

Filogeografia das Lampreias da Europa Ocidental:
contributos para a compreensão dos
seus padrões de especiação

Ana Martins Pereira

Tese de doutoramento em Ciências Biomédicas

2012

Ana Martins Pereira

**Filogeografia das Lampreias da Europa Ocidental:
contributos para a compreensão dos
seus padrões de especiação**

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em
Ciências Biomédicas submetida ao Instituto de
Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade
do Porto.

Orientador – Professor Doutor Vítor Almada
Professor Catedrático
ISPA-IU

Co-orientador – Professor Doutor João Coimbra
Professor Catedrático
Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar da Universidade do
Porto

Para a Sara

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Vítor Almada pela excelente orientação, pelo apoio e pela disponibilidade que me proporcionou ao longo deste trabalho. Agradeço ainda por me ter desafiado a trabalhar com lampreias e me ter mostrado quão interessantes podem estes animais ser. Agradeço o modelo de professor e investigador que me proporcionou, que marcaram e espero que continuem a marcar a minha vida profissional.

Ao Professor Doutor João Coimbra, por ter aceite ser orientador deste trabalho, pela cordial relação que sempre teve comigo, e pela confiança que demonstrou neste projecto.

À Prof. Doutora Joana Robalo pelo apoio, incentivo e disponibilidade que sempre manifestou, quer no que se refere a esta tese, quer no que se refere ao meu trabalho como docente do ISPA.

Aos meus colegas do ISPA: à Carla Sousa Santos, por me ter ensinado e acompanhado na pesca eléctrica e pelo apoio em muitas fases desta tese; ao João Paulo Fonseca, com quem comecei a trabalhar com lampreias, pela preciosa ajuda no início deste trabalho e pelas discussões ao longo dele; ao André Levy, pelas múltiplas ajudas e discussões e pelo incentivo que transmite; à Sara Francisco, pelo apoio que me deu na elaboração desta tese; ao Pedro Coelho, pela ajuda e companhia na pesca eléctrica.

Não quero deixar ainda de agradecer o apoio institucional que me foi dado pelo ISPA na impressão da tese e na flexibilidade nos horários lectivos durante os dois primeiros anos deste doutoramento, sem os quais dificilmente conseguiria conciliar uma tese de doutoramento com a actividade de docência.

RESUMO

Nesta tese, estudaram-se várias questões relacionadas com a filogenia e filogeografia das várias espécies de lampreias que ocorrem em Portugal. Nesse sentido realizou-se um estudo sobre a filogeografia da lampreia marinha (*Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758) na costa ocidental europeia, com foco na região de Portugal. Para este trabalho, utilizaram-se 273 amostras, retiradas de indivíduos de 10 rios da costa europeia, desde o rio Reno, na Alemanha, até ao rio Guadiana, no sul de Portugal. Foi extraído o ADN destas amostras e sequenciada a região não-codificante I da mitocôndria. Encontraram-se níveis de diversidade genética muito baixos e uma rede de haplótipos em forma de estrela, apresentando a grande maioria dos indivíduos o haplótipo central desta rede. Os padrões encontrados sugerem que esta população se encontra a recuperar de um gargalo genético severo, que levou a uma redução drástica do seu efectivo populacional. Neste âmbito, foi sugerido que as glaciações do Plistocénico, nomeadamente a última glaciação (que teve o seu máximo há 18 mil anos na Europa), teria tido um impacto profundo nesta espécie. O aumento da frequência de lampreia marinha na Islândia levou a que fosse feito um pequeno estudo cujo objectivo foi o de averiguar se estas lampreias tinham origem geográfica na costa europeia ou na costa americana, com populações reconhecidamente diferentes do ponto de vista genético. Verificou-se que as lampreias marinhas recolhidas na Islândia são de origem europeia, por comparação das sequências de ADN mitocôndrial da região não-codificante I destes indivíduos com as já obtidas para a costa europeia e disponíveis publicamente para a costa americana.

Com o objectivo de comparar a filogeografia das duas formas de lampreia migradora da Europa Ocidental, confrontaram-se os padrões encontrados em lampreia marinha (*Petromyzon marinus*) e lampreia de rio (*Lampetra fluviatilis* (Linnaeus, 1758)). Para isso, extraiu-se o ADN de amostras de 52 indivíduos de *L. fluviatilis* provenientes de dois rios, um que desagua no mar Báltico (rio Neva) e outro no Mar do Norte (rio Reno). Nestas amostras foi amplificada e sequenciada a região não-codificante I da mitocôndria. Utilizaram-se ainda todos os dados genéticos disponíveis publicamente que permitissem comparações populacionais. Adicionalmente, amplificaram-se e sequenciaram-se os genes mitocondriais que codificam as subunidades 6 e 8 da ATPase de populações de rios que desaguam no Mar do Norte e Mar Báltico. Encontraram-se níveis de diversidade genética em *L. fluviatilis* pelo menos três vezes superiores aos encontrados em *P. marinus*. O padrão da rede de haplótipos é claramente diferente nas duas espécies, observando-se em *L. fluviatilis* uma rede mais profunda, sem um haplótipo central mais

frequente. Ao contrário do que se tinha verificado em *P. marinus*, na lampreia de rio encontrou-se estruturação populacional, diferenciando-se uma população no Mar Báltico e outra no Mar do Norte e Portugal. Os resultados sugerem um crescimento lento mas consistente em *L. fluviatilis*, o que contrasta com o descrito na bibliografia para *P. marinus*. Os padrões encontrados parecem no entanto estar relacionados com diferentes histórias evolutivas na Europa: enquanto a população europeia de *P. marinus* tem aproximadamente 125 mil anos, em *L. fluviatilis* as populações tiveram um ancestral comum há aproximadamente 1 milhão de anos.

Esta tese também teve como objectivo estudar a filogeografia das populações não tróficas de *Lampetra*. Nestas populações, ao contrário do que acontece nas populações tróficas, os indivíduos reproduzem-se nos rios de origem, pouco tempo depois da metamorfose, não migrando para outros locais e não se alimentando como adultos. Verificou-se que muitas das populações Ibéricas não tróficas são geneticamente distintas entre si, tendo sido descrita uma nova população nos rios Cares-Deva, no norte de Espanha. Para o estudo genético das populações, extraiu-se o ADN de 229 indivíduos provenientes de oito bacias da Península Ibérica (associadas aos rios Sado, Tejo, São Pedro, Mondego, Vouga, Douro, Olabidea e Cares-Deva) e ainda de 57 indivíduos provenientes de populações de rios que drenam para o Mar do Norte e Costa Atlântica de França (dos rios Reno, Elba e Garonne). Nestes indivíduos, a região não-codificante I da mitocôndria foi amplificada e sequenciada. Adicionalmente, amplificaram-se e sequenciaram-se os genes mitocondriais que codificam as subunidades 6 e 8 da ATPase em 61 indivíduos não tróficos do género *Lampetra* das mesmas populações. Estas sequências foram analisadas em conjunto com as disponíveis publicamente do mesmo fragmento de populações equivalentes de rios que drenam para o mar Báltico, Mar do Norte e Península Ibérica. Este trabalho permitiu, por um lado, verificar que as populações dos rios Sado, Nabão, São Pedro, Vouga, Douro e Olabidea-Ugarana são distintas, possuindo em geral níveis de diversidade genética baixos. Por outro lado, permitiu verificar que estas populações são compostas apenas por haplótipos exclusivos, derivados uns dos outros, o que sugere algum nível de evolução local. Foi sugerido nesta tese que estas populações mereciam o estatuto de unidades de conservação, não só devido aos padrões genéticos observados, mas também por ocorrerem em áreas geográficas de reduzidas dimensões e por estarem isoladas geneticamente de outras populações.

O estudo das populações Ibéricas não tróficas de *Lampetra* permitiu ainda comprovar que estas populações se originaram múltiplas vezes a partir de ancestrais tróficos ao

longo da história evolutiva de *Lampetra*. Estes resultados põem em causa a validade de *Lampetra planeri* (Bloch, 1784), a designação colectiva atribuída às populações não tróficas de *Lampetra* na Europa Ocidental, que se apresenta como polifilética. Sugere-se assim que, pelo menos até que seja esclarecida a existência ou ausência de mecanismos de isolamento reprodutor entre as formas trófica e não trófica de *Lampetra* da Europa Ocidental, a designação de *L. fluviatilis* seja adoptada para ambas as formas.

ABSTRACT

In the present thesis, several questions related to the phylogeny and phylogeography of lamprey species occurring in Portugal were studied. With this purpose, the phylogeography of sea-lamprey (*Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758) in West – European shores, namely in the Portuguese coast, was studied. Two hundred and seventy three samples were taken from individuals from 10 European rivers, from the Rhine, Germany, to the Guadiana, south Portugal. DNA was extracted and the mitochondrial non-coding region I was sequenced. Low levels of diversity and a shallow star-like haplotype network pattern were found, with the majority of samples corresponding to the central haplotype. These results suggest that the European population of *P. marinus* is recovering from a recent bottleneck, with a significant reduction of its effective population size. This reduction was attributed to a profound impact of the Pleistocene glaciations in the diversity of this species, namely the last glaciation, which had its maximum in Europe 18 000 years ago. The recent increase in the frequency of sea-lampreys in Iceland prompted an investigation about the origin of these lampreys that could come from Europe or from North-America, which have different genetic stocks. The mitochondrial non-coding region I of lampreys collected in Iceland was sequenced and compared with previous results on the same genetic marker from European sea-lamprey and with available data from North-American sea-lamprey in GenBank. The results of this investigation showed that these lampreys came from Europe.

A comparison between the phylogeographical patterns and demographic history in two European migratory lampreys – *Petromyzon marinus* and *Lampetra fluviatilis* was undertaken. With this objective, DNA sequences were obtained from 52 individuals of *L. fluviatilis* from the Baltic Sea (Neva River) and North Sea (Rhine River), from which the mitochondrial non-coding region I was sequenced. All the molecular data available was used. Additionally, a small number of new sequences from samples from the same two rivers was performed. The sequences obtained were sufficient to allow population comparisons. The results obtained show that the levels of genetic diversity are at least three times higher in *L. fluviatilis* than in *P. marinus*. Haplotype network are clearly different between the two species, with a deeper network in *L. fluviatilis*, with no predominance of an ancestral haplotype. In *L. fluviatilis* there is population differentiation, with one population in the Baltic and other in the North Sea and Portugal, which contrasts with the lack of population differentiation found in *P. marinus*. The results suggest a smooth but consistent growth in *L. fluviatilis* during the Pleistocene, which differs from

what is described in the literature for *P. marinus*. The patterns observed are probably related to the different evolutionary histories of the two lamprey species in Europe: *P. marinus* population has approximately 125 000 years of independent evolution in Europe, which contrasts with the fact that *L. fluviatilis* had its most recent common ancestor 1 million years ago.

In this thesis, the phylogeography of non-trophic *Lampetra* populations was studied. These populations are composed by individuals that breed soon after metamorphosis in their natal rivers, without migrating or feeding in the adult stage. Several non-trophic Iberian populations were found to be genetically different, and one new *Lampetra* population was described in the rivers Cares and Deva (north Spain). For this study, DNA was extracted from 229 samples from eight Iberian rivers (Sado, Tejo, São Pedro, Mondego, Vouga, Douro, Olabidea and Cares-Deva) and from 57 samples from rivers that flow to the North Sea and to the Atlantic coast of France (rivers Rhine, Elbe and Garonne). Mitochondrial non-coding region I was amplified and sequenced. Additionally, in 61 of the samples, mitochondrial ATPase subunits 6 and 8 genes were amplified and sequenced. They were analysed with all available sequences from the same markers. The results of this study showed that the populations from the rivers Sado, Nabão, São Pedro, Vouga, Douro and Olabidea-Ugarana are distinct, possessing low levels of genetic diversity. These populations are composed only by exclusive haplotypes, derived from each other, which suggests a considerable level of local evolution. These results, combined with the geographic confinement to small water bodies, and with the fact that these populations are isolated, justify the recognition of different conservation units in these rivers.

This later study also showed that *Lampetra planeri* (Bloch, 1784), the collective name attributed to the west European non-trophic populations of *Lampetra*, is an invalid designation, as it is polyphyletic. In this thesis, it is suggested that, at least until the mechanisms of reproductive isolation between the two forms are clarified, *L. fluviatilis* designation should be attributed to both trophic and non-trophic forms.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 2 - MITOCHONDRIAL DNA FAILS TO REVEAL GENETIC STRUCTURE IN SEA LAMPREYS ALONG EUROPEAN SHORES	27
CAPÍTULO 3 - ICELANDIC LAMPREYS (<i>PETROMYZON MARINUS</i>): WHERE DO THEY COME FROM?	39
CAPÍTULO 4 PHYLOGEOGRAPHICAL ANALYSIS REVEALS MULTIPLE CONSERVATION UNITS IN BROOK LAMPREYS <i>LAMPETRA PLANERI</i> OF PORTUGUESE STREAMS.....	47
CAPÍTULO 5 - GENETIC RELATIONSHIPS OF BROOK LAMPREY OF THE GENUS <i>LAMPETRA</i> IN A PYRENEAN STREAM IN SPAIN	65
CAPÍTULO 6 - NEW DISTRIBUTION DATA ON SPANISH AUTOCHTHONOUS SPECIES OF FRESHWATER FISH	79
CAPÍTULO 7 - ORIGINATION OF DIFFERENT STOCKS OF BROOK LAMPREYS IN SPAIN FROM <i>LAMPETRA FLUVIATILIS</i> AT TWO DISTINCT TIMES AND PLACES....	101

CAPÍTULO 8 PHYLOGEOGRAPHY OF <i>LAMPETRA FLUVIATILIS</i> - CONTRASTS IN THE PATTERNS FOUND IN TWO MIGRATORY LAMPREYS IN WESTERN EUROPE	113
CAPÍTULO 9 DISCUSSÃO GERAL.....	129
Discussão	131
Perspectivas para estudos futuros	145
CAPÍTULO 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

Esta tese aborda vários problemas de filogenia e filogeografia de lampreias da Europa Ocidental. Para melhor enquadrar esta temática, optou-se por dividir a introdução em três partes: na primeira, apresentam-se aspectos gerais da biologia deste grupo, dando especial ênfase ao seu ciclo de vida; na segunda, detalham-se aspectos da morfologia e processos de evolução de espécies pares, dada a sua importância para a temática deste trabalho; finalmente, são apresentadas sucintamente as espécies alvo desta tese.

1.1 Aspectos gerais sobre a biologia de Lampreias

As Lampreias são um dos mais interessantes grupos de vertebrados, quer devido ao facto de apresentarem características muito primitivas, quer por terem um ciclo de vida muito particular. Caracterizam-se pela ausência de maxila, estando a boca no estado adulto no centro de um disco oral, o qual possui dentes córneos e tem capacidade de sucção. Não possuem barbatanas pares nem escamas, têm uma única narina e o seu esqueleto é cartilágneo (Hardisty 2006). O seu corpo é em forma de enguia, com uma cauda proterocerca e sete poros laterais que dão acesso às brânquias (Hubbs & Potter 1971). O fóssil mais antigo deste grupo foi encontrado na África do Sul, em depósitos marinhos ou estuarinos do Devónico, com mais de 350 milhões de anos (Gess et al. 2006). Este fóssil, da espécie *Priscomyzon riniensis* Gess, Coates & Rubidge, 2006, tinha já muitas das características presentes nas lampreias actuais: possuía um disco oral desenvolvido, com dentes circumorais e um cesto branquial (Guess et al. 2006). Embora o registo fóssil de lampreias seja relativamente escasso, provavelmente devido à ausência de estruturas ósseas, foram ainda descritas espécies extintas de lampreias nos Estados Unidos da América, em depósitos do Carbónico superior, com mais de 300 milhões de anos (*Mayomyzon pieckoensis* Bardack & Zangerl, 1968 e *Hardistiella montanensis* Janvier & Lund, 1983) (Bardack & Zangerl 1971) e na China (*Mesomyzon mengae* Chang, Zhang & Miao, 2006), em depósitos de água doce do Cretácico inferior, com 125 milhões de anos (Chang et al. 2006).

Na evolução dos cordados, as lampreias surgiram antes da formação de barbatanas pares, de esqueleto ósseo e de mandíbula. Partilham com as mixinas, um grupo de cordados marinhos, o facto de terem um corpo em forma de enguia, as brânquias

localizadas em cestos branquiais, possuem dentes córneos (com origem embriológica muito diferente dos verdadeiros dentes) e uma única narina, e não possuem barbatanas pares. No entanto, enquanto as lampreias têm elementos vertebrais ao longo da espinhal-medula, embora pouco diferenciados, estes não existem nas mixinas. Estes dois grupos consideravam-se inicialmente aparentados com grupos de peixes fósseis colectivamente designados como Ostracodermes (Janvier 2008). Os Ostracodermes, cuja designação se encontra relacionada com o facto de possuírem placas ósseas a revestir o corpo (o que facilitou o registo fóssil deste grupo) correspondem a pelo menos cinco grupos, os quais partilham com as lampreias e mixinas o facto de não possuírem mandíbula (Forey & Janvier 1993). Deste modo, todos estes grupos teriam precedido evolutivamente a formação de mandíbulas.

As relações entre os vários grupos de cordados têm sido alvo de múltiplos estudos nos últimos anos (Janvier 2010). As lampreias, juntamente com as mixinas, os ostracodermes e os vertebrados com mandíbula (Gnathostomata) constituem um grupo irmão dos cefalocordados, e têm a designação de Craniata. De facto, em formas muito primitivas deste grupo está presente um esqueleto cartilágneo que protege o encéfalo, mas não existem verdadeiras vértebras. Por isso, para uma definição abrangente do grupo prefere-se a designação de craniados a vertebrados. As relações internas no clade Craniata têm sido explicadas por duas hipóteses alternativas (Sansom et al. 2010) (Figura 1). Segundo uma das hipóteses, a mais antiga, as lampreias e as mixinas constituem um clade (Ciclostomata), irmão dos vertebrados com mandíbula. Esta hipótese foi inicialmente definida devido ao facto de lampreias e mixinas não possuírem mandíbula e foi recentemente suportada por dados moleculares (Mallatt & Sullivan 1998, Delarbre et al. 2002). Alternativamente, as lampreias e os vertebrados com mandíbula formariam um clade, cujo clade irmão seria constituído pelas mixinas. Esta hipótese tem sido suportada por dados morfológicos e fisiológicos (as lampreias partilham com os vertebrados com mandíbula o facto de terem arcos hemal e neural desenvolvidos, neuromastos verdadeiros ao longo da linha lateral, músculos oculares extrínsecos, regulação nervosa do coração e hiperosmorregulação), e também por alguns dados moleculares (Forey & Janvier 1993, Yu et al. 2008, Sansom et al. 2010). Estudos recentes, baseados em micro-RNAs, sequências de pequena dimensão, não codificantes, com papel regulatório e altamente conservados, vieram apoiar a hipótese da monofilia do clade Ciclostomata (Heimberg et al. 2010). Estes novos resultados têm reavivado a hipótese da monofilia dos ciclóstomos, sendo correntemente a que tem maior apoio (Janvier 2010). No entanto, as características morfológicas parecem apresentar

difficuldade no estabelecimento das relações entre grupos, o que torna o posicionamento dos vários grupos de Ostracodermes incerto (Janvier 2010).

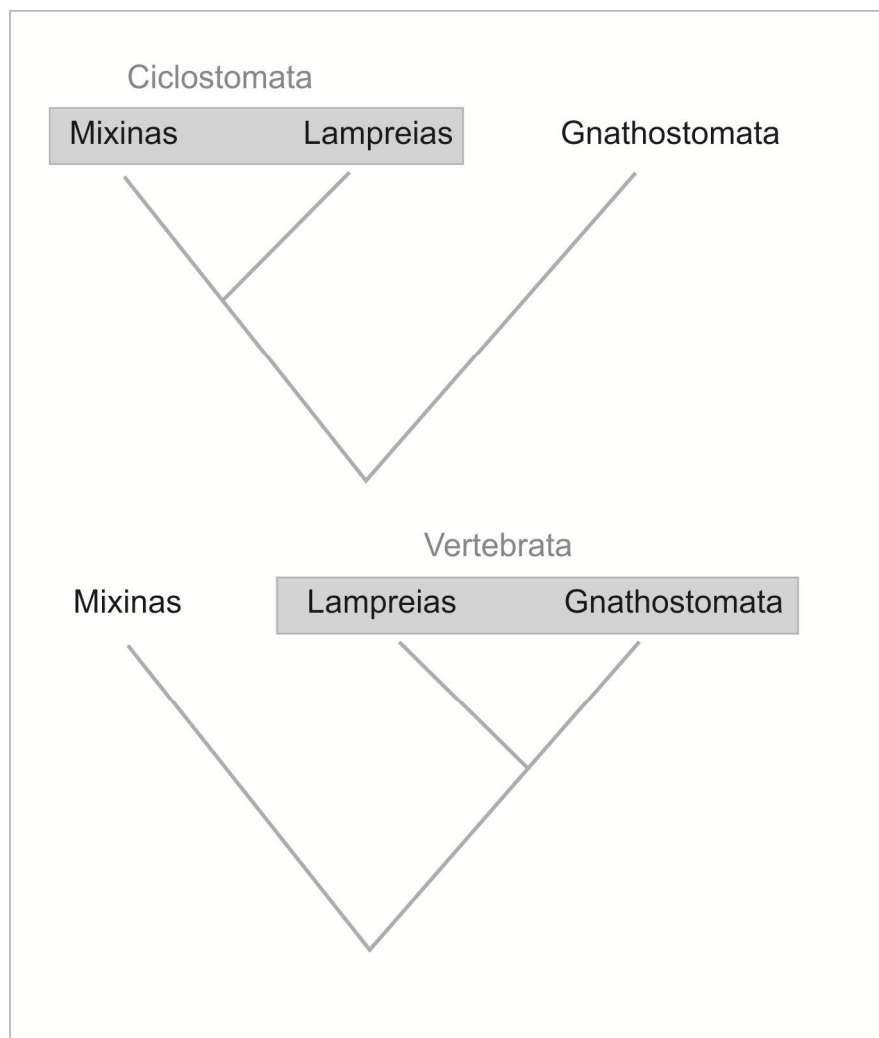


Figura 1 Hipóteses alternativas de relações internas no clade Craniata

As lampreias, assim como as mixinas, têm uma distribuição antitropical (Hubbs & Potter 1971). Embora possam ocasionalmente ocorrer em águas subtropicais, a sua distribuição está confinada à área a norte e a sul dos 30° de latitude, e é limitada pela isotérmica dos 20°C de temperatura média anual (Hardisty 2006).

No que respeita ao seu ciclo de vida (Figura 2), as lampreias possuem uma fase larvar, em que se designam por amocetes, a qual dura vários anos (de 2 a 9), consoante a espécie e a população (Kelly & King 2001, Renaud 2011). As larvas vivem enterradas no fundo dos rios, em zonas de areia e vaza, de preferência com alguma sombra. Alimentam-se por filtração, sobretudo de algas e bactérias. Após esta fase, em que os animais crescem até um comprimento total que varia entre indivíduos da mesma espécie e mais fortemente entre espécies diferentes (o comprimento máximo atingido por larvas

de *Geotria australis* Gray, 1851, uma espécie do hemisfério sul, é de 111 mm, enquanto as larvas de *Eudontomyzon mariae* (Berg, 1931), uma espécie europeia, podem ir até aos 230 mm), os indivíduos iniciam uma metamorfose. Tipicamente este processo dura entre 3 e 10 meses (em *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758 inicia-se em Julho e termina em Outubro-Novembro), sendo altamente síncrono na mesma população (Kelly & King 2001).

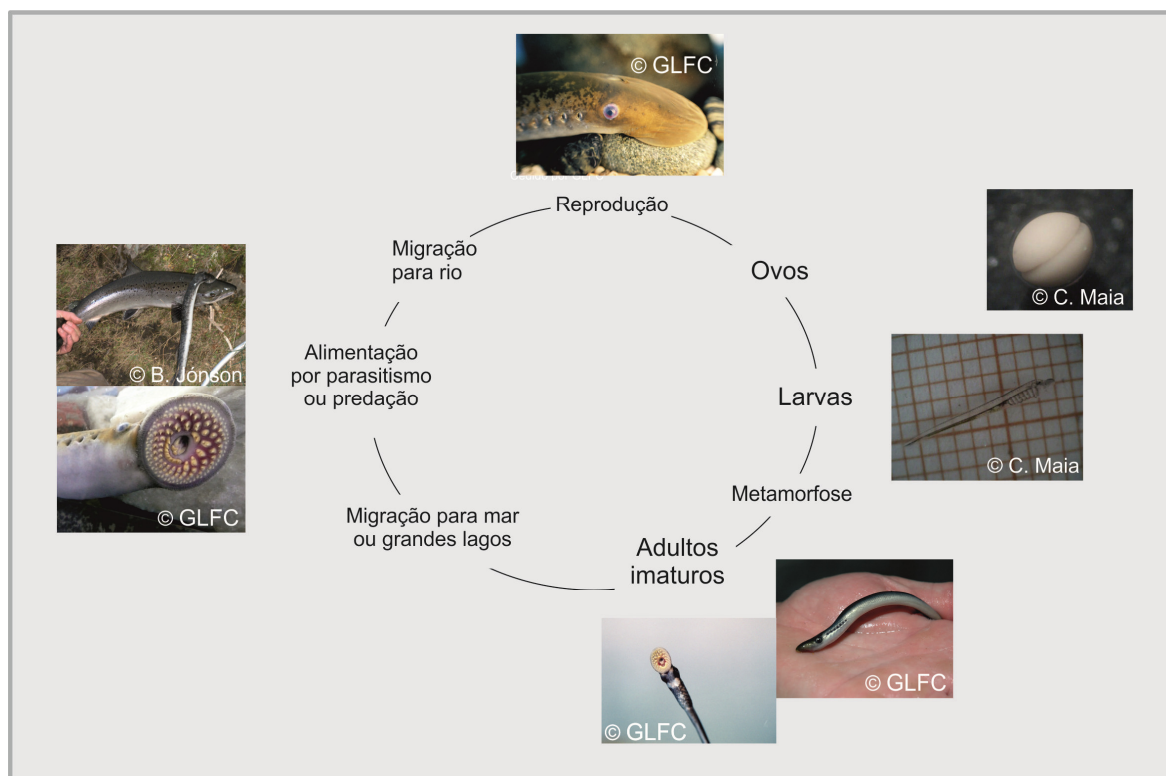


Figura 2 Ciclo de vida de uma lampreia anádroma

Durante a metamorfose, têm efeito alterações profundas na morfologia e fisiologia. Os indivíduos passam a ter olhos funcionais e o capucho oral (uma estrutura situada na parte anterior e superior da cabeça que cobre parcialmente e protege a zona bucal) transforma-se num disco com numerosos dentes e uma estrutura central em forma de pistão. Há também alterações em múltiplos órgãos internos dos animais, em alguns casos com transformações das mesmas estruturas, e, noutros, com regressões e formações de novas estruturas. Exemplos de estruturas que se alteram são a transformação do endóstilo em tiróide e modificações no coração e cesto branquial. Por outro lado, a ligação do intestino à boca é feita tardiamente, com regressão completa das estruturas pré-existentes e formação de uma nova ligação a partir de uma projecção do tecto da faringe (Hardisty & Potter 1971, Hardisty 2006). As modificações nos intestinos e rins são particularmente importantes para a aquisição da capacidade osmorregulatória, particularmente em espécies que vão migrar para o mar (Hardisty 2006). Durante a

metamorfose os indivíduos não se alimentam (Hardisty & Potter 1971; uma exceção a esta situação ocorre na espécie *Lethenteron kessleri* Anikin, 1905, que se alimenta durante a metamorfose exclusivamente de algas unicelulares (Renaud 2011)).

A metamorfose é muito semelhante nas várias espécies de lampreias, o que permitiu a definição de sete estádios comuns às várias espécies, baseados em alterações em cinco caracteres morfológicos externos das larvas (Potter et al. 1982). Assim, mudanças no aspecto, forma e tamanho do olho, modificações do capucho oral, e região pré-branquial da larva, crescimento das barbatanas, modificações na coloração do corpo e modificações na região branquial, com alterações na forma dos branquióporos, permitem classificar as várias fases da metamorfose (Youson & Manzon 2012).

Youson e Manzon, em 2012, reviram as condições até agora conhecidas que influenciam a metamorfose. Em termos de factores abióticos, um aumento da temperatura da água nos meses que antecedem o início da metamorfose (mais do que a temperatura em si) parece fundamental para iniciar a metamorfose, o que explica o facto de em quase todas as espécies este processo ter início entre o Verão e o início do Outono. Embora houvesse sugestões de que o fotoperíodo poderia ter impacto na metamorfose, devido à incapacidade de larvas às quais foi removida a glândula pineal metamorfosarem, estudos controlados em que se sujeitaram larvas a luz natural e a condições controladas de luz-escuridão (Holmes et al. 1994) ou em ambientes de luz controlada e ambientes de escuridão total (Youson et al. 1993) mostraram que o fotoperíodo em si não tem efeito na metamorfose, embora a glândula pineal possa ter algum papel.

Diversos estudos mostraram que, em *P. marinus*, um comprimento total mínimo de 120 mm e um peso de 3 g é necessário para iniciar a metamorfose (Youson & Manzon 2012). Noutras espécies de lampreias, uma maior variação nestes parâmetros parece estar presente (Youson & Mazon 2012). Em *P. marinus*, foram identificadas duas fases no que respeita ao metabolismo dos lípidos (Figura 3): a partir do terceiro ano, as larvas começam uma fase lipogénica, levando à acumulação de lípidos, sobretudo na prega nefrítica, coluna gorda, septos musculares e tecido adiposo subcutâneo. Esta acumulação tem o seu máximo imediatamente antes da metamorfose. Por outro lado, a partir do início da metamorfose, os animais deixam de se alimentar, iniciando-se uma fase lipolítica. Estas variações no metabolismo vieram sugerir que a acumulação de lípidos poderia sinalizar o início da metamorfose. A existência de uma proteína produzida pelo tecido adiposo em mamíferos, designada leptina, com papéis conhecidos na reprodução, crescimento, resposta ao stress e funcionamento da tiróide, levou a que se

iniciassem estudos no sentido de identificar proteínas com função equivalente em lampreias. Ainda não foi possível identificar uma proteína idêntica à leptina, embora haja já alguns indícios da sua existência (Yaghoubian et al. 2001).

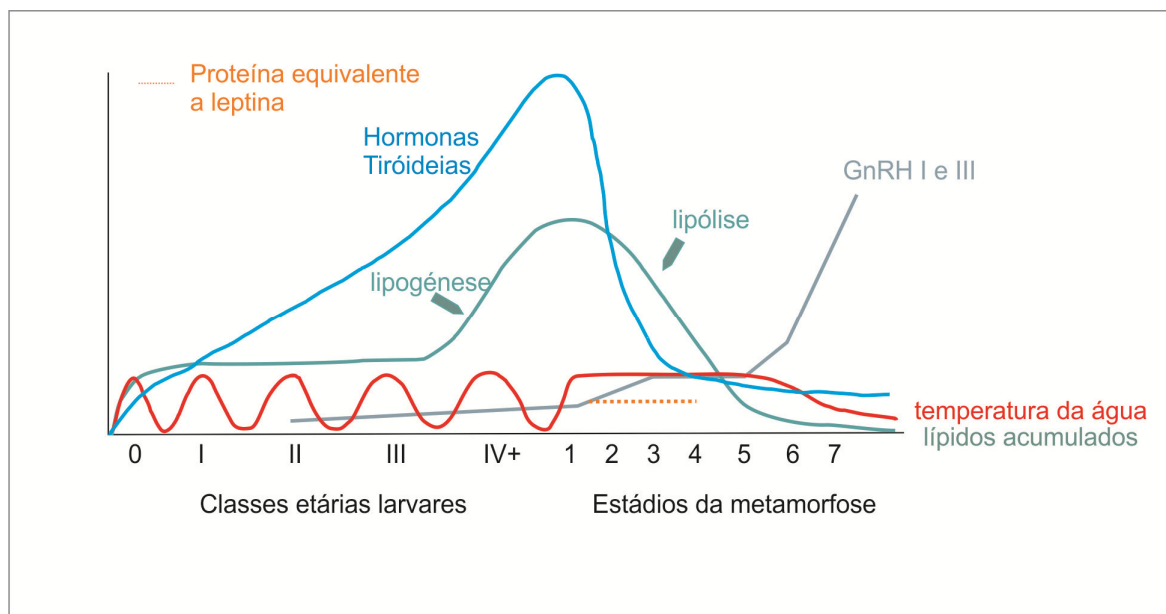


Figura 3 Representação esquemática dos factores com influência conhecida na metamorfose de lampreias e respectiva variação ao longo das diferentes fases larvares e metamórficas (Adaptado de Youson & Manzon 2012)

Em termos hormonais, é conhecido o papel das hormonas tiróideias na metamorfose em lampreias e noutros vertebrados. No entanto, ao contrário do que acontece noutros vertebrados, a metamorfose em lampreias está relacionada com uma descida abrupta nos níveis séricos das hormonas tiroxina (T_3) e triiodotironina (T_4) (Figura 3). Durante o crescimento larvar, estas hormonas são produzidas pelo endóstilo, uma estrutura subfaringica que é substituída pela tiróide durante a metamorfose. A partir da fase I da metamorfose, há uma diminuição da afinidade das células do endóstilo para o iodo, o que inibe a síntese das hormonas em causa. O facto de inibidores da produção das hormonas T_3 e T_4 (perclorato de potássio ($KClO_4$), tiocianato de potássio ($KSCN$) e metimazol (MMI)) levarem a um aumento do número de larvas metamorfoseadas indica que as hormonas tiróideias têm efeito no desencadeamento da metamorfose, embora a sua diminuição possa também ser consequência deste processo (Youson & Manzon 2012). No entanto, as metamorfoses induzidas por inibidores da produção de T_3 e T_4 não foram síncronas como as espontâneas, e não há evidência de que produzam indivíduos com capacidade de se alimentarem, o que leva a crer que outros factores estão também envolvidos na metamorfose (Youson & Manzon 2012). É de referir que, embora este sistema seja aparentemente contrário ao conhecido noutros vertebrados, devido às

concentrações séricas de tiroxina e triiodotironina baixarem após a metamorfose, os valores absolutos mais baixos destas hormonas durante a metamorfose (na fase 6) são equivalentes aos que ocorrem na fase em que estão mais concentradas na metamorfose doutros vertebrados (Youson & Manzon 2012). Assim, Youson e Manzon sugerem que as hormonas tiróideias têm dois efeitos no desenvolvimento das lampreias: “Durante o período larvar, as hormonas tiróideias promovem a alimentação, crescimento larvar e a acumulação de lípidos, mas agem como hormonas juvenilizantes ao inibir a metamorfose. Subsequentemente, na sequência de um sinal desconhecido, a metamorfose inicia-se e níveis muito mais baixos de hormonas tiróideias são necessários para conduzir os processos morfogenéticos associados à metamorfose, como foi observado noutros vertebrados” (Youson & Manzon 2012, pp. 40-41).

Finalmente, sabe-se que o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas está também envolvido na metamorfose. Foram já identificados dois (possivelmente três) factores de libertação de gonadotropinas (GnRH-I, GnRH-III e eventualmente GnRH-II) que actuam no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, controlando a reprodução em lampreias (Sower et al. 2009). Um aumento nos níveis de GnRH-I e GnRH-III no cérebro de indivíduos de três espécies de lampreias foi demonstrado durante a metamorfose (Figura 3), com um pico no final deste processo, o que também acontece em indivíduos com metamorfoses induzidas por perclorato de potássio, embora em fases diferentes da metamorfose (Youson & Manzon 2012).

Após este processo, em algumas espécies, os adultos migram para o mar ou para grandes lagos. Nesta fase do seu ciclo de vida, vão alimentar-se fixando-se com o seu disco oral a presas e sugando fluídos corporais ou arrancando pedaços de músculo (Renaud et al. 2009). O pistão central perfura a superfície da presa, os dentes ferem-na e várias lâminas mais ou menos desenvolvidas podem arrancar pedaços de músculo. As espécies que permanecem agarradas a presas durante longos períodos, e que se alimentam sobretudo de sangue, designam-se por parasitas. Um exemplo deste tipo de espécies é a lampreia marinha *Petromyzon marinus*. As espécies que se alimentam sobretudo de pedaços de músculo, e cujas presas não sobrevivem mais do que uns dias, designam-se por predatórias. Este é o caso de *Lampetra fluviatilis* (Linnaeus, 1758), a lampreia de rio europeia. As principais presas das espécies do hemisfério norte são trutas, salmões, esturjões, arenques, bacalhaus e mamíferos marinhos (Hardisty & Potter 1971, Nichols & Hamilton 2004, Hardisty 2006, Nichols & Tscherter 2010). Esta fase dura entre 6 meses (descrito em alguns indivíduos de *P. marinus*, embora nesta espécie a

fase trófica dure normalmente entre 18 e 28 meses) e pelo menos 2 anos (em *Entosphenus macrostoma*) (Renaud 2011).

Durante esta fase do ciclo de vida, o crescimento é massivo: em *Petromyzon marinus*, os animais passam de 12 a 20 cm (recém-metamorfoseadas) para 60 a 90 cm de comprimento total (Renaud 2011). No final desta fase, o seu desenvolvimento sexual está concluído – os animais estão maduros sexualmente, possuindo as fêmeas até 300 mil ovos (Hardisty 2006). Os animais começam então a fazer migrações junto à costa, com incursões a maior ou menor profundidade. Nas zonas das plumas dos rios, detectam através do olfacto feromonas na água, que são produzidas pelas larvas nos rios e levadas pela água até ao mar ou grandes lagos. Estas feromonas, o sulfato de petromyzonol e o ácido alocólico, vão levar à entrada dos adultos nos rios, com migração para locais adequados para a reprodução (Bjerselius et al. 2000, Vrieze et al. 2011). Este sistema de produção de feromonas pelas larvas e detecção das mesmas pelos adultos foi aparentemente altamente conservado na evolução de lampreias, já que foi verificado em pelo menos em espécies de três géneros diferentes (Vrieze et al. 2011). A migração dos adultos ocorre durante a noite e durante o dia ficam escondidos (Binder & McDonald 2007). Esta migração pode levar, em algumas espécies, até 15 meses e é desencadeada em diferentes alturas do ano, variando quer consoante a espécie, quer consoante a região e temperatura da água (Hardisty 2006). Os animais não têm *homing* (fidelidade ao curso de água natal), já que entram em qualquer rio que tenha larvas, independentemente de ser o rio onde nasceram ou outro (Hatch & Whiteaker 2009). Desde que iniciam a migração reprodutora, as lampreias não se alimentam. As reservas lipídicas acumuladas são portanto de extrema importância para a sobrevivência nesta fase. Por outro lado, uma degeneração sucessiva de estruturas do corpo, nomeadamente das associadas à alimentação, vai ter efeito durante a migração reprodutora (Hardisty 2006).

Uma vez em locais adequados à reprodução, os machos começam a fazer um ninho no leito dos rios, em zonas de cascalho e areia. Este comportamento envolve o transporte de cascalho e formação de uma depressão no fundo do rio que pode ter até um metro e meio de diâmetro nas espécies de maior dimensão. As fêmeas juntam-se então aos machos, participando na construção da depressão, podendo cada ninho ter um número variável de indivíduos (em *Petromyzon marinus*, os ninhos tanto podem ter apenas um macho e uma fêmea como podem ter mais indivíduos (Kelly & King 2001); em *Lampetra planeri* (Bloch, 1784), os ninhos podem ter até 50 indivíduos (Lasne et al. 2010)). Os machos fixam o seu disco oral à cabeça das fêmeas e enrolam o seu corpo à volta destas, espremendo-o, libertando esperma e estremecendo sincronamente. A fêmea

liberta os ovos e a fertilização é externa. Com a vibração, os ovos fertilizados são enterrados no substrato (Hardisty & Potter 1971). Estima-se que apenas 10 a 15% dos ovos permaneça no ninho (Hardisty 2006), estando os restantes mais vulneráveis à predação por outros animais. No comportamento reprodutor estão envolvidas pelo menos duas outras feromonas derivadas de um ácido biliar (24-sulfato de 7 α ,12 α ,24-trihidroxi-5 α -colan-3-one e sulfato de 3-ceto petromyzonol), as quais atraem e induzem o comportamento de procura em fêmeas ovuladas (Li et al. 2002, Siefkes et al. 2005, Yun 2012). Depois da reprodução, os adultos morrem. Após a eclosão, as designadas pro-larvas enterram-se em locais mais a jusante (Hardisty 2006).

1.2 Espécies pares

A descrição acima caracteriza o ciclo de vida de 18 das 42 espécies vivas actualmente reconhecidas (Lang et al. 2009) (Tabela 1). Nas restantes espécies, o ciclo de vida é equivalente desde a reprodução até à metamorfose, mas a migração pós-metamorfose para alimentação não ocorre e os adultos reproduzem-se até seis a dez meses após a metamorfose no mesmo rio em que nasceram, não se alimentando durante a fase adulta (Docker 2009). Em quase todos os géneros, uma espécie parasita ou predadora (*espécie trófica*, de acordo com a terminologia usada por Docker 2009) terá dado origem a uma ou mais espécies que não se alimentam (*espécies não tróficas*). Para estes conjuntos de espécies foi proposta a designação de *espécies pares* (Zanadrea 1959). Posteriormente, foi proposta a designação de *espécies satélites* para as espécie não tróficas derivadas de uma mesma espécie parasita/predadora (Vladykov & Kott 1979), com o objectivo de enfatizar a possibilidade de uma mesma espécie predadora/parasita estar associada a mais do que uma espécie não-predadora/não-parasita.

A semelhança morfológica entre espécies pares foi intensamente estudada durante o século XX (Hardisty & Potter 1971). As espécies não tróficas partilham entre si o facto de não se alimentarem depois da metamorfose, tendo um intestino funcional no máximo durante algumas semanas durante esta fase (embora este seja formado na metamorfose). Adicionalmente, apresentam uma maturação rápida das gónadas, logo desde o início da metamorfose, com redução do número de oócitos nas fêmeas por atresia, e consequente diminuição da fecundidade (Hardisty & Potter 1971a). No entanto, a morfologia das larvas de espécies do mesmo par é muitíssimo semelhante. De facto, as características tradicionalmente usadas na taxonomia e identificação de larvas de lampreias, tais como o número de miómeros, forma da cauda, medidas das proporções corporais e padrões de pigmentação do precursor da língua e do corpo dificilmente

permitem a distinção de espécies pares (Docker 2009). Em relação ao número de miómeros, por exemplo, não é possível distinguir larvas de *Lampetra fluviatilis* e *L. planeri* (Renaud 2011). O mesmo se verifica em três pares de espécies do género *Ichthyomyzon* Girard, 1858, um género que ocorre na América do Norte, e em *Eudontomyzon* Regan, 1911, outro género europeu. Em indivíduos em estádios avançados da metamorfose ou recém-metamorfoseados, a distinção entre espécies pares torna-se mais fácil, dado que as espécies tróficas têm uma morfologia adaptada à alimentação, enquanto as não tróficas parecem ter perdido algumas destas características. Por exemplo, os dentes nas espécies tróficas de cada par são normalmente mais afiados e o diâmetro do intestino é tendencialmente maior (Vladykov & Kott 1979). As espécies tróficas têm ainda o disco oral e o olho proporcionalmente maiores (Docker 2009). Por outro lado, a maturação das gónadas nos meses que se seguem à metamorfose é claramente diferente (Hardisty 2006). Neste sentido, Hardisty (1964) verificou que o número de oócitos em fêmeas de *L. planeri* e *L. fluviatilis* diferiam, embora houvesse sobreposição entre espécies, considerando a variabilidade intraespecífica. Dado que as espécies não tróficas sofrem uma redução significativa dos oócitos por atresia durante a metamorfose e já na fase adulta, seria mais provável uma identificação correcta de amocetes que já tivessem iniciado a metamorfose com base na contagem do número de oócitos em fêmeas. No entanto, haveria alguma sobreposição entre espécies (Hardisty & Potter 1971a).

