

PONENCIA INVITADA**Sobre la presencia del complejo híbrido *Squalius alburnoides* (Steindachner, 1866) (Cyprinidae, Actinopterygii) en un sistema de cuevas situado en el sur de España**

Ignacio Doadrio⁽¹⁾, María Valladolid⁽¹⁾, José Ambrosio Carmona⁽²⁾, Diushi Keri Corona-Santiago⁽¹⁾, Silvia Perea⁽¹⁾, Carina Cunha⁽¹⁾ y Luis Boto⁽¹⁾

⁽¹⁾Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva.
Museo Nacional de Ciencias Naturales.
C/José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid.

⁽²⁾Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía,
Delegación Provincial de Jaén.
C/ Dr. Eduardo García-Triviño López, 15; 23007 Jaén

Email: ID: doadrio@mncn.csic.es, MV: mcnv185@mncn.csic.es, JAC: jgonzacar@gmail.com,
DC: diushi.keri.c@gmail.com, SP: sperea@mncn.csic.es, CC: cjcunha@fc.ul.pt, LB: mcnb119@mncn.csic.es

RESUMEN: En este trabajo se describe a través de la citología, histología y secuenciación del gen de la rodopsina, la única población de peces encontrada en una cueva de la Península Ibérica. Esta población pertenece a la especie *Squalius alburnoides* (Steindachner, 1866) (Cyprinidae) y tiene la particularidad de tener un origen híbrido con individuos y poblaciones de diferentes ploidías ($2n=50$; $3n=75$ y $4n=100$) y distintos mecanismos de reproducción. Los peces de la cueva de Peal del Becerro I presentaron una degeneración incipiente de la retina, con menor cantidad de fotorreceptores y pigmentación que los peces de la misma especie situados en el exterior de la cueva (Embalse de La Bolera). Todos resultaron ser tetraploides simétricos AAPP lo que sugiere que este biotipo favorece de algún modo la viabilidad de poblaciones de esta especie permitiendo recuperar la bisexualidad y un genoma balanceado. Sin embargo, es necesario realizar estudios en profundidad desde la genómica y transcriptómica y tener un mejor conocimiento de la biología y ecología de esta población cavernícola.

Palabras clave: Peces de Cueva, Cyprinidae, Evolución, Peces poliploides.

On the presence of a complex hybrid fish (*Squalius alburnoides* Steindachner, 1866) in a cave system located in southern of Spain

ABSTRACT: In this study we described through a multidisciplinary approach (cytology, histology and rhodopsin gene sequencing) the only cave population of freshwater fish found in the Iberian Peninsula. This population belong to the species *Squalius alburnoides* (Steindachner, 1866) (Cyprinidae), which has the singularity of being a species of hybridogenetic origin with individuals and populations of different ploidies ($2n=50$; $3n=75$ y $4n=100$) and diverse mechanisms of reproduction. The individuals of *S. alburnoides* found in the Peal del Becerro I cave showed an incipient degeneration of the retina, with lower amount of photoreceptor cells and pigmentation relative to individuals outside the cave (de la Bolera reservoir). All individuals from the cave were symmetric tetraploids AAPP, which suggests that this biotope is favouring the viability of this population through the recovery of bisexuality and a balanced genome. Nonetheless, further deeper studies using genomics and transcriptomics approaches are required to achieve a better understanding of the biology and ecology of this cave-dweller population.

Keywords: Cave Fishes, Cyprinidae, Evolution, Polyploid Fishes,

Introducción

Es bien conocido que ciertos rasgos como la pérdida de visión, la ausencia de pigmentación o la mejora en los sistemas sensoriales aparecen en los peces confinados a hábitats cavernícolas, independientemente de la región biogeográfica donde vivan, de su posición filogenética, o de sus requerimientos biológicos o ecológicos (JUAN *et al.* 2010; PORTER & CRANDALL 2003). Este hecho ha dado lugar al interés de los biólogos evolutivos por el estudio de las cuevas y generado diferentes modelos explicativos para la pérdida de visión en peces y otros organismos cavernícolas.

