

## 20 AÑOS DE ESTUDIOS GENÉTICOS SOBRE EL CANGREJO DE RÍO EN ESPAÑA: ¿QUÉ HEMOS APRENDIDO?

20 YEARS OF GENETIC STUDIES ON THE WHITE-CLAWED CRAYFISH IN SPAIN: WHAT HAVE WE LEARNT?

Beatriz Matallanas

Esther Lantero

Carmen Callejas

M.<sup>a</sup> Dolores Ochando

*Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid*

*dochando@bio.ucm.es*

### Resumen

*En este artículo se realiza una revisión de los trabajos genéticos en las poblaciones españolas del cangrejo de río del género *Austropotamobius*, popularmente conocido como cangrejo común. Las poblaciones de esta especie, autóctona en Europa, han sufrido una drástica regresión. Por ello está protegida y se están desarrollando planes para su conservación. Los datos genéticos muestran que las poblaciones españolas deberían considerarse como una unidad genética, independiente de las ya propuestas en el resto de Europa, compuesta por dos unidades de gestión, los grupos genéticos Norte y Centro. Si queremos que los planes de conservación sean eficaces, es crucial incluir esta información genética.*

**Palabras clave:** Cangrejo de río; Marcadores moleculares; Variabilidad genética; Estructura genética; Planes de recuperación; Conservación genética.

### Summary

*This paper is a review about the genetic studies on Spanish populations of the crayfish of genus *Austropotamobius*. The populations of this species, native to Europe, have undergone a drastic decline. Therefore, the species is now protected and plans are developed for its conservation. Genetic data show that Spanish stocks should be considered as a genetic unit independent from those already proposed in the rest of Europe. This unit comprises two management units, the genetic groups Northern and Central. Genetic information must be included in long-term conservation planning if efforts are to be effective.*

**Keywords:** Crayfish; Molecular markers; Genetic variability; Genetic structure; Conservation plans; Genetic conservation.

## Situación actual

Los ecosistemas de agua dulce representan el 0,8% de la superficie terrestre. Su naturaleza fragmentada favorece la especiación y se estima que albergan casi el 6% de todas las especies descritas. Pero, por múltiples factores, estos ecosistemas se encuentran en grave riesgo de deterioro, e incluso, de destrucción (Owen *et al.*, 2015).

España es el país de la Unión Europea con mayor biodiversidad. Su orografía y peculiaridades climáticas, junto con sus características biogeográficas, favorecen la aparición de endemismos dulceacuícolas. Los ecosistemas de agua dulce españoles están sufriendo grandes modificaciones debido al cambio climático (algunas regiones mediterráneas tienen un 20% menos de precipitaciones que hace un siglo), la degradación medioambiental, la fragmentación del hábitat, el aumento de la demanda de agua por parte del hombre y otras actividades humanas. Por ello, las regiones áridas y semiáridas se han incrementado notablemente, provocando a su vez cambios en la biodiversidad de dichos ecosistemas.

En la Península Ibérica hasta la segunda mitad del siglo XX el único astácido presente en nuestros ríos era el cangrejo de río del género *Austropotamobius*. Esta especie, otrora muy abundante en los cauces ibéricos, está seriamente amenazada de extinción pues su distribución y abundancia ha ido descendiendo de forma drástica desde las últimas décadas del siglo XX (Alonso *et al.*, 2000).

Originalmente, los cangrejos estaban presentes en casi la totalidad de la España caliza hasta el sur de la provincia de Granada, límite meridional de la distribución mundial de la especie. Sólo estaban ausentes en Extremadura, Almería, Islas Canarias y Baleares. En la última ficha de la especie en España se reconoce que su presencia es muy dudosa en las Comunidades de Extremadura, Madrid y Murcia y está ausente en Baleares. Además, en otras Comunidades como Castilla y León sus poblaciones están en clara recesión (Alonso *et al.*, 2012). En las provincias donde se mantiene, las poblaciones se localizan en las cabeceras de cuenca, normalmente desconectadas del resto de la red fluvial, bien por zonas que quedan secas o bien por diferentes barreras físicas, ocupando tramos pequeños, que no superan el kilómetro, o en charcas naturales o seminaturales.