Em estudos moleculares, utilizando alozimas, não se obtiveram diferenças entre espécies par europeias (*L. fluviatilis*-*L. planeri*), embora se conseguissem identificar espécies até ao nível genérico (*Lampetra* versus *Petromyzon* versus *Eudontomyzon*) (Engelhorn & Schreiber 1997, Schreiber & Engelhorn 1998). Já nas lampreias asiáticas, Yamazaki e Goto conseguiram distinguir espécies com base em alozimas (Yamazaki & Goto 1998). Com base em estudos utilizando ADN mitocondrial, verificou-se que as diferenças entre espécies do mesmo par são muito pequenas ou mesmo nulas (Docker et al. 1999, Yamazaki et al. 2006, Espanhol et al. 2007, Docker et al. 2012, Capítulo 4). Os mesmos resultados foram obtidos em alguns trabalhos que utilizaram microssatélites: populações simpátricas de duas espécies pares não são distinguíveis usando os marcadores utilizados, ao passo que diferenças entre populações alopátricas estão em muitos casos presentes (Docker 2012).

Tabela 1 Lista das espécies não extintas de lampreias de acordo com Lang et al. 2009. Cada espécie está identificada como trófica ^T ou não trófica ^{NT}. Quando as relações entre espécies par ou satélites estão bem estabelecidas, as espécies estão separadas com •.

Família	Espécie
Geotriidae	<i>Geotria australis</i> ^T
Mordaciidae	<i>Mordacia lapicida</i> ^T <i>Mordacia mordax</i> ^T • <i>Mordacia praecox</i> ^{NT}
Petromyzontidae	<i>Caspiomyzon wagneri</i> ^T “ <i>Eudontomyzon</i> ” <i>hellenicus</i> ^{NT} <i>Entosphenus folletti</i> ^{NT} <i>Entosphenus lethophagus</i> ^{NT} <i>Entosphenus macrostomus</i> ^T <i>Entosphenus minimus</i> ^T <i>Entosphenus similis</i> ^T <i>Entosphenus tridentatus</i> ^T <i>Eudontomyzon danfordi</i> ^T • <i>Eudontomyzon mariae</i> ^{NT} • <i>Eudontomyzon vladykovi</i> ^{NT} • <i>Eudontomyzon stankokaramani</i> ^{NT} <i>Lethenteron morii</i> ^T <i>Ichthyomyzon bdellium</i> ^T • <i>Ichthyomyzon greeleyi</i> ^{NT} <i>Ichthyomyzon castaneus</i> ^T • <i>Ichthyomyzon gagei</i> ^{NT} <i>Ichthyomyzon unicuspis</i> ^T • <i>Ichthyomyzon fossor</i> ^{NT} <i>Okkelbergia aepyptera</i> ^{NT} <i>Lampetra fluviatilis</i> ^T • <i>Lampetra planeri</i> ^{NT} • <i>Lampetra zanandrei</i> ^{NT} • <i>Lampetra lanceolata</i> ^{NT} <i>Lampetra pacifica</i> ^{NT} “ <i>Lampetra</i> ” <i>ayresii</i> ^T • “ <i>Lampetra</i> ” <i>richardsoni</i> ^{NT} • “ <i>Entosphenus</i> ” <i>hubbsi</i> ^{NT} <i>Lethenteron alaskense</i> ^{NT} <i>Lethenteron appendix</i> ^{NT} <i>Lethenteron camtschaticum</i> ^T <i>Lethenteron reissneri</i> ^{NT} <i>Lethenteron kessleri</i> ^{NT} <i>Lethenteron</i> sp <i>N</i> ^{NT} <i>Lethenteron</i> sp <i>S</i> ^{NT} <i>Petromyzon marinus</i> ^T <i>Tetrapleurodon geminis</i> ^{NT} • <i>Tetrapleurodon spadiceus</i> ^T

Estas conclusões vieram reavivar as questões relacionadas com a formação de espécies pares e com a especiação em lampreias. Com o objectivo de contribuir para a clarificação dos processos que dão origem à formação de espécies não parasitas, Hardisty e Huggins (1970) tentaram estimar o tempo de crescimento larvar em *L. fluviatilis* e *L. planeri*. Em termos gerais, concluíram que nos rios ingleses, em média, a fase larvar da primeira espécie era de 4.5 anos e a segunda era de 6.5 anos. Por outro lado, a fase trófica de *L. fluviatilis* corresponderia a 2.5 anos, perfazendo portanto o ciclo de vida das duas espécies valores equivalentes. Foi sugerido que a mesma equivalência existisse em outras espécies pares (Hardisty & Potter 1971a). No entanto, a duração das diferentes fases do ciclo de vida em lampreias tem sido estudada na maioria dos casos com recurso a distribuições de comprimento total na natureza, ou com recurso a estatólitos retirados das cápsulas ópticas, com resultados correlacionados com comprimentos totais, métodos com algum grau de incerteza associado (Youson & Manzon 2012).

Comparando o ciclo de vida de espécies tróficas e não tróficas, e sabendo que o ciclo das espécies tróficas constituiu a situação ancestral, tal como proposto por Zanadrea (1959) e comumente aceite (Docker 2009), verifica-se que a constituição de um ciclo de vida não trófico será resultado de qualquer alteração genética/fisiológica levando a um processo de heterocronia, por maturação sexual precoce nas espécies não tróficas (e consequente reprodução logo após a metamorfose) ou, alternativamente, por um atraso na metamorfose, ocorrendo esta em fases nas quais a maturação sexual já está mais adiantada, levando a que a reprodução se dê logo após a metamorfose, sem ocorrer a migração trófica (Hardisty 2006). A evidência disponível mostra que a duração do ciclo de vida em espécies tróficas e não tróficas é equivalente, ocorrendo portanto mais cedo a em indivíduos de espécies tróficas, o que apoia mais fortemente a hipótese da retardação da metamorfose (Hardisty 2006, Docker 2009). Esta alteração terá de ser relativamente simples, já que deverá ter ocorrido múltiplas vezes na evolução de lampreias.

Embora haja já alguma evidência que permite estabelecer a importância do controlo da metamorfose na evolução de ciclos de vida alternativos e o conhecimento acerca dos processos hormonais relacionados com a metamorfose tenha aumentado significativamente nas últimas décadas, ainda são pouco conhecidos os mecanismos que poderão estar relacionados com a criação de ciclos de vida alternativos (Docker 2009).

Independentemente dos processos que terão dado origem à formação de ciclos de vida não tróficos, a fixação destas diferenças parece não ter a mesma intensidade em diferentes grupos de espécies pares. Docker, em 2009, propôs que diferentes estádios de

especiação ocorressem em diferentes espécies pares. Inicialmente, uma espécie trófica não teria espécies pares (estratégia presente em *Petromyzon marinus*), seguidamente uma espécie seria constituída por populações polimórficas, produzindo ambos os fenótipos (estratégia que ocorre em *Lethenteron camtchaticum* (Tilesius, 1811) (Kucheryavyi et al. 2007)), posteriormente a espécie trófica e não trófica diferenciariam-se, o que caracterizaria uma forma de especiação insipiente, sem aquisição de diferenciação morfológica (estratégia presente em *Lampetra fluviatilis* e *L. planeri* ou nos diversos pares de *Ichthyomyzon*). Finalmente, com o passar do tempo, as espécies pares adquiririam diferenciação morfológica (estratégia presente no par *Lampetra fluviatilis*-*Lampetra aepyptera* (Abbott, 1860)), podendo mesmo constituir espécies-relíquia (espécies não tróficas com uma distribuição mais a sul do que qualquer espécie trófica do mesmo género, que possuem aparentemente características ancestrais e terão sido formadas há mais tempo). Deste modo, a aquisição de caracteres distintos seria característica de espécies com elevado tempo de divergência, ao passo que espécies recentes teriam grande homogeneidade morfológica (Docker 2009).

A passagem de uma espécie com populações polimórficas para duas espécies, com o modo de vida fixado, parece ter ocorrido múltiplas vezes em cada espécie não trófica (isto é, um taxon não trófico terá sido originado duas ou mais vezes a partir de formas ancestrais tróficas) (Docker 2009). Assim, estas espécies seriam frequentemente polifiléticas, e portanto inválidas segundo o conceito evolutivo de espécie (Docker 2009). Diferentes populações não tróficas, isoladas geneticamente da forma ancestral trófica, e isoladas geneticamente entre si, por incapacidade de migrar, constituiriam unidades que, com o passar do tempo, devido ao efeito da deriva genética com fixação de genes diferentes em diferentes populações (*lineage sorting*), adquiririam perfis genéticos progressivamente distintos, constituindo novas espécies (Avice 2000).

Este processo parecer ter ocorrido múltiplas vezes durante as glaciações do Pleistocénico, que terão levado à extinção local de muitas das populações não tróficas na Europa e na América do Norte nas suas áreas norte de distribuição e à preservação de populações mais antigas a sul. Em condições interglaciares, tais como as actuais, novas populações não tróficas terão sido formadas em zonas mais a norte, indisponíveis durante as glaciações. Espécies actualmente com distribuições abrangentes ter-se-ão originado sucessivamente a partir de formas tróficas, sendo portanto constituídas por populações não tróficas com diferentes idades e formadas múltiplas vezes (Docker 2009).

Este modelo de evolução assume que a passagem de espécie trófica para espécie não trófica é unidireccional, o que parece ser verdade na maioria dos casos mas não na totalidade. Exemplos de plasticidade no modo de alimentação foram identificados quer em espécies parasitas/predadoras nas quais se produzem formas *preacox*, que se alimentam durante menos tempo e que crescem até um tamanho reduzido (Maitland 2003), quer em espécies que se reproduzem imediatamente após a metamorfose, sem se alimentarem no estado adulto (Kucheryavyi et al. 2007). Existe ainda evidência directa e indirecta de que populações não tróficas originam indivíduos parasitas (Beamish 1987, Docker 2009).

A elevada frequência da formação de formas não tróficas a partir de espécies tróficas, associada à fraca diferenciação quer morfológica, quer genética, e ainda ao facto de ter sido observada a produção de indivíduos com estratégias tróficas e não tróficas na mesma população (Beamish 1987, Kucheryavyi et al. 2007), por vezes reproduzindo-se em conjunto (Cochran et al. 2008, Lasne et al. 2010), levou alguns autores a propor que pelo menos em algumas das espécies pares, estas não constituiriam verdadeiras espécies mas sim estratégias ontogenéticas diferentes na mesma espécie (Docker 2009).

Este sistema tem também sido proposto para vários complexos de espécies pares em peixes. De facto, em muitas taxa de peixes ocorrem sistemas de espécies com semelhanças aos encontrados em lampreias, particularmente em ambientes temperados de água doce do hemisfério norte. A maioria dessas espécies pertence às famílias Salmonidae, Gasterosteidae e Osmeridae (Taylor 1999). Um dos mais estudados sistemas é o do esgana-gata (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758), uma espécie de teleósteo que apresenta populações residentes em água salgada, que se reproduzem em águas litorais costeiras, populações anádromas, e populações residentes em água doce. Nestas últimas, dois morfótipos evoluíram: uma forma limnética, que se alimenta de plâncton, e uma forma bêntica, que se alimenta de invertebrados bênticos. Em termos morfológicos, estas formas apresentam diferenças ao nível do tamanho, forma do corpo, número de placas laterais e branquiespinhas, entre outras (Taylor 1999, Makinen et al. 2006). Estudos acerca da filogeografia deste complexo específico mostraram que as populações de água doce americanas que ocorrem em seis grandes lagos teriam sido originadas por colonizações independentes a partir da forma marinha, sendo que cada um dos morfótipos teria sido originado por uma colonização independente (Taylor 1999, Taylor et al. 2006). Na Europa, o mesmo se verificou, sendo a colonização de ambientes de água doce muito recente (10 mil anos) (Makinen et al. 2006). A distinção ecológica, morfológica e genética encontrada em cada lago entre os dois morfótipos existentes

levou a que esses fossem considerados espécies biológicas (Taylor et al. 2006) formadas por especiação ecológica (Schluter 2009). Entre estas duas formas, admite-se que o isolamento reprodutor seja mantido pela localização diferencial dos ninhos, embora a época de reprodução seja idêntica. No entanto, foi recentemente mostrado o colapso de um destes sistemas num dos lagos americanos, com aumento da frequência dos híbridos face ao descrito anteriormente (Taylor 2006).

Também em muitos salmonídeos se conhece a existência de polimorfismo relativamente ao comportamento migratório (Taylor 1999, Docker 2009). As diferentes formas (anádroma e residente em água doce) apresentam também diferenças morfológicas, em alguns casos adaptadas por um lado à prevalência em água doce, e por outro ao dispêndio energético necessário para as migrações (Taylor 1999). Estudos genéticos não encontraram diferenças significativas na frequência alélica em diferentes formas simpátricas (Docker & Heath 2003, Olsen et al. 2006, Heath et al. 2008), tendo as populações residentes origens múltiplas a partir das formas migratórias (Docker 2009).

A plasticidade encontrada nestes sistemas parece semelhante à encontrada em espécies pares de lampreias. No entanto, enquanto nestas espécies (ou complexos de espécies) se optou pela manutenção de uma única designação binomial para identificar uma espécie com diferentes morfótipos, em lampreias, optou-se, na maioria dos casos, pela identificação de várias espécies, sendo que a não trófica se apresenta como para ou polifilética.

Neste sentido, alguns autores propuseram que o tipo de ciclo de vida, trófico ou não trófico, apresenta uma plasticidade que não é compatível com o facto de ser um critério de diagnóstico de espécie. Segundo estes autores, a produção de indivíduos com estratégias ontogenéticas alternativas na mesma população assegura o fluxo genético entre as diferentes formas, o que contribuiria para a falta de diferenciação genética observada nos estudos utilizando marcadores moleculares (Docker 2009). Esta situação torna-se ainda mais complicada quando, por alterações ambientais como os ciclos glaciares, um dos habitats, por exemplo o marinho, deixa de ser habitável a uma dada latitude de forma que as formas de água doce subsistem sem contacto com o restante pool genético da espécie.

1.3 Espécies presentes em Portugal

Em Portugal, de acordo com a classificação tradicional, ocorrem três espécies de Lampreias: *Petromyzon marinus*, a lampreia marinha, *Lampetra fluviatilis*, a lampreia de rio e *Lampetra planeri*, a lampreia de riacho.

Petromyzon marinus é uma espécie parasita anádroma (Figura 4). Ocorre em ambos os lados do Atlântico Norte, estando presente na América desde a costa do Labrador (53°N) até à Flórida (30°N) e na Europa desde o Fiord Varanger na Noruega (73°N) até ao Mediterrâneo ocidental (Kelly & King 2001). Está também presente no Mar Báltico (Polónia, Lituânia, Estónia, Rússia e Finlândia). No Mediterrâneo, ocorre no sul de Espanha e França, em Itália, e também na costa Norte Africana (Marrocos, Algéria e Tunísia) (Bianco 1995, Lebel et al. 2007, Renaud 2011). Há também registos da sua ocorrência no Adriático (Holcik et al. 2004).

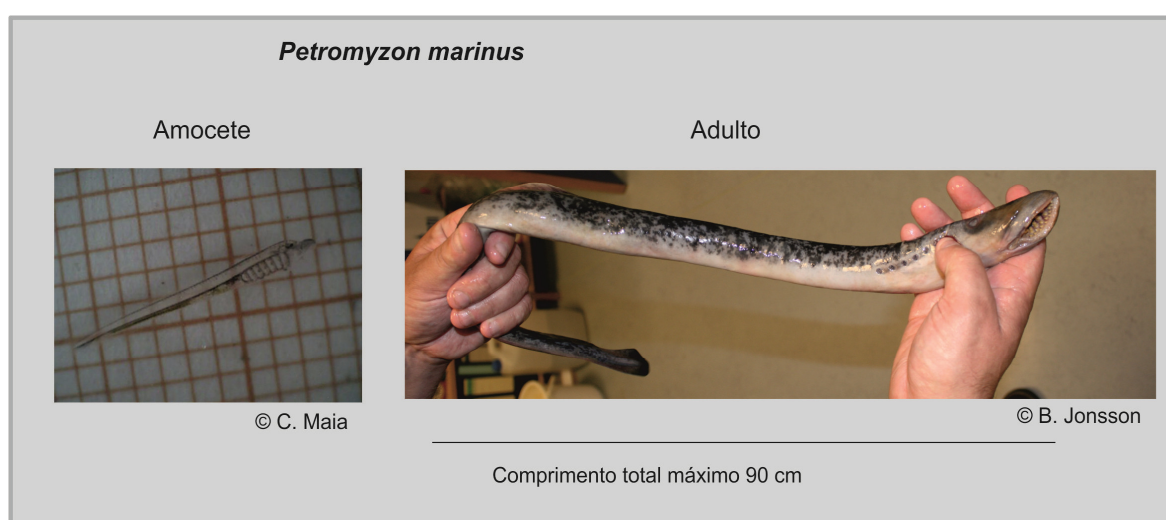


Figura 4 Lampreia marinha *Petromyzon marinus* em fases larvar e adulta

Na América, estão também presentes várias populações exclusivamente de água doce desta espécie. Estas populações ocorrem nos Grandes Lagos, sendo a população do lago Champlain nativa e tendo esta colonizado os restantes (Bryan et al. 2005, Waldman 2006). Na Europa, todas as populações conhecidas são anádromas (Kelly & King 2001, Kottelat & Freyhof 2007).

Petromyzon marinus ocorre em rios com características variáveis, com uma corrente entre 0.03-4400 m³/s no Verão, concentrando-se em áreas de baixa velocidade (<0.2m/s) (Thomas 1962). A temperatura varia entre 10 e 26.1°C, sendo que a temperatura ótima

para a reprodução (temperatura para a eclosão e primeiros estádios de desenvolvimento larvar) varia entre 15 e 16°C (Rodriguez-Muñoz 2001, Renaud 2011). A reprodução ocorre entre Maio e Junho, dependendo da latitude e temperatura da água. Os ovos têm um diâmetro de 0.8 a 1.25 mm e são brancos opacos. Depois de eclodirem, as larvas movem-se passivamente para jusante, para zonas com substrato de areia e cascalho, com uma componente de vaza, qualidade da água elevada e correntes relativamente estáveis (até 0.6-0.8 m³/s) (Kelly & King 2001, Maitland 2003, Renaud 2011). No entanto, esta espécie também está presente em ambientes mais deteriorados, sendo as larvas tolerantes a ambientes com correntes variáveis (Renaud 2011). Num trabalho realizado em dois rios americanos (Ogemaw creek e rio Carp), duas a três semanas após a eclosão, as larvas estavam a aproximadamente 150 metros do ninho (Derosier et al. 2007).

Durante a fase larvar, alimentam-se de partículas em suspensão, não apresentando selectividade. Uma grande percentagem do seu alimento consiste em matéria orgânica em suspensão, alimentando-se também de algas (Kelly & King 2001). A temperatura óptima para o crescimento das larvas é entre 10 e 14°C (Hardisty & Potter 1971b). A duração da fase larvar foi estimada em 2 a 19 anos, sendo 5 anos a duração mais frequente (Renaud 2011). Em Portugal, foi estimada uma duração de 4 anos (Quintella et al. 2003). A metamorfose dá-se quando apresentam entre 14 e 16 cm de comprimento total (Beamish 1980, Morman 1987), sendo a temperatura ideal para a metamorfose próxima dos 21°C (Holmes & Youson 1998). Este processo dura entre 3 e 10 meses e inicia-se tipicamente em Julho. Nas fases finais da metamorfose, no estádio designado por macroftálmia, os animais já têm capacidade osmorregulatória, o que lhes permitirá, assim que tenham terminado a metamorfose, migrar para o mar (nas populações residentes nos Grandes Lagos Americanos, as migrações são para estas grandes massas de água doce). Esta migração é nocturna, é desencadeada por um aumento na descarga dos rios (Kelly & King 2001) e ocorre normalmente entre Novembro e Abril (Hardisty & Potter 1971).

Uma vez no mar, a lampreia marinha alimenta-se por parasitismo. As suas principais presas são esturjões, arenques, bacalhaus, salmões, trutas e mamíferos marinhos (Maitland 2003). Ao largo das águas portuguesas e em geral na parte sul da área de distribuição, muitas destas presas são raras ou inexistentes, pelo que seria interessante verificar quais as presas desta espécie nestes locais. Esta fase trófica dura normalmente entre 18 e 28 meses (Farmer 1980). Findo este período, os adultos têm entre 60 e 90 cm e podem pesar até 2.5 Kg. Iniciam então a migração reprodutora, que ocorre tipicamente

entre Abril e Maio. Em Portugal, esta migração inicia-se em Fevereiro e termina em Abril (Maitland 2003, Quintella et al. 2004). A escolha dos locais para construção dos ninhos encontra-se relacionada com o tamanho do sedimento, sendo preferidos locais com sedimento entre 1.5 e 11 cm de diâmetro, e com a corrente da água, sendo frequente a escolha de locais com correntes entre 1 e 2 m/s (Hardisty 1986).

Em termos globais, o estatuto de conservação desta espécie é *Baixo risco / Pouco preocupante* (IUCN 2012). Embora a sua frequência seja baixa, a ampla distribuição desta espécie justifica este estatuto. Por outro lado, a recuperação de populações da Europa central que estavam em franco declínio também justifica a adopção do mesmo. Em Portugal, assim como em Espanha, o seu estatuto é *Vulnerável* (Doadrio 2002, Cabral et al. 2005). Em Portugal, está presente nas principais bacias hidrográficas a norte do Sado (Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego e Tejo) e também no Guadiana (Cabral et al. 2005).

As principais ameaças a esta espécie são a destruição de habitats e diminuição da área disponível. Por um lado, a construção de barragens impede que zonas mais a montante sejam utilizadas pelas fases larvares desta espécie por impedir as migrações reprodutoras. Mateus et al. (2012) estimaram que 80% da área historicamente utilizada por lampreias em cada bacia da Península Ibérica esteja agora inacessível, devido à construção intensiva de barragens e açudes durante a segunda metade do século XX. Por outro lado, a extracção de inertes leva a alterações no substrato e nas correntes, ambos com impacto no crescimento larvar (Quintella et al. 2007). A diminuição da qualidade da água tem um impacto conhecido em *P. marinus*, tendo levado a diminuições do efectivo em populações da Europa central (Freyhof & Kottelat 2008). Finalmente, a sobrepesca, com incidência em indivíduos reprodutores, pode potencialmente ter um efeito muito importante nesta espécie (Cabral et al. 2005, Mateus et al. 2012).

Lampetra fluviatilis, a lampreia de rio, é uma espécie predadora anádroma (Figura 5). Ocorre no Atlântico nordeste, no Mar do Norte e no Báltico, desde a Finlândia e Suécia até à costa oeste de França. Na Península Ibérica, esta espécie está apenas presente, com uma frequência muito baixa, na parte terminal do rio Tejo. No Mediterrâneo, ocorre com uma frequência desconhecida no sul de França (rio Rodão) e Itália (Bianco 1995, Lebel et al. 2007, Renaud 2011). Embora predominantemente migradora, foram registadas algumas populações residentes em água doce na Rússia, Irlanda e Escócia (Renaud 2011).

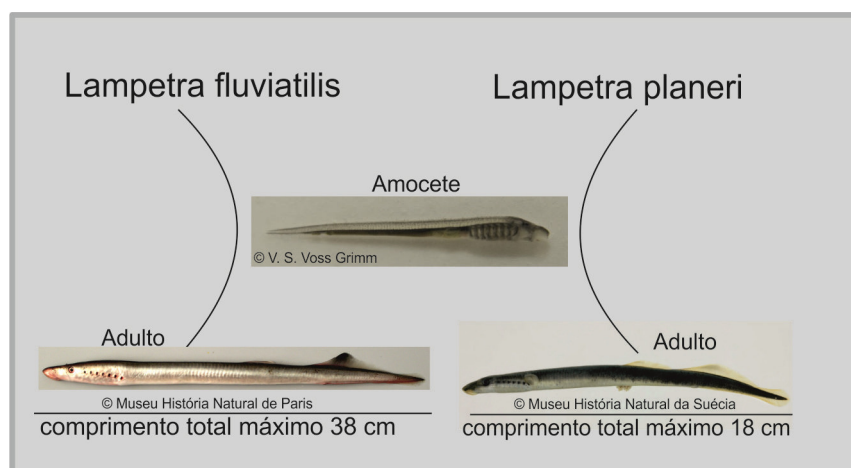


Figura 5 Lampreia de rio (*Lampetra fluviatilis*) e lampreia de riacho (*Lampetra planeri*) em fases larvar e adulta

Em termos morfológicos, no estágio larvar é facilmente distinguível de *P. marinus* pela ausência de pigmentação na região caudal da barbatana e pela ausência de pigmentação na zona ventral do capucho oral (Gardiner 2003).

No que se refere ao seu ciclo de vida, este é muito semelhante ao de *P. marinus*. A duração do estágio larvar nesta espécie está estimada em 4.5 anos (Kelly & King 2001). O comprimento máximo atingido pelas larvas é de 14.5 cm, embora em média a metamorfose se dê quando as larvas atingem os 9-12 cm (Maitland 2003). Após a migração, que, ao contrário do que verifica em *P. marinus*, se restringe à zona dos estuários e áreas adjacentes (Hardisty & Potter 1971), os adultos alimentam-se por predação, sendo as suas principais presas o arenque, a espadilha e a solha. Esta fase dura de 2 a 3 anos, após o que migram para água doce (normalmente em Outubro-Dezembro), reproduzindo-se e morrendo (Maitland 2003). Os adultos antes de se reproduzir podem atingir até 38 cm de comprimento total e 60 g de peso (nas populações residentes em água doce, o comprimento dos adultos é muitas vezes inferior a 20 cm) (Maitland 2003). A fecundidade é altamente variável nesta espécie, possuindo cada fêmea entre 650 e 42500 oócitos (Renaud 2011). Para além destes dois tipos de populações adultas de lampreias de rio (anádroma e residente em água doce), é referida na bibliografia frequentemente, nesta e noutras espécies de lampreias, uma forma *praecox*, que tem um comprimento total entre 18 e 24.5 cm e que terá uma duração da fase trófica reduzida (1.5 a 1.75 anos em contraste com os 2.5 a 2.75 anos na forma anádroma) (Maitland 2003).

O estatuto global de conservação da lampreia de rio é *Baixo risco / Pouco preocupante* (IUCN 2012). Em Espanha encontra-se extinta (Doadrio 2002), embora existam registos históricos da sua presença na parte espanhola do rio Tejo até 1974. Em Portugal, o seu estatuto é *Criticamente em Perigo* (Cabral et al. 2005). Apenas é conhecida a sua ocorrência no rio Tejo, com uma frequência muito baixa. A migração neste rio e afluentes é limitada por várias barragens construídas nos anos 50 e 60: Castelo de Bode (Rio Zêzere), Belver (Rio Tejo), Montargil (Rio Sôr) e Gameiro (Rio Raia) (Mateus et al. 2012). As ameaças à sua conservação são as mesmas que às de *P. marinus*, já que o seu ciclo de vida é semelhante ao desta espécie. No entanto, esta espécie não se encontra sujeita à mesma pressão de pesca, já que é explorada comercialmente apenas na Suécia e Finlândia (Maitland 2003). Também se verifica que embora ocorram nos mesmos rios, a sua distribuição larvar não é a mesma que *P. marinus*. Taverny et al. (2012) mostraram que vários factores como a profundidade, tipo de substrato e vegetação influenciavam e discriminavam a distribuição de *Lampetra* e *P. marinus* num estudo realizado na bacia do Gironde-Dordogne em França. A profundidade preferida por indivíduos do género *Lampetra* era superior a 2 m, e a granulometria do sedimento média a grosseira (em oposição a fina em *P. marinus*). A associação a macrófitas também foi verificada neste trabalho em *Lampetra*.

Lampetra planeri, a lampreia de riacho, é uma espécie não migradora que não se alimenta após a metamorfose (Figura 5). Ocorre em bacias associadas ao Mar Báltico, Mar do Norte, Mar Negro (Bacia do Danúbio), Inglaterra, Escócia e Irlanda, e à costa Atlântica da França (Renaud 2011). Ocorre também em Portugal, nas bacias dos rios Douro, Esmoriz, Vouga, Mondego, Lis, São Pedro, Tejo e Sado, e está também descrita em Itália (Bianco 1995). Em Espanha foram descritas duas populações, uma nos Pirinéus, no rio Olabidea-Ugarana, um afluente do Nivelles que desagua em França (Alvarez & Doadrio 1986), e outra mais recentemente, nos rios Cares e Deva, que confluem num estuário de grandes dimensões (Tina Mayor) que desagua no Mar Cantábrico (Capítulo 6).

Esta é uma espécie par de *L. fluviatilis*. As duas espécies não são distinguíveis nas primeiras fases do estágio larvar, sendo no entanto as fêmeas distinguíveis pelo número de oócitos nas fases mais avançadas de desenvolvimento e já durante a metamorfose (Hardisty 1961).

Em relação ao seu ciclo de vida, o estágio larvar em *L. planeri* dura 6 anos em média, tendo as larvas aproximadamente 13 a 15 cm quando metamorfoseiam (o comprimento

máximo atingido é de 17.7 cm) (Maitland 2003, Renaud 2011). Após a metamorfose, que ocorre tipicamente entre Julho e Setembro no Reino Unido, os adultos migram para montante (as migrações são de curto alcance), em busca de locais adequados para a reprodução (Maitland 2003). Permanecem aí enterrados até que as condições ambientais sejam favoráveis para a reprodução, o que ocorre na Primavera (no Reino Unido, esta ocorre quando a temperatura da água atinge os 10-11°C) (Maitland 2003). Cada fêmea produz aproximadamente 1500 ovos (Hardisty 1961). Os ninhos são construídos por machos e fêmeas, têm aproximadamente 20 a 40 cm de diâmetro, e são construídos em locais com fundo de cascalho fino (partículas com menos de 0.5 cm de diâmetro), com correntes entre 0.2 e 0.3 m/s (Hardisty 1986, Maitland 2003).

A formação de ninhos onde *L. planeri* e *L. fluviatilis* se reproduzem em conjunto foi já descrita diversas vezes (Huggins & Thompson 1970, Lasne et al. 2010). Por outro lado, a viabilidade dos híbridos, pelo menos até à fase de enterramento após a eclosão, foi também demonstrada (Hardisty & Potter 1971a). Os mecanismos propostos para isolamento entre espécies foram a preferência comportamental por indivíduos do mesmo tamanho e a redução da fertilização por a distância entre orifícios reprodutores estar aumentada em indivíduos com tamanhos diferentes (Hardisty & Potter 1971a, Beamish & Neville 1992). No entanto, como descrito acima, o fluxo genético entre as duas espécies não está excluído (Docker 2009).

O estatuto global de conservação da lampreia de riacho é *Baixo risco / Pouco preocupante* (IUCN 2012). Em Portugal e em Espanha, o seu estatuto é *Criticamente em Perigo* (Doadrio 2002, Cabral et al. 2005), devido à diminuição gradual do seu efectivo populacional e à sua reduzida área de distribuição (Cabral et al. 2005).

As principais ameaças à sua conservação são semelhantes às das duas espécies anteriores, sendo que a interrupção de rotas de migração tem uma menor influência, já que as migrações em *L. planeri* são de reduzida amplitude (Mateus et al. 2012). Por outro lado, esta espécie não está sujeita a pesca, pelo que a sobrepesca não se apresenta como ameaça à sua conservação. No entanto, a existência de populações de reduzida dimensão, isoladas de outras populações, confere uma maior fragilidade a *L. planeri*. O facto de estar no limite sul de distribuição confere-lhe também maior vulnerabilidade, pois, se as tendências para a diminuição da precipitação e para o aumento da temperatura no Verão se mantiverem, os cursos de água em que estas populações habitam (na sua maioria de pequenas dimensões) podem sofrer grandes alterações, com consequente impacto negativo nas populações.

1.4 Objectivos

Nesta tese, foram estudadas várias questões relacionadas com a filogenia e filogeografia das várias espécies de lampreias que ocorrem em Portugal. Nesse sentido começou-se por estudar a filogeografia de *Petromyzon marinus* na costa ocidental Europeia, com foco na região de Portugal. Este trabalho deu origem ao primeiro artigo incluído nesta tese (Capítulo 2). Posteriormente, devido a um aumento da frequência desta espécie na Islândia, procedeu-se a um pequeno estudo em que se verificou qual a origem geográfica destes indivíduos que, à partida, tanto poderiam vir da costa europeia como da costa americana, dando origem ao segundo artigo que compõe esta tese (Capítulo 3). A relação entre as duas formas de *Lampetra* na Europa ocidental foi estudada, com recurso a um estudo filogeográfico, com o objectivo de identificar unidades de conservação em Portugal. Este trabalho deu origem ao terceiro artigo desta tese (Capítulo 4). Posteriormente, foi possível verificar a relação de uma população em risco (de pequena dimensão) de *Lampetra* não trófica com as restantes populações estudadas, o que deu origem ao quarto artigo que compõe esta tese (Capítulo 5). Numa colaboração com colegas espanhóis, foi ainda possível identificar uma nova população de *Lampetra* em Espanha (quinto artigo desta tese) (Capítulo 6). As relações desta população com as outras populações de *Lampetra*, nomeadamente com a única outra população conhecida em Espanha, deram origem ao sexto artigo desta tese (submetido) (Capítulo 7). Finalmente, a comparação entre os padrões filogeográficos de lampreia marinha *Petromyzon marinus* e de lampreia de rio *Lampetra fluviatilis* deu origem ao último artigo desta tese (submetido) (Capítulo 8).

Na apresentação dos trabalhos que integram esta tese, optou-se por usar uma ordem temática, apresentando primeiro os que se relacionam com a lampreia marinha, depois os que se relacionam com *Lampetra* e finalmente os que comparam as formas migratórias dos dois grupos.

Lista de artigos incluídos nesta tese por ordem cronológica:

Almada, V.C., Pereira, A.M., Fonseca, J.P., Levy, A., Maia, C. & Valente, A. (2008) Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea-lampreys along European shores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 391-396.

Pereira, A.M., Robalo, J.I., Freyhof, J., Maia, C., Fonseca, J.P., Valente, A. & Almada, V.C. (2010) Phylogeographical analysis reveals multiple conservation units in brook lampreys *Lampetra planeri* of Portuguese streams. *Journal of Fish Biology*, 77: 361-371.

Perea, S., Garzon, P., Gonzalez, J.L., Almada, V.C., Pereira, A. & Doadrio, I. (2011) New distribution data on Spanish autochthonous species of freshwater fish. *Graellsia* 67: 91-102.

Pereira, A.M., Almada, V.C. & Doadrio, I. (2011) Genetic relationships of brook lamprey of the genus *Lampetra* in a Pyrenean stream in Spain. *Ichthyological Research*, 58(3): 278-282.

Pereira, A.M., Jonsson, B., Johansson, M., Robalo, J.I. & Almada, V.C. (2012) Icelandic lampreys (*Petromyzon marinus*): where do they come from. *Ichthyological Research*: 59(1): 83-85.

Pereira, A.M., Doadrio, I. & Almada, V.C. (submetido) Origination of different stocks of brook lampreys in Spain from *Lampetra fluviatilis* at two distinct times and places. *Journal of Fish Biology*.

Pereira, A.M. & Almada, V.C. (submetido). Phylogeography of *Lampetra fluviatilis* - Contrasts in the patterns found in two migratory lampreys in Western Europe. *Frontiers in Biogeography*.

CAPÍTULO 2

**Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea
lampreys along European shores**

CAPÍTULO 2

Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea lampreys along European shores

Introduction

The sea lamprey, *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758 occurs on both sides of the North-Atlantic. While in North America it became a serious problem for many aquatic ecosystems after it invaded the great lakes (Bryan et al. 2005), in Western Europe its conservation is raising increasing concerns (Maitland 2003). Being anadromous, the sea lamprey migrates into rivers and must reach gravel streams where spawning takes place. The larvae are carried downstream and must find suitable muddy/sandy substrata where they live, buried in the sediment for several years, filter feeding on particles carried by the moving water. After the larval stage, the young lampreys, which acquire fully functional eyes and become active swimmers, migrate to the sea, where they live at least two years biting and sucking blood and other tissues from fish (e.g. Hardisty & Potter 1971). With such a life-cycle, sea lampreys are vulnerable to a variety of disturbances: they must survive the crossing of estuaries, typically among the most polluted parts of rivers; they must find their way upstream, often a problem when dams and other kinds of river obstructions have been built; they must find water with the right flow and gravel with the right size for the adults to spawn and the larvae to hatch; and, growing larvae must find clean productive grounds where water velocity and sediment structure are appropriate for their growth. In addition, in some European countries, there is a very profitable fishery of sea lampreys, placing an additional burden on the populations (Kelly & King 2001).

Despite its economical value and high conservation priority, little information is available on the structure of sea lamprey populations that spawn in Western Europe. Rodríguez-Muñoz et al. (2004), using a fragment of 511 bp of the control region of the sea lamprey mitochondrial genome, found that individuals spawning in the rivers Minho and Cella, separated by about 500 km, showed similar patterns of haplotype distribution. They also noted that no haplotypes were shared with samples from North America. In addition, their data suggested that the Iberian populations were much less diverse genetically (three haplotypes in 45 specimens) than the Western Atlantic populations (11 haplotypes in 71 specimens). These findings led Rodríguez-Muñoz et al. (2004) to raise the possibility that

the sea lamprey underwent a severe bottleneck in Southwest Europe. Bryan et al. (2005), using microsatellites, also found that in a Portuguese River (Mondego), the genetic diversity was very low when compared with that found in North-western Atlantic rivers, supporting the finding of Rodríguez-Muñoz et al. (2004). They suggested that a serious reduction of effective population size may have occurred in Europe as a result of the fisheries that exploit sea lamprey in several countries.

Both microsatellites (Bryan et al. 2005) and mtDNA control region (Waldman et al. 2006) revealed a notorious lack of differentiation among the North American rivers draining into the Atlantic. This lack of differentiation is not caused by insufficient variability in the markers used, as demonstrated by the differentiation among populations of lakes where the sea lamprey is possibly native (Bryan et al. 2005, Waldman et al. 2006). More likely, the lack of structure in Atlantic rivers results from the lack of homing in this species (Bergstedt & Seelye 1995). Instead of homing, the sea lampreys are attracted by unknown cues coming from the rivers and by pheromones secreted by amocoetes (e.g. Bjerselius et al. 2000) which means that after a local extinction the re-colonization of a river may be difficult.

In this paper, we used a fragment of 624 bp of mtDNA of the sea lamprey control region, from specimens collected in rivers ranging from the Rhine to the Guadiana (Southern Portugal) and encompassing a substantial fraction of the Western European shore. This fragment includes the region sequenced by Rodríguez-Muñoz et al. (2004). Our aim was to test for possible structure when fish coming from different rivers were compared.

Methods

Taxon sampling

DNA sequences were obtained from 273 individuals (GenBank Accession Nos. from EF565470 to EF565742; for collection site locations, see Figure 1 and Table 3 in supplementary material). Amocoetes were collected by electrofishing, while tissues of adults were acquired from local fisherman that operates at river mouths.

DNA procedures

Total genomic DNA was extracted from fin clips or pieces of muscle preserved in ethanol by an SDS/proteinase-k based protocol (Sambrook et al. 1989). A total of 624 bp of the control region (d-loop) was amplified using the primers LampFor 5'-ACACCCAGAAACA GCAACAAA-3' and LampRev 5'-GCTGGTTTACAAGACCAGTGC-3' designed for this

study. The amplification process was conducted as follows: 4 min at 94° C, 30 cycles of [94° C (1min), 55° C (1min) and 72° C (1 min)], 10 min at 72° C. Sequencing reactions were performed by Macrogen Inc.

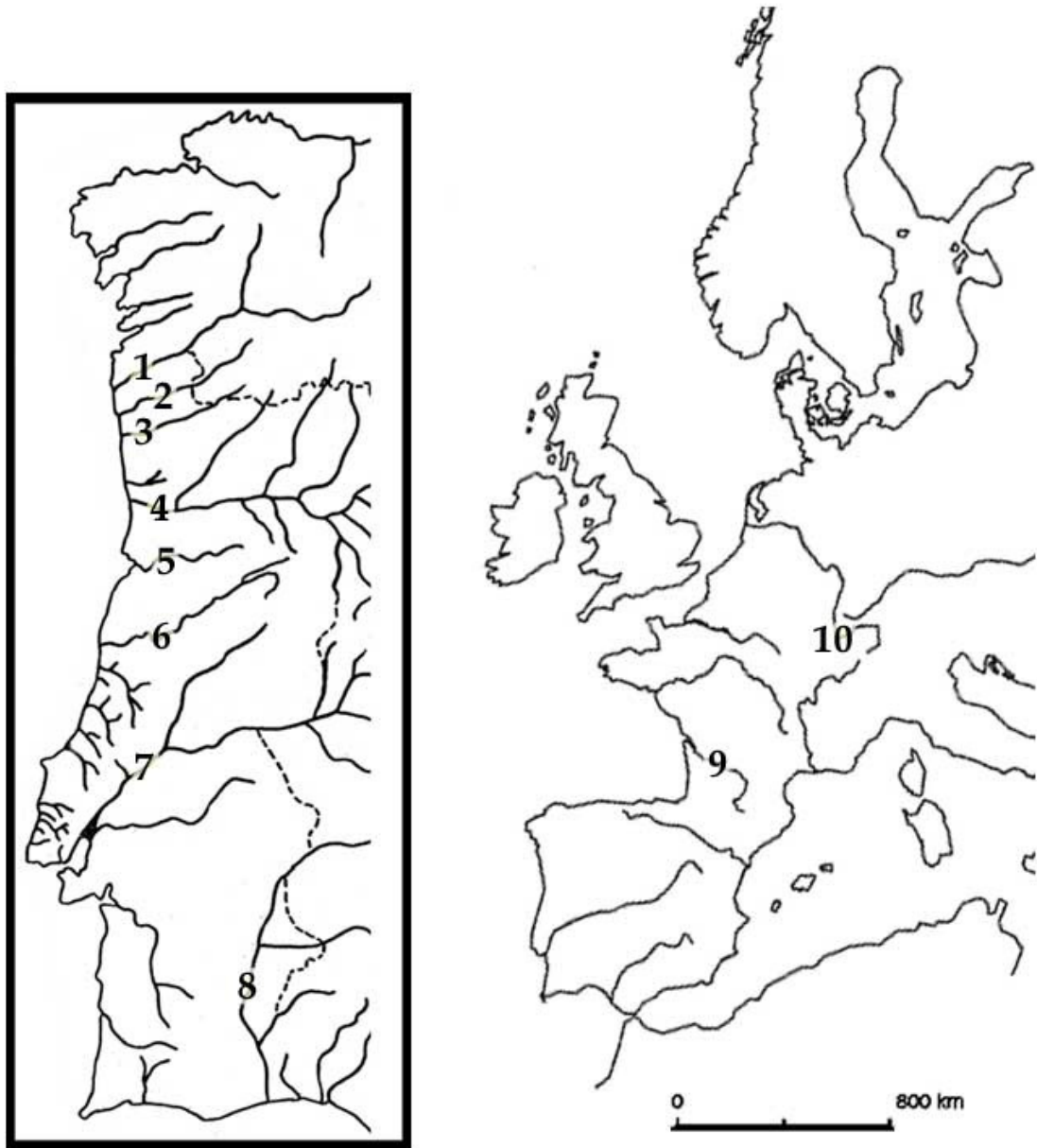


Figure 1 European collection sites for specimens included in this study. Labels for collecting sites in the map: (1) Minho, (2) Lima, (3) Cávado, (4) Douro, (5) Vouga, (6) Mondego, (7) Tejo, (8) Guadiana, (9) Garonne, (10) Rhine.