Los modelos sobre la pérdida de visión pueden no ser excluyentes, pero varían principalmente en la velocidad con que se produce el cambio entre organismos con visión y sin ella. El modelo que ha prevalecido más tiempo

es el regresivo, que de una forma intuitiva puede describirse como pérdida de visión por desuso y que se puede formular en la actualidad como la hipótesis de mutaciones neutrales (PORTER & CRANDALL, 2003; PROTAS *et al.*; 2007; WILKENS, 2007). Esta hipótesis postula que en los peces ciegos se acumulan mutaciones de forma aleatoria en los genes de la visión y que en las cuevas no hay una selección purificadora, que elimine las mutaciones que dan lugar a la ceguera. Este modelo, como bien indica CARTWRIGHT *et al.* (2015), da lugar a un proceso muy lento de pérdida de visión en los organismos, pero puede ser acelerado si existe una presión de selección. Esta presión de selección podría estar presente en las cuevas, ya que se han encontrado un gran número de mutaciones en los genes responsables de la visión en diferentes organismos (PROTAS *et al.*, 2006; GROSS *et al.*, 2013).

La hipótesis alternativa es la adaptativa, que explica la pérdida de visión por el coste energético que supone mantener las estructuras de visión del ojo en un ambiente donde no son necesarias. Por tanto, los individuos con ojos tendrían un menor fitness en los ambientes troglodíticos (MORAN *et al.*, 2015). Si a este coste se añaden algunos efectos pleiotrópicos, como genes que favorecen la alimentación en la oscuridad y que a su vez inhiben la expresión de genes relacionados con la formación del ojo (JEFFERY, 2005), la selección adaptativa puede actuar de forma acelerada. De esta forma se podría explicar la existencia de flujo genético entre individuos de superficie y de cueva sin que haya ejemplares con visión en las cuevas, como ocurre en ciertos peces (*Astyanax mexicanus*) de la Huasteca Potosina en México. La variación críptica puede estar enmascarada en los peces de superficie y cuando son expuestos a selección en las cuevas, rápidamente la pérdida de visión es fijada en la población (CARTWRIGHT *et al.*, 2015).

En la Península Ibérica el registro de organismos troglodíticos es todavía bastante incompleto y hasta el momento no se habían detectado peces que vivieran en el interior de las cuevas. Sin embargo, en el año 2005 el Dr. Alberto Tinaud, de la Universidad de Granada, encontró una población de peces en la cueva Peal del Becerro I (PB-I) en el complejo de Arroyo de la Rambla perteneciente a la cuenca del Guadalquivir. Estos peces pertenecen a la especie *Squalius alburnoides* (Steindachner, 1866) de la familia Cyprinidae, la más diversificada en los peces de agua dulce (NELSON, 2016). Este registro tiene la particularidad de ser la primera vez que se encuentra un pez cavernícola de origen híbrido, como es *S. alburnoides*. Su importancia radica en que hasta ahora todos los modelos evolutivos para los peces de cueva habían sido postulados bajo la premisa de que los organismos presentan reproducción sexual y, por tanto, sus poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Un principio que postula que las poblaciones permanecen en equilibrio mientras no actúe la selección y no se den mutaciones. Estas premisas son violadas en el caso del complejo *S. alburnoides* que no presenta reproducción sexual.

El calandino (*S. alburnoides*) es un ciprínido endémico del oeste de la Península ibérica de origen híbrido. Esta especie se originó como fruto de un cruce interespecífico entre *Squalius pyrenaicus* (Günther, 1868) y una especie, hoy extinguida, de la subfamilia Alburninae. El origen de esta hibridación probablemente ocurrió, en la mayoría de las cuencas donde vive, durante el Plio-Pleistoceno (CUNHA & DOADRIO, 2004) y ha dado lugar a formas o biotipos diploides ($2n=50$), triploides ($3n=75$) y tetraploides ($2n=100$). Existen machos y hembras en todos los biotipos pero con un sesgo a favor de las hembras en la forma triploide, que es la más abundante (CARMONA *et al.* 1997; ALVES *et al.* 2001). El genoma mitocondrial, y por tanto materno, en el calandino es siempre el del cacho (*S. pyrenaicus*). En el caso del genoma parental pueden existir todas las combinaciones entre las especies del género *Squalius* con las que convive: *S. pyrenaicus* (genoma P), *S. carolitertii* (genoma C), *S. aradensis* (genoma S) y la

especie perteneciente a la subfamilia Alburninae (genoma A), pero algunas formas son raras (CARMONA *et al.*, 1997; SOUSA-SANTOS *et al.*, 2006). Diferentes modos de reproducción están presentes en *S. alburnoides*, la mayoría sin una meiosis normal, lo que da lugar a que se conserve el genoma de la especie de la subfamilia Alburninae que se extinguió (ALVES *et al.*, 2001). El modo más frecuente de reproducción es por hibridogénesis meiótica, donde las hembras triploides producen gametos haploides, diploides y raramente triploides que dan lugar a individuos de diferentes ploidias (ALVES *et al.*, 2004). Además, a través de cruces experimentales, se ha señalado que hembras triploides pueden producir también gametos no reducidos, que originan individuos tetraploides (ALVES *et al.*, 2004).

