povh J. A.; Ribeiro R. P.; Gomes P. C.; Jacometo C. B. & da Silva Lopes T. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. Comparison of DNA extraction protocols of fish and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e investigación agraria*, 35(1).
- Perina A.; González-Tizón A.; Vizcaino A.; González-Ortegon E. & Martínez-Lage A. (2017). Isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite loci in *Palaemon serratus* and cross-amplification in *Palaemon* species by 454 pyrosequencing. *Conservation Genetic Resources* 8:169–196.
- Protocolo de muestreo de fauna ictiológica en ríos. Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Publicado en el BOE en 2015.
- Rivas-Rodríguez S; Servia M. J.; Vieira-Lanero R. & Cobo F. (2010). Vectores, antigüedad y procedencia de las especies alóctonas de agua dulce naturalizadas en Galicia. *Nova Acta Científica Compostelana*, 19: 49-69.
- Rivas S.; Vieira-Lanero R.; Servia M. J.; Barca S.; Couto M. T.; Sánchez J.; Nachón D; Silva S.; Gómez-Sande P.; Morquecho C.; Lago L. & Cobo F. (2010). Evolución temporal, vectores y distribución de las especies exóticas dulceacuícolas de la parte española del Baixo Miño. V Simpósio Ibérico Sobre a Bacia Hidrográfica do Baixo Minho. Conference paper.
- Sala, O. E. ; Stuart Chapin E. ; Armesto J. J. ; Berlow E. ; Bloomfield J. ; Dirzo R. ; Huber-Sanwald E. ; Huenneke L. F. ; Jackson R. B. Kinzig A. ; Leemans R. ; Lodge D. M. ; Mooney H. M. ; Oesterheld M. ; LeRoyPoff N. ; Sykes M.; Walker B: H. ; Walker M.&Wall D. H. (2000). Global Biodiversity Scenarios for the year 2100. *Science*, 287: 1770-1774.
- Servia M. J.; Vieira-Lanero R.; Barca S.; Couto M. T.; Rivas S.; Sánchez J.; Nachón D.; González-Sande P.; Morquecho C.; Lago L. & Cobo F. (2010). Datos poblacionales y biométricos de las especies de peces introducidas en los afluentes de la margen española del Baixo Miño. V Simpósio Ibérico Sobre a Bacia Hidrográfica do Rio Minho.
- Suarez-Delgado D.; Herrera-Camacho J.; Lara-Rivera L. L. & Parra-Bracamonte G. M. (2016). Diversidad y origen genético de poblaciones introducidas de bagre de canal (*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818), en el centro occidental de México. Diversity and genetic origin of introduced channel catfish (*Ictalurus punctatus*



Rafinesque, 1818) to central-west Mexico. *Latin American journal of aquatic research*, 44: 525-534.

Wright S. (1920). The relative importance of heredity and environment in determining the piebald pattern of Guinea-pigs. Bureau of animal industry, United States department of agriculture. Communicated by Pear R., March 17, 1920.