Data analysis

Sequences were aligned with ClustalX (Thompson et al. 1997). Phylogenetic analysis was performed with PAUP 4.0 (Swofford 2003) using maximum parsimony (MP). Bootstrap

analysis was used to assess the relative robustness of branches of the MP tree (1000 replicates) (Felsenstein 1985). *Lampetra fluviatilis* Linnaeus, 1758 was used as outgroup in all analyses (GenBank Accession No. Y18683). Relationships among haplotypes were analyzed with a parsimony network estimated by the software TCS Version 1.18 (Clement et al. 2000).

ARLEQUIN software package Version 3.01 (Excoffier 2005) was used to estimate genetic diversity indices, to assess population differentiation, to perform neutrality tests and analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992). An analysis of the mismatch distribution (Rogers 1995) was performed to test sudden expansion and spatial expansion models. Mean numbers of inter-population pairwise differences were corrected by subtracting the average within population differences for the populations of each pair. To allow the use of already published data, when comparing genetic diversity between North America and Europe, sequences were truncated and aligned with homologous sequences from two localities in Spain (rivers Minho and Ceta) (Rodríguez-Muñoz et al. 2004) and nine rivers from the North-western Atlantic (Waldman et al. 2006). The haplotype diversity indices of North American and European drainages were compared with a Mann–Whitney U test with STATISTICA 6.0 (StatSoft 2003). In all other calculations, the non-truncated versions of our sequences were used.

In the absence of a calibrated molecular clock for the control region of the sea lamprey, we tentatively used a value derived from the recent literature on fish. Several studies found that the mitochondrial genome of fishes as a whole typically evolve at a divergence rate around 2% per million years. We adopted this value, although aware that most likely it is a conservative one, as the control region tends to evolve at a particularly fast rate when compared with other regions of the mitochondrial DNA. Effective population size (N_e) was inferred given the estimate of diversity index ($\theta = 2N_e\mu$).

Using empirically derived nucleotide frequencies and a single-rate model of molecular evolution, we simulated DNA matrices of identical dimensions as our empirical data, upon 1000 simulated coalescent genealogies for values of N_e from 10^4 to 10^6 , using Mesquite (Maddison & Maddison 2006), and assuming a generation time of nine years (Hardisty & Potter 1971). In the coalescent simulations, population size was assumed to be constant through time. A scaling factor of 10^8 was selected through preliminary runs that provided a mutation rate similar to 2% per million years. From each set of simulations, we obtained

the distribution of average pairwise differences (π), Watterson's nucleotide diversity (θ), and the number of segregating sites (S), using SITES (Hey & Wakeley 1997).

Results

For the d-loop 63 sites were variable and six were parsimony informative. Eighteen haplotypes were found in the 273 samples studied. MP analysis resulted in six trees, with 67 steps (not shown). The MP tree lacked any noticeable structure representing a typical star-like phylogeny. There were no geographical patterns except for some very short branches which included only samples from one or a few locations.

This absence of pattern is clearly visible in the parsimony network obtained with TCS (Figure 2). All populations are dominated by an ancestral haplotype (PMVG8) which occurs in the majority of fish samples from each population. Indeed, 78% of samples correspond to this haplotype. A total of 18 distinct haplotypes were found, with no haplotype separated by more than three mutational steps from the ancestral one. The second most common haplotype (PMVG6) was separated from the ancestral one by a single mutational step. It occurred in 11% of samples and was present in several Portuguese rivers and in the Rhine. Thus, 89% of samples correspond to these two haplotypes, for which no geographical structure is observed. Although the results of AMOVA were significant, the within population variance was overwhelmingly larger than the among population component (Groups considered: Rhine, Garonne, Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, and Tejo; among population variance = 2.67%; within population variance = 97.33%; $F_{ST} = 0.03$; $p < 0.05$). The genetic diversity indices, neutrality test statistics, inter-population corrected pairwise differences, and pairwise F_{ST} s are presented in Tables 1 and 2. The data in Table 2 suggest that the results of AMOVA are, in large measure, an artefact caused by a disproportionately large sampling effort in some Portuguese rivers, which cause the detection of several rare haplotypes. In contrast, the samples from the River Garonne only contained the ancestral haplotype. Inspection of Table 1 shows that rivers as far apart as the Tagus, Minho and Rhine, did not yield significant pairwise F_{ST} s, a finding that we take as clear evidence of lack of a global phylogeographic pattern in the data.

After our sequences were truncated, 12 haplotypes remained, which included the three haplotypes reported by Rodríguez-Muñoz et al. (2004). The rank order of haplotype frequencies between the two studies is identical. All Eastern Atlantic haplotypes are absent from Western Atlantic samples from Waldman et al. (2006), and vice versa.

Overall, haplotype diversity of the Eastern Atlantic (0.289) is much lower than in the Western Atlantic (0.771); river basin haplotype diversities were significantly lower in Europe than in North America (Mann–Whitney U test, $Z = 3.78$, $n = 20$, $p < 0.001$).

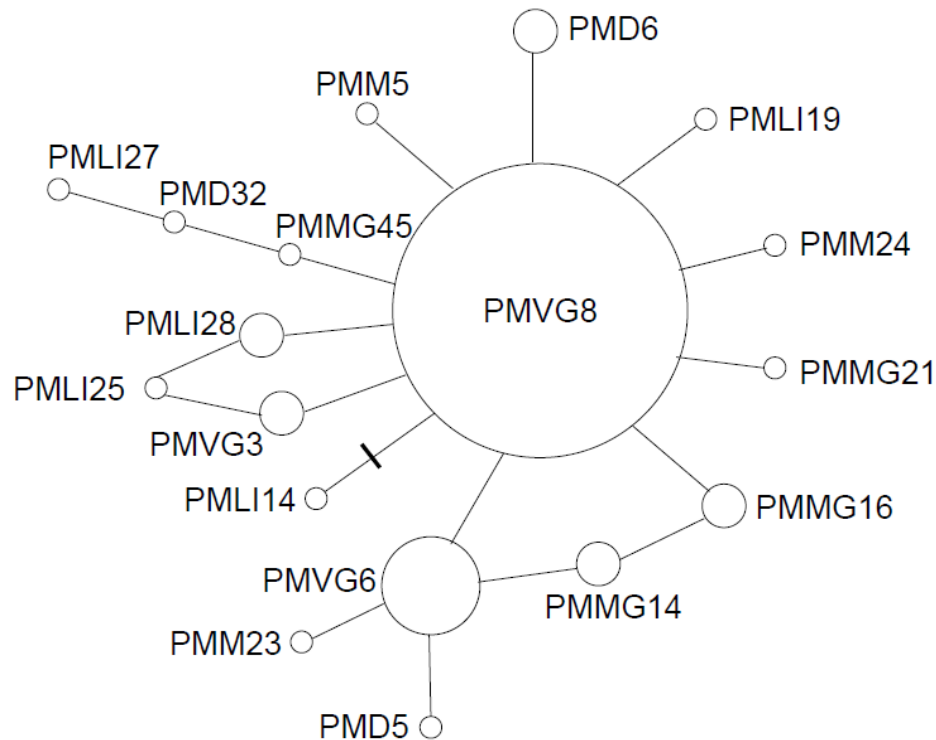


Figure 2 TCS network representing all haplotypes obtained in this study. Labels, number of fish and distribution on each haplotype: PMVG8: 214 fish, Garonne, Cávado, Douro, Guadiana, Lima, Minho, Mondego, Rhine, Tejo and Vouga; PMVG6: 29 fish, Cávado, Douro, Lima, Mondego, Rhine, Tejo and Vouga; PMD5: 1 fish, Douro; PMD6: 4 fish, Douro; PMD32: 1 fish, Douro; PMLI14: 1 fish, Lima; PMLI19: 1 fish, Lima; PMLI25: 1 fish, Lima; PMLI27: 1 fish, Lima; PMLI28: 3 fish, Lima; PMM5: 1 fish, Minho; PMM23: 1 fish, Minho; PMM24: 1 fish, Minho; PMMG16: 5 fish, Mondego; PMMG14: 3 fish, Mondego; PMMG21: 1 fish, Mondego; PMMG45: 1 fish, Mondego; PMVG3: 4 fish, Vouga, Minho, Cávado and Lima.

When all our samples are pooled together, estimates of effective population size, assuming a mutation rate of 2%/Myr, vary from 4200 and 13 055 individuals, using the Tajima (1983) and Watterson (1975) estimates of $\theta \pm \text{SD}$, respectively $\theta_{\pi} \pm \text{SD} = 0.472 \pm 0.456$; $\theta_s \pm \text{SD} = 1.455 \pm 0.559$. Empirical levels of nucleotide diversity (θ and S) are consistent with simulations assuming a 2% mutation rate and a population size (N_e) near 50 000 individuals. However, the average pairwise differences (π) of our data (0.00028) fall within the lower first percentile of simulation results.

Both Tajima's D and Fu's F_s were negative and significant (Table 2), suggesting that the population underwent a recent expansion. Mismatch analysis of the data showed a good fit between expected and observed differences for the pooled data ($SSD = 0.00003129$; $p=0.9582$; Harpending's Raggedness index= 0.1645527 ; $p=0.5477$), also supporting the hypothesis of a sudden expansion.

Both the sudden expansion and spatial expansion models estimate a time of expansion (τ) of 0.5 mutations/generation, or about 40 000 years ago (95% CI: 0–10,000 years). This value falls well within the Pleistocene and, given our likely underestimation of mutation rate when applied to the control region, probably after the end of the last glaciation. The two models vary however in their post-expansion population size estimates: 29 500 individuals after sudden expansion versus 431 700 following a spatial expansion (sudden expansion model $\theta_0 = 0.00$, $\theta_1 = 3.314$, $\tau = 0.516$; spatial expansion model $\theta_0 = 0.001$, $M = 48.489$, $\tau = 0.482$). In both cases, pre-expansion populations are estimated to include only a few thousand individuals.

Discussion

The present results confirm and extend the pattern described by Rodríguez-Muñoz et al. (2004) to an area of Western Europe ranging from the North Sea to Portugal.

The available evidence strongly supports the conclusion that in Europe sea lampreys form a single population, which must be recovering from a recent bottleneck. In addition, the very low genetic diversity of European sea lamprey when compared with the Atlantic coast of North America was clearly confirmed.

The low diversity and haplotype mismatch distribution suggest that the Eastern Atlantic population may be expanding following a recent bottleneck. Our analysis suggest its effective population size may be as low as 50 000. The low average pairwise difference observed in our data relative to that expected in a sample drawn from a constant sized population of 50 000 individuals, suggests that the population is probably growing and the time of the bottleneck may be overestimated.

Table 1 Below the diagonal: population pairwise FSTs . Distance method: pairwise difference. *Represent significant differences between populations. Above the diagonal: corrected average pairwise differences.

	Tejo	Minho	Cávado	Douro	Lima	Garonne	Guadiana	Vouga	Rhine	Mondego
Tejo	-	0.0061	-0.01833	0.00534	0.01877	0.04412	0.04412	- 0.00724	- 0.02778	0.02637
Minho	0.01269	-	0.00653	0.01368	0.00864	0.00753	0.00753	- 0.00655	- 0.00896	0.01287
Cávado	-0.04721	0.01467	-	0.00885	0.01763	0.04615	0.04615	- 0.00665	- 0.02393	0.02916
Douro	0.00247	0.02378	0.01389	-	0.02508	0.03754	0.03754	0.00708	- 0.00511	0.03108
Lima	0.017	0.01175	0.02282	0.03363*	-	0.02553	0.02553	0.00665	0.0045	0.02808
Garonne	0.24380*	0.02517	0.17143*	0.08383*	0.04150*	-	0	0.01587	0.02222	0.02147
Guadiana	-0.625	- 0.93333	-0.65714	-0.78632	-0.88194	0	-	0.01587	0.02222	0.02147
Vouga	-0.0193	-0.0179	-0.0172	0.0114	0.00738	0.08362	-0.82222	-	- 0.01905	0.01353
Rhine	-0.08233	- 0.02899	-0.06779	-0.02734	-0.01774	0.26241	-0.77778	- 0.05733	-	0.01036
Mondego	0.05318*	0.02745	0.06014*	0.05774*	0.04812*	0.04868*	-0.82825	0.02865	0.01349	-

Table 2 Number of individuals sampled (N), number of haplotypes, number of polymorphic sites, gene diversity, mean number of pairwise differences, nucleotide diversity, Tajima's D, Tajima's D p, Fu Fs and Fu Fs p. Values are presented for each population and for all populations pooled together (Western Europe).

	N	Number of haplotypes	Number of polymorphic sites	Gene diversity	Mean number of pairwise differences	Nucleotide diversity	Tajima's D	Tajima's D p	Fu Fs	Fu Fs p
Tejo	17	2	1	0.3824 ± 0.1132	0.382353 ± 0.379406	0.000614 ± 0.000682	0.00000	1.000	0.83402	0.526
Minho	31	6	4	0.3527 ± 0.1088	0.436559 ± 0.402509	0.000701 ± 0.000719	-1.25289	0.068	-4.38603	<10 ⁻⁶
Cávado	26	3	2	0.4277 ± 0.0949	0.446154 ± 0.409976	0.000716 ± 0.000733	0.00000	1.000	-0.24975	0.331
Douro	37	5	4	0.4880 ± 0.0908	0.627628 ± 0.503761	0.001007 ± 0.000899	-1.14569	0.097	-1.65309	0.093
Lima	37	8	8	0.5360 ± 0.0945	0.813814 ± 0.598244	0.001306 ± 0.001067	-2.00635	0.002	-4.45570	0.002
Garonne	26	1	0	0.0000 ± 0.0000	0.000000 ± 0.000000	0.000000 ± 0.000000	0.00000	1.000	n.a.	n.a
Guadiana	1	1	0	1.0000 ± 0.0000	0.000000 ± 0.000000	0.000000 ± 0.000000	0.00000	1.000	n.a.	n.a.
Vouga	28	3	2	0.3148 ± 0.1024	0.325397 ± 0.338302	0.000522 ± 0.000605	-1.00000	1.000	-0.78960	0.180
Rhine	10	2	1	0.3556 ± 0.1591	0.355556 ± 0.375279	0.000571 ± 0.000681	-1.00000	1.000	0.41670	0.392
Mondego	60	6	4	0.3548 ± 0.0771	0.457062 ± 0.408810	0.000732 ± 0.000727	-0.63978	0.282	-3.37914	0.011
Total	273	18	13	0.3745 ± 0.0363	0.471908 ± 0.412565	0.000756 ± 0.000731	-1.93024	0.002	-21.93892	<10 ⁻⁶

In the last glacial maximum and probably repeatedly during the Pleistocene, many of the areas now occupied by the sea lamprey in Europe were glaciated (Climap 1981), and although the waters of North-west Africa were probably of suitable temperature, few rivers were available in the region for the lampreys to spawn and grow. So, it is likely that Iberia was the centre of a much smaller refugial area where the species could survive. Unlike North America, Europe has very few rivers flowing to the South, which makes latitudinal shifts in distribution of freshwater fish much more difficult. On the other hand, it is possible that the aridity and relatively high temperature of Mediterranean rivers limited the use of the Mediterranean area as a refugium for this species.

The lack of differentiation found in European rivers is consistent with the lack of homing repeatedly found for this species (Bergstedt & Seelye 1995) and its ability to travel many hundreds or thousands of kilometres. Fishes with some degree of homing (e.g. salmonids, Neville et al. 2006) tend to display some degree of differentiation among the populations that spawn in different rivers.

Although our results strongly suggest that the sea lampreys of Western Europe form a single large population, it is premature to draw definitive conclusions on this issue. Data from the British Isles and Scandinavia are much needed to get a complete picture of the phylogeography of the sea lamprey in Europe. International cooperation covering as completely as possible the full range of the species, together with additional genetic markers is needed.

Acknowledgments

We thank C. Sousa-Santos, J. Freyhof, A. Paiva and T. Bento for their help in sample collection and fish maintenance. DGRF (“Direcção Geral dos Recursos Florestais”) provided the necessary authorizations for electrofishing. This study was funded by the Pluriannual Program (FCT, UI&D 331/94, partially FEDER funded) and PNAT 1999/BIA/15017.

References

- Bergstedt, R.A., Seelye, J.G. (1995) Evidence for lack of homing by sea lampreys. *Transactions of the American Fisheries Society*, 124: 235–239.
- Bjerselius, R., Li, W.M., Teeter, J.H., Seelye, J.G., Johnsen, P.B., Maniak, P.J., Grant, G.C., Polkinghorne, C.N. & Sorensen, P.W. (2000) Direct behavioral evidence that unique

bile acids released by larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*) function as a migratory pheromone. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(3): 557–569.

Bryan, M.B., Zalinski, D., Filcek, K.B., Libants, S., Li, W. & Scribner, K.T. (2005) Patterns of invasion and colonization of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in North America as revealed by microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, 14: 3757–3773.

Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.

Climap Project Members (1981) Seasonal reconstruction for the earth's surface at the last glacial maximum, GSA Map & Chart Serv., MC-36, Boulder, Geological Society of America, Colorado.

Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.

Excoffier, L.G.L. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50.

Felsenstein, J. (1985) Confidence-limits on phylogenies—an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.

Hardisty, M.W. & Potter, I.C. (1971) The general biology of adult lampreys. In: Hardisty, M.W., Potter, I.C. (Eds.) *The Biology of Lampreys*, vol.1. Academic Press, New York, pp. 127–206.

Hey, J. & Wakeley, J. (1997) A coalescent estimator of the population recombination rate. *Genetics*, 145: 833–846.

Kelly, F.L. & King, J.J. (2001) A review of the ecology and distribution of three lamprey species, *Lampetra fluviatilis* (L.), *Lampetra planeri* (Bloch) and *Petromyzon marinus* (L.): a context for conservation and biodiversity considerations in Ireland. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 101B: 165–185.

- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. (2006) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 1.12. Available from: <<http://mesquiteproject.org/>>.
- Maitland, W.P. (2003) Ecology of the brook, river and sea lamprey. Conserving Natura 2000, Rivers Ecology Series No. 5 English Nature, Petersborough.
- Neville, H.M., Isaak, D.J., Dunham, B., Thurow, F. & Rieman, B.E. (2006) Fine-scale natal homing and localized movement as shaped by sex and spawning habitat in Chinook salmon: insights from special autocorrelations analysis of individual genotypes. *Molecular Ecology*, 15: 4589–4602.
- Rodriguez-Muñoz, R., Waldman, J.R., Grunwald, C., Roy, N.K. & Wirgin, I. (2004) Absence of shared mitochondrial DNA haplotypes between sea lamprey from North American and Spanish rivers. *Journal of Fish Biology*, 64: 783–787.
- Rogers, A.R. (1995) Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49: 608–615.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- StatSoft, I. (2003) STATISTICA (data analysis software system), Version 6. Available from: <www.statsoft.com/>.
- Swofford, D.L. (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4b.10, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tajima, F. (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437–460.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876–4882.

Waldman, J.R., Grunwald, C. & Wirgin, I. (2006) Evaluation of the native status of sea lampreys in lake Champlain based on mitochondrial DNA sequencing analysis. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135: 1076–1085.

Watterson, G. (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7: 256–276.

Supplementary material

Table 3 GenBank accession numbers

River	Country	GenBank Accession numbers
Mondego	Portugal	EF565470; EF565471; EF565494-EF565526; EF565528-EF565539; EF565541-EF565543; EF565673; EF565693; EF565706-EF565713.
Lima	Portugal	EF565472; EF565473; EF565487; EF565490; EF565493; EF565527; EF565540; EF565545; EF565549; EF565551; EF565558; EF565560; EF565563; EF565565; EF565568; EF565569; EF565571; EF565572; EF565584; EF565603; EF565608; EF565618; EF565640; EF565645; EF565648; EF565660; EF565665; EF565675; EF565685; EF565689; EF565691; EF565694- EF565697; EF565704; EF565715
Vouga	Portugal	EF565474; EF565478; EF565483; F565484; EF565547; EF565550; EF565552; EF565561; EF565562; EF565564; EF565566; EF565573-EF565578; EF565598; EF565606; EF565620; EF565625; EF565626; EF565633; EF565652; EF565657; EF565663; EF565705; EF565570
Cávado	Portugal	EF565475; EF565477; EF565480; EF565485; EF565488; EF565491; EF565546; EF565554; EF565592; EF565597; EF565613; EF565614; EF565616; EF565623; EF565631; EF565635; EF565636; EF565651; EF565658; EF565661; EF565664; EF565670; EF565677; EF565687; EF565699; EF565703
Minho	Portugal	EF565476; EF565489; EF565544; EF565548; EF565553; EF565555-EF565557; EF565559; EF565567; EF565580; EF565590; EF565599; EF565605; EF565612; EF565617; EF565622; EF565629; EF565634; EF565643; EF565646; EF565647; EF565655; EF565672; EF565674; EF565684; EF565690; EF565700-EF565702; EF565714
Douro	Portugal	EF565479; EF565481; EF565482; EF565486; EF565492; EF565579; EF565581; EF565582; EF565585; EF565587- EF565589; EF565591; EF565595; EF565600- EF565602; EF565609; EF565611; EF565621; EF565637- EF565639; EF565650; EF565653; EF565654; EF565662; EF565667; EF565669; EF565679- EF565683; EF565686; EF565692; EF565698
Guadiana	Portugal	EF565676
Garonne	France	EF565583; EF565586; EF565593; EF565594; EF565596; EF565604; EF565607; EF565610; EF565615; EF565619; EF565624; EF565627; EF565628; EF565630; EF565632; EF565641; EF565642; EF565644; EF565649; EF565656; EF565659; EF565666; EF565668; EF565671; EF565678; EF565688
Rhine	Germany	EF565716- EF565725
Tejo	Portugal	EF565726- EF565742

CAPÍTULO 3

Icelandic lampreys (*Petromyzon marinus*): where do they come from?

CAPÍTULO 3

Icelandic lampreys (*Petromyzon marinus*): where do they come from?

Abstract The recent discovery of sea lamprey wounds on salmonids in Icelandic rivers prompted an investigation on the origin of sea lampreys in Icelandic waters. Using a mitochondrial DNA fragment, the origin of the lampreys examined was assigned to the European stock and not to the North American one.

Keywords *Petromyzon marinus* • Iceland • Mitochondrial control region • Preying adults in rivers

Introduction

The sea lamprey, *Petromyzon marinus*, occurs on both sides of the North Atlantic, where they are represented by distinct stocks (Rodríguez-Muñoz et al. 2004) in latitudes from 72°N to 25°N (Kelly & King 2001). In North America, its distribution ranges from Newfoundland to Florida (including some inland waters), and in Europe from Norway to the Mediterranean (Kelly & King 2001, Waldman et al. 2006). This anadromous lamprey migrates into rivers where it spawns in nests dug in gravel beds, dying after a short period. The larvae are carried downstream until they reach suitable muddy/sandy substrata where they stay buried in the sediment for several years, filter feeding on particles carried by the moving water (Maitland 2003). After the larval stage, the young lampreys, which acquire fully functional eyes and become active swimmers, migrate to the sea, where they live at least 2 years, biting and sucking blood and other tissues from fish (Hardisty 2006). In North America the presence of this species became a serious problem after the invasion of the Great Lakes and the establishment of populations that complete the entire life cycle in freshwater. They caused very serious declines in several prey species, namely salmonids (Schneider et al. 1996). In Europe, according to the IUCN, the conservation status of this species is the least concern. However, in Western Europe, its conservation status is raising increasing concerns (Maitland 2003).

In the marine waters off Iceland, there have been sporadic records of the parasitic stage of this species, at least since the nineteenth century (Sæmundsson 1926). However, there are no records of reproduction of the species in Icelandic freshwaters and no reports of parasitic lampreys entering rivers (Jónsson & Jóhannsson 2008). In 2006, the presence of sea lamprey wounds in returning sea trout (*Salmo trutta*) caught in freshwater in

southeastern Iceland was reported to the Institute of Freshwater Fisheries, Iceland. It was confirmed by the Institute that sea lamprey wounds were present in trout in several Icelandic rivers. In 2006, three lampreys were caught in marine waters at the south coast, and one was found preying on newly returned salmon (*Salmo salar*) in freshwater in the Ytri Rangá River (63°49.091'N, 20°25.097'W) (Figure 1). This is the first record of sea lamprey attacking returning salmonids in Iceland and the first record of this species in Icelandic freshwater. This record deserves special attention because while typically lampreys entering freshwater to spawn do not feed, this specimen was collected while feeding in the river.

In order to understand the origin of these lampreys, in this article, a 624-bp fragment of mtDNA of non-coding region I from the four specimens described above was sequenced.

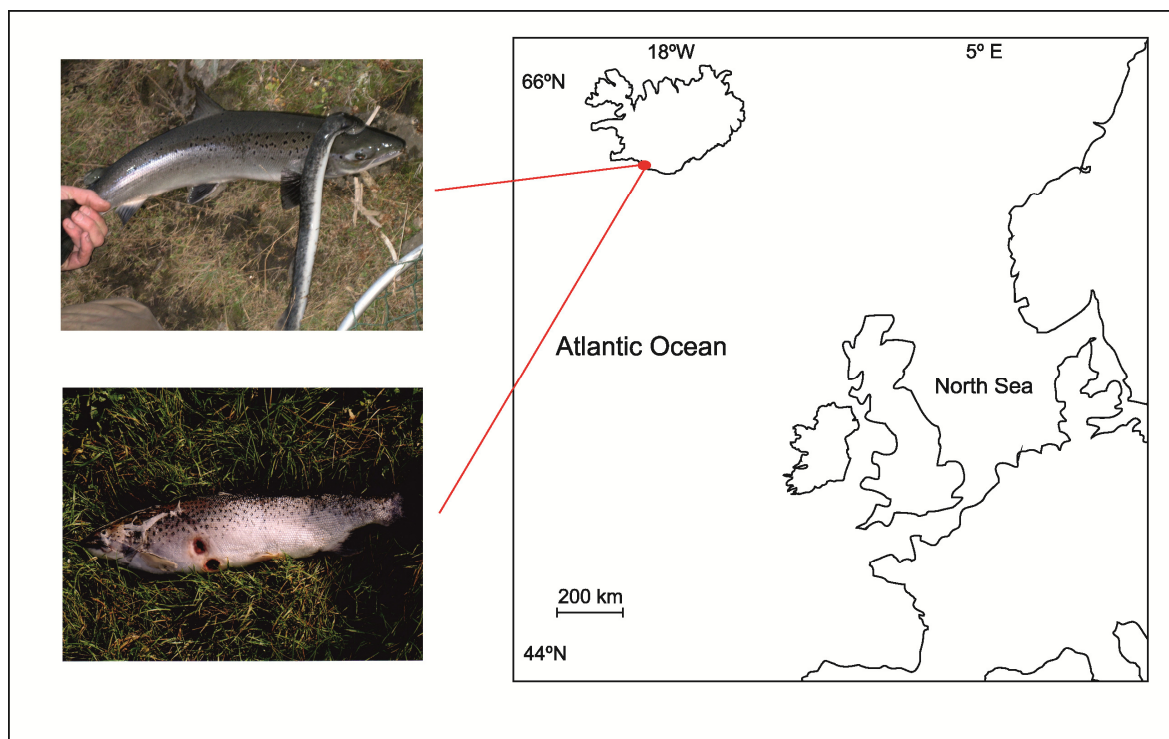


Figure 1 Map with collection site location and photographs of a lamprey preying on a sea trout (upper) and a sea trout with lamprey wounds (bottom)

Materials and methods

DNA sequences were obtained from ethanol-preserved fin clips from four adult lampreys collected in Icelandic water, three in marine waters, and one found preying on newly returned salmon in freshwater in the Ytri Rangá River (63°49.091'N, 20°25.097'W) (Figure 1). The lampreys were caught by local fisherman, frozen, and delivered to the Institute of Freshwater Fisheries, Iceland, where they were deposited. Total genomic DNA was extracted with a REDExtract- N-Amp kit (Sigma-Aldrich, <http://www.sigma.com>). PCR

primers used were LampFor 5'-ACA CCC AGA AAC AGC AAC AAA-3' and LampRev 5'-GCT GGT TTA CAA GAC CAG TGC-3' (Almada et al. 2008). PCR conditions followed Almada et al. (2008). Sequencing reactions were performed in StabVida (Lisbon) on a 3700 ABI DNA sequencer (AppliedBiosystems) using the BigDye terminator DNA sequencing kit (<http://www.stabvida.com>). A 624-bp fragment of mtDNA from the control region (non-coding region I, according to Blank et al. 2008) was sequenced from the four specimens collected (GenBank accession nos. HM245344, HM245345, HM245346, and HM245347).

Sequences were aligned with Clustal X (Thompson et al. 1997) and were compared with all available sequences (Waldman et al. 2006, Almada et al. 2008). The mtDNA fragment used includes the region sequenced by Almada et al. (2008) for the European sea lampreys and Waldman et al. (2006) for the North American ones. Distances among haplotypes were computed using PAUP 4.0b10 (Swofford 2003).

Results and discussion

The four analyzed sequences of *Petromyzon marinus* from Iceland correspond to the same haplotype. This haplotype (PMVG8) was already found by Almada et al. (2008). It was present in 213 individuals out of the 273 analysed in that study, and it was present in samples from the Rhine in Germany to the Guadiana in south Portugal. In order to compare the European haplotypes with the ones obtained by Waldman et al. (2006) from North America, European sequences were truncated to make them homologous with the fragment obtained from American fish. Nine haplotypes from Europe remained, all different from the 18 found in West Atlantic drainages by Waldman et al. (2006). Indeed, the average uncorrected p distance between the haplotype found in Iceland and the European haplotypes is 0.37% (standard deviation, 0.13) and with the North-American haplotypes 1.2% (standard deviation, 0.32). The American haplotype displaying the smallest uncorrected distance to the haplotype found in Iceland is at a distance of 0.6%.

Our data support the conclusion that sea lampreys from Iceland belong to the European stock of this species. The finding of the same haplotype along Europe, from Portugal to Iceland, is in line with the conclusions of Almada et al. (2008). These authors, using the same marker, found that no population differentiation could be detected along West Europe. The lack of structure was interpreted as the result of long migrations in the ocean, combined with poor or no homing. Interestingly, Goodman et al. (2008) found a very similar pattern for another migratory lamprey, *Entosphenus tridentatus*, in the North American Pacific and interpreted it in a similar way. In the future, it would be interesting to

see if this type of phylogeographic pattern holds for other lampreys that spend long periods in the sea.

The findings of this study are concordant with what is known for the Icelandic fish fauna as a whole. Briggs (1995) found that the dominant biogeographic relationships of the Icelandic fauna are with the Eastern Atlantic. Concerning the migratory fish, the occurrence of natural hybrids between European *Anguilla anguilla* and American eel *Anguilla rostrata* has been shown in Iceland (Albert et al. 2006). In the salmonids, apart from species that occur at both sides of the Atlantic, as *Salvelinus alpinus* and *Salmo salar*, the European *Salmo trutta*, is also found in Iceland. Two other migratory species found in Iceland also came from eastern Atlantic stock—*Alosa fallax* and *Acipenser sturio* (Jonsson 1992). At present, there is not enough information on the patterns and causes of large scale movements of sea lampreys in the sea to provide a full explanation, but the presence of Arctic conditions to the west, namely in Greenland (Briggs 1995), coupled with the influence of the Gulf stream in the eastern Atlantic, could explain the absence of lampreys of American origin in Iceland in the fish screened so far.

Two findings of this study deserve further investigation in the future: the increasing records of sea lamprey and the documented occurrence of a lamprey entering freshwater while attacking a salmon. It would be interesting to study in the future to what extent the increasing attacks by sea lamprey in Iceland are coupled with the oceanographic changes that are taking place at high latitudes. The finding of a sea lamprey entering freshwater while preying on a salmon indicates that at least in some conditions, lampreys can move to freshwater while still feeding. The presence of this species in rivers needs to be monitored in the future in order to evaluate if this species is spawning in Icelandic rivers, establishing local larval populations.

Acknowledgments This work was supported by a grant from Iceland, Liechtenstein, and Norway through the EEA Financial Mechanism and the Norwegian Financial Mechanism by the project MarinERA ‘Marine phylogeographic structuring during climate change: the signature of leading and rear edge of range shifting populations’ and by the Eco-Ethology Research Unit (331/94) Pluriannual financing program (Fundação para a Ciência e a Tecnologia; partially FEDER funded).

References

- Albert, V., Jónsson, B. & Bernatchez, L. (2006) Natural hybrids in Atlantic eels (*Anguilla anguilla*, *A. rostrata*): evidence for successful reproduction and fluctuating abundance in space and time. *Molecular Ecology*, 15:1903–1916.
- Almada, V.C., Pereira, A.M., Robalo, J.I., Fonseca, J.P., Levy, A., Maia, C. & Valente, A. (2008) Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea-lampreys along European shores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 391–396.
- Blank, M., Jurss, K. & Bastrop, R. (2008) A mitochondrial multigene approach contributing to the systematics of the brook and river lampreys and the phylogenetic position of *Eudontomyzon mariae*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65: 2780–2790.
- Briggs, J.C. (1995) *Global biogeography. Developments in palaeontology and stratigraphy*. Elsevier, Amsterdam.
- Goodman, D.H., Reid, S.B., Docker, M.F., Haas, G.R. & Kinziger, A.P. (2008) Mitochondrial DNA evidence for high levels of gene flow among populations of a widely distributed anadromous lamprey *Entosphenus tridentatus* (Petromyzontidae). *Journal of Fish Biology*, 72: 400–417.
- Hardisty, M.W. (2006) *Lampreys. Life without jaws*. Forrest text, Ceredigion, UK.
- Jónsson, B. & Jóhannsson, M. (2008) Rannsóknir á landnámi sæsteinsuga (*Petromyzon marinus*) á Íslandi. Report from Institute of Freshwater Fisheries, VMST/0801: 1–23.
- Jonsson, G. (1992) *Islenskir fiskar*. Fiolvi, Reykjavik.
- Kelly, F.L. & King, J.J. (2001) A review of the ecology and distribution of three lamprey species, *Lampetra fluviatilis* (L.), *Lampetra planeri* (Bloch) and *Petromyzon marinus* (L.): a context for conservation and biodiversity considerations in Ireland. *Proceedings of the Royal Irish Academy*, 101B: 165–185.
- Maitland, P.S. (2003) Ecology of the river, brook and sea lamprey. Conserving Natura 2000 Rivers Ecology Series No. 5. English Nature, Peterborough.

Rodriguez-Muñoz, R., Waldman, J.R., Grunwald, C., Roy, N.K., Wirgin, I. (2004) Absence of shared mitochondrial DNA haplotypes between sea lamprey from North American and Spanish rivers. *Journal of Fish Biology*, 64: 783–787.

Schneider, C.P., Owens, R.W., Bergstedt, R.A. & O’Gorman, R. (1996) Predation by sea lamprey (*Petromyzon marinus*) on lake trout (*Salvelinus namaycush*) in southern Lake Ontario, 1982–1992. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 1921–1932.

Swofford, D.L. (2003) *PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4b.10*. Sinauer Associates, Massachusetts.

Sæmundsson, B. (1926) Fiskarnir (in Icelandic). Bókaverslun Sigfúsar Eymundssonar, Reykjavík.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research*, 24: 4876–4882.

Waldman, J.R., Grunwald, C., Roy, N.K. & Wirgin, I.I. (2006) Evaluation of the native status of sea lampreys in Lake Champlain based on mitochondrial DNA sequencing analysis. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135: 1076–1085.

CAPÍTULO 4

**Phylogeographical analysis reveals multiple conservation units in
brook lampreys *Lampetra planeri* of Portuguese streams**

CAPÍTULO 4

Phylogeographical analysis reveals multiple conservation units in brook lampreys *Lampetra planeri* of Portuguese streams

Abstract The populations of brook lamprey *Lampetra planeri* of Portuguese rivers were analysed phylogeographically using a fragment of 644 bp of the mitochondrial control region of 158 individuals from six populations. Samples representing *L. planeri* and migratory lampreys *Lampetra fluviatilis* of rivers draining to the North Sea and the Baltic Sea were also included to assess the relationships of Portuguese samples. The data support a clear differentiation of all the populations studied. Several populations, which are isolated among themselves and also from the migratory lampreys, proved to be entirely composed of private haplotypes, a finding that supports some time of independent evolutionary history for these populations. This, combined with the geographic confinement to small water bodies, justifies the recognition of at least four conservation units in the Portuguese rivers Sado, São Pedro, Nabão and Inha.

Keywords allopatric speciation • conservation units • *Lampetra* • phylogeography • Portugal.

Introduction

Lampreys (Petromyzonidae) are remarkable not only for their assortment of very primitive characters but also for their diverse life histories and patterns of speciation (Hardisty 2006). All lampreys spawn in fresh water and have a larval phase that typically lasts for several years. The eyeless ammocoetes, which are filter feeders, live buried in the sediment. After metamorphosis, their development may take one of two courses: (1) individuals may migrate downstream spending one or more years in the sea or lakes, where they adopt a parasitic or predatory way of life. Upon approach of sexual maturation, they migrate back into fresh water where they spawn and die; (2) alternatively, recently metamorphosed lampreys may remain in fresh water without feeding, reaching sexual maturity at a much smaller size, spawning and dying after a short period (Kottelat & Freyhof 2007).

While the majority of extant lamprey genera include one or more migratory species, in most of them non-migratory forms are also present (Lang et al. 2009). This observation indicates that the shift between the two life-history patterns occurred independently several times in lamprey evolution. Non-migratory forms are viewed as derived from the migratory ones, leading to the concept of paired or satellite species (Zanandrea 1959, Vladykov & Kott 1979).

There is still a considerable debate about the taxonomic status of at least some of the non-migratory species. Exchange of genes between the two forms has not been ruled out in areas where they occur sympatrically (Schreiber & Engelhorn 1998). On the other hand, it has been suggested that different environmental conditions could trigger different life histories, a situation that would not by itself exclude the role of genetic factors in the determination of different ontogenetic pathways (Kucheryavii et al. 2007). Additionally, some authors considered that the same species could be polymorphic for feeding type and life history (Manion & Purvis 1971, Beamish 1987).

In Western Europe, two species of the genus *Lampetra* have been traditionally recognized: the lampetra or river lamprey *Lampetra fluviatilis* (L.) and the brook lamprey *Lampetra planeri* (Bloch).

Lampetra fluviatilis is composed of predatory migratory fish, mostly distributed in north-west Europe, from western France and the British Isles to Scandinavia, spawning in rivers draining to the Atlantic Sea, North Sea and Baltic Sea. In south-west Europe, it is absent from Spain, where the last record of its presence dates back to 1974 in the Tagus drainage (Doadrio 2002). In Portugal, there are apparently few records in recent years, although its previous presence in the Tagus is well documented (Doadrio 2002).

Lampetra planeri, a non-parasitic and non-migratory fish, occupies a similar range in the fresh waters of north-west Europe and is absent from Spain, except for a stream close to the French border in the Pyrenees (Doadrio 2002). In Portugal, many populations ascribed to this species are found in numerous rivers and streams (Cabral et al. 2005). Some populations are present in Italy (Kottelat & Freyhof 2007).

Both species have been assigned various levels of protection in western European countries (Kelly & King 2001). In Portugal, fish of the genus *Lampetra* were considered critically endangered by Cabral et al. (2005).

Blank et al. (2008) compared a substantial number of mitochondrial genes and found that none of them could serve to detect consistent differences between *L. fluviatilis* and *L. planeri* in the area where both co-occur, a finding that points either to a persistent gene flow between forms or to a differentiation process which is so recent that lineage sorting in mtDNA has not yet taken place.

Espanhol et al. (2007), using mtDNA (ATPase 6,8 and cytochrome *b* genes), demonstrated that *L. planeri* is polyphyletic, and thus, according to the phylogenetic species concept, does not correspond to a valid species. They showed that *L. planeri* possesses haplotypes that are shared with *L. fluviatilis* and others that are derived by numerous independent pathways from *L. fluviatilis*. Although these authors used only a few samples per river, they also showed that several Portuguese haplotypes of non-migratory lampreys are quite distinctive and may represent ancient branches in the radiation of *Lampetra*.

The study of Espanhol et al. (2007) included only a small number of samples per drainage, which precludes any phylogeographic analysis. A population approach, however, is urgently needed in terms of conservation, because many Portuguese populations are confined to small or very small streams and are isolated from the sea. Therefore, they are reproductively isolated from other populations and, according to the results of Espanhol et al. (2007), may represent evolutionary units.

In this article, a fragment of the control region of the mtDNA was used to compare several Portuguese *L. planeri* populations, their genetic diversity, their level of differentiation and their relationships with north European populations.

Materials and Methods

Sampling

DNA sequences were obtained from 267 individuals for the control region (GenBank accession numbers from EU595965 to EU596199 and from GQ340523 to GQ340554; for collection site locations, see Figure 1). Ammocoetes and adults were collected by electrofishing. While the ammocoetes of migratory and non-migratory *Lampetra* are not easily distinguishable, the mature adults are readily classified according to size and morphology. The diagnostic criteria given by Kottelat and Freyhof (2007) were used. Ammocoetes from populations of drainages where there are no records of predatory lamprey were assigned to the non-migratory form. These include the Rivers Sado, Nabão,

São Pedro, Mondego and Inha. In all these rivers, all the adults captured were small non-migratory lampreys. Because of the historical presence of the migratory form in the Tagus River, the absence of migratory fish was not sure and refrained from classifying them as migratory or non-migratory.