En este trabajo y mediante herramientas citológicas, histológicas y moleculares se pretende hacer la primera descripción de un pez cavernícola de origen híbrido que vive en el sur de España. El conocimiento de sus adaptaciones al medio troglodítico puede ayudar a responder cuestiones sobre la velocidad del cambio adaptativo o la supervivencia de individuos, de una especie que por sus modos de reproducción debe tener una variabilidad genética reducida y que incumple la hipótesis del equilibrio formulada por Hardy-Weinberg.

Material y métodos

Un total de 64 individuos de *Squalius alburnoides* fueron estudiados: 13 individuos provienen de la cueva PB-I en el complejo del Arroyo de la Rambla, Peal del Becerro (Jaén) en la cuenca del río Guadalquivir, y fueron capturados con la ayuda del Grupo de Espeleología de Villacarrillo (G.E.V.). Esta cueva presenta un río activo y un desarrollo conocido de más de 5 kilómetros, al menos parte de sus aguas desaguan en el embalse de la Bolera a través de la fuente de Valentín. Once ejemplares provienen del embalse de la Bolera, río Guadalentín, cuenca del Guadalquivir, Pozo Alcón (Jaén). 10 ejemplares del río Estena, cuenca del Guadiana, Navas de Estena (Ciudad Real). 10 ejemplares del río Almonte, cuenca del Tajo, Jaraicejo (Cáceres) y 10 ejemplares de la Rivera de Huelva. Además, se analizaron 10 ejemplares de la especie *S. pyrenaicus* y que fue uno de los parentales que originó el complejo híbrido de *S. alburnoides*: 5 vinieron de Rivera de Cala, cuenca del Guadalquivir, Santa Olalla (Huelva) y 5 ejemplares del río Estena, cuenca del Guadiana, Navas de Estena (Ciudad Real).

El nivel de ploidia se determinó a través de citometría de flujo de las células sanguíneas, siguiendo el protocolo de COLLARES-PEREIRA & MOREIRA DA COSTA (1999). La sangre fue extraída de la vena caudal en los individuos previamente anestesiados con MS-222. La sangre se estabilizó en un buffer y se congeló a -70°C . Eritrocitos de pollo o de *S. pyrenaicus* fueron utilizados como estándares internos y externos.

Posteriormente los ejemplares se sacrificaron con sobredosis de MS-222 y se le cortó un trozo de aleta caudal que fue conservada en etanol absoluto para los análisis moleculares. Finalmente los ejemplares se fijaron

en formaldehído al 10% y posteriormente se conservaron en etanol al 70% de las colecciones del Museo Nacional de Ciencias Naturales.

Para el estudio morfológico se extrajeron una serie de ojos de ejemplares de cueva, río y embalse, que se fijaron en formaldehído al 10% tamponado con CNa al 0,9%. Los ejemplares de cueva y de río se fotografiaron con una Nikon Coolpix adaptada a lupa binocular. Posteriormente se incluyeron en parafina, se cortaron secciones de 10 μm y éstas se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina. Las preparaciones histológicas se fotografiaron con un microscopio Zeiss Axioplan, equipado con cámara digital y software Axiovision.

Microsatélites

La extracción del ADN total de las aletas conservadas en etanol fue realizada con el kit Biosprint de Qiagen. Siete microsatélites fueron estudiados para confirmar la dotación genómica de los ejemplares N7J4, E1G6 (MESQUITA *et al.*, 2003; PALA & COELHO, 2005), LCO1, LCO3, LCO4, LCO5 (TURNER *et al.*, 2004) y SAS1 (BOTO *et al.*, 2011). Las reacciones de PCR siguieron a PALA & COELHO (2005) y BOTO *et al.*, (2011) excepto para LCO1, el cual fue amplificado en un volumen de 10 μl conteniendo 25–50 ng de DNA, 0.2 mM of cada dNTP, 2 mM MgCl_2 , 1 U Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y 0.2 μM of cada cebador. Los productos de PCR fueron analizados en un secuenciador automático CEQ 2000XL (Beckman Coulter) y el tamaño molecular de los alelos determinado usando el software CEQ de análisis de fragmentos.