El último informe sobre su distribución y abundancia (Alonso, 2012) señala que la especie parece estar recuperándose ligeramente gracias a las reintroducciones realizadas por las Administraciones, con ejemplares que proceden de otras poblaciones naturales o de astacifactorías (centros de cría en cautividad para este fin). Estas actuaciones compensan, en parte, las poblaciones que se pierden por la introducción de especies exóticas, las enfermedades y las condiciones climáticas. A pesar de todo, estas actuaciones no consiguen aumentar el rango de distribución del cangrejo de río, es decir, no ha vuelto a establecerse en aquellas regiones donde desapareció.

## ¿Debemos conservar esta especie?

El cangrejo de río constituye un elemento clave en los ecosistemas de agua dulce donde habita, jugando un importante papel en de la cadena trófica. Por un lado, es presa de

numerosas especies y por otro, es predador de macroinvertebrados acuáticos, animales muertos, larvas y materia vegetal viva o en descomposición. Contribuye así a eliminar la materia orgánica de los ríos haciendo que la columna de agua se vuelva cada vez más oligotrófica y que el fondo se vaya enriqueciendo en oxígeno, ayudando a mantener la salud de los sistemas dulceacuícolas (Lindqvist, 1988; Moñino *et al.*, 2003). Son además un indicador natural de la polución de los medios acuáticos y la preservación de estos ecosistemas, puesto que acumulan en sus tejidos metales pesados (Schilderman *et al.*, 1999).

Esta especie ha sido emblema de nuestra fauna y al mismo tiempo, un pilar básico en la tradición cultural, deportiva y gastronómica de muchas regiones españolas. En numerosas zonas los cangrejos eran objeto de pesca comercial, existiendo incluso cooperativas de pescadores profesionales, y suponían importantes ingresos para los pescadores y las Administraciones que concedían licencias para la misma (Pardo, 1950-1951; Torre y Rodríguez, 1964).

Por su importante papel ecológico y su rápida desaparición, el cangrejo de río se ha incluido en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza en la categoría *en peligro* (Füreder *et al.*, 2010) y está protegido en todos los países en los que habita (IUCN 2004, VU B2bce+3bcd).

El Anexo V de la Directiva europea 92/43/CEE regula la protección de Hábitats Naturales y Seminaturales y Fauna y Flora Silvestres, en referencia a aquellas especies cuya recogida y explotación pueden ser objeto de medidas de gestión. España, como país miembro de la Unión Europea, debe cumplir dicha normativa.

Igualmente el cangrejo de río aparece como *vulnerable* en nuestro Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (BOE nº 149 del 23 de junio de 2003). Sin embargo, la legislación española es compleja a este respecto, incluyendo leyes de conservación de la naturaleza, pesca continental y comercio de especies silvestres tanto en el ámbito nacional como en el autonómico. Algunas Comunidades Autónomas han publicado sus propias actuaciones relativas a la conservación de la naturaleza y pesca interior como Aragón, La Rioja y Navarra, donde hay vigente un Plan de Recuperación de la especie (Alonso, 2012). En aquellas Comunidades en las que no se ha legislado específicamente sobre esta especie, se aplican las regulaciones nacionales.

Los planes de recuperación son programas de restauración activa de las poblaciones basados en la translocación de individuos desde otras poblaciones naturales o de cautividad. Por tanto, están limitados por el número y tamaño de las poblaciones 'donantes' existentes. Tienen en cuenta varios factores como el riesgo de transmisión de enfermedades, las características de los cuerpos de agua que se pretenden repoblar o la distribución de especies exóticas en esas áreas (Alonso *et al.*, 2000; Diéguez-Urbeondo *et al.*, 1997). Sin embargo hasta hoy, la información genética no se ha considerado un objetivo prioritario de esos programas, cuando debería serlo, ya que variabilidad genética es la base de la viabilidad y evolución de las poblaciones (Awise, 2000; Moritz *et al.*, 2002).