Figure 1 Map with collection site locations and haplotype network. Haplotype number identifications refer to rivers. 1, Sado; 2, Tagus; 3, Nabão; 4, São Pedro; 5, Mondego; 6, Inha; 7, Garonne; 8, Elbe; 9, Rhine; 10, Neva. Haplotypes of migratory *Lampetra fluviatilis* are identified with superscript M. * corresponds to the GenBank accession number Y18683. Private haplotypes present in the marked with grey.

Molecular procedures

Total genomic DNA was extracted from fin clips or pieces of muscle preserved in ethanol by an SDS–proteinase-k-based protocol (Sambrook et al. 1989 with modifications). A total of 644 base pairs (bp) of the control region (non-coding region I according to Blank et al. 2008) were amplified using the primers LampFor 5'-ACACCCAGAAACAGCAACAAA-3' and LampRev 5'-GCTGGTTTACAAGACCAGTGC-3' (Almada et al. 2008). PCR conditions followed Almada et al. (2008). Sequencing reactions were performed in StabVida on a 3700 ABI DNA sequencer (Applied Biosystems;

www.appliedbiosystems.com) using the Big Dye terminator DNA sequencing kit (<http://www.stabvida.com>).

Data analysis

Sequences were aligned with Clustal X (Thompson et al. 1997). In the control region, an indel of 39 bp was widespread, which is homologous to part of the repetitive motif described by White and Martin (2009) in *Lampetra* (*Okkelbergia*) *aepyptera* (Abbott). The insertion had a conserved sequence and did not vary in the number of repeats, and most populations were polymorphic for the indel. Thus, it was coded as a transversion to make the data amenable to subsequent analysis.

Phylogenetic analysis was performed with PAUP 4.0b10 (Swofford 2003) using maximum parsimony (MP). Relationships among haplotypes were analysed with a parsimony network estimated by the software TCS version 1.18 (Clement et al. 2000). Because the river Inha was comparatively overrepresented (49 samples) with only three haplotypes, the number of samples included in the haplotype network was reduced to 32. Care was taken to ensure that the reduction kept the relative frequency of haplotypes constant and that all of them were included.

Arlequin software package version 3.01 (Excoffier & Schneider 2005) was used to estimate genetic diversity indices, to assess population differentiation and to perform a Mantel test between geographic and *F*_{ST} values and an analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992). Mean numbers of inter-population pair-wise differences were corrected by subtracting the average within-population differences for the populations of each pair. To further test the relationships among populations, the corrected mean number of pairwise differences was used to perform a multidimensional scaling using the software SPSS 16.0 (SPSS Inc. 2008).

Results

A total of 267 sequences were obtained. The number of variable sites was 31 (one of which corresponds to an indel of 39 bp, coded as a transversion, see Materials and Methods for further details), of which 20 were parsimony informative. Fifty-eight haplotypes were found. The average percentage of divergence among haplotypes was 1.97% (corresponding to 11 differences), while the most divergent haplotypes differed by 2.16% (corresponding to 13 differences).

In Table 1, the number of samples, number of haplotypes, percentage of private haplotypes, genetic diversity indices and mean and maximum number of differences between haplotypes for each population are shown. Inspection of Table I shows that the highest levels of genetic diversity are found in populations of the Rivers Neva, Rhine, Garonne and Tagus, while the Portuguese Rivers Mondego, Inha, Nabão, São Pedro and Sado plus the Elbe population show the lowest genetic diversity levels. The percentage of private haplotypes reaches 100% in Rivers Sado, Nabão, Inha, São Pedro and Garonne. Thus, the Rivers Sado, São Pedro, Inha and Nabão in Portugal stand out for both the low levels of genetic diversity and the presence of private haplotypes. The Mantel test failed to detect a correlation between geographic and genetic distances among populations (correlation coefficient = -0.302 ; $P > 0.05$), providing evidence against an isolation by distance model of population differentiation. Indeed, the most distinct populations are found in a restricted geographical area in Portugal.

An AMOVA including all populations detected significant inter-population variation ($V_a = 2.01047$; $P < 0.001$; $V_b = 0.96110$).

In Table 2, the net average differences among all pairs of populations and the corresponding F_{ST} values are shown. Both values were significant for all pairs of populations, also allowing for a Bonferroni correction. It is interesting to note that, even within the same drainage, significant differences could be detected among populations, although with low-to-moderate F_{ST} values. These are the cases of the migratory and non-migratory fish from the Rhine and those of the Tagus and its tributary Nabão. The highest F_{ST} values were those found in comparisons involving the Sado population, and this was also true for net average differences. A very high level of population differentiation was also found in comparisons involving the São Pedro River.

In Figure 2, the relationships among populations are summarized using a multidimensional scaling based on the corrected average pair-wise differences (stress = 0.1240 ; $RSQ = 0.9513$). Inspection of Figure 2 reveals two salient features: there is a grouping near the centre of the graph, which includes migratory and non-migratory fishes from the Rhine, and samples from the Neva, Garonne, Tagus and Mondego rivers. Several Portuguese populations of small rivers occupy very peripheral positions and are also quite separated from each other.

Table 1 Number of samples, number of haplotypes, percentage of private haplotypes, genetic diversity indices and mean and maximum numbers of pairwise differences per population.

	N	Number of haplotypes	Percentage of private haplotypes	Gene diversity	Nucleotide diversity	Maximum number of differences between haplotypes	Mean number of pairwise differences within population
Rhine ¹	33	8	62.5	0.8409 ± 0.0328	0.007450 ± 0.004185	10	4.492424 ± 2.269317
Elbe ¹	16	2	0	0.4583 ± 0.0954	0.000764 ± 0.000793	1	0.458333 ± 0.425019
Garonne ¹	8	5	100	0.8571 ± 0.1083	0.006596 ± 0.004202	8	3.964286 ± 2.216707
Inha ¹	49	3	100	0.3452 ± 0.0764	0.000597 ± 0.000654	2	0.358844 ± 0.354095
Mondego ¹	16	2	50	0.1250 ± 0.1064	0.000208 ± 0.000376	1	0.125000 ± 0.202014
São Pedro ¹	24	2	100	0.3913 ± 0.0912	0.000652 ± 0.000705	1	0.3913 ± 0.379463
Tagus ^{1,2}	18	11	63.6	0.8824 ± 0.0643	0.006036 ± 0.003589	7	3.627451 ± 1.927931
Nabão ¹	19	7	100	0.6608 ± 0.1143	0.002890 ± 0.001965	11	1.736842 ± 1.056511
Sado ¹	32	3	100	0.6552 ± 0.0418	0.001442 ± 0.001160	2	0.866935 ± 0.626696
Neva ²	24	13	38.5	0.9384 ± 0.0255	0.006629 ± 0.003827	10	4.003623 ± 2.073226
Rhine ²	28	13	53.8	0.8862 ± 0.0416	0.004513 ± 0.002748	9	2.73059 ± 1.493020

1 - non-migratory population; 2 - *Lampetra fluviatilis* (migratory-populations); 1,2 – uncertain life history population

Maximum parsimony analysis produced 50 000 equally parsimonious trees, which failed to recover the distinction between migratory and non-migratory lampreys, confirming the results of Espanhol et al. (2007). The MP trees were basically unresolved, except for a few haplotype groups with weak supports.

In Figure 1, a parsimony haplotype network is presented. Inspection of this figure supports the following conclusions: (1) Lack of monophyly of the non-migratory. Indeed, *L. planeri* include haplotypes that were independently derived from haplotypes found in migratory *L. fluviatilis* at least nine times. Moreover, at least 3 haplotypes were shared between migratory and non-migratory forms. (2) The populations of the Rivers Sado, São Pedro, Inha, Nabão and Garonne, in which only private haplotypes were found, contained sequences that were derived from other haplotypes of the same river, strongly suggesting a considerable history of local independent evolution. Nabão and Garonne populations are polyphyletic, while the remaining three are monophyletic. (3) In contrast to these clades confined to specific rivers, several haplotypes found in migratory *L. fluviatilis* have a wide geographic distribution, with some found in the Tagus in Portugal and in the Neva near the Russian Baltic Sea. (4) In the Tagus, where migratory *L. fluviatilis* were recorded with some consistency until relatively recent dates, the haplotypes now present are shared or derived by very few steps from the ones found in migratory fish.

Table 2 Population pairwise Fst (distance method: pairwise differences) (above diagonal) and corrected average pairwise differences (below the diagonal)

	Rhine ¹	Elbe ¹	Garonne ¹	Inha ¹	Mondego ¹	São Pedro ¹	Tagus ^{1,2}	Nabão ¹	Sado ¹	Neva ²	Rhine ²
Rhine ¹	4.49242	0.29818	0.32733	0.598	0.30385	0.65838	0.24835	0.5123	0.68412	0.23138	0.27667
Elbe ¹	1.42803	0.45833	0.62208	0.93389	0.89394	0.94561	0.56165	0.78268	0.91306	0.49514	0.46655
Garonne ¹	2.16558	2.47619	3.96429	0.84337	0.6625	0.83559	0.38379	0.54133	0.81941	0.20909	0.17001
Inha ¹	2.97263	5.40136	4.21088	0.35884	0.9082	0.88304	0.5167	0.89089	0.94037	0.63347	0.71425
Mondego ¹	1.42424	2.45833	2.51786	3.00425	0.125	0.95299	0.403	0.77923	0.90899	0.4069	0.48106
São Pedro ¹	5.37632	7.26268	6.0722	2.78819	5.80435	0.3913	0.62164	0.88646	0.94112	0.69338	0.75153
Tagus ^{1,2}	1.39629	2.75572	2.3083	1.23928	1.35294	2.87951	3.62745	0.57483	0.76801	0.27395	0.33164
Nabão ¹	3.70833	4.16886	2.70207	5.97579	3.55263	7.65961	3.58686	1.73684	0.86873	0.50532	0.51412
Sado ¹	5.86767	7.71237	6.37345	8.80038	6.25403	10.62088	6.07225	7.84285	0.86694	0.66474	0.77302
Neva ²	1.29364	2.59194	1.05771	2.62149	1.73777	4.9692	1.45298	3.08591	4.35118	4.00362	0.08351
Rhine ²	1.41468	1.70933	0.55456	3.01235	1.70412	5.0107	1.51762	2.47703	5.90235	0.29829	2.73016

1- non-migratory population; 2 - *Lampetra fluviatilis* (migratory-populations); 1,2 – uncertain life history population.

All values were significant ($p < 0.05$).



Figure 2 Multidimensional scaling based on corrected average pair-wise differences between pairs of *Lampetra* spp. populations. 1- *L. planeri* non-migratory population; 2- *Lampetra fluviatilis* migratory populations. 1,2- uncertain life-history population (population in which most specimens are non-migratory but the presence of some migratory individuals cannot be ruled out).

Discussion

A striking result of the present study is the very high level of genetic diversity found in *L. fluviatilis* migrating to the North Sea and Baltic Sea. This finding stands in sharp contrast with the extremely low genetic diversity and lack of population differentiation in *Petromyzon marinus* L. samples collected in western Europe, from the Rhine to the Tagus, by Almada et al. (2008). Indeed, using the same DNA fragment, these authors found only 18 haplotypes in 273 specimens, in contrast with the 58 haplotypes in 267 specimens found in this study. This difference could be the result of the contrasting behaviour of *P. marinus* and the migratory *L. fluviatilis*. Indeed, *P. marinus* apparently lacks homing (Bergstedt & Seelye 1995), and *P. marinus* travel extensively in the sea, with a high probability of migrating to a river different from the one where they were born. This means that a large area such as the west coast of Europe may harbour a single gene pool, subjected to a common process of lineage sorting, likely to be especially severe during population bottlenecks. The behaviour of *Lampetra* may be conducive to a more

rapid population differentiation and retention of a higher level of genetic diversity. It is known that *L. fluviatilis* tends to perform more restricted migratory movements than *P. marinus*, with individuals staying within or near the mouth of estuaries (Maitland 2003). This migratory pattern may restrict but not suppress gene flow between rivers, favouring some level of population differentiation and retention of an overall higher level of genetic diversity, as haplotypes lost in a river by drift will likely persist in other drainages.

In glacial conditions, it is likely that migratory *L. fluviatilis* must have moved south, which would have increased their abundance in Portuguese rivers. In interglacials, like the present one, the bulk of the migratory populations must have moved northward again. In this situation, the Portuguese populations would have become increasingly isolated from the migratory fish from North Europe. The reduction of population size in small streams, combined with a lack of gene flow among rivers, would have favoured a rapid lineage sorting and loss of genetic diversity.

The low percentage of divergence among haplotypes of European *Lampetra* spp., when compared, for instance with the ones found in *L. aepyptera* (Martin & White 2008), another non-parasitic lamprey, and the finding that some *Lampetra* populations are polyphyletic are consistent with the hypothesis that brook lamprey populations in different Portuguese rivers may have originated from the migratory stock in relatively recent times during the Pleistocene. The polyphyletic populations could represent cases where lineage sorting did not take place yet, a condition that is typical of the initial stages of population isolation (Avice 2000). An exception to this scenario of small localized populations getting isolated from a large migratory stock may be represented by the population of the River São Pedro, which contained haplotypes derived from the ones found in Nabão. The two rivers have their sources <5 km apart, which means that minor geological changes may have allowed previous contacts between the two headwaters. This would identify dispersal among rivers as a less important, but plausible, process in *L. planeri* phylogeography, which agrees with the findings of Martin and White who found substantial phylogeographical structure in *L. aepyptera*.

The low overall level of divergence observed, and the use of a single marker, makes a discussion on the status of local populations as potential species obviously premature. Regardless of future conclusions on this point, this article describes mechanisms that, given sufficient time, will promote allopatric speciation *sensu* Futuyma (2005).

For the populations of the Rivers Sado, Inha and São Pedro, there is no evidence that migratory *Lampetra* were present in historical times, which means that it may be almost sure that gene flow does not exist among populations. On the other hand, even the mitochondrial data alone clearly demonstrate the distinctiveness and uniqueness of the Portuguese *L. planeri* populations, suggesting that the populations of the Rivers Sado, Nabão, São Pedro and Inha qualify as distinct conservation units following the Convention of Biological Diversity (CBD). They are composed of unique haplotypes, isolated from other populations, and are confined to small streams (in the Sado River, *L. planeri* only occur in a few tributaries), and are thus highly vulnerable to extinction if proper management action is not taken.

The need to recognize conservation units for these Portuguese *L. planeri* populations is made more urgent for two reasons. The first is that the total area of territory where *Lampetra* species are present is very small (Cabral et al. 2005). This means that population sizes are likely small. Secondly, these non-migratory lampreys occupy southern locations in the overall range of *Lampetra* spp. in Western Europe and may have acquired adaptive traits favourable in the high temperature conditions where they live.

One could argue that these populations are the less valuable, from a conservation point of view, because of their very low level of genetic diversity, which contrasts with the high levels found in large rivers such as the Neva, Rhine and Tagus. The low genetic diversity, however, negates neither the distinctiveness of populations nor the possibility of independent evolutionary histories. Indeed, it may simply reflect a prolonged condition of low population size, with accelerated lineage sorting, due to the small habitat areas where these populations occur.

The population from the River Garonne also contained only private haplotypes. Because of small sample size, however, it is premature to draw conclusions on the status of this population or species. It is likely that a more comprehensive phylogeographical analysis of *Lampetra* spp. in Western Europe may uncover additional populations with high levels of distinctiveness, restricted distributions and low gene flow with other populations.

One positive contribution of the present work is the demonstration that much more phylogeographic work must be undertaken to properly understand and conserve the genetic biodiversity of *Lampetra* spp. in Europe.

In conclusion, these data provide clear evidence supporting the genetic distinctiveness and consequent need for conservation of the *Lampetra* spp. populations of small Portuguese streams. It also demonstrates the need for detailed phylogeographical analysis of *Lampetra* spp. across its western European range.

Acknowledgments

We thank two anonymous referees for their very useful comments and suggestions. We also thank C. Sousa-Santos for her help and S. Chenu for the skilful technical assistance and N. Bogutskaya (St Petersburg), A. Nolte (Plön), M. Povz (Ljubljana), C. Taverny (Gradignan), D. Turan (Rize) and F. Wagner (Jena) for providing us with preserved lamprey tissues. This work was supported by a grant from Iceland, Liechtenstein and Norway through the EEA Financial Mechanism and the Norwegian Financial Mechanism, by the project MarinERA 'Marine phylogeographic structuring during climate change: the signature of leading and rear edge of range shifting populations' and from the Eco-Ethology Research Unit (331/94) Pluriannual financing programme (Fundação para a Ciência e a Tecnologia). Collection of specimens complied with the current laws of each country.

References

- Almada, V.C., Pereira, A.M., Robalo, J.I., Fonseca, J.P., Levy, A., Maia, C. & Valente, A. (2008) Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea-lampreys along European shores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 391–396.
- Avice, J.C. (2000) *Phylogeography*. Harvard University Press, Boston.
- Beamish, R.J. (1987) Evidence that parasitic and nonparasitic life history types are produced by one population of lamprey. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44: 1779–1782.
- Bergstedt, R.A. & Seelye, J.G. (1995) Evidence for lack of homing by sea lampreys. *Transactions of the American Fisheries Society*, 124: 235–239.
- Blank, M., Jurss, K. & Bastrop, R. (2008) A mitochondrial multigene approach contributing to the systematics of the brook and river lampreys and the phylogenetic position of *Eudontomyzon mariae*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65: 2780–2790.

- Cabral, H., Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queiroz, A.I., Rogado, L. & Santos-Reis, M. (Eds) (2005) *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.
- Doadrio, I. (2002) *Atlas y libro rojo de los peces continentales de España*. Dirección General de la Natureza - Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Espanhol, R., Almeida, P.R. & Alves, J. (2007) Evolutionary history of lamprey paired species *Lampetra fluviatilis* (L.) and *Lampetra planeri* (Bloch) as inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 16: 1909–1924.
- Excoffier, L.G.L. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1: 47–50.
- Excoffier, L.G.L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.
- Futuyma, D.J. (2005) *Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hardisty, M.W. (Ed.) (2006) *Lampreys – Life Without Jaws*. Forrest Text, Ceredigion.
- Kelly, F.L. & King, J.J. (2001) A review of the ecology and distribution of three lamprey species, *Lampetra fluviatilis* (L.), *Lampetra planeri* (Bloch) and *Petromyzon marinus* (L.): a context for conservation and biodiversity considerations in Ireland. *Proceedings of the Royal Irish Acadademy*, 101B: 165–185.
- Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007) *Handbook of European Freshwater Fishes*. Kottelat, Cornol.
- Kucheryavyi, A.V., Savvaitova, K.A., Pavlov, D.S., Gruzdeva, M.A., Kuzishchib, K.V. & Stanford, J. A. (2007) Variations of life history strategy of the arctic lamprey *Lenthenteron*

camtschaticum from the Utkholok River (Western Kamchatka). *Journal of Ichthyology*, 47: 37–52.

Lang, N.J., Roe, K.J., Renaud, C.B., Gill, H.S., Potter, I.C., Freyhof, J., Naseka, A.M., Cochran, P., Pérez, H.E., Habit, E.M., Kuhajda, B.R., Neely, D.A., Reshetnikov, Y.S., Salnikov, V.B., Stoumboudi, M.T. & Mayden, R.L. (2009) Novel relationships among Lampreys (Petromyzontiformes) revealed by a taxonomically comprehensive molecular data set. *American Fisheries Society Symposium*, 72: 41–55.

Maitland, P.S. (2003) *Ecology of the River, Brook and Sea Lamprey*. Conserving Natura 2000 Rivers Ecology Series No. 5. English Nature, Peterborough.

Manion, P.J. & Purvis, H.A. (1971) Giant American brook lampreys, *Lampetra lamottei*, in the Upper Great Lakes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 28: 616–620.

Martin, H. & White, M.M. (2008) Intraspecific phylogeography of the least brook lamprey (*Lampetra aepyptera*). *Copeia*, 2008: 579–585.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schreiber, A. & Engelhorn, R. (1998) Population genetics of a cyclostome species pair, river lamprey (*Lampetra fluviatilis* L.) and brook lamprey (*Lampetra planeri* Bloch). *Journal of Zoological, Systematics and Evolutionary Research*, 36: 85–99.

Swofford, D.L. (2003) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4b.10. Sinauer Associates, Massachusetts.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876–4882.

Vladykov, V.D. & Kott, E. (1979) Satellite species among the holarctic lampreys (Petromyzonidae). *Canadian Journal of Zoology*, 57: 860–867.

White, M.M. & Martin, H.R. (2009) Structure and conservation of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of the least brook lamprey (*Lampetra aepyptera*). *Journal of Molecular Evolution*, 68: 715–723.

Zanandrea, G. (1959) Speciation among lampreys. *Nature*, 184: 380.

CAPÍTULO 5

Genetic relationships of brook lamprey of the genus *Lampetra* in a Pyrenean stream in Spain

CAPÍTULO 5

Genetic relationships of brook lamprey of the genus *Lampetra* in a Pyrenean stream in Spain

Abstract The genetic relationships of a population of brook lamprey *Lampetra planeri* from Spain were analysed using a fragment of the mitochondrial non-coding region in order to describe its relationships with other European *Lampetra* populations. DNA sequences were obtained from ten larvae, all corresponding to a single private haplotype. Its closest haplotype differed by five mutations and was found in several samples of *Lampetra fluviatilis*, both from the North Sea and the Baltic. These results argue for the great conservation value of this brook lamprey population, likely originated from *L. fluviatilis* ancestors.

Keywords *Lampetra* • Phylogeography • Spain • Conservation unit • Multiple origins of West European brook lampreys

Introduction

Lampreys and hagfishes are the only surviving agnathans, thus representing the more basal vertebrate lineages still alive. Their origin predates the formation of jaws and paired fins (Takezaki et al. 2003).

Typically, lampreys spawn in freshwater and have a larval phase that lasts for several years, during which the larvae (ammocoetes) live buried in the sediment, filter-feeding. After this period, individuals undergo an extensive metamorphosis that leads to the formation of functional eyes, restructuring of the mouth and digestive tracts, and changes in coloration and osmoregulatory capacity. Some species then migrate downstream to lakes or to the sea. At this stage they adopt a parasitic or predatory feeding mode, using their sucker-like mouth to attach to other fish or sea mammals. With their tongue, they open a wound, from which they suck blood, other fluids and even scratches of tissue. These parasitic/predatory lampreys grow massively, and after 1 or more years, they migrate back to rivers where they spawn and die (Hardisty 2006).

Alternatively, in some species of lampreys, when the individuals reach metamorphosis, their sexual maturation is so advanced that they do not migrate to the sea and initiate spawning soon after emerging from the sediment, at a much more reduced size, upon

which they die. This alternative life history means that there is neither feeding nor seaward migration after metamorphosis (Hardisty 2006).

Many studies support the hypothesis that the non-migratory lampreys derived from parasitic ancestors through a suppression of the migratory parasitic life stage. This event occurred independently in several lamprey lineages and gave rise to several freshwater species that are composed only of non-migratory individuals (Zanandrea 1959, Hardisty 2006).

Traditionally, in the genus *Lampetra*, two species have been recognised in western Europe: the migratory and predatory river lamprey *Lampetra fluviatilis* and the non-migratory, strictly freshwater brook lamprey, *Lampetra planeri*. The two species display similar distributions from the Iberian Peninsula to Scandinavia, sometimes co-occurring in the same river (Kottelat & Freyhof 2007).

Two studies on the phylogeography of *L. planeri* in West Europe have been made (Espanhol et al. 2007, Pereira et al. 2010). Espanhol et al. (2007), using ATPase and cytochrome b genes of mitochondrial DNA (mtDNA), provided unequivocal evidence that the genealogy of the European *Lampetra* species does not conform to a model of two separate species, one migratory and parasitic and the other including all brook lampreys. On the contrary, brook lamprey haplotypes appeared in different branches of the phylogenetic tree amongst haplotypes of *L. fluviatilis*. Pereira et al. (2010), using another molecular marker (non-coding region I), also found a lack of monophyly in west European *L. planeri*.

These studies have also shown that the southern populations of *L. planeri* are clearly differentiated (Espanhol et al. 2007, Pereira et al. 2010). Using mtDNA non-coding region I, Pereira et al. (2010) proposed that some of the Portuguese populations of this species, namely the ones of the rivers Sado, Nabão, São Pedro and Inha, correspond to different conservation units (see Figure 1 for geographic position). Their conclusions were supported by the isolation of these populations from other populations of *L. planeri* and *L. fluviatilis*, by the exclusive presence of private haplotypes in these populations and by their confinement to small water bodies.

In Spain, one population ascribed to this species is present in the Olabidea-Ugarana River. This river is close to the Pyrenees and flows into the Atlantic, Bay of Biscay, in Saint Jean de Luz (France), where it is called the Nivelle (Alvarez & Doadrio 1986). This

population may be in the same situation as those in the Portuguese rivers Sado, Nabão, São Pedro and Inha, because it is confined to a small water body, where *L. fluviatilis* is absent.

In this paper, a fragment of the mitochondrial non-coding region I was used to evaluate the genetic relationships of this population with other European populations.

Materials and methods

DNA sequences were obtained from ten ammocoetes from the Olabidea-Ugarana River (for collection site location, see Figure 1), collected by electrofishing.

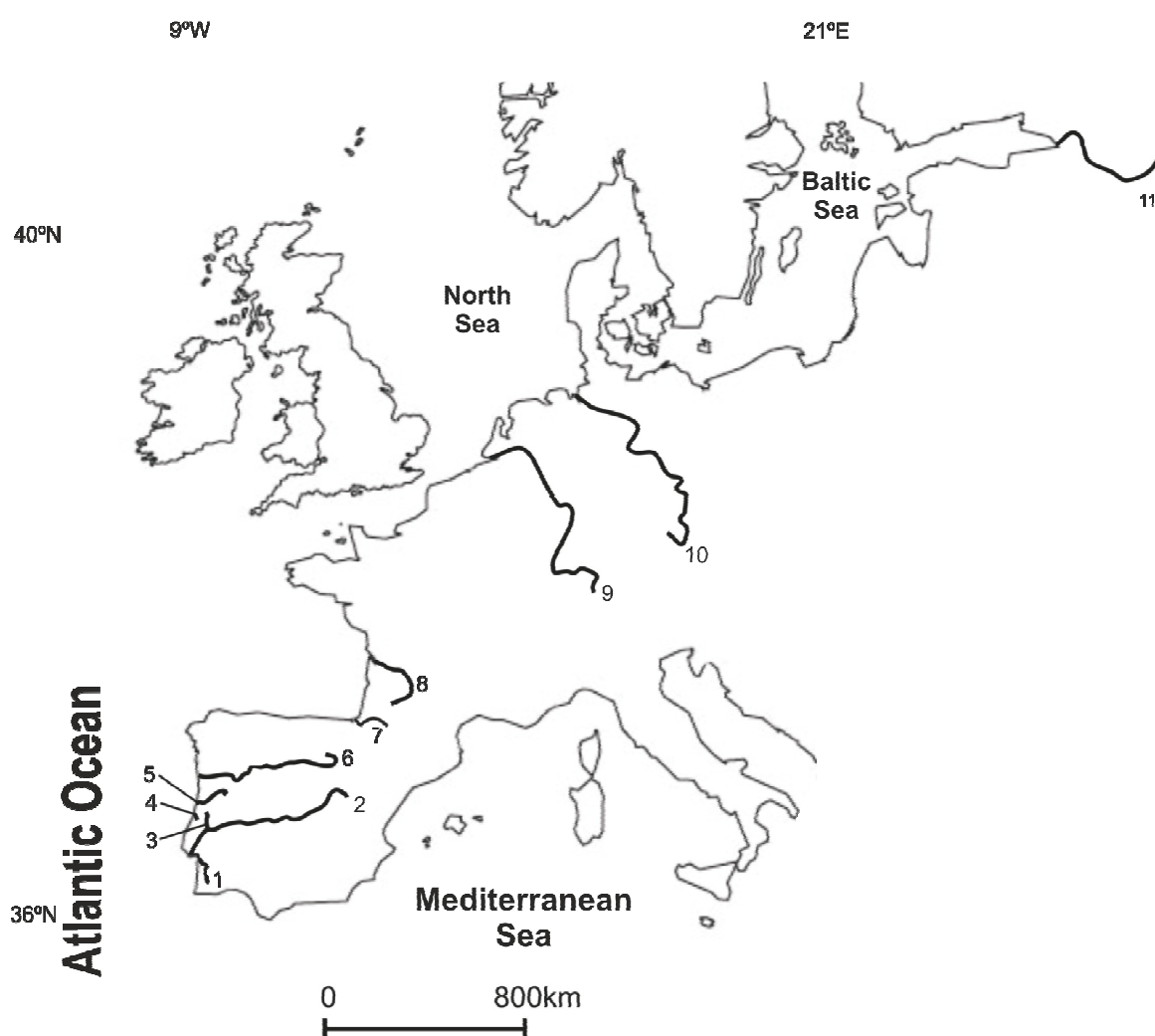


Figure 1 Map with collection site locations. 1 Sado, 2 Tagus, 3 Nabão, 4 São Pedro, 5 Mondego, 6 Inha, 7 Olabidea-Ugarana, 8 Garonne, 9 Elbe, 10 Rhine, 11 Neva.

Ammocoetes were used because there was no risk of confusion with *Lampetra fluviatilis*, as only brook lampreys have been reported in the area (Alvarez & Doadrio 1986). Care was taken to collect only a small fin clip in order to avoid harming the larvae, which were subsequently returned to the river. Total genomic DNA was extracted from fin clips preserved in ethanol by an SDS/proteinase-K based protocol (Sambrook et al. 1989, with modifications). A total of 644 base pairs (bp) including a partial sequence of the ND6 gene as well as the control region (non-coding region I according to Lee & Kocher 1995) was amplified (GenBank accession nos. from HM212773 to HM212782) using the primers LampFor 5'-ACA CCC AGA AAC AGC AAC AAA-3' and LampRev 5'-GCT GGT TTA CAA GAC CAG TGC-3' (Almada et al. 2008). PCR conditions followed Almada et al. (2008). Sequencing reactions were performed in StabVida (Lisbon) on a 3700 ABI DNA sequencer (Applied Biosystems) using the ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle-sequencing kit (Applied Biosystems) (<http://www.stabvida.com>). Sequences were aligned with Clustal X (Thompson et al. 1997). An indel of 39 bp described by Pereira et al. (2010) in many *Lampetra* haplotypes was coded following these authors. Relationships among haplotypes were analysed with a parsimony network estimated by the software TCS version 1.18 (Clement et al. 2000). ARLEQUIN software package version 3.01 (Excoffier & Schneider 2005) was used to estimate population differentiation and genetic diversity. To access the relationships between the Spanish samples and other European samples, all available sequences of the genus *Lampetra* in Europe for the same fragment were included in the analysis [see Pereira et al. (2010) for GenBank accession numbers].

Results and discussion

From the 644 bp, 19 sites were polymorphic. The ten Spanish samples correspond only to one haplotype. The genetic diversity of this population is therefore equal to zero for all indices. A haplotype network (Figure 2) with all the haplotypes found by Pereira et al. (2010), with the conservation unit defined in that paper, and the Spanish haplotype are represented [for complete information about the haplotypes, see Electronic supplementary material (ESM) Table S1].

The haplotype of the Olabidea-Ugarana River (haplotype 27) is exclusively found in that river. Inspection of Figure 2 shows that it is separated by five mutations from the nearest neighbour (haplotype 14), which is a haplotype found in *Lampetra fluviatilis*, both from the North Sea and Baltic. While in many populations there is a polymorphism for the 39 bp indel mentioned above, the samples from the Olabidea-Ugarana River were homogenous, suggesting the ancestor of this population displays this insertion.

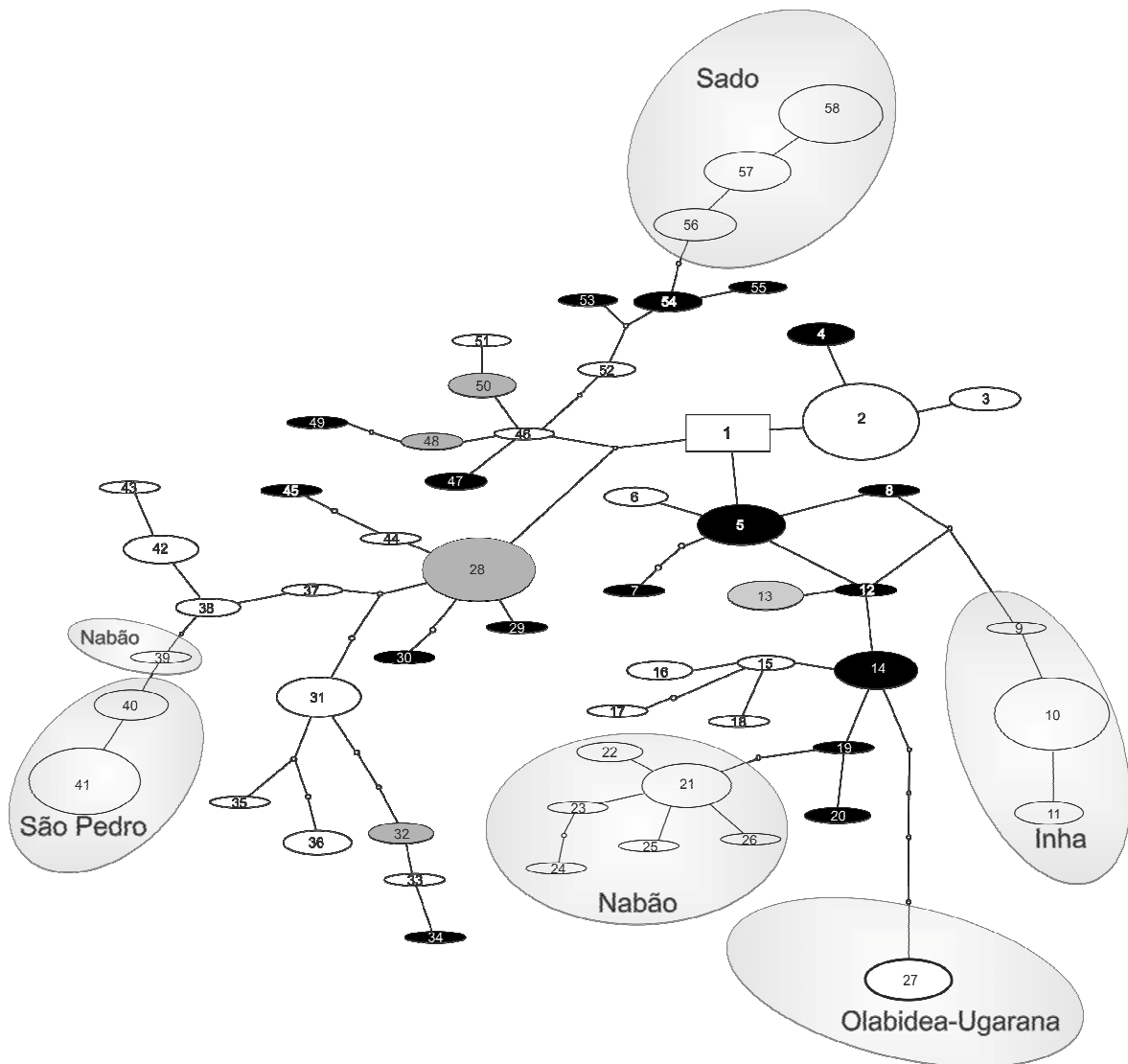


Figure 2 Network of the non-coding region I haplotypes of European *Lampetra*. Ellipses represent haplotypes found in Pereira et al. (2010) and in this study, and small open circles missing intermediate haplotypes. Size of ellipses is proportional to the number of individuals where the haplotypes is found. Black ellipses represent haplotypes found exclusively in *L. fluviatilis* samples, grey ellipses haplotypes found in *L. fluviatilis* and in *L. planeri*, and white ellipses haplotypes present in *L. planeri* samples. Haplotype 1 is the most probable ancestral haplotype. Conservation units defined by Pereira et al. (2010) are marked, as well as the haplotype found in Olabidea-Ugarana River (27). For complete information about haplotypes, see ESM Table S1

Table 1 Pairwise population FST (distance method: pairwise differences) between all pairs of European *Lampetra* populations analysed in Pereira et al. (2010) and in this study.

	Tagus	Elbe	Inha	Mondego	Nabão	Neva ^{LF}	Rhine ^{LF}	Rhine	São Pedro	Sado	Garonne	Olabidea-Ugarana
Tagus	0											
Elbe	0.56165	0										
Inha	0.5167	0.93389	0									
Mondego	0.403	0.89394	0.9082	0								
Nabão	0.57483	0.78268	0.89089	0.77923	0							
Neva ^{LF}	0.27395	0.49514	0.63347	0.4069	0.50532	0						
Rhine ^{LF}	0.33164	0.46655	0.71425	0.48106	0.51412	0.08351	0					
Rhine	0.24835	0.29818	0.598	0.30385	0.5123	0.23138	0.27667	0				
São Pedro	0.62164	0.94561	0.88304	0.95299	0.88646	0.69338	0.75153	0.65838	0			
Sado	0.76801	0.91306	0.94037	0.90899	0.86873	0.66474	0.77302	0.68412	0.94112	0		
Garonne	0.38379	0.62208	0.84337	0.6625	0.54133	0.20909	0.17001	0.32733	0.83559	0.81941	0	
Olabidea-Ugarana	0.99415	0.99929	0.99926	0.99981	0.99713	0.99292	0.99495	0.99134	0.99931	0.99835	0.99571	0

Pereira et al. (2010), based on a population differentiation analysis, in a multidimensional scaling analysis and in the analysis of the haplotype network (which differs from the present one only in the presence of the Spanish haplotype), concluded that the populations of the Portuguese rivers Sado, Nabão, São Pedro and Inha constitute different conservation units. This conclusion was supported by the following criteria: their low genetic diversity (gene diversity less than 0.6608 ± 0.1143 in all cases), by the fact that the haplotypes found in each of those rivers occur only in that river and that they are derived one from each other. These results suggest a considerable history of local independent evolution and argue for the great conservation value of those *Lampetra planeri* populations (Pereira et al. 2010). The population of the Olabidea-Ugarana River has the same characteristics described for the rivers Sado, Nabão, São Pedro and Inha. It forms a distinct phylogroup composed of a private haplotype, and it is the population that is at the greatest distance both from the two populations of *L. fluviatilis* previously studied and from all the populations of *L. planeri* described (see FST matrix in Table 1). This distinctiveness and considerable separation (for *Lampetra* patterns) suggest that this population should be considered an additional conservation unit, but this issue must remain open until a more complete survey is conducted. Pereira et al. (2010) presented evidence that several Portuguese brook lamprey populations originated independently from an ancestral *L. fluviatilis* stock and predicted that similar situations were likely to be found in other European countries. The brook lampreys of the Olabidea-Ugarana River conform to that prediction, bringing into question the monophyly of the brook lamprey species *L. planeri*.

Acknowledgments We thank C. Sousa-Santos for her help. This work was supported by a grant from Iceland, Liechtenstein and Norway through the EEA Financial Mechanism and the Norwegian Financial Mechanism, by the project MarinERA “Marine phylogeographic structuring during climate change: the signature of leading and rear edge of range shifting populations” and from the Eco-Ethology Research Unit (331/94) Pluriannual financing program (Fundação para a Ciência e a Tecnologia). Collection of specimens complied with the current laws of each country.

References

Almada V.C., Pereira, A.M., Robalo, J.I., Fonseca, J.P., Levy, A., Maia, C. & Valente, A. (2008) Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea-lampreys along European shores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 391–396.

Alvarez, J. & Doadrio, I. (1986) Sobre la presencia de *Lampetra planeri* Bloch, 1784 en España. *Acta Vertebrata*, 13: 158–160.

Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.

Espanhol, R., Almeida, P.R. & Alves, J. (2007) Evolutionary history of lamprey paired species *Lampetra fluviatilis* (L.) and *Lampetra planeri* (Bloch) as inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 16: 1909–1924.

Excoffier, L.G.L. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50.

Hardisty, M.W. (2006) *Lampreys. Life without jaws*. Forrest text, Ceredigion, UK.

Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007) *Handbook of European freshwater fishes*. Kottelat, Cornol.

Lee, W.J. & Kocher, D. (1995) Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of a vertebrate genome organization. *Genetics*, 139: 873–887.

Pereira, A.M., Robalo, J.I., Freyhof, J., Maia, C., Fonseca, J.P., Valente, A. & Almada, V.C. (2010) Phylogeographical analysis reveals multiple conservation units in brook lampreys of Portuguese streams. *Journal of Fish Biology*, 77: 361–371.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Takezaki, N., Figueroa, F., Zaleska-Rutczynska, Z. & Klein, J. (2003) Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 287–292.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876–4882.

Zanandrea, G. (1959) Speciation among lampreys. *Nature*, 184: 280.

Supplementary material

ESM Table S1 Haplotype distribution of the non-coding region I haplotypes of European *Lampetra*

Haplotype number	River	Neva	Rhine	Rhine	Elbe	Garonne	Olabidea-Ugarana	Inha	Mondego	São Pedro	Nabão	Tagus	Sado
Species	<i>L. fluviatilis</i>	<i>L. fluviatilis</i>	<i>L. fluviatilis</i>	<i>L. planeri</i>	<i>L. planeri</i>	<i>L. planeri</i>	<i>L. planeri</i>	<i>L. planeri</i>	<i>L. planeri</i>	<i>L. planeri</i>	<i>L. planeri</i>	<i>L. planeri</i>	<i>L. planeri</i>
1				3	5								
2				8	11								
3				5									
4		2	2										
5		4	5										
6						2							
7			1										
8			1										
9								1					
10								19					
11								4					
12			1										
13		2	3									1	
14		3	8										
15						1							
16						1							
17						1							
18						3							
19			1										
20			2										
21											11		
22											3		
23											1		
24											1		
25											1		
26											1		

27						10						
28		1						15			1	
29		1										
30		1										
31			9									
32	1		2									
33			1									
34												
35			1									
36			4									
37											1	
38											3	
39										1		
40									6			
41									18			
42											6	
43											1	
44								1				
45	Genbank accession number Y18683											
46											1	
47												
48	1										1	
49	1											
50	1	3										
51											1	
52											1	
53	1											
54	3											
55	1											
56												7
57												10
58												15

CAPÍTULO 6

New distribution data on Spanish autochthonous species of freshwater fish

CAPÍTULO 6

New distribution data on Spanish autochthonous species of freshwater fish

Abstract Over the last two years (2008-2010) we performed a monitoring project to update the Spanish freshwater fish fauna. We have collected in 785 sampling localities homogeneously distributed throughout Spain each year. We find as the most important result of this study the occurrence of several species that constitute new records for some rivers or basins in Spain: *Lampetra planeri*, *Petromyzon marinus*, *Barbus haasi*, *Iberochondrostoma lemmingii*, *Squalius alburnoides*, *Squalius carolitertii*, *Squalius malacitanus*, *Cobitis calderoni*, *Cobitis paludica*, and *Salaria fluviatilis*. Finally we corroborate the existence of *Barbatula barbatula* in the Duero basin and the assignation of the northeastern populations of this genus to *B. quignardi*.