La información de los microsatélites y los niveles de ploidía permitieron identificar el número de copias de los individuos (diploides, triploides o tetraploides) e identificar los alelos P o A de su genoma. Trabajos previos validan este método para *S. alburnoides* (PALA & COELHO, 2005; CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2007, CUNHA *et al.*, 2008, BOTO *et al.*, 2011).

Secuenciación de genes de rodopsina

Se secuenció el gen de la rodopsina ya que es fotorreceptor específico de los bastones de la retina y con una función muy importante en condiciones de escasa luminosidad.

Para secuenciar las diferentes copias de genes de rodopsina presentes en los genomas de *S. alburnoides* con diferente grado de ploidía diseñamos una pareja de cebadores (RH1F2/RH1RB) (Tabla I) teniendo en cuenta las secuencias que flanquean al gen en diferentes ciprínidos. Estos cebadores amplificaron sólo los genes de rodopsina codificados en el genoma A pero no los codificados por el genoma P, tanto en individuos de *S. pyrenaicus* como de *S. alburnoides*. Una vez conocida la secuencia de los genes codificados por el genoma A, diseñamos unos nuevos cebadores para amplificar los genes codificados en el genoma P (RH1F4/RH1RC) indistintamente de que el genoma P esté en *S. pyrenaicus* o *S. alburnoides* (Tabla I). Los fragmentos amplificados fueron purificados, ligados al vector pGEMT, y clonados en bacterias competentes TOPO. Un número de clones entre 4 y 11 fueron secuenciados usando cebadores universales y las secuencias de los diferentes clones fueron comparadas para detectar posibles errores.

Resultados

Los datos de citometría de flujo revelaron que todos los individuos de la cueva PB-1 y los del embalse de La Bolera resultaron tetraploides ($4n=100$) y simétricos (PPAA) con genoma de *S. pyrenaicus* (PP) y de la especie de Alburninae extinta (AA) (Tabla II). La cueva PB-I se encuentra junto al embalse de la Bolera y es posible que en determinados años el agua del embalse pueda entrar en la cavidad.

En los ojos de los ejemplares de cueva (Fig. 1a,c) y de río (Fig. 1b,d) se observaron diferencias en la cantidad y la distribución del pigmento a lo largo del iris. Los indivi-

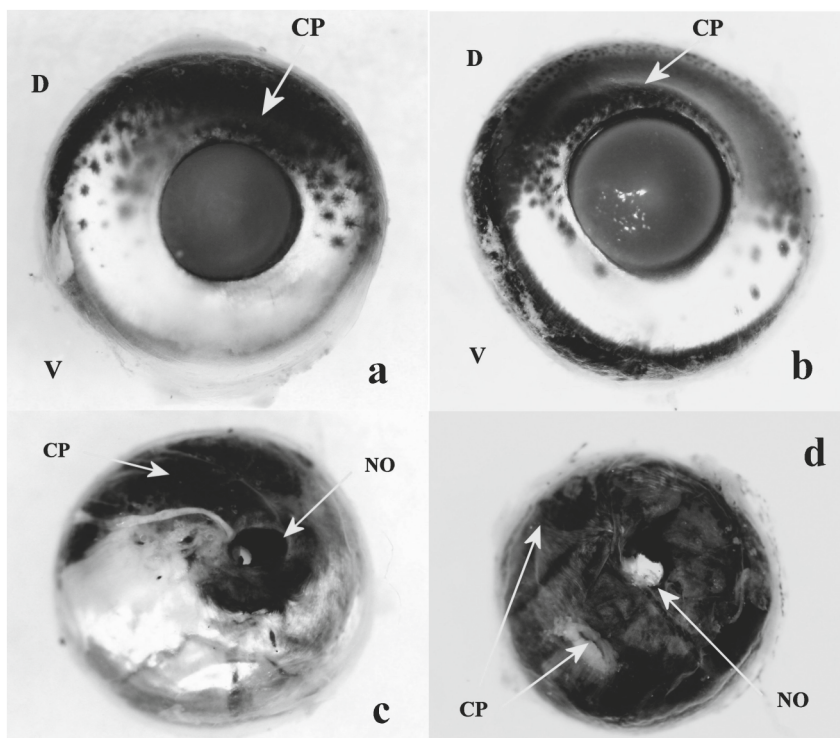


Figura 1. Morfología externa de los ojos, a y c: *S. alburnoides* de la cueva PB-I, b y d: *S. alburnoides* del Embalse de la Bolera. D: área dorsal del ojo, V: área ventral del ojo, CP: capa pigmentada, NO: salida del nervio óptico. (Foto Laboratorio de Histología MNCN-CSIC).