Con todo ello, cara a una adecuada gestión de la conservación del cangrejo de río, dada su importancia ecológica y social, se ha profundizado en la caracterización de las

poblaciones peninsulares de *Austropotamobius* desde un abordaje científico que incluye datos genéticos. Los resultados publicados por otros autores y por nuestro propio grupo (Tabla 1) resumidos en este artículo, resultan ser de gran utilidad para la legislación y protección de la especie.

Autor (año)	Marcador genético	Nº pobl.	Nº indiv.	V. genética	V. interpobl.	Estr. genética
Zarazaga (1993)	Isoenzimas	-	-	Sí (↓↓)	-	N/A
Santucci <i>et al.</i> (1997)	Isoenzimas	2	75	Sí (↓)	Sí (↓)	N/A
Grandjean <i>et al.</i> (1997)	RFLP	1	15	No	-	N/A
Grandjean <i>et al.</i> (2001)	RFLP	14	154	No	-	No
Grandjean <i>et al.</i> (2002)	16S	2	2	Sí (↓↓)	Sí (↓↓)	N/A
Trontelj <i>et al.</i> (2005)	COI	7	7	Sí (↓↓)	Sí (↓↓)	N/A
Beroiz <i>et al.</i> (2008)	RAPD	11	275	Sí (↓)	Sí (↓)	Indicios
Diéguez-Urbeondo <i>et al.</i> (2008)	COI	29	229	Sí (↓)	Sí (↓)	Sí
Pedraza-Lara <i>et al.</i> (2010)	COI + 16S	53	204	Sí (↑)	Sí (↑)	Sí
Matallanas <i>et al.</i> (2013)	SSR	20	300	Sí (↑)	Sí (↑)	Sí (clara)
Matallanas <i>et al.</i> (2016)	COI + 16S	25	250	Sí (↑↑)	Sí (↑↑)	Sí (clara)

**Tabla 1.** Resumen de los estudios científicos realizados en las poblaciones españolas de cangrejo de río ordenados cronológicamente. Nº pobl.: número de poblaciones analizadas; Nº indiv.: número de individuos estudiados; V. genética: variabilidad genética; V. interpobl.: variabilidad genética interpoblacional; Estr. Genética: estructura genética.

### Primeros estudios genéticos (de finales del s. XX a principios del s. XXI)

Los primeros trabajos realizados para tratar de conocer la variabilidad genética subyacente en las poblaciones españolas del cangrejo de río se basaron en el estudio de caracteres morfológicos (toman como base la forma de los organismos) y merísticos (aquellos que se pueden contar, como el número de antenas o patas). Pero, muchas veces, el análisis de estos caracteres no es suficiente para distinguir poblaciones de una misma especie, especialmente en la especie que nos ocupa, ya que aparentemente carece de caracteres clave que permitan estudiarla a este nivel y caracterizarla (Souty-Grosset y Reynolds, 2009).

Donde los datos morfológicos han resultado ser inconclusos, los marcadores genéticos pueden proporcionar indicadores precisos e inequívocos (Wilson *et al.*, 1985). Por ello, las herramientas moleculares han cobrado gran importancia entre los biólogos, y en particular, entre aquellos que estudian decápodos (Martin *et al.*, 2009). Gracias a estas herramientas se han podido identificar especies crípticas (aquellas que no se pueden distinguir morfológicamente) y/o de morfotipo variable (Puillandre *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2010).

Desde hace años se ha venido desarrollando una amplia variedad de métodos moleculares para examinar los niveles de variabilidad genética en las poblaciones de todo tipo de organismos. Revisando los trabajos publicados, se observa que el cangrejo de río se ha ido analizando con las técnicas más ‘modernas’ del momento, dado el interés que despierta en la comunidad científica de España y del resto de Europa.