Keywords Distribution data • freshwater fish • new records • Spain

The Iberian freshwater fish fauna is characterized by a relatively high number of endemic species in relation to other European fish faunas, some of which are restricted to a small hydrogeographical region (Doadrio 2002, Kottelat & Freyhof 2007). Some of these species are highly threatened and have sharply declining populations in the Iberian Peninsula (Doadrio 2002, IUCN 2010), requiring extensive monitoring to detect further changes in population trends and distribution ranges. A monitoring project on Spanish rivers between 2008 and 2010 using 785 sampling localities has produced new records and confirmed others for several species as well as supplying new data on the distribution range of these species. These new records, along with the current Iberian distribution of the species, are presented in Figure 1. Common names follow Leunda et al (2009).

***Lampetra planeri* Bloch, 1784 (Cephalaspidomorphi, Petromyzontidae)**

The genus *Lampetra* Bonnaterre, 1788, is characterized by a slender body and an oral disc in which the middle endolateral teeth are usually tricuspid, and the posterior teeth are frequently absent (Kottelat & Freyhof 2007). European fresh waters are inhabited by two species, the European river lamprey (*L. fluviatilis* Linnaeus, 1758) and the

European brook lamprey (*L. planeri* Bloch, 1784). In Spain only one population of *L. planeri*, from the Ugarana River basin (Nivelle in France), has been reported (Álvarez & Doadrio 1986, Doadrio 2002). However, the Ugarana is not located in the Iberian Peninsula, having its source in the north Pyrenean slope in Spain and flowing into the Atlantic slope between Saint-Jean de Luz and Ciboure in France. In Portugal, *L. planeri* is reported from several rivers including the Sado, São Pedro, Nabão, and Inha (Pereira et al. 2010). *Lampetra fluviatilis* has become extinct in Spain because of the construction of several dams in the Tagus River. The last reported record in Spain was in 1974 in the Guadarrama River, Tagus basin, Chozas de Canales, Toledo (Doadrio 2002).

During monitoring of the majority of Spanish rivers, we found *Lampetra planeri* (Figure 2) within the Iberian Peninsula in Spain for the first time. This population was identified in five sites within the Deva River basin (Table 1). The Deva is a short river in the Cantabrian area, with its source in Fuente De (Cantabria), flowing into the Cantabrian Sea at the border between the autonomous communities of Asturias and Cantabria. In August of 2009 and 2010, all captured specimens were ammocoetes of life stages prior to the “transformer” stage [that marking the beginning of transition to adult form, and is characterized by the development of functional eyes and the modified mouth into a fully formed sucker (Gardiner 2003)]. In March 2009, we collected a transformer and in December 2010, all captured specimens were transformers. None of the specimens were sexually mature. Some transformers were kept in an aquarium to wait for sexual maturation. Transformers of *Lampetra planeri* are distinguished from those of *L. fluviatilis* by either coloration pattern or relative body proportions, such as disc length, eye length, or preorbital length relative to total length, with these parts being proportionally larger in *L. fluviatilis* than in *L. planeri* (Hardisty et al. 1970). Although body depth has been reported as a morphometric measurement to distinguish between the transformers of the two *Lampetra* species potentially inhabiting the Iberian Peninsula, its validity for this purpose has been questioned (see Gardiner 2003). Total length range of the transformers also differs, being usually less than 120 mm in *Lampetra fluviatilis* (typically 90-115 mm) and often exceeding 130 mm in *L. planeri* (although populations frequently range from 90 to 120 mm). Almost all of the Deva-Cares specimens showed total length greater than 130 mm. The position of teeth in the oral disc (Figure 3) differs, but during winter the oral disc of *L. planeri* and *L. fluviatilis* are similar. For this reason, oral disc morphology and its proportion relative to total length have limitations for species identification during winter (Gardiner 2003). The morphometric character most useful for distinguishing between *L. planeri* and *L.*

fluviatilis transformers is eye length relative to body length, which is 2.2-2.4% of total length in *L. planeri* and 2.5-2.7% in *L. fluviatilis* (Gardiner 2003). The eye length proportion in the Deva-Cares specimens that we collected ranged from 1.8 to 2.2% (Table 2). The taxonomy of these two *Lampetra* species has been a matter of controversy for a long time. They are considered to be morphologically similar but different in their timing of metamorphosis and sexual maturation (e. g. Loman 1912). From a molecular point of view, it is difficult to distinguish the species genetically (Schreiber & Engelhorn 1998, Espanhol et al. 2007, Blank et al. 2008) despite the presence of unique haplotypes of each, since they do not possess a definitive phylogenetic structure (Pereira et al. 2010). Communal spawning and behavioural mating between *Lampetra fluviatilis* and *L. planeri* has been identified, although without successful reproduction confirmed (Lasne et al. 2010). This statement questions whether reproductive isolation between both species really exists or not and whether *L. fluviatilis* and *L. planeri* belong to the same species or constitute different ecotypes within the same species (Docker 2009), if we consider the classical biological species concept of non-interbreeding populations (e. g. Mayr 1942, Dobzhansky 1950). The main differences between these species are found in their life cycle. *Lampetra planeri* is a strictly freshwater non-predatory species, whereas *L. fluviatilis* is a predatory migratory species. Waiting for more specific studies regarding hybridization between both species, adaptations to life conditions and studies finding more specific genetic markers able to separate *Lampetra* species, we use morphological diagnostic characters reported in literature for transformers (e.g. Gardiner 2003) to distinguish both species. Morphometric characters measured (Table 2) along with the size of oocytes of a female sexually mature specimen (Figure 4), which were always greater than 0.5 mm, as is indicated in Kottelat & Freyhoff (2007) for individuals of *Lampetra planeri*, allowed us to ascribe the specimens captured in the Deva- Cares basin as belonging to *L. planeri*.

Sea lamprey, *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758 (Cephalaspidomorphi, Petromizontidae)

The sea lamprey (*Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758) (Figure 2) is an anadromous parasitic species characterized by an oral disc wider than the body and an infra-oral lamina with 7-8 large, sharp teeth (Kottelat & Freyhof 2007). In addition, unlike *Lampetra* larvae, the caudal region of the sea lamprey ammocoete contains black pigment, with the entire oral hood being pigmented, while in *Lampetra* the pigmentation area does not reach the edge of the upper lip (Gardiner 2003).

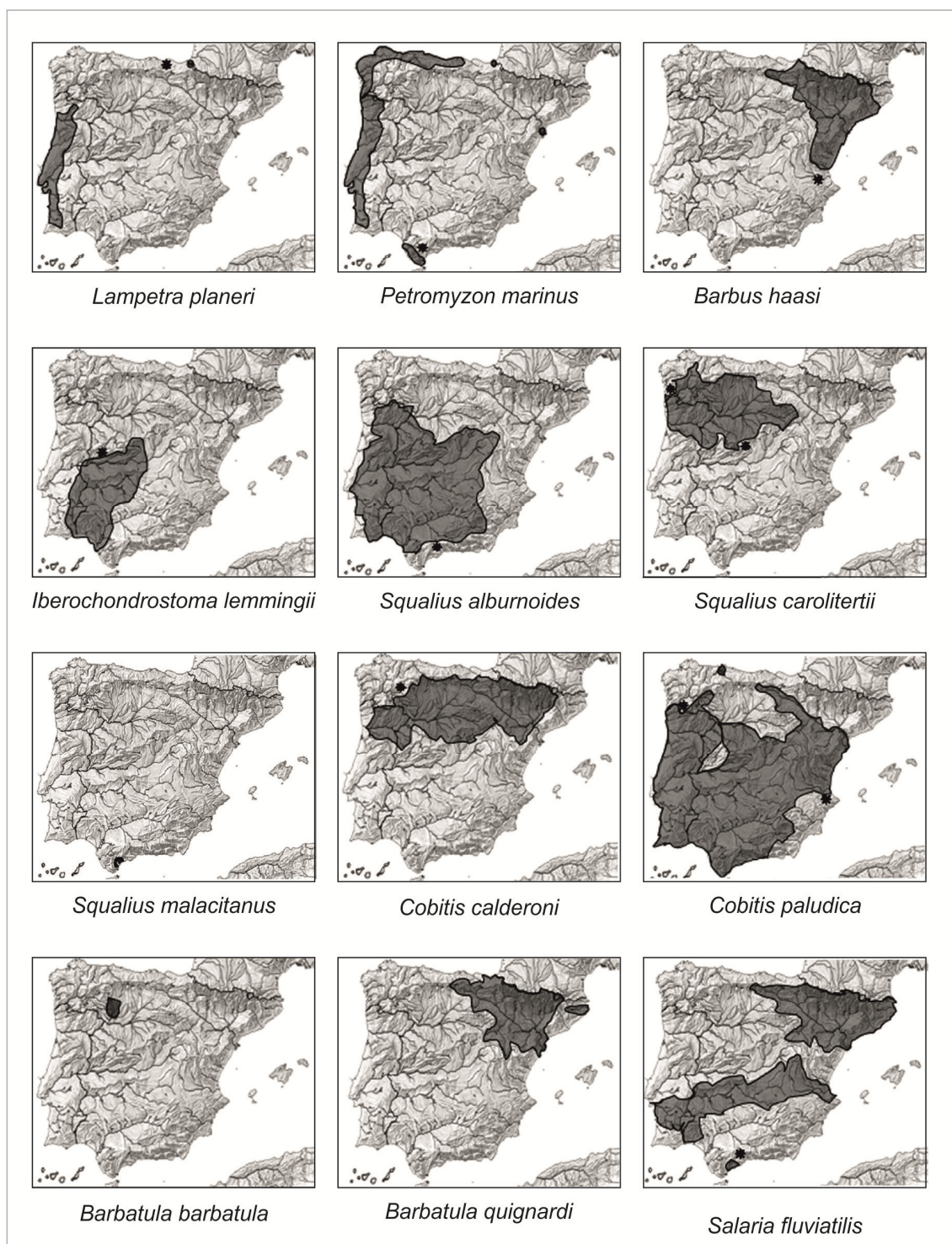


Figure 1 Iberian distribution of freshwater fish species included in this study. Black star indicates new records for these species.

The sea lamprey is widely distributed on both sides of the North Atlantic Ocean, although, recently, molecular analysis has suggested that the European and North American specimens may represent different species (Rodríguez-Muñoz et al. 2004).

In Spain, it occupies several basins along the Cantabrian, Atlantic, and Mediterranean (only in the Ebro River) slopes. Therefore, the sea lamprey inhabits most Cantabrian rivers, although it is missing from some areas of País Vasco and Cantabria community, as well as from Galician rivers. This species has been reported from several basins including the Guadiana River, Guadalquivir's estuary and some southern rivers such as the Guadiaro estuary, the Guadalete and Barbate Rivers, and some Ebro tributaries. These records are old and scarce (Doadrio 2002). We have recently collected juvenile specimens from the Guadiaro River (Table 1). This confirms that reproduction of the sea lamprey occurs in southern Spain. The Guadiaro River runs southward from the Serranía de Ronda (Málaga province) through the Sierra de Grazalema and flows into the Mediterranean Sea at Sotogrande in Cádiz. Populations of sea lamprey have declined mainly because of pollution, water abstraction for irrigation and golf courses, and presence of barriers in rivers that prevent them from reaching breeding sites (Doadrio 2002). Thus, although the sea lamprey is widely distributed along the majority of Spanish coastal areas, it is rare.

Iberian redfin barbel, *Barbus haasi* Mertens, 1925 (Actinopterygii, Cyprinidae)

The Iberian redfin barbel (*Barbus haasi* Mertens, 1925) is an endemic Spanish fish identified by its large head and a longer and wider snout relative to other Iberian *Barbus* species. In the adult, pharyngeal teeth are present in three rows (5/3/2) and are straight, the upper lip is thick, and the lower one has a well-developed median lobe. The most posterior unbranched dorsal fin ray has small denticles (Doadrio 1990, Doadrio 2002).

This species is distributed along the upper reaches of several Spanish rivers, the Ebro basin, and several Mediterranean rivers including the Llobregat, Francolí, Foix, Besós, Gaia, La Cenia, Riudecanyes, Mijares, Palancia, and Turia (Doadrio & Garzón 1987, Doadrio 2002). Recently, we found a previously unreported population of *B. haasi* in the Jucar basin (Table 1), a river which runs southward from its source in the Montes Universales in Cuenca province, later turning east to flow into the Gulf of Valencia in the Mediterranean Sea. This extends the range of this species. The morphological identification was confirmed by mitochondrial DNA analysis. *Barbus haasi* (Figure 2

Table 1 New records of Spanish freshwater fish species. Voucher numbers refer to tissue samples collected from individuals for DNA analyses. Collectors: AA, A. Arriol; BL, B. Levin; BP, B. Prieto; CC, C. Cunha; CP, C. Pedraza; CPz, C. Pérez; EF, E. Fernández; FM, F. Melero; GS, G. Solís; ID, I. Doadrio; IM, I. Martínez; JLG, J.L. González; JM, J. Manzano; MJA, M.J. Aramburu; MV, M. Vilá; PG, P. Garzón; PO, P. Ornelas; SP, S. Perea.

Taxa	Locality	UTM	Nº specimens collected (voucher numbers)	Date	Collectors
<i>Lampetra planeri</i>	Deva R. Panes. Asturias. Spain	30T 0371192 4798562	49 ammocoetes (MNCN AT19104-19153)	VIII/18/2010	PG, JLG, ID
<i>Lampetra planeri</i>	Deva R. La Hermida. Cantabria. Spain	30T 0367385 4793019	22 ammocoetes (MNCN AT11482-11483)	VIII/6/2009	PG, JLG, ID
			13 ammocoetes (MNCN AT19072-19084)	VIII/11/2010	PG, JLG, ID
<i>Lampetra planeri</i>	Cares R. Mier. Asturias. Spain	30T 0364166 4797591	1 transformer 11 ammocoetes (MNCN AT19098-19103)	III/2/2009	IM, FM
				VIII/18/2010	PG, JLG, ID
<i>Lampetra planeri</i>	Deva R. Panes. Asturias. Spain	30T 0371168 4798471	36 transformers	IV/12/2010	PG, PO, CP, ID
<i>Lampetra planeri</i>	Deva R. Rumenes. Cantabria. Spain	30T 0369611 4795043	21 (11 transformers + 10 ammocoetes)	IV/12/2010	PG, PO, CP, ID
<i>Lampetra planeri</i>	Deva R. Puente Lles. Asturias. Spain	30T 0369759 4797452	22 transformers	IV/12/2010	PG, PO, CP, ID
<i>Petromyzon marinus</i>	Guadiaro R. Jimena de la Frontera. Cádiz. Spain	30S 0284451 4034112	1 (MNCN AT9450)	VI/12/2009	PG, JLG, ID
			1	VI/27/2010	PG, JLG, ID
<i>Barbus haasi</i>	Barranco del Agua. Júcar basin. Jarafuel. Valencia. Spain	30S 0664334 4334018	1 (MNCN M356)	IV/23/2001	ID
			21 (MNCN AT19625-19646)	IX/10/2010	PG, JLG, ID
<i>Iberochondrostoma lemmingii</i>	Arroyo Palomero. Alagón basin. Cerezo. Cáceres. Spain	29T 735508 4457628	4 (MNCN AT6893-6897)	III/22/2009	PG, JLG, ID
			13	V/6/2010	PG, JLG, ID

<i>Squalius alburnoides</i>	Guadalhorce R. Álora. Málaga. Spain	30S 0348796 4077634	44 (MNCN AT9641- 9647)	VI/24/2010	PG, JLG, ID
<i>Squalius alburnoides</i>	Guadalhorce R. Cártama. Málaga. Spain	30S 0355999 4066246	92	VI/27/2010	PG, SP, JLG, ID
<i>Squalius carolitertii</i>	Alberche R. Tagus basin. San Martín de la Vega del Alberche. Ávila. Spain	30T 0315779 4477869	25 25 (MNCN AT18549- 18575)	V/31/2009 VI/30/2010	PG, CC, AA, ID MJA, BP, JLG
<i>Squalius carolitertii</i>	Oitavén R. Verdugo basin. Fornelos de Montes. Pontevedra. Spain	29T 0545613 4689244	45	VII/14/	2010 PG, JLG, JM, MV, ID
<i>Squalius malacitanus</i>	Vaquero stream. Estepona. Málaga	30S 0303138 4007225	1	IV/14/2011	CPz, EF
<i>Cobitis calderoni</i>	Caboalles R. Sil basin. Villablino. León. Spain	29T 0717124 4757683	2 (MNCN AT17956-57)	VI/30/2010	PG, JLG, PO, ID
<i>Cobitis paludica</i>	Macaco R. Limia basin. Lobios. Ourense. Spain	29T 0592552 4652952	6 (MNCN AT18058- 18063)	VII/1/2010	PG, JLG, PO, ID
<i>Cobitis paludica</i>	Serpis R. Serpis basin. Beniarrés. Alicante. Spain	30S 0279262 4035725	1 (MNCN AT12727) 3	IX/25/2009 IX/8/2010	PG, JLG, BL, ID PG, GS, JLG, ID
<i>Barbatula barbatula</i>	Cea R. Douro basin. Villamol. León. Spain	30T 0332250 4699010	15 14 (MNCN AT16841)	VII/15/2009 VI/4/2010	PG, JLG, ID PG, JLG, GS, ID
<i>Barbatula barbatula</i>	Esla R. Douro basin. Villaroañe. León. Spain	30T 0293776 4706287	60 13 (MNCN AT16833- 16835)	VII/16/2009 VI/4/2010	PG, JLG, ID PG, GS, JLG, ID
<i>Barbatula barbatula</i>	Órbigo R. Douro basin. Veguellina. León. Spain	30T0263752 4701473	50 (MNCN AT10987- 10991)	VII/16/2009	PG, JLG, ID
<i>Salaria fluviatilis</i>	Hozgarganta R. Guadiaro basin. Jimena de la Frontera. Cádiz. Spain	30S 0279262 4035725	1 (MNCN AT9445) 4 (MNCN AT17689- 17691)	VI/12/2009 VI/26/2010	PG, BP, JLG, ID PG, SP, JLG, ID
<i>Salaria fluviatilis</i>	Bullent R. Pego. Alicante. Spain	30S 0752960 4307746	11 (MNCN AT19410- 19411)	IX/9/2010	PG, GS, JLG, ID

Table 2 Morphometric measurements of *Lampetra planeri* specimens captured in the Deva-Cares basin. Measurements are expressed in mm.

Specimen	Preorbital length (% relative to TL)	Eye length (% relative to TL)	Oral disc length (% relative to TL)	Body depth (% relative to TL)	Total length (TL)
1	8.1 (6.3)	2.9 (2.2)	5.6 (4.3)	9 (7)	128
2	7.8 (6.2)	2.8 (2.2)	5.6 (4.4)	9.8 (7.8)	125
3	8.9 (5.7)	2.8 (1.8)	5.9 (3.8)	10.2 (6.5)	155
4	8.8 (6.2)	3.1 (2.2)	6.3 (4.4)	9.6 (6.8)	141
5	8.4 (6)	3 (2.1)	6.7 (4.8)	9.4 (6.7)	139
6	8.2(5.7)	3.2 (2.2)	6.5 (4.5)	9.6 (6.7)	143
7	7.9 (5.4)	2.7 (1.8)	5.7 (3.9)	9.4 (6.4)	146
8	7.6 (5.7)	2.6 (1.9)	4.8 (3.6)	8.9 (6.6)	133
9	7.8 (5.4)	2.7 (1.9)	5.7 (3.9)	9 (6.2)	145
10	9.6 (6.1)	3 (1.9)	6.4 (4)	10.1 (6.4)	157
11	9.4 (5.9)	3.1 (1.9)	6 (3.8)	9.8 (6.2)	158
12	10.7 (6)	3.6 (2)	6.6 (3.7)	10.8 (6.1)	176
13	8.4 (5.9)	3.1 (2.2)	5.1 (3.6)	8.8 (6.2)	142
14	8.2 (6.1)	3.1 (2.3)	5.9 (4.4)	8.2 (6.1)	134
15	9.8 (6.4)	3.4 (2.2)	6.1 (4)	9.8 (6.5)	151
16	8.7 (5.5)	3.4 (2.1)	6.5 (4.1)	9.9 (6.2)	158
17	9.9 (5.9)	3.4 (2.1)	7 (4.2)	11.2 (6.7)	167
18	7.6 (5.5)	2.6 (1.8)	4.9 (3.5)	9.4 (6.8)	138
19	7.9 (6.3)	2.7 (2.1)	4.9 (3.9)	7.4 (5.9)	124
20	6.3 (5.6)	2.1 (1.8)	4.5 (4)	7.1 (6.3)	112
21	8.6 (5.9)	3.4 (2.3)	6.6 (4.5)	8.7 (6)	145
22	8.2 (5.6)	3.2 (2.2)	5 (3.4)	8.5 (5.8)	145

shows genetic introgression with the Western Mediterranean barbel (*B. meridionalis*) in the Besós and Llobregat basins, which represents the northern extremes of the distribution area of the Iberian redfin barbel (Machordom *et al.*, 1990). The Jucar basin constitutes the southern border of its distribution, thus hybridization may occur between the Iberian redfin barbel and the Eastern Iberian barbel (*Luciobarbus guiraonis*), the other barbel species inhabiting the Jucar basin. Further efforts are necessary to determine the occurrence of hybridization or possibly an ancient mitochondrial introgression from *B. haasi* to *L. guiraonis*, a phenomenon described for other cyprinids (see e.g. Dowling & Demarais 1993, Aboim *et al.* 2010). In general, Iberian redfin barbel populations have suffered a strong decline mainly due to pollution and the presence of exotic species (Doadrio 2002), which still continues.

Iberian arched-mouth nase, *Iberochondrostoma lemmingii* (Steindachner, 1866) (Actinopterygii, Cyprinidae)

The Iberian arched-mouth nase (*Iberochondrostoma lemmingii* Steindachner, 1866) is a small cyprinid characterized by an arched mouth without a horny layer on the lower lip. The body is covered with small scales, 52-66 on the lateral line, and the entire body may be black spotted (Doadrio 2002, Robalo et al. 2007).

This species is an Iberian endemism distributed in several Spanish river basins: the Tagus, Guadiana, Guadalquivir, and Odiel. Within the past two years, we discovered a population of this species (Figure 2) in the Palomero stream, a small tributary of the Alagón River in the Tagus basin, from which it had not been previously reported (Table 1). This record constitutes its most northwesterly distribution in the Iberian Peninsula. The Palomero stream is a small river with its source in the Sierra del Castillejo and Sierra del Canchal flowing into the Valdeobispo reservoir in the Alagón basin. Water pollution and water abstraction for irrigation are the main threats to this species in this region (Doadrio 2002).

Calandino, *Squalius alburnoides* (Steindachner, 1866) (Actinopterygii, Cyprinidae)

The calandino (*Squalius alburnoides* Steindachner, 1866) is a small species of hybrid origin, which has variable ploidy levels. The calandino has a slender body and a thinner caudal peduncle in comparison to other Iberian *Squalius* species. It possesses small fins, usually with 7 branched dorsal fin rays and 8-9 branched anal fin rays (Doadrio 2002). This species is distributed along the southwestern part of the Iberian Peninsula and inhabits the following river basins: Douro, Tagus, Sado, Guadiana, Guadalquivir, and Odiel (Doadrio 2002). Within these basins it is generally associated with other *Squalius* species due to its reproductive biology, which generally involves meiotic hybridogenesis (see e.g. Carmona et al. 1997). We have found a previously unreported Spanish population for this species (Figure 2) in the River Guadalhorce in southern Spain (Table 1). This river drains the plain of Antequera and flows into the Mediterranean Sea in Málaga province. The newly discovered population comprised diploid and triploid individuals. The possibility that this species has been artificially introduced into the River Guadalhorce cannot be discounted, due to the absence of previous records in this basin.



Figure 2 Specimens collected in each newly reported population. A) *Lampetra planeri* (Deva Basin); B) *Petromyzon marinus* (Guadiaro River); C) *Barbus haasi* (Júcar basin); D) *Iberochondrostoma lemmingii* (Palomero River); E) *Squalius alburnoides* (Guadalhorce River); F) *Squalius carolitertii* (Alberche River); G) *Squalius malacitanus* (Vaquero River); H) *Cobitis calderoni* (Caboalles River); I) *Cobitis paludica* (Serpis basin); J) *Cobitis paludica* (Limia Basin); K) *Barbatula barbatula* (Cea River); L) *Barbatula quignardi* (Ebro Basin); M) *Salaria fluviatilis* (Bullent River); N) *Salaria fluviatilis* (Hozgarganta River).

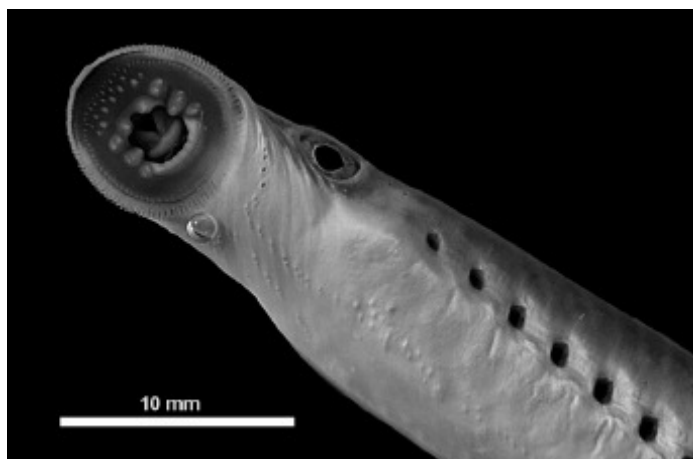


Figure 3 Oral disc of *Lampetra planeri* during the winter season

Northern Iberian chub, *Squalius carolitertii* (Doadrio, 1987) (Actinopterygii, Cyprinidae)

The Northern Iberian chub (*Squalius carolitertii* Doadrio, 1987) is a medium-sized species characterized by narrow infraorbital bones relative to other Iberian *Squalius* species, such as the Southern Iberian chub (*S. pyrenaicus*) and the Gallo chub (*S. castellanus*); a rounded snout; and a subterminal mouth. Head length is approximately equal to body depth (Doadrio 1987, Doadrio 2002, Doadrio et al. 2007). The distribution range of *S. carolitertii* covers the northwestern region of the Iberian Peninsula (Doadrio 2002), in the Douro and Galician river basins. Within Galician drainage, *S. carolitertii* is present in the Limia, Miño, and Lézere basins. We report for the first time this species (Figure 2) in the upper reaches of the Alberche River, a tributary of the Tagus basin (Table 1). The Alberche River constitutes one of the main tributaries of the Tagus basin. Its source is in Fuente Alberche and it forms the natural division between the Sierra de Gredos and Sierra de Guadarrama ranges in the Sistema Central Mountains. We also found for the first time a second population of *S. carolitertii* in northwestern Spain in the Oitavén River (Table 1), a tributary to the Verdugo River which flows into the Atlantic at the Ría de Vigo in Galicia.

Málaga chub, *Squalius malacitanus* Doadrio & Carmona, 2006 (Actinopterygii, Cyprinidae)

The Málaga chub (*Squalius malacitanus* Doadrio & Carmona, 2006) is a medium-sized cyprinid species characterized by broad infraorbital bones, especially the fourth and fifth

ones; a terminal mouth; a snout shorter or equal to eye diameter and a depth caudal peduncle. These features distinguish *S. malacitanus* from other Iberian *Squalius* species such as the Southern Iberian chub (*S. pyrenaicus*) or the Eastern Iberian chub (*S. valentinus*) as well as some osteological characters (Doadrio & Carmona 2006). The Málaga chub is a southern Spanish endemism that inhabits several rivers of Málaga province, such as the Guadalmina and Guadaiza basins and the Genal River, a tributary of the Guadiaro basin. Recently, one specimen (Figure 2, Table 1) of *S. malacitanus* has been found in the Vaquero stream (Estepona, Málaga) which constitutes a new record for this species in Spain. The Vaquero stream is a short river located in Málaga province within the autonomous community of Andalucía that flows into the Mediterranean Sea. The species has a restricted area and should be considered critically endangered according to the IUCN red list.

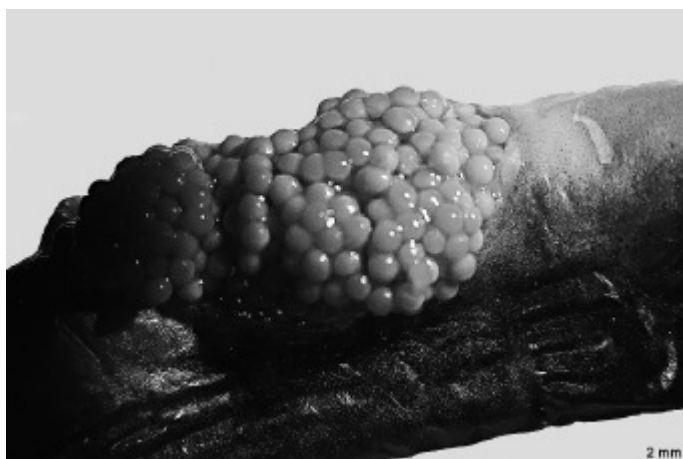


Figure 4 Oocytes size of a sexually mature female collected in the Deva-Cares basin

Northern Iberian spined-loach, *Cobitis calderoni* Bacescu, 1962 (Actinopterygii, Cobitidae)

The Northern Iberian spined-loach (*Cobitis calderoni* Bacescu, 1962) is chiefly distinguished from other Iberian *Cobitis* species, such as the Southern Iberian spined-loach (*C. paludica*), by the absence of the lamina circularis and the distribution of dark blotches along the body. It also possesses a longer and narrower caudal peduncle than *C. paludica* (Doadrio 2002).

The distribution of *C. calderoni* is mainly the northern part of the Iberian Peninsula and comprises three well-separated populations in Spain: two in the northern Ebro and Douro basins and a third, isolated, population in the Tagus basin. In this latter drainage, *C. calderoni* occurs in sympatry with *C. paludica* (Doadrio & Perdices 2005). Molecular

studies have demonstrated that populations of *C. calderoni* from the Douro and Tagus basins are phylogenetically more closely related to each other than to the Ebro population (Perdices & Doadrio 2000). In the Ebro basin the species is scarce and generally non-abundant, except for some populations in the Rioja region which are abundant. Conversely, some Douro populations are highly abundant (Doadrio 2002). The species is also present in some rivers in the Douro basin in Portugal, but is restricted to small regions (Rogado et al. 2005). Within the Tagus basin, *C. calderoni* inhabits the upper stretches of the Jarama and Lozoya Rivers. Other populations from the upper reaches of the Tajuña and Manzanares rivers (Doadrio 2002) need further confirmation. Monitoring sampling strategies in the Tajuña River were unsuccessful into finding *Cobitis calderoni*.

Within the past two years, we found a previously unreported Spanish population of this species (Figure 2) in the Caboalles River of the Sil basin (Table 1), which flows into the Las Rozas reservoir. In this river, we confirmed that *C. calderoni* occurs in sympatry with the Southern Iberian spined-loach (*C. paludica*). *Cobitis calderoni* is an endangered species that has suffered a sharp decline in population in recent years (Crivelli 2006).

Southern Iberian spined-loach, *Cobitis paludica* (De Buen, 1930) (Actinopterygii, Cobitidae)

The southern Iberian spined-loach (*Cobitis paludica* De Buen, 1930) is chiefly distinguished from other Iberian *Cobitis* species, such as the Northern Iberian spined-loach (*C. calderoni*), by the presence of the lamina circularis and the distribution of body markings. In addition, the length of its caudal peduncle is about equal to its depth (Doadrio 2002). *Cobitis paludica* is a widely distributed species in Spain, although it does not occur in the most northerly Spanish regions, being present only in some areas of the Miño and Nalón basins, where it was probably artificially introduced (Doadrio 2002). In Spain, *C. paludica* inhabits numerous river basins, including the Ebro, Tagus, Guadiana, Guadalquivir, Guadalete, Guadalhorce, Guadalmedina, Barbate, Jara, Piedras, Vega, Peñíscola, Odiel, Jucar, Turia, Mijares, Bullent and Racons, Albufera de Valencia, and some tributaries on the western margin of Douro basin.

In the Limia basin, *C. paludica* (Figure 2) has been reported only in Portugal; however, we recently discovered the species in the Spanish region of this basin, in the Macaco River, a small tributary 10 km in length on the western margin of the Limia basin. The source of this river is in the Spanish region of the Sierra de Geres and it flows into the Lindoso

reservoir. The newly reported population constitutes a new record for the southern Iberian spined-loach in Spain (Table 1). We also found a new record for *C. paludica* in the Serpis River basin within the Spanish Levantine region (Table 1). The Serpis is a short coastal river in the provinces of Alicante and Valencia. This river originates in the Carrasqueta Mountains with the confluence of the Polop and Troncal streams and flows into the Mediterranean Sea at Gandía (Valencia province). This new report constitutes the southernmost Mediterranean population of *C. paludica*. In general, populations of the Southern Iberian spined-loach have suffered severe depletion and have disappeared from some rivers in the Ebro basin (Doadrio 2002).

***Barbatula* Linck, 1790 (Actinopterygii, Nemacheilidae)**

The genus *Barbatula* Linck, 1790, differs from the other European nemacheilid genus *Oxynoemacheilus* in possessing a truncated or slightly emarginated (as opposed to deeply emarginated) caudal fin and 15-16 (instead of 17) branched caudal fin rays (Kottelat & Freyhof 2007). Iberian populations of this genus were originally considered a subspecies of the European population, however, not all authors recognized this taxonomic designation and attributed the Iberian populations to the species *Barbatula barbatula* (e.g. Kottelat 1997), but without taking into account exhaustive morphological or genetic approaches. Thus, it was believed that the Iberian Peninsula was inhabited by *B. barbatula*, but the need for a taxonomic review of the Spanish populations was suggested (Doadrio 2002). The populations from the Douro basin were considered to have an allochthonous origin from other Spanish population as a result of translocation by fishermen. Later all Spanish populations were recognized as *B. quignardi* (Kottelat & Freyhof 2007). After a morphological review of the specimens collected during our monitoring project, we confirm that the Spanish populations of this genus belong to two species, the Pyrenean stone loach, *B. quignardi* (Bacescu-Mester, 1967) and the stone loach, *B. barbatula* (Linnaeus, 1758). The main morphological differences between these species are the presence of 2-4 irregular dark blotches along the dorsum between the nape and dorsal fin in *B. quignardi* that are not often present in *B. barbatula*. Other differences are the origin of the dorsal fin, which is anterior to (*B. barbatula*) or posterior to (*B. quignardi*) the pelvic fins origin; and morphometric variables related to the depth of the caudal peduncle (Kottelat & Freyhof 2007).

In general, the species *B. quignardi* occupies a more restricted area than *B. barbatula*. The former species is endemic to Spain and France, while *B. barbatula* is distributed throughout Eurasia (Kottelat & Freyhof 2007). In Spain *B. quignardi* (Figure 2) occupies

the Ebro basin, the eastern Cantabrian rivers of the Bidasoa and Nervión basins and the Ter river in the Cataluña Community. Populations from the Douro basin belong to the species *B. barbatula* (Figure 2) and have an allochthonous origin, probably from European rivers. *B. barbatula* occurs in three of the main tributaries of the eastern margin of the Douro basin, the Cea, Esla, and its tributary Órbigo (Table 1), the first two populations being new records of the stone loach for Spain.

Freshwater blenny, *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801) (Actinopterygii, Blenniidae)

The freshwater blenny (*Salaria fluviatilis*) is a small scaleless fish with long dorsal and anal fins that extend along the dorsum and most of the ventral part of the body. It also possesses a small filiform tentacle above each eye (Kottelat & Freyhof 2007), which has been considered a taxonomic character (Kottelat 2004). There is a marked sexual dimorphism with males possessing a conspicuous cephalic crest, particularly marked during the breeding season. The Iberian distribution range of *S. fluviatilis* extends to several Spanish rivers: the Ebro, Júcar, Bullent, Fluvía, Verde, Guadaiza, and Guadiana. The species is absent from the northwestern quadrant of the Iberian Peninsula and has probably disappeared from Albufera de Valencia and the Segura River (Doadrio 2002). Historically, its populations were locally abundant but have suffered a severe decline during the last recent years (Doadrio 2002). Within the last two years, we found a new record for *S. fluviatilis* (Figure 2), in the Hozgarganta River, a tributary of the Guadiaro basin (Table 1), which is a short Spanish river flowing into the Mediterranean Sea. We also confirmed a previous report of its presence in the Bullent River (Figure 2, Table 1), a small basin in the Levantine region of Spain flowing from the discharge of a karstic aquifer in the form of springs into the Mediterranean Sea.

Acknowledgments

We thank all those who have helped us in fieldwork: B. Prieto, M. J. Arumburu, P. Ornelas, C. Pedraza, J. Manzano, A. Arraiol, C. Cuhna, G. Solís, M. Vilá, I. Martínez and F. Melero. The Lucidus Consultancy reviewed the English text. Cristina Pérez from URS provided us with very useful information. We would like especially thanks to Jerónimo de la Hoz, Nel Álvarez, Gustavo González and Paco Blanco. We also thanks all the Administration stuff of the Autonomous Communities that gave us permissions for sampling. This study was funded by the project CGL201015231/Bos and “Seguimiento de la Ictiofauna Continental Española” from the Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.

References

- Aboim, M.A., Mavárez, J., Bernatchez, L. & Coelho, M.M. (2010) Introgressive hybridization between two Iberian endemic cyprinid fish: a comparison between two independent hybrid zones. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 817-828.
- Álvarez, J. & Doadrio, I. (1986) Sobre la presencia de *Lampetra planeri* Bloch, 1784 en España. *Doñana Acta Vertebrata*, 13: 158-160.
- Blank, M., Jurrs, K. & Bastrop, R. (2008) A mitochondrial multigene approach contributing to the systematics of the brook and river lampreys and the phylogenetic position of *Eudontomyzon mariae*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65: 2780-2790.
- Crivelli, A.J. (2006) *Cobitis calderoni*. In: IUCN 2010. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 18 November 2010.
- Carmona, J. A., Sanjur, O.I., Doadrio, I., Machordom, A. & Vrijenhoek, R.C. (1997) Hybridogenetic reproduction and maternal ancestry of polyploidy Iberian fish: the *Tropidophoxinellus alburnoides* complex. *Genetics*, 146: 983-993.
- Doadrio, I. (1987) *Leuciscus carolitertii* n. sp. from the Iberian Peninsula (Ostariophysi, Cyprinidae). *Senckenbergiana Biologica*, 68(4/6): 301-309.
- Doadrio, I. (1990) Phylogenetic relationships and classification of western palearctic species of the genus *Barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae). *Aquatic Living Resources*, 3: 295-303.
- Doadrio, I. (2002) *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza/Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC. Madrid.
- Doadrio, I. & Carmona, J.A. (2006) Phylogenetic overview of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in the Iberian Peninsula, with description of two new species. *Cybium*, 30(3): 199-214.
- Doadrio, I. & Garzón, P. (1987) Sobre la distribución de *Barbus haasi* (Ostariophysi, Cyprinidae). *Doñana Acta Vertebrata*, 14: 123-125.

- Doadrio, I. & Perdices, A. (2005) Phylogenetic relationships among the ibero-african cobitids (*Cobitis*, Cobitidae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 484-493.
- Doadrio, I., Perea, S. & Alonso, F. (2007) A new species of the genus *Squalius* Bonaparte, 1837 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Tagus River Basin (Central Spain). *Graellsia*, 63(1): 89-100.
- Dobzhansky, T. (1950) Mendelian populations and their evolution. *American Naturalist*, 84: 401-418.
- Docker, M. F. (2009) A review of the evolution of nonparasitism in lampreys and an update of the paired species concept. *American Fisheries Society Symposium* 72: 71-114.
- Dowling, T.E. & Demarais, B.D. (1993) Evolutionary significance of introgressive hybridization in cyprinid fishes. *Letters to Nature*, 362: 444-446.
- Espanhol, R., Almeida, P.R. & Alves, M.J. (2007) Evolutionary history of lamprey paired species *Lampetra fluviatilis* (L) and *L. planeri* (Bloch) as inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 16: 1909-1924.
- Gardiner, R. (2003) *A field identification key for lamprey ammocoetes*. Conserving Natura 2000 River Series. Conservation techniques Nº4. English Nature. Peterborough.
- Hardisty, M.W., Potter, I.C. & Sturge, R. (1970) A comparison of the metamorphosing and macrophthalmia stages of the lampreys *Lampetra fluviatilis* and *Lampetra planeri*. *Journal of Zoology*, 162: 383-400.
- IUCN (2010) *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2010.3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 20 September 2010.
- Kottelat, M. (1997) European Freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. *Biologia (Bratislava), Section Zoology*, 52(Suppl.): 1-271.

Kottelat, M. (2004) *Salaria economidisi*, a new species of freshwater fish from lake Trichonis, Greece, with comments on variation in *S. fluviatilis* (Teleostei, Blenniidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 111: 121-137.

Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007) *Handbook of European freshwater fishes*. Cornol & Freyhof, Berlin

Lasne, E., Sebatié, M.R. & Evanno, G. (2010) Communal spawning of brook and river lampreys (*Lampetra planeri* and *L. fluviatilis*) is common in the Oir River (France). *Ecology of Freshwater Fish*, 19: 323-325.

Leunda, P.M., Elvira, B., Ribeiro, F., Miranda, F., Oscoz, J., Alves, M.J. & Collares-Pereira, M.J. (2009) International standardization of common names for Iberian Endemic Freshwater Fishes. *Limnetica*, 28(2): 189-202.

Loman, J.C.C. (1912) Über die Naturgeschichte des Bachneunauges *Lampetra planeri*. *Zoologisches Jahrbuch* (Suppl.), 15: 243-270.

Machordom, A., Berrebi, P. & Doadrio, I. (1990) Spanish barbel hybridization detected using enzymatic markers: *Barbus meridionalis* Risso X *Barbus haasi* Mertens (Osteichthyes: Cyprinidae). *Aquatic Living Resources*, 3: 295-303.

Mayr, E. (1942) *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press. New York.

Perdices, A. & Doadrio, I. (2000) Diversification patterns in *Cobitis calderoni* (Osteichthyes: Cobitidae) and relationships with some *Cobitis* lineages. *Folia Zoologica*, 49(1): 45-54.

Pereira, A.M., Robalo, J.I., Freyhof, J., Maia, C., Fonseca, J.P., Valente, A. & Almada, V.C. (2010) Phylogeographical analysis reveals multiple conservation units in brook lampreys *Lampetra planeri* of Portuguese streams. *Journal of Fish Biology*, 77: 361-371.

Robalo, J.I., Almada, V.C., Levy, A. & Doadrio, I. (2007) Re-examination and phylogeny of the genus *Chondrostoma* based on mitochondrial and nuclear data and the definition of 5 new genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 362-372.

Rodríguez-Muñoz, R., Waldman, J.R., Grundwald, C., Roy, N.K. & Wirgin, I. (2004) Absence of shared haplotypes between sea lamprey from North American and Spanish rivers. *Journal of Fish Biology*, 64: 783-787.

Rogado, L., Alexandrino, P., Almeida, P.R., Alves, M.J., Bochechas, J., Cortes, R., Domingos, I., Filipe, A. F., Madeira, J. & Magalhães, M.F. (2005) Peixes. In: M.J. Cabral, J. Almeida, P. R. Almeida, T. Dellinger, N. Ferrand-Almeida, M.E. Oliveira, J.M. Palmeirin, A.I. Queiros, L. Rogado & M. Santos-Reis (eds.). *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza. Lisboa.