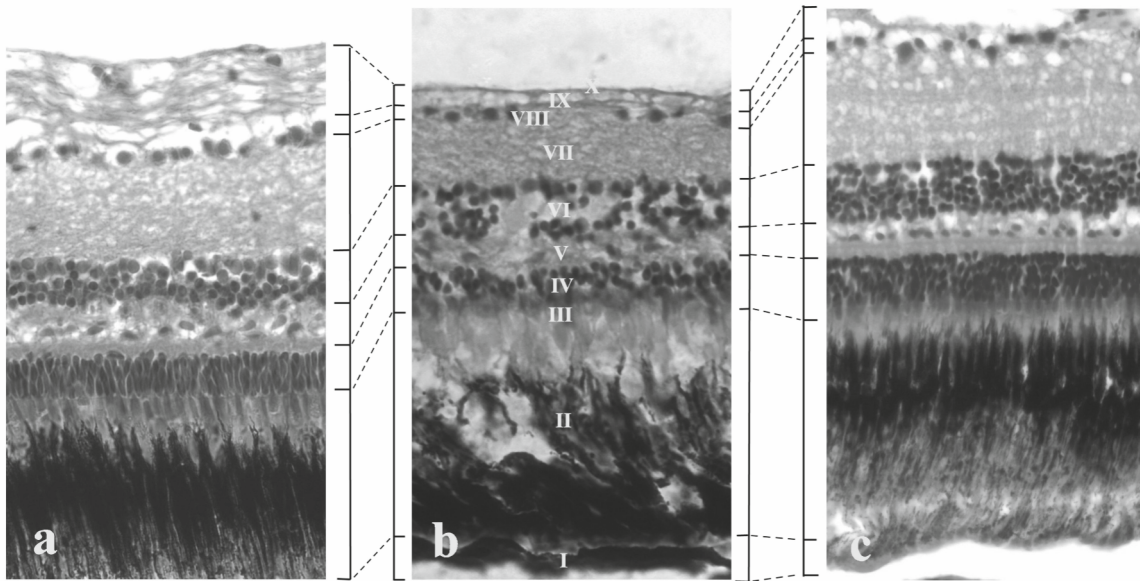


Figura 2. Cortes histológicos de ojos de *S. alburnoides* del embalse de La Bolera (a), de la cueva PB-I (b) y de la rivera de Huelva (c), donde se muestra la equivalencia de las distintas capas de la retina. En la imagen del pez de pantano (a) no aparece representada la capa I. Capas de la retina: I: células pigmentarias (la más exterior del ojo), II: capa de bastones y conos, III: membrana limitante externa, IV: cuerpos celulares de conos y bastones, V: capa plexiforme externa, VI: capa de células bipolares integradoras, VII: capa plexiforme interna, VIII: capa de células ganglionares, IX: fibras nerviosas ópticas, X. membrana limitante interna, en contacto con el humor vítreo del ojo. (Foto Laboratorio de Histología MNCN-CSIC).

duos de la cueva presentaron en la cara externa el pigmento hasta un tercio del iris aproximadamente, mientras que en el control del exterior de la cueva, el pigmento alcanzó la mitad del iris. En la cara interna del ojo se observó una completa pigmentación en los peces que viven en el exterior, mientras que la capa pigmentaria alcanzó sólo el tercio superior del ojo en los peces de cueva. Los cortes histológicos del ojo de los individuos de la cueva en comparación con los del exterior indicaron diferencias en los fotorreceptores de la retina y en la capa pigmentaria (Figura 2b). Se detectó una diferencia notable en la densidad de células fotorreceptoras que componen la capa de conos y bastones, siendo menor en los ejemplares de la cueva.