La primera técnica empleada para conocer su diversidad fue la electroforesis de proteínas isoenzimáticas (‘diferentes formas moleculares de enzimas con la misma especificidad de sustrato’). Mediante esta técnica se mostró que la variabilidad genética de las poblaciones españolas era baja (heterocigosis = 0,12; Zarazaga, 1993) y aun así, en otro estudio se descubrió que estaba entre los valores más altos del rango descrito en las demás poblaciones europeas presentando además variantes genéticas o alelos exclusivas (heterocigosis: España = 0,04; Francia = 0,003; Italia = 0,03; Eslovenia = 0,03; Croacia = 0,02; Reino Unido = 0; Santucci *et al.*, 1997).

El análisis molecular de isoenzimas es un método relativamente económico, sencillo y rápido desde el punto de vista técnico, pero como cualquier técnica no está exenta de inconvenientes. Por ejemplo, el número de sistemas enzimáticos a estudiar es limitado, lo que disminuye su capacidad de discriminación, y sólo se detecta una parte de la variación genética total.

El desarrollo posterior de técnicas basadas en el análisis del ADN permitió superar los inconvenientes que limitaban la utilidad de la técnica de electroforesis proteica.

Una de estas técnicas son los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), fundamentada en la digestión del ADN de un organismo con enzimas de restricción y la posterior separación electroforética de los fragmentos resultantes (Figura 1). En contra de lo reflejado en los estudios de isoenzimas, los primeros trabajos que analizaron poblaciones españolas con RFLP concluyeron que éstas no presentaban variación genética ni inter ni intrapoblacional, es decir, ni entre, ni dentro de las poblaciones analizadas (diversidad haplotípica = 0; diversidad nucleotídica = 0, Grandjean *et al.*, 1997, 2001).

En 1986 surge una nueva metodología, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Mullis *et al.*, 1986), que supone una auténtica revolución en la biología molecular. Su éxito radica en la amplificación de fragmentos específicos partiendo de pequeñas cantidades de un ADN molde. Esta técnica se ha combinado con otras, como la secuenciación del ADN ya que el análisis más fino de la estructura del ADN consiste en la determinación de su secuencia. El procedimiento más utilizado para su determinación, hasta hace pocos años, ha sido el método automático de Sanger que ha dominado la producción científica durante casi dos décadas, obteniéndose un número monumental de logros.

Tratando de conocer la variabilidad genética de las poblaciones europeas de cangrejo de río ambas técnicas, PCR de un determinado fragmento de ADN y su posterior secuenciación, se han empleado con gran profusión para analizar su ADN mitocondrial (ADNmt). Entre las razones del empleo del ADNmt destaca su tasa de mutación, más apropiada, en general, que la del ADN nuclear para estudios filogenéticos. Además, la

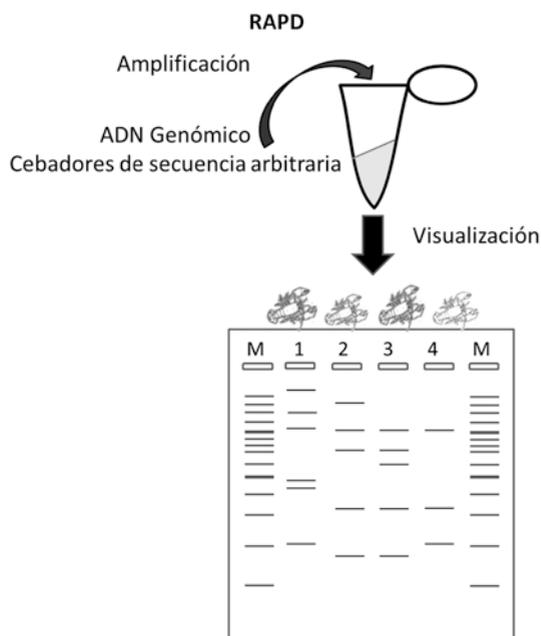


## Últimos estudios genéticos (desde el 2008 hasta hoy)

Tuvimos que esperar hasta el año 2008 para tener una imagen más realista de la diversidad de nuestros cangrejos de río. En ese año se publicaron dos estudios genéticos que revelaron la existencia de variabilidad genética y una cierta estructuración de sus poblaciones.