Schreiber, A. & Engelhorn, R. (1998) Population genetics of a cyclostome species pair, river lamprey (*Lampetra fluviatilis* L.) and brook lamprey (*Lampetra planeri* Bloch). *Journal of Zoological Systematic and Evolution*, 36: 85-99.

CAPÍTULO 7

Origination of different stocks of brook lampreys in Spain from
Lampetra fluviatilis at two distinct times and places

CAPÍTULO 7

Origination of different stocks of brook lampreys in Spain from *Lampetra fluviatilis* at two distinct times and places

Abstract In this paper, the hypothesis that the brook lampreys from two rivers in Spain (Olabidea-Ugarana and Cares-Deva) correspond to two distinct and isolated lineages was tested. DNA sequences of the mitochondrial non-coding region I from 49 larvae of the Cares-Deva were used, as well as sequences from the same marker from *L. fluviatilis* and from *L. planeri* of the Olabidea-Ugarana already published. Results obtained shows that the two Spanish populations correspond to different genetic units and that Cares-Deva population is probably a recent offshoot of *L. fluviatilis*.

Keywords *Lampetra* • Spain • phylogeography • non-coding region I

Introduction

Lampreys are remarkable not only for their assortment of very primitive characters but also for their diverse life histories and patterns of speciation (Hardisty 2006).

All lampreys spawn in freshwater and have a larval phase that typically lasts for several years. The eyeless ammocoetes, which are filter feeders, live buried in the sediment. After metamorphosis, their development may take two courses: individuals may migrate downstream spending one or more years in the sea or lakes, where they adopt a parasitic or predatory way of life, growing massively. Upon the approach of sexual maturation, they migrate back into freshwater where they spawn and die. Alternatively, recently metamorphosed lampreys may remain in freshwater without feeding, reaching sexual maturity at a much smaller size, spawning and dying after a short period (Kottelat & Freyhof 2007).

A common phenomenon in the evolution of lampreys is the formation of these non-migratory geographically localised freshwater species from widely distributed migratory larger ones (Zanandrea 1959, Hardisty 2006). This “satellite” species have been recognised in 8 genera (Lang et al. 2009).

It is still a matter of some debate if speciation of these small lampreys (brook lampreys) occurs in sympatry (by size assortative mating) with the large sized ones, or if it is a

gradual process facilitated by condition where gene flow between the two forms is blocked or very reduced, e. g. because the migratory form shift in its range and ceased to occur in the area, or if it is a gradual process driven by climatic or other ecological changes.

In Western Europe, lampreys of the genus *Lampetra* were traditionally divided in two species: the large anadromous *L. fluviatilis* (Linnaeus, 1758) and the small non migratory *L. planeri* (Bloch, 1784), which does not feed as an adult and remains in its natal waterbody. In recent years, evidence has been accumulating against the monophyly of *L. planeri*, favouring multiple origins of local stocks of brook lampreys from widely distributed *L. fluviatilis* (Espanhol et al. 2007, Pereira et al. 2010). In Spain, *L. fluviatilis* was formerly present on the Tagus drainage, but is not recorded since 1974 after the construction of a series of dams on this large Iberian river (Doadrio 2002).

Recently, two *Lampetra* populations were discovered in the north and northeast of the country (see Figure 1) (Alvarez & Doadrio 1986, Doadrio 2002, Mateus et al. 2011, Perea et al. 2011). The population from the Olabidea-Ugarana was recently analysed genetically using mt-DNA (non coding region I) and was shown to be a brook lamprey form, with very low diversity and containing a private haplotype, quite distinct from the haplotypes of *L. fluviatilis* (Pereira et al. 2011).

The Cares-Deva population was analysed and diagnosed as brook lampreys (Perea et al. 2011). All the transformers kept in aquaria in December 2010 described by those authors were sexually mature in the following spring, dying a few weeks later. As the migratory or brook lamprey ontogenetic trajectory is established before the transformer stage, the demonstration of sexual maturation with sperm and egg production is unequivocal confirmation of the non-migratory brook lamprey status of the animals.

Mateus et al. (2011) analysed mt-DNA sequences of brook lampreys from Deva River and concluded that they belong to a clade that also contains *L. fluviatilis* and brook lampreys from west Portugal. However, no comparisons were made including the two Spanish populations. From a conservation perspective, it is necessary to access to what extent the two brook lamprey populations present in north Spain correspond to a single stock or to distinct stocks.

In this paper, the hypothesis that the brook lampreys from Olabidea-Ugarana and Cares-Deva correspond to two distinct and isolated lineages was tested. Additionally, it was

intended to assess if their derivation from *L. fluviatilis* was caused by a single event or corresponds to two distinct ones.

Material and Methods

DNA sequences were obtained from 49 ammocoetes from the Cares-Deva basin (for collection site location, see Figure 1), collected by electrofishing. Care was taken to collect only a small fin clip in order to avoid harming the larvae. Total genomic DNA was extracted from samples preserved in 96% ethanol with the REDExtract-N-Amp kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturers instructions. A total of 644 bp including a partial sequence of the ND6 gene as well as the control region (non-coding region I according to Lee and Kocher 1995) was amplified (Genbank Accession Nos. from JQ286095 to JQ286143) using the primers LampFor 5'-ACACCCAGAAACAGCAACAAA-3' and LampRev 5'-GCTGGTTTACAAGACCAGTGC-3' (Almada et al. 2008). PCR conditions followed Almada et al. (2008). Sequencing reactions were performed in StabVida on a 3700 ABI DNA sequencer (Applied Biosystems) using the Big Dye terminator DNA sequencing kit (<http://www.stabvida.com>). Sequences were aligned with Clustal X (Thompson et al. 1997). An indel of 39 bp described by Pereira et al. (2010) in many *Lampetra* haplotypes was coded following these authors.

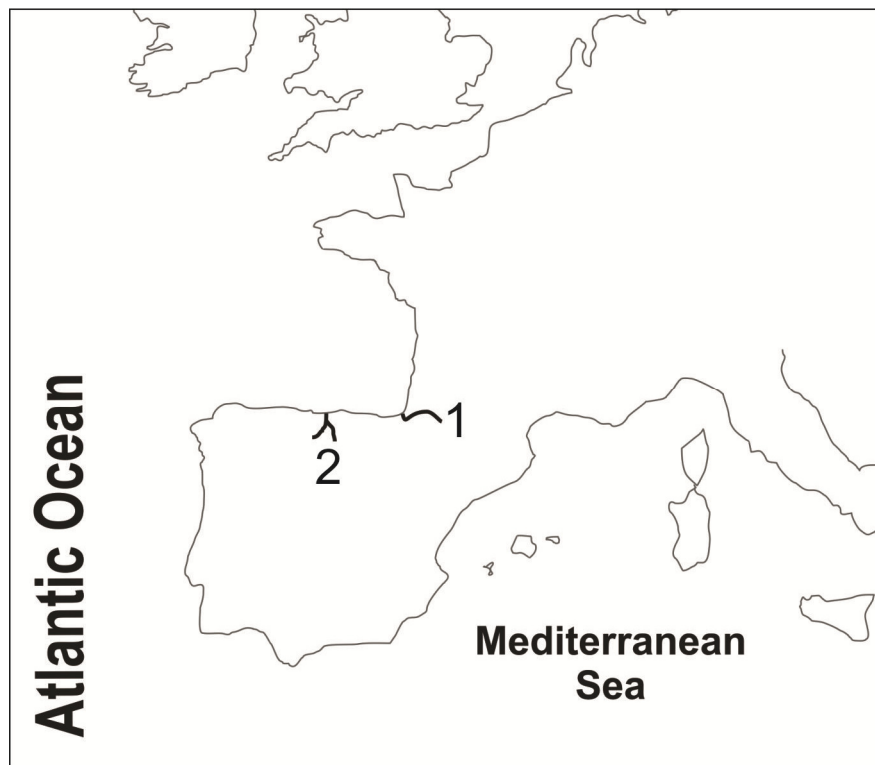


Figure 1 Map with collection site location: 1- Olabidea-Ugarana; 2 - Cares-Deva.

To access the relationships among the Spanish populations and between those and *L. fluviatilis*, all available sequences from the Olabidea-Ugarana *L. planeri* population and from populations of *L. fluviatilis* were included in the analysis (Olabidea-Ugarana: genbank accession numbers from HM212773 to HM212782, Neva *L. fluviatilis* population: genbank accession numbers from EU596026 to EU596049; Rhine *L. fluviatilis* population: genbank accession numbers from EU596118 to EU296144 and GQ340546).

Relationships among haplotypes were analyzed with a parsimony network estimated by the software TCS version 1.18 (Clement et al. 2000). Arlequin software package version 3.01 (Excoffier & Schneider 2005) was used to perform an AMOVA, estimate genetic diversity indices and to assess population differentiation and levels of migration between populations (Excoffier et al. 1992). The statistical significance of differences between population haplotype diversities was assessed by a X^2 test developed by Salicrú et al. (1993).

Results

From the 644 bp, 8 sites were polymorphic and 7 were parsimony informative. The 49 Cares-Deva samples correspond to six haplotypes, four of them shared with *L. fluviatilis* populations previously studied. The two other haplotypes are exclusive of this population.

A population analysis showed that there are no significant differences between the two *L. fluviatilis* populations studied, after Bonferroni corrections ($F_{ST} = 0.0903$; $p = 0.09$). Thus, all the analysis made subsequently consider the existence of a single *L. fluviatilis* population.

An AMOVA with three samples (*L. fluviatilis*, Cares-Deva and Olabidea-Ugarana) yielded a significant value for the variation between populations ($V_a = 0.91345$; $p = 0.000$) and a substantial component of within population variation (56.94%).

In Table 1, pairwise F_{ST} values and corrected average pairwise differences are shown. It is interesting to note that the Cares-Deva population is at a higher distance from the Olabidea-Ugarana than from *L. fluviatilis*.

In Table 2, the sample size, number of haplotypes, gene diversity, nucleotide diversity and mean number of pairwise differences for the two Spanish populations and from the *L. fluviatilis* population are presented. Inspection of this table shows that the highest levels of genetic diversity are found in *L. fluviatilis*, followed by the Cares-Deva population. The

Olabidea-Ugarana shows zero haplotype and nucleotide diversities. The differences between population's haplotype diversities are significant, according to the test developed by Salicrú *et al.* (1993) ($X^2 = 4954.2$, $p < 0.001$). Pairwise comparisons among populations showed significant differences between the two Spanish populations and also between each of them and *L. fluviatilis*.

Table 1 Population pairwise F_{ST} (below diagonal) and corrected average pairwise differences (above diagonal).

	<i>L. fluviatilis</i>	Olabidea-Ugarana	Cares-Deva
<i>L. fluviatilis</i>	-----	5.2187	0.4759
Olabidea-Ugarana	0.62359	-----	5.48129
Cares-Deva	0.15265	0.79991	-----

Table 2 Sample size (N), number of haplotypes (N_H), gene diversity, nucleotide diversity and mean number of pairwise differences.

Population	N	N_H	Gene diversity	Nucleotide diversity	Mean number of pairwise differences
<i>L. fluviatilis</i>	52	26	0.9548+/-0.0141	3.601056+/-1.856933	0.005952+/-0.003406
Olabidea-Ugarana	10	1	0.0000+/-0.0000	0.0000+/-0.0000	0.0000+/-0.0000
Cares-Deva	49	6	0.7483+/-0.0389	1.608844+/-0.969813	0.002677+/-0.001791

In Figure 2, a parsimony haplotype network is shown. This network shows that the ancestral haplotype is found in *L. fluviatilis* population and in Cares-Deva. In fact, the haplotypes found in the Cares-Deva population are present in three of the five lineages derived from the ancestral haplotype. The haplotype found in the Olabidea-Ugarana is derived from a haplotype exclusively present in Cares-Deva, which is however at a distance of four mutations.

The number of migrants between *L. fluviatilis* and Cares-Deva is superior to one (2.7755), opening the possibility of present or recent gene flow, while the corresponding figures between *L. fluviatilis* and Olabidea-Ugarana (0.30181) and between Cares-Deva and Olabidea-Ugarana (0.12507) are below one, suggesting that gene flow is absent.

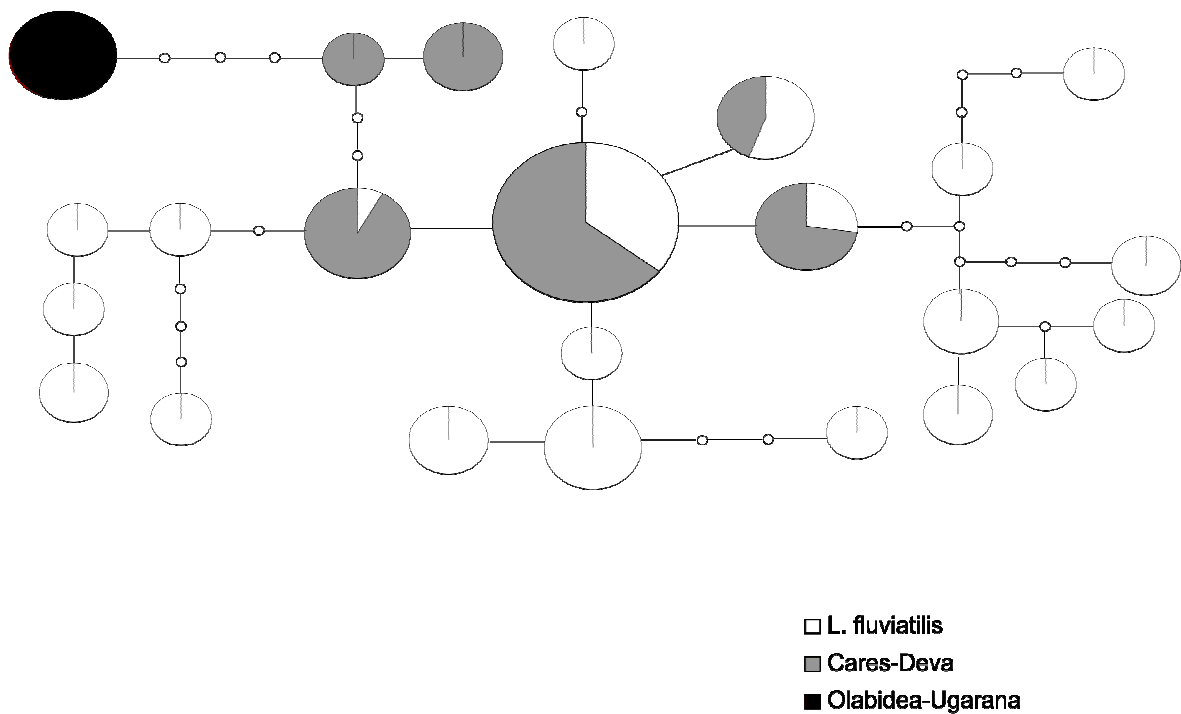


Figure 2 Haplotype network. The colors present in each circle are related to the populations were each haplotype is present: black – Olabidea-Ugarana; grey – Cares-Deva; white – *L. fluviatilis*.

Discussion

The results presented above are fully consistent with the hypothesis presented: *L. fluviatilis* seems to have been the source of the brook lampreys both from the Cares-Deva and the Olabidea. The samples from Olabidea-Ugarana shows signs of absence of gene flow and is the most divergent population (corrected average pairwise difference equals 5.2187), while the divergence between *L. fluviatilis* and the population of the Cares-Deva is an order of magnitude smaller (corrected average pairwise difference equals 0.4759). Genetic diversity is maximal in *L. fluviatilis*, intermediate in Cares-Deva and reduced to zero in the Olabidea. Thus, a scenario where the lampreys from Cares-Deva may be a very recent offshoot of the migratory *L. fluviatilis* and the Olabidea-Ugarana population must be of more ancient origin is plausible. Both populations share a common ancestor that could be a haplotype of *L. fluviatilis*, common in the area at an earlier time. Thus, the hypothesis that *L. fluviatilis* gave rise at different places and at different times to purely freshwater lineages seems well supported.

A different problem not yet fully solved is to determine if and when interbreeding between the migratory and non-migratory lampreys ceased. Only with adequate nuclear marker could this problem be solved. In the Olabidea-Ugarana, the population is very distant from the sea and has peculiar colour patterns that point to a long isolation. In the Cares-Deva, lampreys are more similar in morphology and coloration to *L. fluviatilis*, but all females collected at the end of transformer phase were brook lampreys approaching spawning season, and no records of *L. fluviatilis* are available for the area.

The level of available evidence clearly points to the recognition of two conservation units in Spain – one in the Cares-Deva and other in the Olabidea-Ugarana. The extreme low genetic diversity of the Olabidea-Ugarana may represent an endpoint on a process of extreme reduction of population size, associated with the acquisition of brook lamprey life history in small streams. It seems plausible that in small waterbodies the habitat available for lampreys is limited, so that brook lampreys once cut off *L. fluviatilis* begin to lose diversity. However, instead of a temporary bottleneck, this loss of diversity may be permanent if the carrying capacity of the environment allows only a reduced number of lampreys to occur at a given time. Equilibrium may be reached after new mutations accumulate, but at a level of diversity that is much lower than in the migratory ancestors.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from Iceland, Liechtenstein and Norway through the EEA Financial Mechanism and the Norwegian Financial Mechanism, by the project MarinERA ‘Marine phylogeographic structuring during climate change: the signature of leading and rear edge of range shifting populations’, by a National Museum of Natural Sciences Project (CGL2010 -15231) and by the Eco-Ethology Research Unit (331/94) Pluriannual financing program (Fundação para a Ciência e a Tecnologia; partially FEDER funded).

References

- Almada, V.C., Pereira, A.M., Robalo, J.I., Fonseca, J.P., Levy, A., Maia, C. & Valente, A. (2008) Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea lampreys along European shores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 391-396.
- Alvarez, J. & Doadrio, I. (1986) Sobre la presencia de *Lampetra planeri* Bloch, 1784 en España. *Acta Vertebrata*, 13: 158–160.

Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.

Espanhol, R., Almeida, P.R. & Alves, J. (2007) Evolutionary history of lamprey paired species *Lampetra fluviatilis* (L.) and *Lampetra planeri* (Bloch) as inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 16: 1909–1924.

Doadrio, I. (2002) *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza/Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, Madrid.

Excoffier, L.G.L. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1: 47–50.

Hardisty, M.W. (2006) *Lampreys. Life without jaws*. Forrest text, Ceredigion.

Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007) *Handbook of European freshwater fishes*. Cornol & Freyhof, Berlin.

Lee, W.J. & Kocher, D. (1995) Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of a vertebrate genome organization. *Genetics*, 139: 873–887.

Pereira, A.M., Robalo, J.I., Freyhof, J., Maia, C., Fonseca, J.P., Valente, A. & Almada V.C. (2010) Phylogeographical analysis reveals multiple conservation units in brook lampreys of Portuguese streams. *Journal of Fish Biology*, 77: 361–371.

Lang, N.J., Roe, K.J., Renaud, C.B., Gill, H.S., Potter, I.C., Freyhof, J., Naseka, A.M., Cochran, P., Pérez, H.E., Habir, E.M., Kuhajda, B.R., Neely, D.A., Reshetnikov, Y.S., Salnikov, V.B., Stoumboudi, M.Th. & Mayden, R.L. (2009) Novel relationships among Lampreys (Petromyzontiformes) revealed by a taxonomically comprehensive molecular data set. *American Fisheries Society Symposium*, 72: 41-55.

Mateus, C.B., Almeida, P.R., Quintella, B.R. & Alves, M.J. (2011) MtDNA markers reveal the existence of allopatric evolutionary lineages in the threatened lampreys *Lampetra fluviatilis* (L.) and *Lampetra planeri* (Bloch) in the Iberian glacial refugium. *Conservation genetics*, 12: 1061-1074.

Perea, S., Garzón, P., González, J.L., Almada, V.C., Pereira, A. & Doadrio, I. (2011) New distribution data on Spanish autochthonous species of freshwater fish. *Graellsia*, 67(1): 91-102.

Salicru, M., Menendez, M.L., Morales, D. & Pardo, L. (1993) Asymptotic distribution of (h, φ) -entropies. *Communications in Statistics - Theory & Methods*, 22: 2015-2031.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876–4882.

Zanandrea, G. (1959) Speciation among lampreys. *Nature*, 184: 280.

CAPÍTULO 8

Phylogeography of *Lampetra fluviatilis* - Contrasts in the patterns found in two migratory lampreys in Western Europe

CAPÍTULO 8

Phylogeography of *Lampetra fluviatilis* - Contrasts in the patterns found in two migratory lampreys in Western Europe

Abstract With the objective of studying the phylogeographic patterns found in *L. fluviatilis* in Europe, we reanalysed all the molecular data available for two mitochondrial markers: non-coding region I and ATPase subunits 6 and 8. Additional sequences of the ATPase 6, 8 were performed to allow population comparisons, making a total of 52 sequences of the non-coding region I and 68 sequences of the ATPase 6, 8, covering the Baltic Sea, North Sea and Portugal. The results obtained were compared with the ones published for *P. marinus*. In *L. fluviatilis*, the levels of diversity are at least three times higher than in *P. marinus* in Europe. *L. fluviatilis* shows population differentiation in Europe and displays a deeper haplotype network, with no predominance of an ancestral haplotype. The results suggest a smooth but consistent growth along the Pleistocene in *L. fluviatilis*, without signs of interglacial expansion or glacial bottlenecks, pointing to a much older history of around 1 My for *L. fluviatilis* population, which contrasts with the time of expansion of 125 my, recently published for *P. marinus*. Differences found in the phylogeography of these two migratory lampreys are discussed considering their thermal preferences and migration abilities.

Keywords *Lampetra fluviatilis* • *Petromyzon marinus* • phylogeography • lampreys • Europe

Introduction

Two migratory lampreys occur in the North Atlantic. The sea lamprey *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758 occurs on both sides of Atlantic (from the Labrador coast to Florida in North America, and from Norway to the Mediterranean in Europe) while *Lampetra fluviatilis* (Linnaeus, 1758), the river lamprey, is restricted to the eastern margin of the Atlantic (from Norway to the Mediterranean) (Kelly & King 2001). Both being anadromous, they have to cross inshore waters twice in their life cycle and find streams with appropriate substratum, where they spawn and die. The larvae stay in freshwater filter-feeding in the sediment, migrating to the sea after four to nine years (Renaud 2011).

Genner et al. (2012) performed a phylogeographic study using the mitochondrial non-coding region I of *P. marinus* in the Atlantic. They found that the European population has a very low genetic diversity, little population structure and is dominated by two haplotypes, results that were in line with the ones of a previous study that found values of gene diversity of 0.3745 and nucleotide diversity of 0.000756 for the European population (Almada et al. 2008). The North American population is more diverse, and estimation of size and age point to a larger effective population size and an older origin (Genner et al. 2012). In view of this, these authors raise the possibility of a very severe bottleneck in the European sea-lamprey and/or a recent origin from an older American lineage. There are no similar phylogeographic data describing *L. fluviatilis*. However, several authors have studied the relationship between *L. fluviatilis* and *L. planeri*. *L. planeri* is a collective designation for the non-feeding and non-migratory adult populations similar in the larval phase to *L. fluviatilis*, but living permanently in freshwater, spawning and dying soon after metamorphosis at a much smaller size. These studies have shown that these populations have evolved several times independently at different times and places from an *L. fluviatilis* ancestor, making the species *L. planeri* polyphyletic (Espanhol et al. 2007, Blank et al. 2008, Pereira et al. 2010).

We studied the phylogeography of *Lampetra fluviatilis* using a fragment of the mitochondrial non-coding region I and ATPase subunits 6 and 8. The hypothesis presented is that *L. fluviatilis* has higher genetic diversity than *P. marinus* in Europe, due to differences in behaviour and thermal preferences, together with an older history of evolution in Europe.

Material and Methods

For *Lampetra fluviatilis*, 52 DNA sequences of the mitochondrial non-coding region I (Genbank accession numbers EU596026 - EU596049, EU596118 - EU596144, GQ340546) and 36 sequences of subunits 6 and 8 of mitochondrial ATPase (Genbank accession numbers: AJ937924, AJ937925, AJ937928, AJ937936-937939, AJ937954) were downloaded from GenBank. Additionally, we obtained 32 *Lampetra fluviatilis*, 14 from the Baltic Sea (Neva River) and 18 from the North Sea (Rhine river) (for collection site location see Figure 1), from which we extracted total genomic DNA with a REDEExtract-N-AmpTM tissue PCR kit (Sigma-Aldrich, <http://www.sigma.com>). Mitochondrial ATPase subunits 6 and 8 were amplified, using the primers and protocol described in Espanhol et al. (2007). Sequencing reactions were performed in StabVida (Lisbon) on a 3700 ABI DNA sequencer (AppliedBiosystems) using the BigDye

terminator DNA sequencing kit (<http://www.stabvida.com>) (Genbank accession numbers JX910226-910239, EU596200–596204 and from EU596219-596230). Thus, the complete dataset includes 52 sequences of the non-coding region I plus 68 sequences of the ATPase subunits 6 and 8 gene of *L. fluviatilis*.

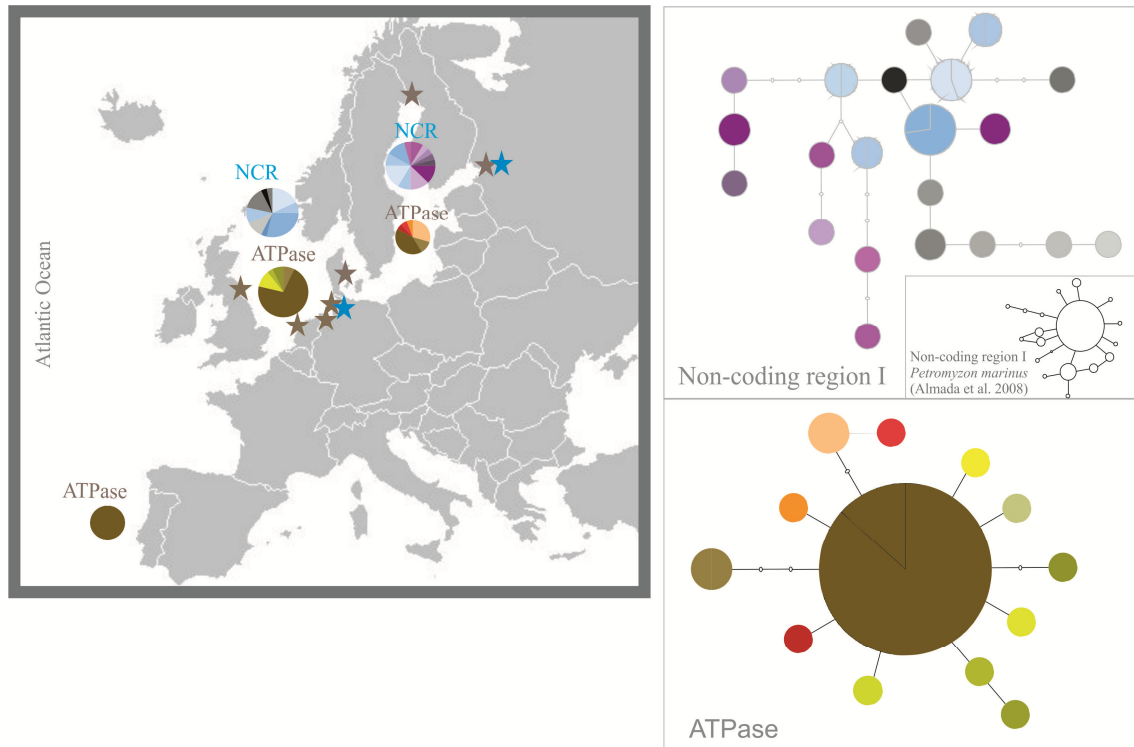


Figure 1 Left: map with collection site locations (brown for sites with samples from which the ATPase was sequenced; blue for the non-coding region (NCR)): (1) Tagus River, Portugal; (2) Forth, Scotland; (3) Wadden Sea, Netherlands; (4) Elbe, Germany; (5) Rhine, Germany; (6) Gudenaa, Denmark; (7) Ricklean, Sweden; (8) Neva, Russia. Pie charts represent the relative proportion of haplotypes per population; brown shades and blue shades represent shared haplotypes between populations for the ATPase and non-coding region (NCR) datasets, respectively. Each colour represents a haplotype. Pie chart sizes are proportional to sample size. A) Pie chart for the Portugal ATPase dataset (location 1); B) Pie chart for the North Sea ATPase dataset (locations 2, 3, 4, 5 and 6); C) Pie chart for Baltic Sea ATPase dataset (locations 7 and 8); D) Pie chart for the North Sea NCR dataset (location 5); E) Pie chart for the Baltic Sea NCR dataset (Location 8). Right: haplotype parsimony networks. The area of the circles is proportional to each haplotype frequency. Colours refer to the region in which haplotypes were found. For comparison purposes, the haplotype network obtained by Almada et al. 2008 is presented.

DNA sequences were aligned using Clustal X with default parameter values (Thompson et al. 1997) and truncated in order to use all sequences available. Relationships among haplotypes were analyzed with parsimony networks estimated by TCS version 1.18 (Clement et al. 2000). ARLEQUIN version 3.01 (Excoffier & Schneider 2005) was used to calculate genetic diversity indices and population differentiation and to perform analysis of molecular variance (AMOVA) and mismatch analysis. Because for some locations sample sizes for ATPase subunits 6 and 8 gene were very small, it would be meaningless to compute F_{st} for all possible location pairs. Thus, we adopted a biogeographic classification, grouping all samples in three geographic categories: one for the North Sea and Skagerrak, another for the Baltic Sea and another for Portugal.

There is no molecular clock calibrated with fossils for lamprey mtDNA. Genner et al. (2012), following previous calibration for cyclostomes based on a large number of genes, found a mutation rate of 0.34%/My for the non-coding region I, which is adopted here. The ATPase gene apparently evolves at a slower rate than non-coding region I within *Lampetra*. After comparing p-distances in the non-coding region I and ATPase between 29 individuals of *Lampetra fluviatilis* for which the two markers were available, it was concluded that the mutation rate of the ATPase is approximately half of that of the non-coding region I. Thus, a mutation rate of 0.17%/My for the ATPase gene was adopted in this study. Past population demography was inferred with the non-coding region and ATPase data using mismatch distributions. Additionally, a linear Bayesian skyline plot, as implemented in BEAST version 1.6, was used with non-coding region I and ATPase datasets (Drummond et al. 2005, Drummond & Rambaut 2007). The substitution model used was HKY. The Bayesian distribution was generated using results from five independent runs of 150 million MCMC steps obtaining combined effective samples sizes of parameter estimates of over 200 (burn-in of 10%). The median and confidence interval for the estimate of the age of the most recent common ancestor ($t_{MRC A}$) were depicted using Tracer v.1.4 (Rambaut & Drummond 2007).

Results obtained were compared with those published for *P. marinus* (Almada et al. 2008, Genner et al. 2012).

Results

For the non-coding region I and ATPase, a total of 52 and 68 sequences respectively were analysed. In Table 1 the description of the genetic diversity in each population and for pooled data is presented for both markers.

In Figure 1, a haplotype network is presented for the non-coding region I. Analysis of this figure shows a deep genealogy, with no predominance of an ancestral haplotype. This network includes haplotypes separated by a high number of mutational steps. The haplotype network for the ATPase gene, presented in Figure 1, shows that the southern samples of *L. fluviatilis*, from the Tagus River in Portugal, correspond to the ancestral haplotype. The levels of diversity within this region are zero, with only this haplotype being present. By contrast, the Baltic has the highest diversity (Table 1; Figure 1). An AMOVA using the ATPase dataset with three groups (Baltic, North Sea and Portugal) reveal there are significant differences between groups ($V_a=0.06916$, $p=0.0000$), but the F_{ST} values show no significant differences between Portugal and North Sea ($F_{ST}=0.00916$, $p=0.3333$). The F_{ST} between North Sea and Baltic was significant after Bonferoni correction ($F_{ST}=0.1361$, $p=0.0000$). Based on the corrected average pairwise differences, it is estimated that the divergence between the Baltic and North Sea populations of *L. fluviatilis* have occurred 74 – 83 ky ago, clearly before the last glacial maximum.

Tajima D and Fu' F_s tests results are presented in Table 2. Mismatch analysis shows that the distributions for the non-coding region I and for ATPase subunits 6 and 8 did not differ significantly from the model of sudden expansion (Table 2). Using both markers, the mismatch distribution is deeper in the Baltic, extending up to 9 and 6 differences, using the non-coding region I and ATPase gene dataset respectively (Figure 2). The time of expansion calculated using the mismatch analysis is around 1 My for the Baltic population (995 ky and 1.1 My using the non-coding region I and ATPase dataset, respectively), and 666 Ky and 1.2 My for the North Sea population (using the non-coding region I and ATPase dataset, respectively). For the pooled data, expansion is estimated to have occurred 627 ky using the non-coding region and 1.3 My ago using the ATPase dataset. The t_{MRCA} calculated using BEAST is estimated to be 1.08 and 1.05 My for the pooled data using the non-coding region I and ATPase datasets respectively, 1.07 and 1.02 My for the Baltic and 1.05 and 1.02 My for North Sea, using the two datasets respectively (Table 2).

Table 1 Number of samples, number of haplotypes, allelic richness, genetic diversity indices and mean number of pairwise differences for non-coding region I and ATPase subunits 6 and 8 per population.

Population	N	Molecular marker	Number of haplotypes	Allelic richness	Gene diversity	Nucleotide diversity	Number of polymorphic sites	Mean number of pairwise differences
Baltic Sea	24	Non-coding Region I	13	54.2%	0.9384 +/- 0.0255	0.006201 +/- 0.003614	11	3.739130 +/- 1.954770
	17	ATPase	6	35.3%	0.7647 +/- 0.0752	0.002619 +/- 0.001740	8	1.985294 +/- 1.178504
North Sea	28	Non-coding Region I	13	46.4%	0.8862 +/- 0.0416	0.004054 +/- 0.002517	11	2.452381 +/- 1.367719
	30	ATPase	9	30.0%	0.5586 +/- 0.1076	0.001365 +/- 0.001042	10	1.034483 +/- 0.709663
Portugal	19	ATPase	1	5.3%	0.0000 +/- 0.0000	0.0000 +/- 0.0000	0	0.0000 +/- 0.0000
Pooled data	52	Non-coding Region I	21	40.4%	0.9133 +/- 0.0224	0.005290 +/- 0.003082	15	3.200603 +/- 1.680498

Table 2 Demographic parameters of *Lampetra fluviatilis*. Values with probability under 0.05 are marked with *. Neutrality tests: D (Tajima's test), Fs (Fu's test). Mismatch distributions: τ (time in generations; upper and lower bounds of 95% CI in parenthesis), t (time in years), θ_0 (theta0), N_0 (female effective population size before the expansion), θ_1 (theta1), N_1 (female effective population size after the expansion), SSD (sum of square deviation) and Hri (Harpending's Raggedness index). Estimates of t_{MRCA} (time to most recent common ancestor) with BEAST: median and confidence interval for t_{MRCA} .

Molecular marker	<i>Baltic Sea</i>		<i>North Sea</i>		<i>Pooled data</i>	
	Non-coding region I	ATPase	Non-coding region I	ATPase	Non-coding region I	ATPase
D	-0.45636	-0.56952	-0.87913	-2.05433*	-0.5403	-1.93785*
Fs	-4.14843*	-0.59012	-5.85365*	-7.94552*	-10.32055*	-8.41307*
Mismatch distribution						
τ	4.103	2.779	2.743	3	2.585	3.477
(95% CI)	(2.636-6.469)	(0.463-7.291)	(1.263-4.863)	(0.447-4.652)	(1.009-11.271)	(0.862-7.332)
t	995 ky	1078 Ky	666 ky	1164 ky	627 ky	1349Ky
(95% CI)	(640-1570 ky)	(179-2829 ky)	(306-1180ky)	(173-1805 ky)	(244-2735ky)	(334-2845 ky)
θ_0	0.207	0	0	0.375	0.808	0
	(0-1.744)	(0-1.270)	(0-1.093)	(0-0.492)	(0-0.952)	(0-0.396)
N_0	50 k	0	0	146 k	196 k	0
	(0-423 k)	(0-493 k)	(0-265 K)	(0-191 k)	(0-231k)	(0-154 k)
θ_1	18.005	4.948	19.563	0.650	15.045	1.142
	(5.079-1943.943)	(2.004-2169.636)	(2.24-714.641)	(0-5.222)	(4.722-6613.795)	(0.253-6.558)
N_1	4369 k	1920 k	4747 k	252 k	3651 k	443 k
	(1233k-4.72*10 ⁸)	(778-841858k)	(544 k - 1.73*10 ⁸)	(0-2026k)	(1146k-1.6*10 ⁹)	(98-2545 k)
SSD	0.00618	0.01813	0.001169	0.002104	0.0004558	0.01157
Hri	0.01099	0.0644	0.01099	0.1720	0.01148	0.1145
BEAST t_{mrca} (95% CI)	1.07 My	1.02	1.05 My	1.02	1.08 My	1.05
	(0.60-1.75 My)	(0.55-1.74)	(0.60-1.67 My)	(0.56-1.69)	(0.61-1.76 My)	(0.58-1.81)

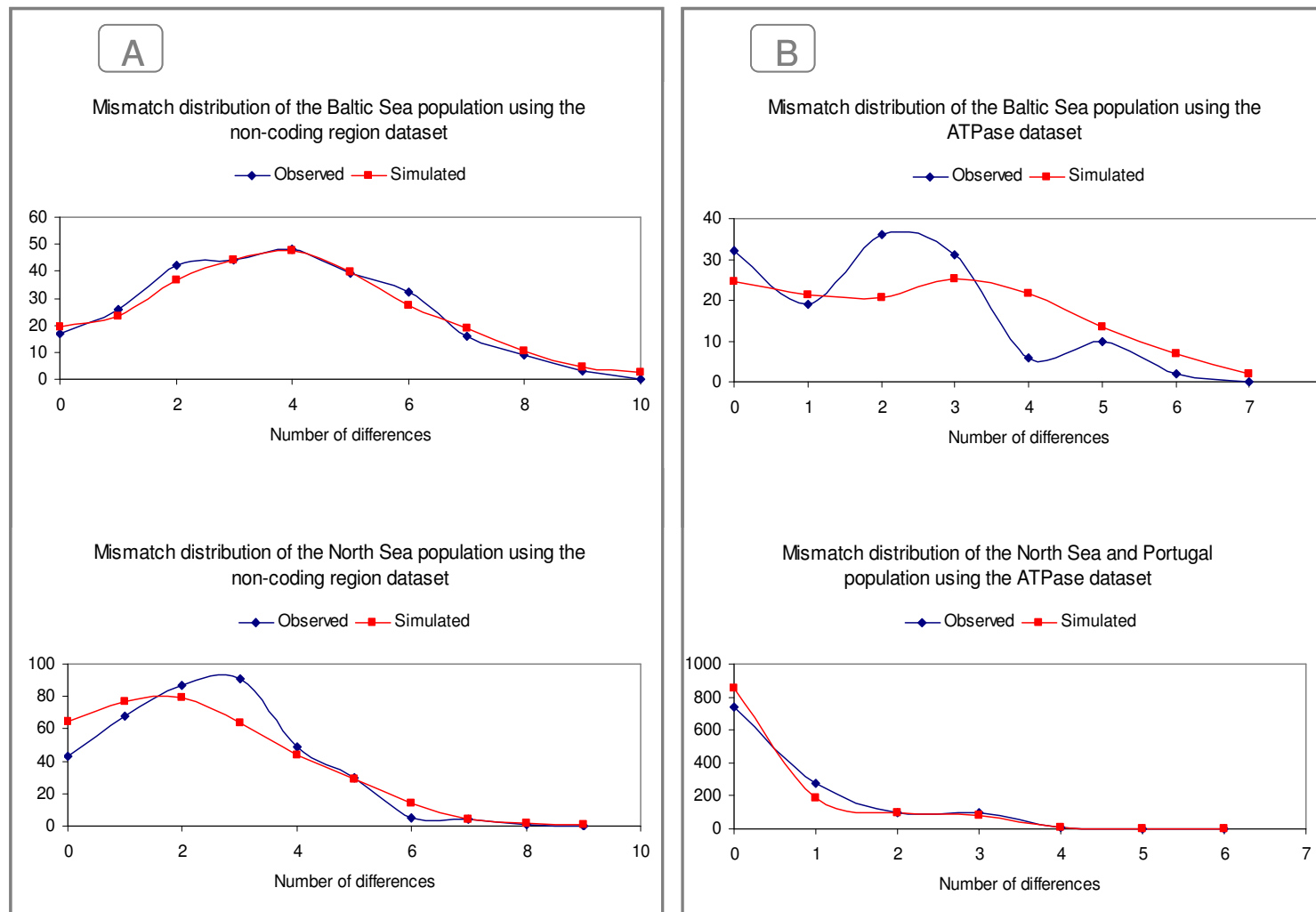


Figure 2 Mismatch distributions for the non-coding region I and ATPase datasets per population.

The Bayesian skyline plot produced shows a smooth but consistent growth along the last million years in *L. fluviatilis*, without evidence for recent acceleration or past bottlenecks (Figure 3).

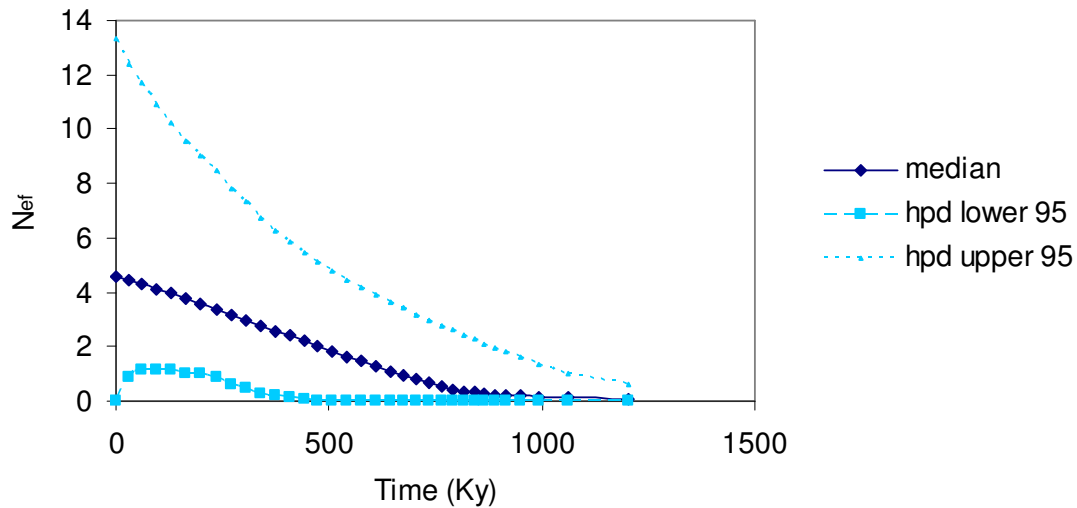


Figure 3. Bayesian skyline plot (BSP) for the non-coding region I and ATPase datasets.