La comparación de las secuencias de los genes de rodopsina en los diferentes individuos analizados mostró que esta secuencia es de 1.065 pares de bases en las secuencias codificadas por el genoma A y de 1.059 pb para las secuencias codificadas por el genoma P. El individuo estudiado de la cueva PB-I parece presentar genes completamente funcionales y sin signos de pseudogenización, mostrando sólo ligeras diferencias de secuencia con respecto a los genes presentes en la población del embalse de la Bolera (tres nucleótidos en los genes codificados por el genoma P y un nucleótido en los genes codificados por el genoma A). Por un lado, comparaciones entre las secuencias presentes en las poblaciones de la cueva PB-I y del embalse de la Bolera con otras poblaciones de diferentes ríos mostraron que las poblaciones de la cuenca del Guadalquivir (incluyendo las poblaciones del embalse y de la cueva) difieren en 5-7 pares de bases para los genes P y en 2-5 pares de bases para los genes A con respecto a las poblaciones del Guadiana y Tajo, lo que refuerza la presencia de polimorfismos de secuencia diferentemente distribuidos entre cuencas.

Por otro lado, las secuencias de los genes codificados por los genomas A y P difieren entre sí en 25-30 pares de bases (datos no mostrados) en concordancia con su diferente origen filogenético.

Discusión

Los peces de cuevas han constituido un interesante modelo desde los comienzos de la Teoría Evolutiva por la pérdida de estructuras morfológicas aparentemente complejas y rápida adaptación a la oscuridad. Existen peces cavernícolas en todo el mundo excepto en la Antártida y Europa. En este trabajo nosotros describimos por primera vez un pez con una incipiente pérdida de visión en una cueva de Europa. Además, es el primer organismo de origen híbrido adaptado a vivir en condiciones de oscuridad.

Uno de los rasgos morfológicos característicos de los peces cavernícolas es la pérdida de los ojos (BOROWSKY & WILKENS, 2002). En *S. alburnoides* de la cueva PB-I no existe esta pérdida pero las estructuras del ojo se encuentran alteradas con respecto a los ejemplares del exterior. Los fotorreceptores se encuentran en un menor número y más desorganizados, además de presentar el ojo una escasa capa pigmentaria lo que en principio parece una pérdida incipiente de visión.

La existencia de individuos tetraploides de *S. alburnoides* dentro y fuera de la cueva aporta información relevante, por un lado biotipos tetraploides simétricos de *S. alburnoides* (AAPP) no habían sido descritos para la cuenca del Guadalquivir. Estos tetraploides sólo aparecen en cierta frecuencia en las poblaciones situadas en el norte de su área de distribución (Tajo y Duero) y parece que la existencia de poblaciones estables sólo ocurría en la cuenca del Duero (ALVES *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2011). Nues-

tro estudio aunque preliminar parece indicar la existencia de poblaciones estables de individuos tetraploides fuera y dentro de la cueva y un origen común reciente, que coincide con las escasas diferencias genéticas para la rodopsina.

Probablemente no es casual que sea *S. alburnoides* la primera especie que presenta una población adaptada a ambientes cavernícolas ya que se ha demostrado que los organismos unisexuales muestran una elevada adaptabilidad a ambientes extremos (VRIJENHOEK, 1989). Independientemente del mecanismo por el que se este perdiendo la visión, los organismos poliploides presentan una ventaja con respecto a los diploides ya que las dotaciones cromosómicas extra también pueden acumular mutaciones. La ventaja consistiría en que se adaptarían más rápidamente a la oscuridad al tener más oportunidades para acumular mutaciones en aquellos genes que afectan a otros sentidos, lo que les ayudaría a compensar la pérdida de visión. O, por qué no, a los genes que regulan su metabolismo, haciéndolo más lento (los ejemplares observados en el interior de la cueva se movían muy lentamente por lo que pudieron capturarse con relativa facilidad).

Además, los individuos tetraploides podrían dar lugar a la recuperación de la bisexualidad en estas poblaciones de *S. alburnoides* y por tanto tener un genoma balanceado que en un futuro, podría originar especiación aun hábitat determinado como son las cuevas. Sin embargo, todavía hay muchas líneas de investigación y cuestiones abiertas que pueden ser respondidas a través de las nuevas técnicas moleculares como la genómica y la transcriptómica o estudios de la biología y ecología de *S. alburnoides*.

Aunque los datos que tenemos son muy escasos, la población de *S. alburnoides* en la cueva de Peal del Becerro I parece escasa, por ello es urgente la protección de la misma de forma estricta y la conservación del sistema de cavidades donde habita.