En primer lugar, en el trabajo de Beroiz y colaboradores (2008) se analizó un mayor número de ejemplares y poblaciones españolas que en estudios anteriores empleando la técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* o ADN polimórfico amplificado al azar) (Figura 2). El único trabajo que empleó esta técnica en poblaciones españolas de cangrejo de río evidenció que éstas presentaban más variabilidad genética superior que la detectada con las técnicas anteriores y cierta diferenciación geográfica. Estos resultados aportaron la primera evidencia genética directa de que las poblaciones de cangrejo de río españolas no eran genéticamente uniformes, y por tanto, podíamos albergar cierta esperanza frente al reto de su conservación (Beroiz *et al.*, 2006, 2008).

En 2008 también se publicó otro trabajo que analizaba una región más variable del gen COI en una muestra ligeramente mayor a investigaciones previas con este marcador. No obstante la mayoría de ellas pertenecía a un área reducida (Álava, Burgos, Cantabria, La Rioja y Navarra) (Diéguez-Urbeondo *et al.*, 2008). Los autores encontraron dos variantes genéticas con un patrón de distribución geográfico, una de ellas localizada principalmente en los ejemplares del norte del país (en las regiones mencionadas) y la otra en Granada y Teruel; además en algunas poblaciones de la cuenca del Ebro detectaron las dos, por lo que se podía considerar como una zona de contacto.

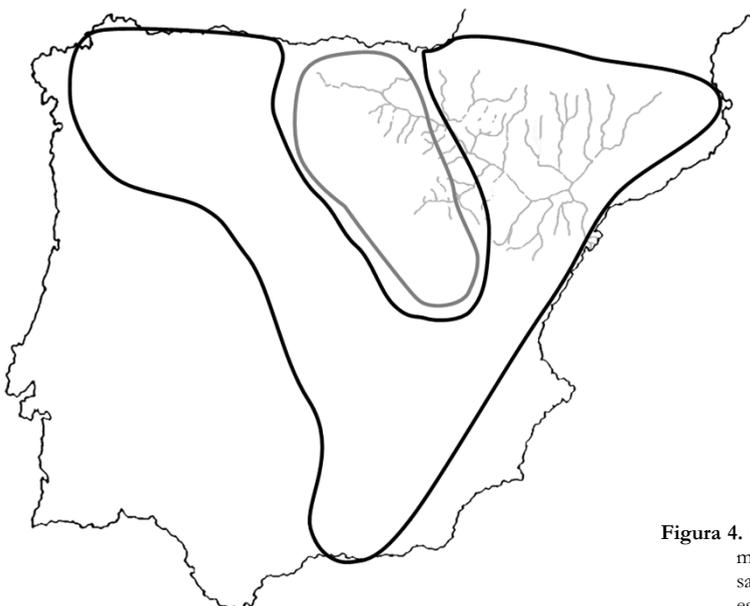


**Figura 2.** Los RAPD son una técnica desarrollada a partir de la PCR en la que se emplean cebadores de pequeño tamaño de secuencia arbitraria, generalmente 10 nucleótidos. Estos fragmentos se unen a distintas regiones del ADN problema por lo que se obtienen multitud de fragmentos amplificados con cada cebador. La variabilidad genética origina distintos patrones en los individuos estudiados. En la representación del gel de agarosa pueden verse cuatro de estos patrones. En la primera y la última calle se muestra un marcador de peso molecular.