Discussion

Phylogeographic patterns in *Lampetra fluviatilis* differ sharply from those of *Petromyzon marinus* in Europe (Genner et al. 2012). In *L. fluviatilis*, the levels of diversity are higher than those of *P. marinus* in Europe. There is a structure when samples from Portugal to the Baltic are compared, which differentiate two groups (Portugal-North Sea and Baltic). Estimates of effective population size are much larger for *L. fluviatilis* (4.5 million females in *L. fluviatilis* in contrast to approximately 1 million females in *P. marinus* (Genner et al. 2012)), while time to most recent common ancestor is higher. For the non-coding region I, *P. marinus* displays a star-like pattern in the haplotype network, with the ancestral haplotype encompassing the large majority of samples (78%, according to Almada et al. 2008; Figure 1). In contrast, *L. fluviatilis* displays a deeper network, with no predominance of an ancestral haplotype. The time for most recent common ancestor for *L. fluviatilis* is near 1 My. The Bayesian skyline plot shows a smooth but consistent growth along the Pleistocene, without evidence of any acceleration in the present interglacial. Thus, the available evidence points to a much older history for *L. fluviatilis* populations in Europe (1 My contrasting with 125 ky proposed by Genner et al. (2012) for European *P. marinus*). Like in the American *P. marinus*, which is more diverse and older than the European *P. marinus*, the population

grew consistently along the glacial-interglacial cycles, without signs of interglacial expansion or glacial bottlenecks.

The divergence calculated between the Baltic and North Sea populations in *L. fluviatilis* is estimated to have occurred 74 and 83 ky, using the corrected number of pairwise differences with the non-coding region I and ATPase datasets respectively. Since the North Sea was unavailable at that time, as in the last glaciation it was partially emerged and partially covered by an ice sheet (Andersen & Borns Jr. 1997), we suggest that for this particular species the Baltic population is not a recent derivative of the North Sea. Rather, it seems plausible that survival in distinct refugia, with reduced migration among them, may have generated the patterns observed.

Although *L. fluviatilis* survives at temperatures similar to those tolerated by *P. marinus*, its reproduction and metamorphosis require substantially lower temperatures (between 8.5 and 12°C in *L. fluviatilis* and 15°C in *P. marinus* (Maitland 2003)). These thermal requirements should have limited the areas where it would be possible for these species to breed, *P. marinus* being more restricted to southern areas than *L. fluviatilis*. The Iberian Peninsula was proposed to have been an important refugium for *P. marinus* during the last glaciation (Almada et al. 2008, Genner et al. 2012). *L. fluviatilis* may have also been abundant in the Iberian Peninsula during glaciations and even in the Mediterranean, where several non-migratory *Lampetra* populations persist. The fact that genetically distinct non-migratory *Lampetra* populations are found in many Portuguese rivers, and the finding that two haplotypes in the ATPase and three in the non-coding region I of *L. fluviatilis* were recovered from the strictly freshwater populations (Pereira et al. 2010, Mateus et al. 2011), suggest that the presence of this species in Iberia was once stronger.

The present restriction of *L. fluviatilis* to the Tagus River and its extremely low diversity in Iberia contrasts with abundance and higher genetic diversity in *P. marinus* in Portugal. It is likely that *L. fluviatilis* in the Iberian Peninsula is at the extreme south of its range, being a relict population. A slight increase in temperatures both in sea and rivers may bring it to rapid local extinction. In the northern part of its range, the lower thermal requirements to breed and metamorphose of *L. fluviatilis* may have allowed a wider use of unglaciated areas than in *P. marinus*, what is in agreement with the old divergence between populations that are now in the North Sea and the Baltic. Presently, *L. fluviatilis* is much more abundant in the southern Baltic than *P. marinus*, and the differences seems to be consistent for hundred of years (Thiel et al. 2009). The

fact that a number of glacial lakes seem to have acted as glacial refugia from which the Baltic was recolonized by *Cottus gobio* (Kontoula & Vainola 2001), suggests that similar processes could have operated in *L. fluviatilis*, which can migrate to large freshwater bodies, surviving in absence of routes to the sea.

These two lamprey species have also different adult sizes, migration behaviours and life cycle duration. Adults of *P. marinus* reach a larger size and perform long off-shore movements. Their feeding mode, which may involve being attached to large fishes of even sea mammals, may promote long range migrations (Maitland 2003, Hocik 2004). Because this species lacks *homing*, the river where it migrates to spawn must have a large random component from generation to generation. In contrast, *L. fluviatilis* adults are smaller and stay in areas near the estuaries (Maitland 2003), having a higher probability of breeding in their natal river. This difference in behaviour may promote the retention of an overall higher genetic diversity in *L. fluviatilis* than in *P. marinus*. The genetic differentiation in populations present in *L. fluviatilis* may reduce the effect of the genetic drift in this species when compared with *P. marinus*, because haplotypes lost in a river by drift will likely persist in other drainages (Avice 2000).

Smaller life cycle duration, characteristic of *L. fluviatilis* (Kelly & King 2001), may also have consequences in what concerns genetic diversity, as for the same period of time, a higher number of generations have elapsed in this species, which may have promoted a higher level of diversification.

In summary, we propose that differences in thermal requirements, in size and in behaviour, affecting dispersal, can account for the different diversity patterns found in *P. marinus* and *L. fluviatilis*. We are aware however, that while *L. fluviatilis* persisted in Europe for many glacial cycles (for at least 1 My), *P. marinus* may have migrated from North America (probably 125 ky ago, Genner et al. 2012) having a much shorter evolutionary history in Europe, that would cause by itself a smaller scope for diversification.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Iceland, Liechtenstein and Norway through the EEA Financial Mechanism and the Norwegian Financial Mechanism and by the Eco-Ethology Research Unit (331/94) project PEst-OE/MAR/UI0331/2011 (Fundação para a Ciência e Tecnologia – FCT) (partially FEDER funded).

References

- Almada, V.C., Pereira, A.M., Robalo, J.I., Fonseca, J.P., Levy, A., Maia, C. & Valente, A. (2008) Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea-lampreys along European shores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 391–396.
- Anderson, B.G. & Borns Jr., H.W. (1997) *The ice age world*. Scandinavian University Press, Oslo.
- Avice, J.C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Blank, M., Jurss, K. & Bastrop, R. (2008) A mitochondrial multigene approach contributing to the systematics of the brook and river lampreys and the phylogenetic position of *Eudontomyzon mariae*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65: 2780–2790.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. (2005) Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1185–1192.
- Espanhol, R., Almeida, P.R. & Alves, J. (2007) Evolutionary history of lamprey paired species *Lampetra fluviatilis* (L.) and *Lampetra planeri* (Bloch) as inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 16: 1909–1924.
- Excoffier, L.G.L. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1: 47–50.
- Genner, M.J., Hillman, R., McHugh, M., Hawkins, S.J. & Lucas, M.C. (2012). Contrasting demographic histories of European and North American sea lamprey (*Petromyzon marinus*) populations inferred from mitochondrial DNA sequence variation. *Marine and Freshwater Research*, 63: 827–833.

Holcik, J., Delic, A., Kucinic, M., Bukvic, V. & Vater, M. (2004) Distribution and morphology of the sea lamprey from the Balkan coast of the Adriatic Sea. *Journal of Fish Biology*, 64: 514-527.

Kelly, F.L. & King, J.J. (2001) A review of the ecology and distribution of three lamprey species, *Lampetra fluviatilis* (L.), *Lampetra planeri* (Bloch) and *Petromyzon marinus* (L.): a context for conservation and biodiversity considerations in Ireland. *Proceedings of the Royal Irish Academy*, 101B: 165–185.

Kontula, T. & Vainola, R. (2001) Postglacial colonization of Northern Europe by distinct phylogeographic lineages of the bullhead, *Cottus gobio*. *Molecular Ecology*, 10: 1983-2002.

Maitland, P.S. (2003) *Ecology of the River, Brook and Sea Lamprey*. Conserving Natura 2000 Rivers Ecology Series No. 5. English Nature, Peterborough.

Mateus, C.B., Almeida, P.R., Quintella, B.R. & Alves, M.J. (2011) MtDNA markers reveal the existence of allopatric evolutionary lineages in the threatened lampreys *Lampetra fluviatilis* (L.) and *Lampetra planeri* (Bloch) in the Iberian glacial refugium. *Conservation genetics*, 12(4): 1061-1074.

Pereira, A.M., Robalo, J.I., Freyhof, J., Maia, C., Fonseca, J.P., Valente, A. & Almada, V.C. (2010) Phylogeographical analysis reveals multiple conservation units in brook lampreys *Lampetra planeri* of Portuguese streams. *Journal of Fish Biology*, 77: 361–371.

Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) Tracer v1.4. Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Renaud, C. B. (2011) *Lampreys of the world. An annotated and illustrated catalogue of lamprey species known to date*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 5. FAO, Rome.

Thiel, R., Winkler, H.M., Riel, P., Neumann, R., Grohsler, T., Bottcher, U., Spratte, S. & Hartmann, U. (2009) Endangered anadromous lampreys in the southern Baltic Sea: spatial distribution, long-term trend, population status. *Endangered species Research*, 8: 233-247.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997)
The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment
aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.

CAPÍTULO 9

DISCUSSÃO GERAL

CAPÍTULO 9

DISCUSSÃO GERAL

Discussão

Esta tese propunha-se a abordar questões relacionadas com os padrões filogeográficos de duas espécies de lampreias migradoras – *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758, a lampreia marinha, e *Lampetra fluviatilis*, a lampreia de rio. Pretendia ainda estudar a filogeografia das populações não tróficas de *Lampetra* da Europa ocidental, tendo como principal objectivo contribuir para a compreensão dos processos de especiação em lampreias.

Os principais resultados desta tese foram a elaboração de uma análise comparativa da filogeografia das duas espécies de lampreias migradoras, observando-se um grande número de diferenças quer ao nível da diversidade genética, quer ao nível dos padrões filogeográficos encontrados, o que foi relacionado com diferentes características da história vital nestas duas espécies e ainda com histórias evolutivas na Europa com durações muito diferentes (Capítulos 2, 3 e 8).

O estudo da filogeografia das populações não tróficas de *Lampetra* mostrou que existem múltiplas populações na Península Ibérica, distintas entre si, sendo algumas, as mais antigas, caracterizadas por níveis de diversidade genética baixos. Estas populações encontram-se normalmente associadas a áreas de distribuição muito reduzidas. O estatuto de unidade de conservação foi proposto para algumas destas populações (Capítulos 4, 5, 6 e 7). Estes resultados serão discutidos com o objectivo de clarificar os processos de especiação em *Lampetra*.

Nesta discussão serão abordados os principais resultados sobre as temáticas estudadas. Os parágrafos finais serão dedicados à discussão dos tópicos e abordagens considerados mais promissores para estudos futuros neste domínio.

Os trabalhos sobre a filogeografia das duas lampreias migradoras europeias mostraram que as filogeografias da Lampreia marinha e da Lampreia de rio na Europa são muito distintas. *Petromyzon marinus*, a lampreia marinha, apresenta uma única população europeia (Capítulos 2 e 3, Genner et al. 2012). Utilizando como marcador genético a

região não codificante I da mitocôndria, um segmento de ADN provavelmente homólogo à região de controlo (Lee & Koche 1995), verifica-se que os níveis de diversidade genética desta espécie na Europa são extremamente baixos (a diversidade haplotípica é igual a 0.3745 ± 0.0363 e a diversidade nucleotídica é igual a 0.000756 ± 0.000731). O padrão da rede de haplótipos é em forma de estrela, com um haplótipo central muito frequente (78% dos indivíduos possuem este haplótipo) e vários haplótipos derivados a um ou dois passos mutacionais. Este padrão, associado aos baixos níveis de diversidade, sugere que esta população está em expansão e a recuperar de um gargalo genético severo, que levou a uma redução drástica do seu efectivo populacional. Neste âmbito, foi sugerido que as glaciações do Plistocénico, nomeadamente a última glaciação (que teve um pico há 18 mil anos na Europa), teria tido um impacto profundo nesta espécie (Capítulos 2 e 3). Contrastando com estes resultados, a lampreia de rio (*Lampetra fluviatilis*) apresenta níveis de diversidade genética elevados (a diversidade haplotípica é de 0.9133 ± 0.0224 , aproximadamente três vezes maior do que a encontrada na população europeia de *P. marinus*, e a diversidade nucleotídica é 0.005290 ± 0.003082 , também muito superior à encontrada em *P. marinus* na Europa) (Capítulo 8). A lampreia de rio apresenta estruturação populacional, sendo as populações do Mar do Norte diferentes das do Báltico (quer usando como marcadores a região não codificante I mitocondrial, quer o gene que codifica as subunidades 6 e 8 da ATPase, também mitocondrial). A população portuguesa do Rio Tejo não é significativamente diferente das do Mar do Norte (Capítulo 8). O padrão encontrado na rede de haplótipos é muito diferente do encontrado em *P. marinus*, já que não existe um haplótipo central mais frequente, estando os haplótipos mais frequentes dispersos por vários locais da rede. Por outro lado, o ancestral comum mais recente das populações europeias de *L. fluviatilis* tem aproximadamente 1 milhão de anos. Genner et al. (2012) estimaram que o ancestral comum mais recente da população europeia de *P. marinus* tenha 125 mil anos. Este resultado parece apontar para que a lampreia marinha seja muito mais recente do que a lampreia de rio na Europa (Capítulo 8). De facto, o tempo de coalescência estimado para a população americana é superior a 0.5 milhões de anos e, mais recentemente, terá sido a partir desta população que a Europa terá sido colonizada (Genner et al. 2012). Os níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica das populações atlânticas americanas como um todo são comparativamente mais elevados (respectivamente, 0.7713 ± 0.0256 e 0.005505 ± 0.003521 , Waldman et al. 2006). Estes resultados, juntamente com os diferentes padrões encontrados, podem ser explicados pelas diferentes idades das populações.

Se considerarmos que não existem diferenças significativas entre os locais de amostragem em *P. marinus* na America do Norte (Waldman et al. 2006, Genner et al.

2012), ou seja que as amostras analisadas revelam a existência de uma única população americana (mesmo considerando locais a mais de 1000 km de distância, como o Rio St. Lawrence, no Quebec e o rio Delaware, no estado de Nova Iorque), os níveis de diversidade desta população são equivalentes aos encontrados em *L. fluviatilis* (0.9133 ± 0.0224 de diversidade haplotípica e 0.005290 ± 0.003082 de diversidade nucleotídica). Interpretações acerca das diferenças encontradas entre as duas populações de lampreias migradoras da Europa ocidental que não tenham em conta a sua história evolutiva podem portanto conduzir a conclusões precipitadas. As diferenças encontradas são mais provavelmente devidas a diferenças na história de cada uma das espécies, estando *L. fluviatilis* a evoluir há mais tempo na Europa, e não tanto a diferenças intrínsecas ao ciclo de vida de cada espécie. Por outro lado, enquanto *L. fluviatilis* se originou provavelmente na Europa (a distribuição desta espécie é exclusivamente Europeia, assim como a de todas as outras espécies do mesmo género), *P. marinus* terá a sua origem mais provável na América do Norte. Esta hipótese é sustentada não só pelo facto de esta espécie ter maiores níveis de diversidade na América do Norte, mas também por as espécies filogeneticamente mais próximas, do género *Ichthyomyzon* Girard, 1858 terem a sua distribuição confinada à América do Norte.

Embora a lampreia marinha tenha uma história evolutiva muito mais recente na Europa, parece claro que as duas espécies de lampreias migradoras aí estiveram presentes durante a última glaciação. A sua diferente distribuição na Europa, com *P. marinus* mais presente no sul e em menor número no mar Báltico, e *L. fluviatilis* com uma distribuição mais a norte, estando fortemente presente no mar Báltico (Thiel et al. 2009), parece ser resultado de diferenças nas preferências térmicas. Durante a última glaciação, o mar do Norte estava parcialmente coberto por gelo e parcialmente emerso devido à descida do nível do mar (Andersen & Borns Jr. 1997). Toda a área de distribuição destas espécies se localizava a sul do golfo da Biscaia. No entanto, enquanto *L. fluviatilis* se reproduz e metamorfoseia a temperaturas entre 8.5 e 12°C, *P. marinus* necessita de 15°C (Maitland 2003). Estas diferenças devem ter levado a que *P. marinus* tenha ocupado zonas muito mais a sul da linha do gelo e que *L. fluviatilis* possa ter estado em regiões mais a norte. Por outro lado, os resultados desta tese (capítulo 8) mostram que as populações do Báltico e do Mar do Norte estão a divergir há 74 a 83 mil anos, muito antes do último máximo glacial. Estes resultados sugerem que o refúgio utilizado pela população que deu origem à população actual de *L. fluviatilis* do mar Báltico não terá sido o mesmo da do Mar do Norte. A capacidade de migrar para áreas de água doce destas espécies de lampreias, nomeadamente de *L. fluviatilis*, sugere que o refúgio glacial que deu origem à população actual do mar Báltico desta espécie tenha sido um dos grandes lagos de água

doce nas proximidades do Báltico, tal como já foi sugerido para outras espécies (Kontoula & Vainola 2001).

A distribuição actual de *L. fluviatilis* parece indicar que a Península Ibérica, e em particular Portugal, é neste momento o seu limite sul de distribuição. A presença de uma população no rio Tejo, embora de dimensão muito reduzida, mostra que as condições actuais deste rio, não sendo óptimas, permitem a sobrevivência de *L. fluviatilis*. A ausência desta espécie em qualquer outro rio da Península Ibérica é no entanto surpreendente, já que as condições de temperatura são mais adequadas em muitos dos rios localizados a norte do Tejo. Adicionalmente, a presença de múltiplas populações não tróficas de *Lampetra* sugerem que as condições para a reprodução e desenvolvimento larvar nesses rios permitiriam a sobrevivência da lampreia de rio. O facto das rotas de migração para montante e jusante nos rios serem interrompidas por barragens e açudes (Mateus et al. 2012) não explica a ausência desta espécie, já que *P. marinus* também se reproduz em alguns destes rios, e por vezes populações de larvas de *P. marinus* e de *Lampetra* não trófica coexistem nos mesmos locais. Foi ainda demonstrado que *L. fluviatilis* responde às feromonas produzidas por larvas de *P. marinus* como hormonas sinalizadoras de bons locais para reprodução (Fine et al. 2004, Docker 2006), o que torna mais difícil a compreensão da distribuição geográfica de *L. fluviatilis* na Península Ibérica. A hipótese mais provável para explicar a sua presença no Tejo parece ser o facto de esta bacia estar associada a um estuário de grandes dimensões. *Lampetra fluviatilis*, após a migração trófica, permanece em estuários e áreas adjacentes (Maitland 2003). Bacias com estuários de grandes dimensões devem, portanto, ser preferidas às bacias com menores estuários. A ausência de rios de grandes dimensões na costa norte da Península, associada à grande dimensão do rio Tejo (que possui a maior bacia hidrográfica da Península) e ainda ao facto do Douro, outro rio de grandes dimensões, ter tido correntes muito fortes após a última glaciação (Pais et al. 2012), dificultando a entrada de lampreias em fase de migração reprodutora, parecem ser factores determinantes para explicar a distribuição actual desta espécie.

No entanto, a presença de *L. fluviatilis* na Península Ibérica foi indiscutivelmente mais forte no passado. A presença de populações não tróficas de *Lampetra* em dez bacias diferentes, duas em Espanha (associadas aos rios Olabidea e Cares-Deva) e oito em Portugal (associadas aos rios Sado, Tejo, São Pedro, Liz, Mondego, Vouga, Esmoriz e Douro), estando presentes haplótipos de *L. fluviatilis* nestas populações (dois haplótipos usando o gene que codifica as subunidades 6 e 8 da ATPase e seis usando a região não-

codificante da mitocôndria; Capítulo 8) comprovam ter havido no passado uma forte presença desta espécie na Península.

Coloca-se então a questão: quando é que se formaram estas populações? E em que condições?

Tendo em conta o estudo feito por Lang et al. (2009), em que foi apresentada uma reconstrução filogenética das relações entre lampreias (Figura 1), verifica-se que um ancestral de *L. fluviatilis* terá em tempos entrado no Mediterrâneo e dado origem às duas espécies de *Lampetra* não tróficas existentes no Mediterrâneo e Mar Negro: *Lampetra zanandreae* Vladykov, 1955, que ocorre nas bacias dos rios Adige e Po em Itália e na Croácia, e *L. lanceolata* Kux & Steiner, 1972, que ocorre na Turquia, em rios que desaguam no Mar Negro (Renaud 2011).

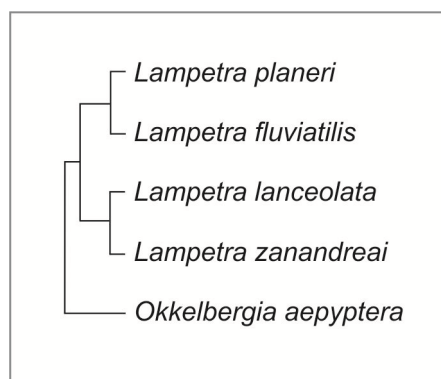


Figura 1 Relações internas no género *Lampetra*
(adaptado de Lang et al. 2009)

Considerando a distribuição antitropical das lampreias, é altamente improvável que até ao Plistocénico tenha havido lampreias no Mediterrâneo, já que até ao Miocénico as temperaturas eram muito superiores às actuais e no Pliocénico, em que já se verificava algum arrefecimento, as temperaturas da água do mar eram aproximadamente 5°C superiores às actuais (Dowsett et al. 2009), portanto muito acima dos limites de tolerância de qualquer lampreia trófica (Renaud 2011). A formação das duas espécies não tróficas do Mediterrâneo e Mar Negro terá portanto de datar do período Quaternário.

Trabalhos não publicados utilizando como marcador a sequência que codifica a subunidade 16S do ribossoma mitocondrial (533 pares de bases) e amostras de *L. fluviatilis* dos rios Reno, Garonne e Neva e *Lampetra* não trófica dos rios Vístula, Elba, Garonne, Cares-Deva, Olabidea-Ugarana, Douro e Mondego, ribeira de São Pedro e rios

Tejo, Nabão e Sado (num total de 31 indivíduos amostrados) e ainda de *L. zanandreae* e *L. lanceolata* mostraram que todos os indivíduos, tróficos ou não tróficos, dos rios que desaguam no Atlântico, Mar do Norte e Báltico correspondem ao mesmo haplótipo (com excepção dos do rio Olabidea-Ugarana, que apresentam um outro haplótipo, a uma mutação dos restantes). Por outro lado, *L. zanandreae* apresenta um haplótipo próprio, a uma mutação do haplótipo mais frequente de *Lampetra*. *Lampetra lanceolata* também tem um haplótipo fixado (para além da mutação presente em *L. zanandreae*, possui ainda outra). Utilizando os genes que codificam as subunidades 6 e 8 da ATPase observa-se um padrão idêntico (dados não publicados): embora se registre maior variabilidade, encontram-se muitos haplótipos partilhados entre *L. fluviatilis* e as populações não tróficas de *Lampetra*. No entanto, *L. zanandreae* e *L. lanceolata* possuem haplótipos bastante diferentes (em 826 pares de bases sequenciados, *L. zanandreae* está a 29 mutações do haplótipo mais próximo de *L. fluviatilis* e *L. lanceolata* a 25 mutações). Neste quadro, torna-se claro que o ancestral de *L. fluviatilis* e das populações não tróficas de *Lampetra* do Atlântico, mar do Norte e Báltico terá de ter entrado no Mediterrâneo, provavelmente no Plistocénico inferior.

Os ciclos de glaciações que ocorreram durante o Plistocénico, com alternância de condições glaciares e interglaciares, devem ter levado *L. fluviatilis* a estender a sua distribuição mais para sul ou mais para norte sucessivamente. Enquanto em condições glaciares (em muitas das glaciações), o mar estava coberto por gelo ou a temperaturas muito baixas até à costa de Espanha e Portugal (Anderson & Borns Jr. 1997), em condições interglaciares, águas subtropicais chegaram até ao golfo da Biscaia, nomeadamente no caso do interglacial Eem (Anderson & Borns Jr. 1997). Em condições interglaciares o nível do mar chegou a estar 4 a 6 metros mais alto do que o actual, enquanto que em condições glaciares, o nível do mar desceu. Estas alterações tiveram consequências conhecidas na rede de drenagem dos rios Ibéricos, pois quando o nível do mar descia, rios agora isolados encontrar-se-iam unidos em estuários de grandes dimensões. Exemplo desta situação é a existência do rio Beiralis, que corria de sul para norte e unia a foz de vários rios a norte do Douro (Minho, Âncora, Lima, Neiva, Cávado e Ave) durante a última glaciação (Rodrigues & Dias 1989).

Os trabalhos que compõem esta tese sobre a filogeografia das populações não tróficas Ibéricas de *Lampetra* permitiram a identificação de cinco unidades de conservação: as populações dos rios Sado, Nabão, São Pedro, Inha (Douro) e Olabidea-Ugarana. Embora num estudo anterior (Espanhol et al. 2007), em que eram utilizados como marcadores os genes mitocondriais que codificam o citocromo b e as subunidades 6 e 8 da ATPase, se

tenha verificado que as populações não tróficas do Sado e dos rios Vouga-Esmoriz eram diferentes das restantes populações de *Lampetra*, os trabalhos publicados nesta tese, por utilizarem um marcador de evolução mais rápida (região não codificante I da mitocôndria) e por cobrirem um número muito maior de populações com uma dimensão amostral claramente superior, permitiram uma visão mais clara da situação das populações Portuguesas.

Nestes trabalhos verificou-se que as populações dos rios Sado, Nabão, São Pedro, Inha (Douro) e Olabidea-Ugarana partilham entre si o facto de terem níveis de diversidade baixos, de estarem confinadas a áreas geográficas de pequena dimensão, isoladas de outras populações, e ainda terem um nível de evolução local considerável. De facto, na rede de parcimónia produzida (Figura 2), verifica-se que estas populações são compostas apenas por haplótipos exclusivos e, com excepção do rio Nabão, em todos os rios onde ocorre mais de um haplótipo, estes são derivados uns dos outros. No caso do rio Nabão, a população é composta por dois grupos de haplótipos: um derivado de um haplótipo presente no Tejo e outro derivado directamente do ancestral da rede. Outro aspecto de salientar nesta rede é que os haplótipos presentes na ribeira de São Pedro derivam de um haplótipo presente no rio Nabão.

Num trabalho posterior, Mateus et al. (2012), utilizando os mesmos marcadores que Espanhol et al. (2007), chegaram a resultados concordantes com os obtidos nesta tese, pois para além do clade do rio Sado (que numa tentativa de reconstituição filogenética constituiria o clade mais basal), e o clade dos rios Vouga-Esmoriz (que já tinha sido previamente identificado), também o clade do rio Nabão era composto por haplótipos exclusivos, constituindo um clade independente, mais basal do que o composto pelas restantes amostras estudadas.

Parece assim bastante sustentada a posição destacada das populações dos rios Sado (em ambos os estudos), Nabão (em ambos os estudos) e Vouga-Esmoriz. Relativamente a esta última população, dados não publicados de sequências da região não-codificante I da mitocôndria de amostras de uma população não trófica do Vouga confirmam o seu carácter distinto, embora com este marcador, os haplótipos que compõem este rio sejam os mais divergentes (a 10 mutações do haplótipo mais próximo, que está presente no Tejo, Mondego e em *L. fluviatilis* do Reno; Figura 2).

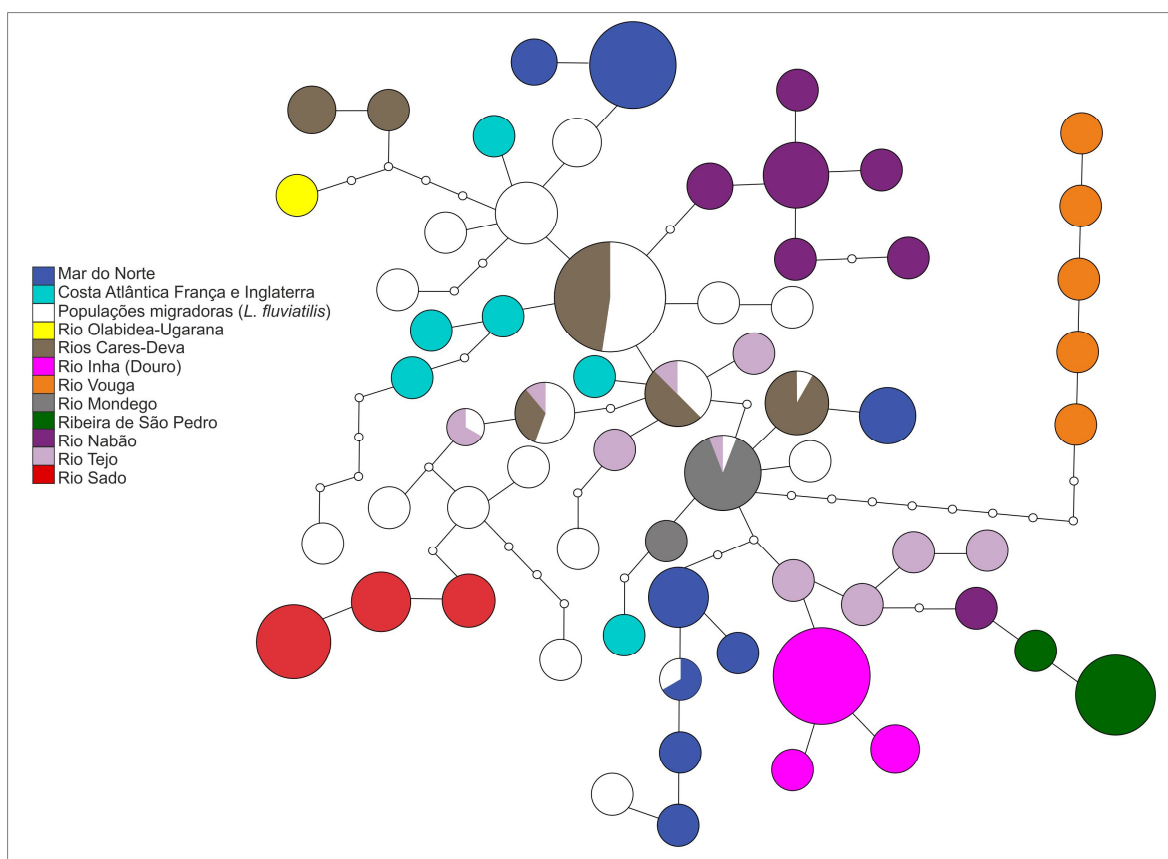


Figura 2 Representação esquemática da rede de parcimónia obtida para a região não codificante I da mitocôndria. Cada círculo representa um haplótipo, sendo as suas cores referente aos locais onde foi encontrado. O tamanho relativo de cada círculo é proporcional à frequência absoluta do haplótipo respectivo.

Sabendo que as lampreias só poderiam ter chegado à Península Ibérica a partir do Plistocénico, as condições das bacias hidrográficas e a configuração da rede hidrográfica à época terão sido determinantes na formação de populações residentes em água doce.

As bacias Cenozóicas Portuguesas começaram a encher no Eocénico Médio. Estas bacias correspondem a depressões com a direcção NE-SW que, durante o Miocénico superior e até ao Pliocénico drenavam para grandes lagos no interior da Península, na sua maioria endorreicos (Pais et al. 2012). No Pliocénico superior, ocorreu uma significativa alteração climática: o clima quente e seco deu lugar a um regime chuvoso e húmido. O drástico aumento da pluviosidade potenciou o enchimento das bacias endorreicas, que culminou no extravasamento das águas nelas contidas. O regime endorreico deu portanto lugar ao exorreísmo da maior parte das bacias, que passaram progressivamente a drenar para o Atlântico, alterando as redes de drenagem que existiam previamente e criando conexões antes inexistentes (Andeweg 2002, Pais et al. 2012). Algumas das bacias Ibéricas actuais (por exemplo a do Tejo) correspondem à

união de várias bacias endorreicas ancestrais, que se localizavam em diferentes pontos da Península, alguns deles junto à costa (Pais et al. 2012).

A Bacia do Sado, que deriva da bacia de Alvalade, designação dada à bacia messiniana a sul de Alcácer do Sal (Pimentel & Azevedo 1994), iniciou o seu enchimento no Eocénico médio. Os registos mais antigos de sedimentos marinhos datam do Miocénico superior, e mostram que neste período esta bacia foi afectada por incursões marinhas. No final do Pliocénico, a mudança climática que se verificou, concomitante com o levantamento generalizado da Península Ibérica e o seu basculamento para SW (fase ibero-manchega I), levou à drenagem desta bacia para o Atlântico, passando de endorreica a exorreica (Pais et al. 2012). Logo, a partir do Plistocénico, há cerca de 2 milhões de anos, esta bacia poderia ser colonizada por *L. fluviatilis*, provavelmente em condições glaciares. A existência de águas tropicais na costa portuguesa há 125-100 mil anos (Anderson & Borns Jr. 1997) leva a crer que durante esse período, *L. fluviatilis* tenha visto a sua distribuição restrita ao Mar do Norte e Báltico e que, se as populações de não tróficas de *Lampetra* sobreviveram na costa de Portugal, é de prever que os seus efectivos fossem muito reduzidos.

O rio Nabão, um afluente do rio Zêzere, que por sua vez drena para a margem direita do rio Tejo, fazia inicialmente parte da secção distal da bacia do Baixo Tejo (Pais et al. 2012), cuja formação data do Eocénico (Simões 2003). A abertura de depressões alongadas com uma orientação NE-SW formou a rede de drenagem associada à bacia do Baixo Tejo, que entre o Eocénico e o Miocénico se caracterizou por possuir uma sedimentação em leques aluviais endorreicos (Cunha & Martins 2004). No Miocénico, esta bacia drenava para um estuário, à semelhança do que acontecia com o Mondego. No final do Miocénico e início do Pliocénico, a sedimentação tornou-se reduzida e o Baixo Tejo transformou-se numa bacia endorreica. No Pliocénico superior o aumento das descargas dos rios, associado à mudança climática que então se verificou, e ainda as alterações na inclinação da Península Ibérica acima descritas levaram à captura da bacia endorreica de Madrid (Tejo superior) pela bacia do Baixo Tejo, levando à formação do actual Tejo exorreico, há aproximadamente 2 milhões de anos (Cunha & Martins 2004).

Mateus et al. (2011) propuseram que a divergência da população não trófica de *Lampetra* do Nabão estivesse relacionada com eventos do Miocénico e Pliocénico. No entanto, nesta altura as condições marinhas eram altamente desfavoráveis para a manutenção de populações de *Lampetra*, pelo que parece muito mais provável que esta divergência seja posterior. Aproximadamente há 2 milhões de anos, na mesma altura em que o actual

curso do Tejo se formou, conexões entre o rio Nabão e a ribeira de São Pedro, assim como entre o rio Nabão e o rio Lis (cujas nascentes estão muito próximas entre si), eram altamente prováveis. A proximidade das nascentes poderá ter facilitado a dispersão num de dois sentidos: colonização do rio Nabão a partir das ribeiras do Oeste (Lis e São Pedro), as quais drenavam para o Atlântico e por onde seria possível a entrada de *L. fluviatilis*, ou, alternativamente, no sentido inverso, a colonização das ribeiras do Oeste a partir da população de *L. fluviatilis* do rio Nabão, que o teria colonizado via curso principal do rio Tejo. O facto do rio Nabão apresentar populações polifiléticas (de acordo com a rede de parcimónia; Figura 2) leva a crer que a colonização deste rio tenha ocorrido pelo menos em duas fases desfazadas temporalmente. Uma destas estará relacionada com a colonização da ribeira do São Pedro, já que existem relações entre os haplótipos destes dois rios (Figura 2). De facto, *Achondrostoma oligolepis* (Robalo, Doadrio, Almada & Kottelat, 2005), uma espécie do norte e centro de Portugal, tem apenas um núcleo populacional em toda a bacia do rio Tejo, precisamente no rio Nabão, sendo no entanto abundante em vários rios do Oeste, nomeadamente nos rios Lis, São Pedro, Alcoa, Tornada e Real. Deste modo, parece provável que *A. oligolepis* tenha entrado na bacia do Nabão não a partir do curso principal do Tejo, mas através de ligações estabelecidas entre o rio Nabão e outros cursos de água do Oeste (nomeadamente o Lis ou o São Pedro) cujas nascentes estão separadas apenas por escassos quilómetros. Estas passagens constituiriam vias de dispersão que formas não tróficas de *Lampetra* provenientes de bacias do Oeste podem ter utilizado para colonizar o rio Nabão.

Em relação à população do Rio Vouga, provavelmente tão antiga quanto as outras duas, sabe-se que no Pliocénico se depositam sedimentos do tipo fluvio-marinho na plataforma litoral de Albergaria-a-Velha, perto da actual ria de Aveiro (Gomes & Barra 2001). Estes resultados mostram que esta bacia era já exorreica nesta altura (Gomes & Barra 2001). A colonização do rio Vouga por *L. fluviatilis* seria portanto possível desde o Pliocénico, desde que as condições abióticas fossem favoráveis. É no entanto de salientar que, há 18 000 anos, durante a última glaciação, o curso do Vouga corria na plataforma litoral até desaguar no canhão submarino de Aveiro, em resultado da significativa regressão marinha observada (Rodrigues & Dias 1989). No entanto, o rio Esmoriz, que segundo Espanhol et al. (2007) partilha haplótipos com a população não trófica do Vouga, durante a última glaciação encontrava-se a drenar para o canhão submarino do Douro (Rodrigues & Dias 1989). Apenas há 10 mil anos as bacias dos rios Douro e Esmoriz se encontram separadas, o que implica que contactos entre as bacias dos rios Vouga, Esmoriz e Douro eram possíveis directa ou indirectamente nesta altura.

Resultados não publicados relativos a sequenciações do gene mitocondrial que codifica as subunidades 6 e 8 da ATPase em amostras de populações não tróficas de *Lampetra* dos rios Elba, Reno, Garonne, Inha (Douro), Mondego, São Pedro, Nabão, Tejo e Sado, num total de 61 indivíduos foram analisados em conjunto com os resultados obtidos por Espanhol et al. (2007) e Mateus et al. (2011). Estas análises resultaram na rede de parcimónia apresentada na Figura 3. Nesta rede é possível observar o carácter distinto das populações dos rios Sado e Vouga-Esmoriz, que são compostos apenas por haplótipos exclusivos, derivados uns dos outros e relativamente afastados do centro da rede. Estes resultados são concordantes com os obtidos nesta tese utilizando a região não codificante I da mitocôndria. Por outro lado, os haplótipos presentes no rio Nabão, tal como acontece quando se utiliza o marcador de evolução mais rápida, estão presentes em dois locais da rede: num grupo de haplótipos exclusivos derivados de haplótipos presentes nos rios Vouga-Esmoriz e ainda num outro haplótipo, partilhado com as populações não tróficas de rios que desaguam no Mar do Norte e nos rios Tejo, Inha (Douro) e São Pedro, para além de estar também presente em *L. fluviatilis*. Parece portanto claro que a população do rio Nabão, tendo um carácter distinto, é no entanto polifilética.

Para além das populações dos rios Sado, Nabão e Vouga, as populações não tróficas de *Lampetra* das ribeiras de São Pedro, Inha (Douro) e Olabidea-Ugarana são consideradas unidades de conservação (Capítulos 4 e 5). Nestas ribeiras foram encontrados níveis de diversidade muito baixos. A população da Ribeira de São Pedro, uma ribeira de pequena dimensão, é apenas constituída por dois haplótipos na região não-codificante I da mitocôndria (Capítulo 4) e também por dois haplótipos considerando o gene que codifica as subunidades 6 e 8 da ATPase (Figura 3). Embora, com este último marcador, esta população não seja composta apenas por haplótipos exclusivos, os resultados com os dois marcadores não parecem discordantes, tendo em conta o facto de a região não codificante I da mitocôndria evoluir mais rapidamente. Na população do rio Inha (Douro) foram encontrados três haplótipos na região não codificante I da mitocôndria (Capítulo 4) e quatro no gene que codifica as subunidades 6 e 8 da ATPase (Figura 3). Também neste caso os resultados não são discordantes, já que com o primeiro marcador estes haplótipos são exclusivos e derivados uns dos outros, enquanto que com o segundo marcador dois dos quatro haplótipos são exclusivos, sendo três dos quatro haplótipos derivados uns dos outros. Assim, em ambos os marcadores, observa-se algum nível de evolução local, um dos critérios utilizados para diagnosticar unidades de conservação (Fraser & Bernatchez 2001). Em relação à população do rio Olabidea-Ugarana, esta foi apenas estudada no que diz respeito à região não codificante I da mitocôndria. A sua

falta de diversidade genética, o facto de ser composta apenas por um haplótipo exclusivo desta população, assim como a sua posição na rede de haplótipos (Capítulo 5), mostram bem que esta população é única e tem níveis de diversidade e uma história de evolução local compatíveis com ser considerada uma outra unidade de conservação.

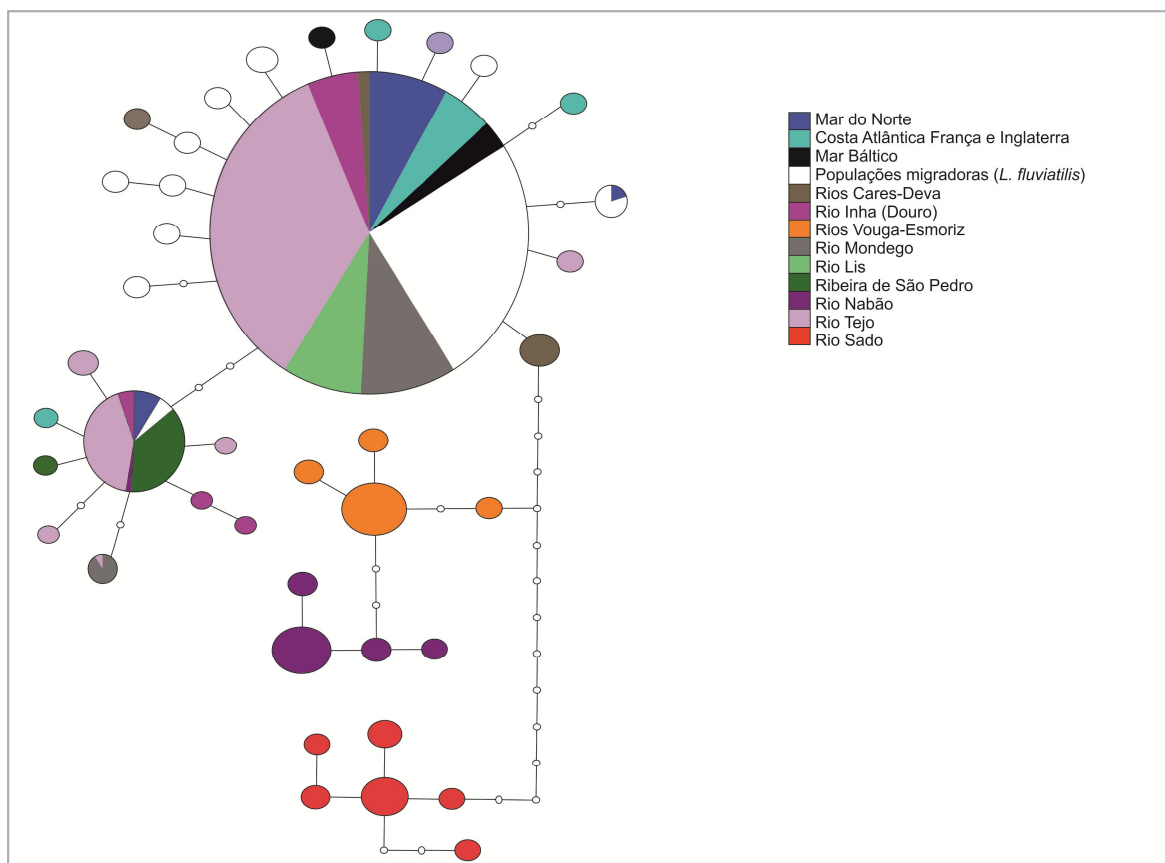


Figura 3 Representação esquemática da rede de parcimónia obtida para o gene mitocondrial que codifica as subunidades 6 e 8 da ATPase. Cada círculo representa um haplótipo, sendo as suas cores referente aos locais foi amostrado. O tamanho relativo de cada círculo é proporcional à frequência absoluta do haplótipo respectivo.