Referencias

- ALVES M. J., COELHO, M. M. & COLLARES-PEREIRA, M. J., 2001. Evolution in action through hybridization and polyploidy in an Iberian freshwater fish: A genetic review. *Genetica*, 111, 375-385.
- ALVES, M. J., GROMICHO, M., COLLARES-PEREIRA, M. J., CRESPO-LÓPEZ, E., & COELHO, M. M., 2004. Simultaneous production of triploid and haploid eggs by triploid *Squalius alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Experimental Zoology*, 301A, 552-558.
- BOROWSKY, R. & WILKENS, H. 2002. Mapping a cave fish genome: polygenic systems and regressive evolution. *Journal of Heredity*, 93(1): 19-21.
- BOTO, L., CUNHA, C. & DOADRIO, I., 2011. A polymorphic microsatellite from the *Squalius alburnoides* complex (Osteichthyes, Cyprinidae) cloned by serendipity can be useful in genetic analysis of polyploids. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 524-528.
- CARMONA, J. A., SANJUR, O. I., DOADRIO, I., MACHORDOM, A. & VRIJENHOEK, R. C., 1997. Hybridogenetic reproduction and maternal ancestry of polyploid Iberian fish: the *Tropidophoxinellus alburnoides* complex. *Genetics*, 146, 983-993.
- CARTWRIGHT, R. A., SCHWARTZ, R. S., MERRY, A. L. & HOWELL, M. M., 2015. Strong selection is necessary for evolution of blindness in cave dwellers. *bioRxiv*, 031872.
- COLLARES-PEREIRA, M. J. & MOREIRA DA COSTA, L., 1999. Intraspecific and interspecific size variation in Iberian Cyprinidae and the problem of diploidy and polyploidy, wit review of genome sizes within the family. *Folia Zoologica*, 48, 61-76.
- CRESPO-LÓPEZ, M. E., PALA, I., DUARTE, T. L., DOWLING, T. E. & COELHO, M. M., 2007. Genetic structure of the diploid-polyploid fish *Squalius alburnoides* in southern Iberian basins Tejo and Guadiana, based on microsatellites. *Journal of Fish Biology*, 71, 423-436.
- CUNHA, C. COELHO, M. M., CARMONA, J. A. & DOADRIO, I., 2004. Phylogeographical insights into the origins of the *Squalius alburnoides* complex via multiple hybridization events. *Molecular Ecology*, 13(9), 2807-2817.
- CUNHA, C., DOADRIO, I. & COELHO, M. M., 2008. Speciation towards tetraploidization after intermediate processes of non-sexual reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, B 363, 2921-2929.
- CUNHA, C., DOADRIO, I., ABRANTES, J. & COELHO, M. M., 2014. The evolutionary history of the allopolyploid *Squalius alburnoides* (Cyprinidae) complex in the northern Iberian Peninsula. *Heredity*, 106 (1), 100-112.
- GROSS, J. B.; FURTERER, A., CARLSO, B. M. & STAHL, B. A., 2013. An integrated transcriptome-wide analysis of cave and surface dwelling *Astyanax mexicanus*. *Plos One* 8(2):e55659.
- JEFFERY, W. R., 2005. Adaptative evolution of eye degeneration in the Mexican blind cavefish. *Journal of Heredity*, 96, 185-196.
- JUAN, C., GUZIK, M. T., JAUME, D. & COPER, S. J. B., 2010. Evolution in caves: Darwin's "wrecks of ancient life" in the molecular era. *Molecular Ecology*, 19, 3865-3860.
- MESQUITA, N., CUNHA, C., HÄNFLING, B., CARVALHO, G. R., ZÉ-ZÉ, L., TENREIRO, R. & COELHO, M. M., 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the endemic Portuguese freshwater fish *Squalius aradensis* (Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes*, 3, 572-574.
- MORAN, D., SOFTLEY, R. & WARRANT, E. J., 2015. The energetic cost of vision and the evolution of eyeless Mexican cavefish. *Science Advances*, 1:e1500363.
- NELSON, J. S., GRANDE, T. C. & WILSON, M. V. H. 2016. (eds) *Fishes of the world*. 5th Ed. John Wiley & Sons Inc. Hoboken NJ.