A população do rio Olabidea-Ugarana apresenta além disso, como referido acima, um haplótipo distinto do das outras *Lampetras* europeias (tróficas ou não tróficas) na sequência que codifica a unidade 16S do ribossoma mitocondrial, o que corrobora o reconhecimento de uma unidade de conservação para esta população (dados não publicados).

A morfologia das larvas destas populações Ibéricas é também diferente (dados não publicados): enquanto as larvas das populações do Tejo correspondem em termos de dimensões e coloração ao descrito para *Lampetra planeri*, as larvas dos rios São Pedro, Inha e Nabão têm uma coloração mais escura. Por outro lado, as larvas das populações

dos rios Sado e Olabidea apresentam uma coloração mais amarelada. Finalmente, as larvas do rio São Pedro são de menores dimensões, tendo indivíduos mantidos em cativeiro metamorfoseado com tamanhos muito inferiores aos originários doutras populações. Também adultos pescados na ribeira de São Pedro apresentaram dimensões mais reduzidas.

Os resultados destes trabalhos acerca da filogeografia das lampreias não tróficas da Península Ibérica vêm reavivar a discussão sobre a validade da espécie *Lampetra planeri*. De facto, os resultados acima descritos parecem indicar que, tal como previsto teoricamente, *L. fluviatilis* terá dado origem a populações não tróficas diversas vezes ao longo do tempo. Assim, enquanto as populações do Olabidea-Ugarana, Vouga-Esmoriz, Nabão e Sado parecem ser as mais antigas, as lampreias migradoras terão dado posteriormente origem às populações do São Pedro e Inha, e ainda mais tarde às do Tejo, Mondego e Cares-Deva, as quais partilham haplótipos para a região não-codificante I da mitocôndria com *L. fluviatilis*.

Se, por um lado, se torna ainda mais evidente que a transição de população trófica para não trófica parece suficientemente fácil para ter ocorrido múltiplas vezes, quando se considera apenas a área geográfica estudada, por outro lado a validade de *L. planeri* é posta em causa, sendo polifilética.

A definição de espécie, embora seja uma das mais importantes unidades na Biologia, é ainda controversa, tendo já sido propostos pelo menos 26 conceitos alternativos (Hausdorf 2011). Um dos conceitos mais frequentemente utilizados tem sido o conceito biológico de espécie (Mayr 1942). Segundo este conceito, uma espécie é um conjunto de um ou mais grupos de indivíduos que potencialmente se podem reproduzir entre si, originando descendência fértil, e que estão reprodutivamente isolados de outros grupos (Futuyma 1998). Outro conceito utilizado frequentemente é o conceito evolutivo (Wiley 1978), o qual define espécie como uma linhagem que evolui separadamente de outras (Futuyma 1998). O conceito filogenético, que define uma espécie como a mais pequena unidade monofilética com uma mesma origem evolutiva, também tem sido frequentemente usado (Futuyma 1998, Frankham et al. 2012). Em situações concretas, a utilização de diferentes definições pode ter consequências legais, financeiras, biológicas e ao nível da conservação, o que torna o processo de unificação do conceito de espécie da maior importância (Frankham et al. 2012). De Queiroz (2005, 2007) defende que em todos os conceitos modernos de espécie está implícito que esta é uma metapopulação (ou um segmento desta) que evolui separadamente. Este “conceito unificado” separaria o

que o autor considera ser a conceptualização da espécie (como unidade evolutiva) e o seu reconhecimento, pondo fim às discussões sobre esta temática. No entanto, mesmo este conceito não parece ser consensual (Hausdorf 2011).

No caso das formas de *Lampetra* da Europa Ocidental, a situação taxonómica é complexa. Por um lado, a espécie *L. planeri* é claramente inválida, já que é polifilética. Deste modo, haveria a tendência para identificar cada população não trófica como uma espécie diferente, especialmente nas situações em que são compostas apenas por haplótipos exclusivos em mais de um marcador mitocondrial, tendo portanto uma história evolutiva própria e nalguns casos sendo claramente monofiléticas. No entanto, não é conhecida a relação destas populações não tróficas com a forma trófica. Neste momento, *L. fluviatilis* está ausente da Península Ibérica, com excepção da população do rio Tejo. Se alterações climáticas levarem a que esta forma de *Lampetra* se torne mais frequente na Península Ibérica, não é claro se a entrada de indivíduos migradores não irá levar a que ocorra fluxo genético entre populações, sobretudo porque toda a evidência actualmente disponível indica que os cruzamentos entre as formas tróficas e não tróficas são viáveis, tendo sido demonstrada a existência de fluxo genético entre formas tróficas e não tróficas no género *Ichthyomyzon* (ver introdução geral). Esta situação taxonómica parece em tudo equivalente à que ocorre em *Gasterosteus aculeatus* e em vários salmonídeos (Taylor 1999, 2006, Makinen et al. 2006, Docker 2009), mas sem a diferenciação morfológica clara que ocorre nestas situações. Nestes grupos, optou-se pela manutenção de uma única designação específica, com variantes, situação que parece a mais adequada para o complexo de *Lampetra*, pelo menos até que os mecanismos de isolamento reprodutor ou a ausência dos mesmos possam estar esclarecidos. De acordo com este critério, todas as populações não tróficas de *Lampetra* deveriam ser incluídas na espécie *L. fluviatilis*.

No entanto, em termos de conservação, é necessário ter em conta que esta espécie é composta por diferentes unidades, com características bastante distintas. A criação do conceito de ESU (Unidade Evolutivamente Significativa), nos anos 80, inicialmente definido como um subconjunto da população que possui atributos genéticos significativos para o presente e futuro da espécie em causa, veio responder, em termos de políticas de conservação, à necessidade de considerar não apenas a espécie como um todo, mas sim as unidades que a compõem (Fraser & Bernatchez 2001). Mais tarde, Waples redefiniu este conceito, na sequência do seu trabalho com o salmão do pacífico: “Uma população deve satisfazer dois critérios para ser considerada uma ESU: deve estar substancialmente isolada reprodutivamente de outras populações e deve representar um

importante componente do legado evolutivo da espécie” (Waples 1991). A identificação de unidades de gestão de conservação (MU: *Managment units*), definidas como populações conspecíficas entre as quais a conectividade é suficientemente baixa para que cada população deva ser monitorizada e gerida independentemente (Palsbøll et al. 2006), vai também no mesmo sentido: as unidades de conservação não têm de ser as espécies, mas antes subunidades destas que apresentam características próprias. No caso de *Lampetra fluviatilis sensu lato*, é claramente necessário que sejam discriminadas as unidades que a compõem do ponto de vista da conservação: por um lado, uma forma migradora trófica, provavelmente com duas unidades populacionais (uma associada ao Mar do Norte e outra ao Mar Báltico); por outro lado, uma forma não trófica residente em água doce, composta por múltiplas unidades (pelo menos uma presente nas bacias que desaguam no Mar do Norte, e, na Península Ibérica, pelas unidades populacionais dos rios Sado, Nabão, São Pedro, Vouga-Esmoriz, Douro e Olabidea-Ugarana).

Perspectivas para estudos futuros

No sentido de clarificar as relações filogenéticas entre formas migradoras e não migradoras de *Lampetra* duas abordagens serão necessárias no futuro. Por um lado, estudos sobre a possibilidade de fluxo genético em populações simpátricas, como a do Tejo, serão de extrema importância. A utilização de marcadores de evolução mais rápida, como microssatélites, em formas ontogenéticas alternativas que ocorrem em simpatria, o que pode ser conseguido nas populações do rio Tejo, pode permitir clarificar se existe ou não fluxo genético entre populações. Por outro lado, a possibilidade de se proceder a reproduções por inseminação artificial em cativeiro, e a manutenção das larvas em gaiolas em situação natural, à semelhança do que já foi feito em *Petromyzon marinus*, pode permitir perceber se os híbridos são viáveis e férteis, e qual a estratégia ontogenética que seguem.

Uma outra abordagem, complementar à primeira, será o estudo da metamorfose em formas alternativas de *Lampetra*. Se é conhecido que em *P. marinus* se encontraram alterações ao nível das GnRH durante a metamorfose, em espécies com formas ontogenéticas alternativas não foi ainda investigado este fenómeno. As variações nas concentrações destas hormonas nas diferentes fases da metamorfose podem dar importantes pistas acerca das alterações necessárias para a formação de ciclos de vida diferentes em *Lampetra*. No entanto, com as novas tecnologias de sequenciação, a perspectiva se obterem transcriptomas e mesmo genomas das formas tróficas e não

tróficas da mesma espécie cria a possibilidade de se identificarem genes que possam ter uma expressão diferencial nas duas formas. Uma vez identificados esses genes, e investigada a sua função, é possível obter indicações sobre os reais determinantes das diferentes ontogenias. É ainda necessário verificar com rigor qual a duração da fase larvar nas duas formas alternativas. A utilização de estatólitos para estimar a duração desta fase foi já conseguida em *P. marinus*. Seria interessante, no futuro, proceder da mesma forma em *Lampetra*.

Uma das grandes dificuldades no estudo desta espécie tem sido o facto de a fase larvar ser muito longa e não ser possível identificar a estratégia ontogenética dos indivíduos antes da metamorfose. O número de trabalhos sobre a biologia básica destes animais é também reduzido. Por outro lado, enquanto existe bastante literatura sobre *P. marinus*, e alguma sobre *Lampetra* e *Ichthyomyzon*, em muitas outras espécies de lampreias não existem trabalhos sobre a sua biologia mais básica. Por exemplo, seria interessante estudar as espécies do género *Eudontomyzon*, um outro género europeu, no qual a espécie trófica tem uma distribuição muito mais restrita do que uma das espécies não tróficas. Esta espécie não trófica, *Eudontomyzon mariae*, apresenta um número de oócitos aparentemente elevado que, tendo em conta a diversidade intraespecífica, se sobrepõe ao da respectiva espécie par trófica.

Embora esta tese tenha contribuído para caracterizar as populações não-migradoras Ibéricas de *Lampetra*, a caracterização da variabilidade, nomeadamente ao nível morfológico merece ainda algum investimento.

Também ainda deve ser estudada a história evolutiva das formas não tróficas de *Lampetra* que ocorrem fora da Península Ibérica. Sabendo-se que os períodos finais das glaciações deram origem à formação de numerosos lagos e novos cursos de água, é de prever que aquilo que se chamava tradicionalmente *L. planeri* fora da Península Ibérica possa corresponder a um cenário complexo, com a formação de formas migradoras em diversos momentos e locais a partir de *L. fluviatilis*, combinadas com processos de dispersão em água doce e cruzamento com outras populações, quando a rede hidrográfica originou novas conexões.

Na presente tese mostrou-se evidência que suporta a existência de dois refúgios para *L. fluviatilis*. Se, como os dados parecem indicar, as lampreias do Báltico e do Mar do Norte correspondem a duas linhagens que permaneceram isoladas e adquiriram algumas diferenças, cada uma delas pode ter desempenhado um papel que está por avaliar na

formação das populações de água doce. Esta é outra área que constitui mais um desafio para o futuro.

CAPÍTULO 10

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 10

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboim, M.A., Mavárez, J., Bernatchez, L. & Coelho, M.M. (2010) Introgressive hybridization between two Iberian endemic cyprinid fish: a comparison between two independent hybrid zones. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 817-828.

Albert, V., Jónsson, B. & Bernatchez, L. (2006) Natural hybrids in Atlantic eels (*Anguilla anguilla*, *A. rostrata*): evidence for successful reproduction and fluctuating abundance in space and time. *Molecular Ecology*, 15: 1903–1916.

Almada V.C., Pereira, A.M., Robalo, J.I., Fonseca, J.P., Levy, A., Maia, C. & Valente, A. (2008) Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea-lampreys along European shores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 391–396.

Alvarez, J. & Doadrio, I. (1986) Sobre la presencia de *Lampetra planeri* Bloch, 1784 en España. *Acta Vertebrata*, 13: 158–160.

Anderson, B.G. & Borns Jr., H.W. (1997) *The ice age world*. Scandinavian University Press, Oslo.

Andeweg, B. (2002) Cenozoic tectonic evolution of the Iberian Peninsula. Causes and effects of changing stress fields. PhD thesis, Vrije Universiteit, Amsterdam.

Avice, J.C. (2000) *Phylogeography*. Harvard University Press, Boston.

Bardack, D. & Zangerl, B. (1971) Lampreys in the fossil record. In: Hardisty, M.W. & Potter, I.C.(Eds.) *The Biology of Lampreys*, vol. I. Academic Press, New York, pp. 67-84.

Beamish, F.W.H. (1980) Biology of the North American anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1924-1943.

Beamish, R.J. (1987) Evidence that parasitic and nonparasitic life history types are produced by one population of lamprey. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44: 1779–1782.

- Beamish, R.J. & Neville, C.-E. (1992) The importance of size as an isolating mechanism in lampreys. *Copeia*, 1: 191–196.
- Bergstedt, R.A. & Seelye, J.G. (1995) Evidence for lack of homing by sea lampreys. *Transactions of the American Fisheries Society*, 124: 235–239.
- Bianco, P.G. (1995) Mediterranean Endemic Freshwater Fishes of Italy. *Biological Conservation*, 72: 159–170.
- Binder, T.R. & McDonald, D.G. (2007) Is there a role for vision in the behaviour of sea lampreys (*Petromyzon marinus*) during their upstream spawning migration? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64: 1403–1412.
- Bjerselius, R., Li, W.M., Teeter, J.H., Seelye, J.G., Johnsen, P.B., Maniak, P.J., Grant, G.C., Polkinghorne, C.N. & Sorensen, P.W. (2000) Direct behavioral evidence that unique bile acids released by larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*) function as a migratory pheromone. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(3): 557–569.
- Blank, M., Jurrs, K. & Bastrop, R. (2008) A mitochondrial multigene approach contributing to the systematics of the brook and river lampreys and the phylogenetic position of *Eudontomyzon mariae*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65: 2780–2790.
- Briggs, J.C. (1995) *Global biogeography. Developments in palaeontology and stratigraphy*. Elsevier, Amsterdam.
- Bryan, M.B., Zalinski, D., Filcek, K.B., Libants, S., Li, W. & Scribner, K.T. (2005) Patterns of invasion and colonization of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in North America as revealed by microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, 14: 3757–3773.
- Cabral, H., Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queiroz, A.I., Rogado, L. & Santos-Reis, M. (Eds) (2005) *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.
- Carmona, J.A., Sanjur, O.I., Doadrio, I., Machordom, A. & Vrijenhoek, R.C. (1997) Hybridogenetic reproduction and maternal ancestry of polyploidy Iberian fish: the *Tropidophoxinellus alburnoides* complex. *Genetics*, 146: 983–993.

Chang, M. M., Zhang, J. & Miao, D. (2006) A lamprey from the Cretaceous Jehol biota of China. *Nature*, 441: 972-974.

Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.

Climap Project Members (1981) Seasonal reconstruction for the earth's surface at the last glacial maximum, GSA Map & Chart Serv., MC-36, Boulder, Geological Society of America, Colorado.

Cochran, P.A., Bloom, D.D. & Wagner, R.J. (2008) Alternative reproductive behaviors in lampreys and their significance. *Journal of Freshwater Ecology*, 23: 437-444.

Crivelli, A.J. (2006) *Cobitis calderoni*. In: IUCN 2010. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 18 November 2010.

Cunha, P.P. & Martins, A.A. (2004) Principais aspectos geomorfológicos de Portugal central, sua relação com o registo sedimentar e a importância do controlo tectónico. In: Araújo, M.A. & Gomes, A.A. (Eds.) *Geomorfologia do NW da Península Ibérica*. Faculdade de Letras da Universidade do Porto, Porto, pp. 155-182.

De Queiroz, K. (2005) A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 56: 196-215.

De Queiroz, K. (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6): 879-886.

Delarbre, C., Gallut, C., Barriel, V., Janvier, P. & Gachelin, G. (2002) Complete mitochondrial DNA of the hagfish, *Eptatretus burgeri*: the comparative analysis of mitochondrial DNA sequences strongly supports the cyclostome monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22: 184-192.

Derosier, A.L., Jones, M.L. & Scribner, K.T. (2007) Dispersal of Sea Lamprey Larvae During Early Life: Relevance for Recruitment Dynamics. *Environmental Biology of Fishes*, 78: 271–284.

Doadrio, I. (1987) *Leuciscus carolitertii* n. sp. from the Iberian Peninsula (Ostariophysi, Cyprinidae). *Senckenbergiana Biologica*, 68(4/6): 301-309.

- Doadrio, I. (1990) Phylogenetic relationships and classification of western palearctic species of the genus *Barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae). *Aquatic Living Resources*, 3: 295-303.
- Doadrio, I. (2002) *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza/Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC. Madrid.
- Doadrio, I. & Carmona, J.A. (2006) Phylogenetic overview of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in the Iberian Peninsula, with description of two new species. *Cybium*, 30(3): 199-214.
- Doadrio, I. & Garzón, P. (1987) Sobre la distribución de *Barbus haasi* (Ostariophysi, Cyprinidae). *Doñana Acta Vertebrata*, 14: 123-125.
- Doadrio, I. & Perdices, A. (2005) Phylogenetic relationships among the ibero-african cobitids (*Cobitis*, Cobitidae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 484-493.
- Doadrio, I., Perea, S. & Alonso, F. (2007) A new species of the genus *Squalius* Bonaparte, 1837 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Tagus River Basin (Central Spain). *Graellsia*, 63(1): 89-100.
- Dobzhansky, T. (1950) Mendelian populations and their evolution. *American Naturalist*, 84: 401-418.
- Docker, M.F. (2006) Bill Beamish's contributions to lamprey research and recent advances in the field. *Guelph Ichthyology Reviews*, 7: 1-52.
- Docker, M. F. (2009) A review of the evolution of nonparasitism in lampreys and an update of the paired species concept. *American Fisheries Society Symposium* 72: 71-114.
- Docker, M.F. & Heath, D.D. (2003) Genetic comparison between sympatric anadromous steelhead and freshwater resident rainbow trout in British Columbia, Canada. *Conservation Genetics*, 4: 227-231.

- Docker, M.F., Mandrak, N.E. & Heath, D.D. (2012) Contemporary gene flow between “paired” silver (*Ichthyomyzon unicuspis*) and northern brook (*I. fessor*) lampreys: implications for conservation. *Conservation Genetics*, 13: 823–835.
- Docker, M.F., Youson, J.H., Beamish, R.J. & Devlin, R.H. (1999) Phylogeny of the Lamprey Genus *Lampetra* Inferred from Mitochondrial Cytochrome *b* Gene Sequences. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(12): 2340–2349.
- Dowling, T.E. & Demarais, B.D. (1993) Evolutionary significance of introgressive hybridization in cyprinid fishes. *Letters to Nature*, 362: 444–446.
- Dowsett, H.J., Chandler, M.A. & Robinson, M.M. (2009) Surface temperatures of the Mid-Pliocene North Atlantic Ocean: implications for future climate. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 367: 69–84.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. (2005) Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1185–1192.
- Espanhol, R., Almeida, P.R. & Alves, J. (2007) Evolutionary history of lamprey paired species *Lampetra fluviatilis* (L.) and *Lampetra planeri* (Bloch) as inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 16: 1909–1924.
- Excoffier, L.G.L. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1: 47–50.
- Excoffier, L.G.L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.
- Farmer, G.J. (1980) Biology and physiology of feeding in adult lamprey. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1751–61.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence-limits on phylogenies—an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.

- Fine, J.M., Vrieze, L.A. & Sorensen, P.W. (2004) Evidence that Petromyzontid lampreys employ a common migratory pheromone that is partially comprised of bile acids. *Journal of Chemical Ecology*, 30(11): 2091–2109.
- Forey, P.L. & Janvier, P. (1993) Agnathans and the origin of jawed vertebrates. *Nature*, 361: 129–134.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Dudash, M.R., Eldridge, M.D.B., Fenster C.B., Lacy, R., Mendelson III, R. J., Porton, I.J., Ralls, K. & Ryder, O.A. (2012) Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Conservation Genetics*, 153: 25-31.
- Fraser, D.J. & Bernatchez, L.B. (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10: 2741-2752.
- Freyhof, J. (2011) *Lampetra fluviatilis*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>.
- Freyhof, J. (2011) *Lampetra planeri*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>.
- Freyhof, J. & Kottelat, M.(2008). *Petromyzon marinus*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>.
- Futuyma, D.J. (1998) *Evolutionary Biology*. 3rd Edition. Sinauer Associates, Sunderland.
- Futuyma, D.J. (2005) *Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Gardiner, R. (2003) *A field identification key for lamprey ammocoetes*. Conserving Natura 2000 River Series. Conservation techniques N°4. English Nature, Peterborough.
- Gardiner, R. (2003) *Identifying Lamprey. A Field Key for the Sea, River and Brook Lamprey*. Conservation Techniques Series, No. 4.. Conserving Natura 2000, Peterborough.
- Genner, M.J., Hillman, R., McHugh, M., Hawkins, S.J. & Lucas, M.C. (2012) Contrasting demographic histories of European and North American sea lamprey (*Petromyzon marinus*) populations inferred from mitochondrial DNA sequence variation. *Marine and Freshwater Research*, 63: 827-833.

- Gess, R.W., Coates, M.I. & Rubidge, B.S. (2006) A lamprey from the Devonian period of South Africa. *Nature*, 443: 981-984.
- Gomes, A.A. & Barra, A. (2001) Morfologia e cobertura detrítica da plataforma litoral na área de Albergaria-a-Velha (Distrito de Aveiro). *Estudos do Quaternário*, 3: 7-14.
- Goodman, D.H., Reid, S.B., Docker, M.F., Haas, G.R. & Kinziger, A.P. (2008) Mitochondrial DNA evidence for high levels of gene flow among populations of a widely distributed anadromous lamprey *Entosphenus tridentatus* (Petromyzontidae). *Journal of Fish Biology*, 72: 400–417.
- Hardisty, M. W. (1961) Oocyte Numbers as a Diagnostic Character for the Identification of Ammocoete Species. *Nature*, 4794: 1215–1216.
- Hardisty, M.W. (1964) The fecundity of lampreys. *Archiv fur Hydrobiologie*, 60: 340-357.
- Hardisty, M. W. (1986) General introduction to lampreys. In: Holcik, J. (Ed.) *The freshwater fishes of Europe*. Aula-Verlag, Wiesbaden, pp. 19-83.
- Hardisty, M.W. (2006) *Lampreys – Life Without Jaws*. Forrest Text, Ceredigion.
- Hardisty, M.W. & Huggins, R.L. (1970) Larval growth in the river lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *Journal of Zoology*, 161: 549–559.
- Hardisty, M.W. & Potter, I.C. (1971) The general biology of adult lampreys. In: Hardisty, M.W., Potter, I.C. (Eds.) *The Biology of Lampreys*, vol.1. Academic Press, New York, pp. 127–206.
- Hardisty, M.W. & Potter, I.C. (1971a) Paired Species. In: Hardisty, M.W., Potter, I.C. (Eds.) *The Biology of Lampreys*, vol.1. Academic Press, New York, pp. 249-278
- Hardisty, M.W. & Potter, I.C. (1971b) The behaviour, Ecology and growth of larval lampreys. In: Hardisty, M.W., Potter, I.C. (Eds.) *The Biology of Lampreys*, vol.1. Academic Press, New York, pp. 85-126.
- Hardisty, M.W., Potter, I.C. & Sturge, R. (1970) A comparison of the metamorphosing and macrophthalmia stages of the lampreys *Lampetra fluviatilis* and *Lampetra planeri*. *Journal of Zoology*, 162: 383-400.

- Hatch, D.R. & Whiteaker, J.M. (2009) A field study to investigate repeat homing in Pacific lamprey. *American Fisheries Society Symposium*, 72: 41–55.
- Heath, D.D., Bettles, C.M., Jamieson, S., Stasiak, I. & Docker, M.F. (2008) Genetic differentiation among sympatric migratory and resident life history forms of rainbow trout in British Columbia. *Transactions of the American Fisheries Society*, 137: 1268-1278.
- Heimberg, A.M., Cowper-Sallari, R., Sémon, M., Donoghue, P.C.J. & Peterson, K.J. (2010) MicroRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *PNAS*, 107(45): 19379-19383.
- Hey, J. & Wakeley, J. (1997) A coalescent estimator of the population recombination rate. *Genetics*, 145: 833–846.
- Holcik, J., Delic, A., Kucinic, M., Bukvic, V. & Vater, M. (2004) Distribution and morphology of the sea lamprey from the Balkan coast of the Adriatic Sea. *Journal of Fish Biology*, 64: 514-527.
- Holmes, J.A., Beamish, F.W.H., Seelye, J.G., Sower, S.A. & Youson, J.H. (1994) Long-term influence of water temperature, photoperiod, and food deprivation on metamorphosis of sea lamprey, *Petromyzon Marinus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51: 2045–2051.
- Holmes, J.A. & Youson, J. H. (1998) Extreme and Optimal Temperatures for Metamorphosis in Sea Lampreys. *Transactions of the American Fisheries Society*, 127: 206–211.
- Hubbs, C.L. & Potter, I.C. (1971) Distribution, phylogeny and Taxonomy. In: Hardisty, M.W., Potter, I.C. (Eds.) *The Biology of Lampreys*, vol.1. Academic Press, New York, pp. 1-65.
- Huggins, R.J. & Thompson, A. (1970) Communal spawning of brook and river lampreys, *Lampetra planeri* Bloch and *Lampetra fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology*, 2: 53–54.
- IUCN (2010) *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2010.3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 20 September 2010.
- Janvier, P. (2008) Early jawless vertebrates and cyclostome origins. *Zoological Science*, 25(10): 1045-1056.

Janvier, P. (2010) MicroRNAs revive old views about jawless vertebrate divergence and evolution. *PNAS*, 107(45): 19137-19138.

Jónsson, B. & Jóhannsson, M. (2008) Rannsóknir á landnámi sæsteinsuga (*Petromyzon marinus*) á Íslandi. Report from Institute of Freshwater Fisheries, VMST/0801: 1–23.

Jonsson, G. (1992) Islenskir fiskar. Fiolvi, Reykjavík.

Kelly, F.L. & King, J.J. (2001) A review of the ecology and distribution of three lamprey species, *Lampetra fluviatilis* (L.), *Lampetra planeri* (Bloch) and *Petromyzon marinus* (L.): a context for conservation and biodiversity considerations in Ireland. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 101B: 165–185.

Kontula, T. & Vainola, R. (2001) Postglacial colonization of Northern Europe by distinct phylogeographic lineages of the bullhead, *Cottus gobio*. *Molecular Ecology*, 10: 1983-2002.

Kottelat, M. (1997) European Freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. *Biologia (Bratislava), Section Zoology*, 52(Suppl.): 1-271.

Kottelat, M. (2004) *Salaria economidisi*, a new species of freshwater fish from lake Trichonis, Greece, with comments on variation in *S. fluviatilis* (Teleostei, Blenniidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 111: 121-137.

Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007) *Handbook of European Freshwater Fishes*. Kottelat, Cornol.

Kucheryavyi, A.V., Savvaitova, K.A., Pavlov, D.S., Gruzdeva, M.A., Kuzishchib, K.V. & Stanford, J.A. (2007) Variations of life history strategy of the arctic lamprey *Lenthenteron camtschaticum* from the Utkholok River (Western Kamchatka). *Journal of Ichthyology*, 47: 37–52.

Lang, N.J., Roe, K.J., Renaud, C.B., Gill, H.S., Potter, I.C., Freyhof, J., Naseka, A.M., Cochran, P., Pérez, H.E., Habit, E.M., Kuhajda, B.R., Neely, D.A., Reshetnikov, Y.S., Salnikov, V.B., Stoumboudi, M.T. & Mayden, R.L. (2009) Novel relationships among Lampreys (Petromyzontiformes) revealed by a taxonomically comprehensive molecular data set. *American Fisheries Society Symposium*, 72: 41–55.

- Lasne, E., Sebatié, M.R. & Evanno, G. (2010) Communal spawning of brook and river lampreys (*Lampetra planeri* and *L. fluviatilis*) is common in the Oir River (France). *Ecology of Freshwater Fish*, 19: 323-325.
- Lebel, I., Auphan, N., Brosse, L. & Menella, J.-Y. (2007) Le Plan Migrateurs Rhône-Méditerranée: Action En Faveur De La Biodiversité. *Cybium*, 31(2): 261–273.
- Lee, W.J. & Kocher, D. (1995) Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of a vertebrate genome organization. *Genetics*, 139: 873–887.
- Leunda, P.M., Elvira, B., Ribeiro, F., Miranda, F., Oscoz, J., Alves, M.J. & Collares-Pereira, M.J. (2009) International standardization of common names for Iberian Endemic Freshwater Fishes. *Limnetica*, 28(2): 189-202.
- Li, W., Scott, A.P., Siefkes, M.J., Yan, H., Liu, Q., Yun, S-S. & Gage, D.A. (2002) Bile acid secreted by male sea lamprey that acts as a sex pheromone. *Science*, 296: 138-141.
- Loman, J.C.C. (1912) Über die Naturgeschichte des Bachneunauges *Lampetra planeri*. *Zoologisches Jahrbuch* (Suppl.), 15: 243-270.
- Machordom, A., Berrebi, P. & Doadrio, I. (1990) Spanish barbel hybridization detected using enzymatic markers: *Barbus meridionalis* Risso X *Barbus haasi* Mertens (Osteichthyes: Cyprinidae). *Aquatic Living Resources*, 3: 295-303.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. (2006) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 1.12. Available from: <<http://mesquiteproject.org/>>.
- Maitland, P.S. (2003) *Ecology of the River, Brook and Sea Lamprey*. Conserving Natura 2000 Rivers Ecology Series No. 5. English Nature, Peterbough.
- Mäkinen, H.S., Cano, J.M. & Merilä, J. (2006) Genetic relationships among marine and freshwater populations of the European three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) revealed by microsatellites. *Molecular Ecology*, 15: 1519–1534.
- Mallat, J. & Sullivan, J. (1998) 28S and 18S rDNA Sequences Support the Monophyly of Lampreys and Hagfishes. *Molecular Biology and Evolution*, 15(12): 1706–1718.
- Manion, P.J. & Purvis, H.A. (1971) Giant American brook lampreys, *Lampetra lamottei*, in the Upper Great Lakes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 28: 616–620.

Martin, H. & White, M.M. (2008) Intraspecific phylogeography of the least brook lamprey (*Lampetra aepyptera*). *Copeia*, 2008: 579–585.

Mateus, C.B., Almeida, P.R., Quintella, B.R. & Alves, M.J. (2011) MtDNA markers reveal the existence of allopatric evolutionary lineages in the threatened lampreys *Lampetra fluviatilis* (L.) and *Lampetra planeri* (Bloch) in the Iberian glacial refugium. *Conservation genetics*, 12: 1061-1074.

Mateus, C.S., Rodríguez-Muñoz, R., Quintella, B.R., Alves, M.J. & Almeida, P.R. (2012) Lampreys of the Iberian Peninsula: distribution, population status and conservation. *Endangered Species Research*, 16: 183-198.

Mayr, E. (1942) *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press. New York.

Morman, R.H. (1987). Relationship of density to growth and metamorphosis of caged larval sea lampreys, *Petromyzon marinus* Linnaeus, in Michigan streams. *Journal of Fish Biology*, 30, 173–181.

Neville, H.M., Isaak, D.J., Dunham, B., Thurow, F. & Rieman, B.E. (2006) Fine-scale natal homing and localized movement as shaped by sex and spawning habitat in Chinook salmon: insights from special autocorrelations analysis of individual genotypes. *Molecular Ecology*, 15: 4589–4602.

Nichols, O.C. & Hamilton, P.K. (2004) Occurrence of the parasitic sea lamprey, *Petromyzon marinus*, on western North Atlantic right whales, *Eubalaena glacialis*. *Environmental Biology of Fishes*, 71: 413–417.

Nichols, O.C. & Tscherter, U.T. (2011) Feeding of sea lampreys *Petromyzon Marinus* on minke whales *Balaenoptera acutorostrata* in the St Lawrence Estuary, Canada. *Journal of Fish Biology*, 78: 338–343.

Olsen, J.B., Wuttig, K., Fleming, D., Kretschmer, E.J. & Wenburg, J.K. (2006) Evidence of partial anadromy and resident-form dispersal bias on a fine scale in populations of *Oncorhynchus mykiss*. *Conservation Genetics*, 7: 613-619.

Pais, J., Cunha, P.P., Pereira, D., Legoinha, P., Dias, R., Moura, D., Silveira, A.B., Kullberg, J.C. & González-Delgado, J.A. (2012). *The Paleogene and Neogene of Western*

Iberia (Portugal). A Cenozoic Record in the European Atlantic Domain. Springer, Heidelberg.

Palsbøll, P.J., Bérubé, M. & Allendorf, F.W. (2006) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(1): 11-16.

Perdices, A. & Doadrio, I. (2000) Diversification patterns in *Cobitis calderoni* (Osteichthyes: Cobitidae) and relationships with some *Cobitis* lineages. *Folia Zoologica*, 49(1): 45-54.

Perea, S., Garzón, P., González, J.L., Almada, V.C., Pereira, A. & Doadrio, I. (2011) New distribution data on Spanish autochthonous species of freshwater fish. *Graellsia*, 67(1): 91-102.

Pereira, A.M., Robalo, J.I., Freyhof, J., Maia, C., Fonseca, J.P., Valente, A. & Almada, V.C. (2010) Phylogeographical analysis reveals multiple conservation units in brook lampreys of Portuguese streams. *Journal of Fish Biology*, 77: 361–371.

Pimentel, N.L. & Azevedo, T.M. (1994) Etapas e controlo alpina da sedimentação na bacia do Sado (SW de Portugal). *Cadurno del Laboratório Xeolóxico de Laxe*, 19: 229-238.

Potter, I.C. (1980) The Petromyzoniformes with particular reference to paired species. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1595–1615.

Quintella, B.R., Andrade, N.O. & Almeida, P.R. (2003) Distribution, larval stage duration and growth of the Sea Lamprey ammocoetes, *Petromyzon marinus* L., in a highly modified river basin. *Ecology of Freshwater Fish*, 12: 286–293.

Quintella, B.R., Andrade, N.O., Dias, M.N., & Almeida, P.R. (2007) Laboratory assessment of sea lamprey larvae burrowing performance. *Ecology of Freshwater Fishes*, 16: 177-182.

Quintella, B.R., Andrade, N.O., Koed, A. & Almeida, P.R. (2004) Behavioural patterns of Sea Lampreys' spawning migration through difficult passage areas, studied by electromyogram telemetry. *Journal of Fish Biology*, 65: 961–972.

Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) Tracer v1.4. Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

- Renaud, C.B. (2011) *Lampreys of the world. An annotated and illustrated catalogue of lamprey species known to date*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 5.FAO, Rome.
- Renaud, C.B., Gill, H. S. & Potter, I.C. (2009) Relationships between the diets and characteristics of the dentition, buccal glands and velar tentacles of the adults of the parasitic species of lamprey. *Journal of Zoology*, 278: 231–242.
- Robalo, J.I., Almada, V.C., Levy, A. & Doadrio, I. (2007) Re-examination and phylogeny of the genus *Chondrostoma* based on mitochondrial and nuclear data and the definition of 5 new genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 362-372.
- Rodrigues, A. & Dias, J.M.A. (1989) Evolução pós-glaciária da plataforma continental portuguesa a norte do cabo Mondego. *Anais do Instituto Hidrográfico*, 10: 39-50.
- Rodríguez-Muñoz, R., Nicieza, A.G. & Braña, F. (2001) Effects of temperature on developmental performance, survival and growth of sea lamprey embryos. *Journal of Fish Biology*, 58: 475–486.
- Rodríguez-Muñoz, R., Waldman, J.R., Grundwald, C., Roy, N.K. & Wirgin, I. (2004) Absence of shared haplotypes between sea lamprey from North American and Spanish rivers. *Journal of Fish Biology*, 64: 783-787.
- Rogers, A.R. (1995) Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49: 608–615.
- Sæmundsson, B. (1926) Fiskarnir (in Icelandic). Bókaverslun Sigfúsar Eymundssonar, Reykjavík.
- Salicru, M., Menendez, M.L., Morales, D. & Pardo, L. (1993) Asymptotic distribution of (h, ϕ) -entropies. *Communications in Statistics - Theory & Methods*, 22: 2015-2031.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sansom, R.S., Gabbott, S.E. & Purnell, M. A. (2010) Decay of vertebrate characters in hagfish and lamprey (Cyclostomata) and the implications for the vertebrate fossil record. *Proceedings of the Royal Society B*, 278(1709): 1150-1157.

Schluter, D. (2009) Evidence for Ecological Speciation and Its Alternative. *Science*, 323(6): 737–740.

Schneider, C.P., Owens, R.W., Bergstedt, R.A. & O’Gorman, R. (1996) Predation by sea lamprey (*Petromyzon marinus*) on lake trout (*Salvelinus namaycush*) in southern Lake Ontario, 1982–1992. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 1921–1932.

Schreiber, A. & Engelhorn, R. (1998) Population genetics of a cyclostome species pair, river lamprey (*Lampetra fluviatilis* L.) and brook lamprey (*Lampetra planeri* Bloch). *Journal of Zoological Systematic and Evolution*, 36: 85-99.

Siefkes, M.J., Winterstein, S.R. & Li, W. (2005) Evidence That 3-keto petromyzonol sulphate specifically attracts ovulating female sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Animal Behaviour*, 70: 1037–1045.

Simões, M. (2003) On the hydrogeology of the Lower Tagus Basin and its Cenozoic geologic evolution. *Ciências da Terra* (UNL), 15: 239-248.

Sower, S.A., Freamat, M. & Kavanaugh, S.I. (2009) Insight from lamprey genomics: brain and pituitary reproductive hormones of lampreys. *American Fisheries Society Symposium*, 72: 57-70.

StatSoft, I. (2003) STATISTICA (data analysis software system), Version 6. Available from: <www.statsoft.com/>.

Swofford, D.L. (2003) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4b.10. Sinauer Associates, Massachusetts.

Tajima, F. (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437–460.

Takezaki, N., Figueroa, F., Zaleska-Rutczynska, Z. & Klein, J. (2003) Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 287–292.

Taverny, C., Lassalle, G., Ortusi, I., Roqueplo, C., Lepage, M. & Lambert, P. (2012) From shallow to deep waters: habitats used by larval lampreys (Genus *Petromyzon* and *Lampetra*) over a Western European basin. *Ecology of Freshwater Fish*, 21: 87–99.

Taylor, E.B. (1999) Species pairs of north temperate freshwater fishes: Evolution, taxonomy and conservation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 299-324.

Taylor, E.B., Boughman, J.W., Groenenboom, M., Sniatynski, M., Schluter, D. & Gow, J.L. (2006) Speciation in reverse: morphological and genetic evidence of the collapse of a three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) species pair. *Molecular Ecology*, 15: 343–355.

Thiel, R., Winkler, H.M., Riel, P., Neumann, R., Grohsler, T., Bottcher, U., Spratte, S. & Hartmann, U. (2009) Endangered anadromous lampreys in the southern Baltic Sea: spatial distribution, long-term trend, population status. *Endangered species Research*, 8: 233-247.

Thomas, J.D. (1962) The food and growth of brown trout (*Salmo trutta* L.) and its feeding relationship with the salmon parr (*Salmo salar* L.) and the eel (*Anguilla anguilla* L.) in the river Teify, West Wales. *Journal of Animal Ecology*, 31: 175–205.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876–4882.

Vladykov, V.D. & Kott, E. (1979) Satellite species among the holarctic lampreys (Petromyzonidae). *Canadian Journal of Zoology*, 57: 860–867.

Vrieze, L.A., Bergstedt, R.A. & Sorensen, P.W. (2011) Olfactory-mediated stream-finding behavior of migratory adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68: 523–533.

Waldman, J.R., Grunwald, C. & Wirgin, I. (2006) Evaluation of the native status of sea lampreys in lake Champlain based on mitochondrial DNA sequencing analysis. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135: 1076–1085.

Waples, R.S. (1991) Pacific Salmon, *Oncorhynchus* Spp., and the definition of ‘species’ under the endangered species act. *Marine Fisheries Review*, 53(3): 11–22.

Watterson, G. (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7: 256–276.

- White, M.M. & Martin, H.R. (2009) Structure and conservation of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of the least brook lamprey (*Lampetra aepyptera*). *Journal of Molecular Evolution*, 68: 715–723.
- Yaghoubian, S., Filosa, M.F. & Youson, J.H. (2001) Proteins immunoreactive with antibody against a human leptin fragment are found in serum and tissues of the sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 129: 777-785.
- Yamazaki, Y. & Goto, A. (1998) Genetic structure and differentiation of four *Lethenteron* taxa from the far east, deduced from allozyme analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 52: 149–161.
- Yamazaki, Y., Yokoyama, R., Nishida, M. & Goto, A. (2006) Taxonomy and molecular phylogeny of *Lethenteron* lampreys in Eastern Eurasia. *Journal of Fish Biology*, 68: 251–269.
- Youson, J.H., Holmes, J.A., Guchardi, J.A., Seelye, J.G., Beaver, R.E., Gersmehl, J.E., Sower, S.A. & Beamish, F.W.H. (1993) Importance of condition factor and the influence of water temperature and photoperiod on metamorphosis of sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50: 2448–2456.
- Youson, J.H. & Manzon, R.G. (2012) Lamprey Metamorphosis. In: Doufour, S., Rousseau, K. & Kapoor, B. G. (Eds.) *Metamorphosis in Fish*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp. 12-75.
- Yu, J.K., Meulemans, D., McKeown, S.J. and Bronner-Fraser, M. (2008) Insights from the amphioxus genome on the origin of vertebrate neural crest. *Genome Research*, 18: 1127-1132.
- Yun, S.-S. (2012) Comparative studies of bile acid release in the mature male lampreys. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 15(1): 63-67.
- Zanandrea, G. (1959) Speciation among lampreys. *Nature*, 184: 380.