- PALA, I. & COELHO, M. M., 2005. Contrasting views over a hybrid complex: between speciation and evolutionary "dead-end". *Gene*, 347, 283-294.
- PORTER, M. L. & CRANDALL, K. A., 2003. Lost along the way: The significance of evolution in reverse. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 541-547.
- PROTAS, M. E., C. HERSEY, D. KOCHANNEK, Y. ZHOU, H. WILKENS, W. R. JEFFERY, L. I. ZON, R. BOROWSKY, & TABIN, C. J., 2006. Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nature Genetics*, 38, 107-111.
- PROTAS, M., CONRAD, M., GROSS, J. B., TABIN, C. & BOROWSKY, R. 2007. Regressive evolution in the Mexican cave Tetra, *Astyanax mexicanus*. *Current Biology* 17, 452-452.
- SOUSA-SANTOS, C., COLLARES-PEREIRA, M. J. & ALMADA, V. C., 2006. Evidence of extensive mitochondrial introgression with nearly complete substitution of the typical *Squalius pyrenaicus*-like mtDNA of the *Squalius alburnoides* complex (Cyprinidae) in an independent Iberian drainage. *Journal of Fish Biology*, 68, 292-301.
- TURNER, T. F., DOWLING, T. E., BROUGHTON, R. E. & GOLD, J. R., 2004. Variable microsatellite markers amplify across divergent lineages of cyprinid fishes (subfamily Leuciscinae). *Conservation Genetics*, 5, 279-281.
- VRIJENHOEK, R. C. 1989. Genetic and Ecological constraints on the origins and establishment of unisexual vertebrates. Pp 281-188. In: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. Dawley, R. And Bogart, J. (Eds). New York State Museum, Albany, New York.
- WILKENS, H., 2007. Regressive evolution: Ontogeny and genetics of cavefish eye rudimentation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 92, 287-296.

Agradecimientos

En primer lugar tenemos que agradecer Toni Pérez y a todo el equipo del Grupo de Espeleología de Villacarrillo (G.E.V.) su ayuda en la recolección de los ejemplares. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. El Dr. Alberto Tinaut nos proporcionó el primer dato sobre la presencia de estos peces. M. Gallardo y Gabino González hicieron parte del trabajo histológico. O. Domínguez nos acompañó en la realización de los muestreos.

Este artículo se citará de la siguiente manera:

DOADRIO, I., VALLADOLID, M., CARMONA, J.A., CORONA-SANTIAGO, D.K., PEREA, S., CUNHA, C. y BOTE, L. 2016. Sobre la presencia del complejo híbrido *Squalius alburnoides* (Steindachner, 1866) (Cyprinidae, Actinopterygii) en un sistema de cuevas situado en el sur de España. *Actas Congreso de Espeleología "EspeleoMeeting Ciudad de Villacarrillo"*: 9-15. Villacarrillo (Jaén).

APÉNDICE I

Tabla I. Cebadores y temperaturas de anillamiento utilizados en la amplificación de genes de rodopsina.

Cebador	Secuencia	T ^a Anillamiento	Genoma
RH1F2	CTGAGCGCMACATCCAACCG -26 -5	60 °C	A
RH1RB	AKCCCAGTGCABGTMRICTGC +44 +25	60 °C	A
RH1F4	ATGAACGGTACAGAGGGA 1 18	53 °C	P
RH1RC	GTTTAYGCMGGRGASACG 1067 1049	53 °C	P

Nota: Números bajo las secuencias indican la posición del nucleótido dentro o fuera de la secuencia de rodopsina. Posición 1 es el primer nucleótido en la secuencia codificante y símbolos - y + marcan posiciones antes o después de la secuencia codificante. Las amplificaciones consistieron en 3 minutos de incubación a 94°C seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a la correspondiente temperatura de anillamiento y 1 minuto y 30 segundos a 72°C, con una incubación final de 7 minutos a 72°C.

Tabla II. Especies, genotipos y localidades de los individuos estudiados para microsatélites y citometría de flujo, de estos se secuenció un ejemplar para las rodopsinas.

Especies	Genotipos	Localidades	Cuencas	N
<i>Squalius pyrenaicus</i>	PP	Río Estena	Guadiana	5
<i>Squalius pyrenaicus</i>	PP	Rivera de Cala	Guadalquivir	5
<i>Squalius alburnoides</i>	AA	Río Estena	Guadiana	10
<i>Squalius alburnoides</i>	AA	Rivera de Huelva	Guadalquivir	10
<i>Squalius alburnoides</i>	PA	Río Almonte	Tajo	10
<i>Squalius alburnoides</i>	PPAA	PB-I Cueva	Guadalquivir	13
<i>Squalius alburnoides</i>	PPAA	Río Guadalentín (Embalse de La Bolera)	Guadalquivir	11