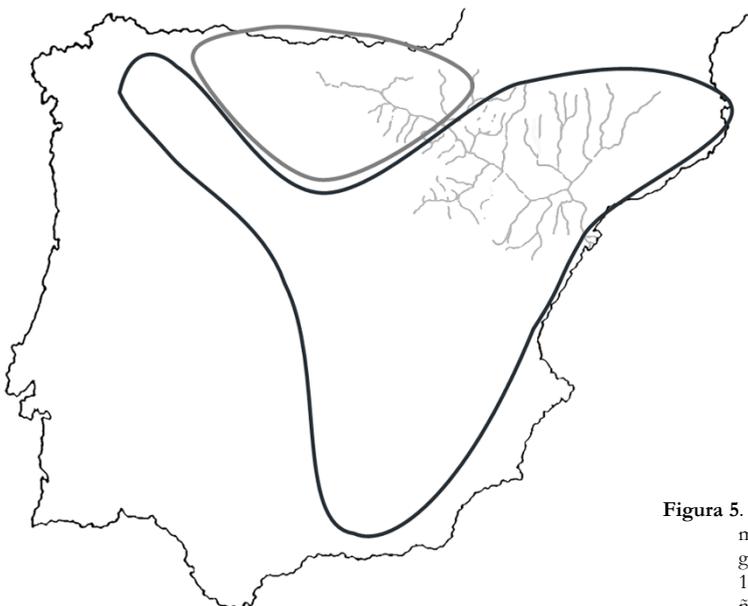


En 2013 nuestro grupo realizó el primer trabajo de envergadura que analizaba el genoma nuclear en poblaciones españolas de cangrejos mediante microsatélites o repeticiones de secuencias simples (SSR) (Figura 3). Los SSR se distribuyen por todo el genoma nuclear y no están sometidos a selección (Pascual *et al.*, 2001). Además poseen una alta tasa de mutación (Primmer *et al.*, 1996) y elevados niveles de variación, incluso en poblaciones pequeñas de especies en peligro (Allendorf y Luikart, 2007), como el cangrejo de río. El análisis con microsatélites de casi 350 cangrejos de 23 poblaciones españolas reveló una imagen muy informativa (Matallanas *et al.*, 2013). En primer lugar se detectó una mayor variabilidad genética que la previamente descrita con otros marcadores nucleares (heterocigosis = 0,19), a pesar del declive poblacional que la especie ha experimentado en España en las últimas décadas. El nivel de variabilidad genética y la presencia de alelos exclusivos (variantes genéticas no presentes en las demás poblaciones) en algunas de las poblaciones analizadas indicaban que, o bien derivan de poblaciones grandes y consolidadas, o que estaban recobrando la variación genética gracias a los planes de recuperación puestos en marcha.

En segundo lugar, los resultados obtenidos revelaron que la variabilidad genética encontrada no se distribuía homogéneamente a lo largo de la Península Ibérica sino que existían dos grupos genéticos. El primero de ellos englobaba a las poblaciones del norte peninsular (Burgos, Navarra, y Álava) junto con dos muestras del centro de España (en Cuenca y Guadalajara), mientras que el resto de los ejemplares analizados pertenecían al segundo grupo genético (Figura 4).



**Figura 4.** Grupos genéticos detectados mediante el estudio de microsatélites en las poblaciones españolas de cangrejo de río.



**Figura 5.** Grupos genéticos detectados mediante el estudio de dos genes mitocondriales, COI y 16S, en las poblaciones españolas de cangrejo de río.

Recientemente hemos publicado un trabajo en el que analizamos fragmentos muy largos de los genes mitocondriales COI y 16S en 240 cangrejos de 24 poblaciones de todo el rango de distribución de la especie en España (Matallanas *et al.*, 2016), las mismas muestras que analizamos con microsatélites (Matallanas *et al.*, 2013). Gracias al esfuerzo de muestreo y a la mayor longitud de las secuencias estudiadas se evidenciaron unos niveles de variabilidad genética de la especie en España similares a los presentes en otras poblaciones europeas analizadas con estos genes (diversidad haplotípica = 0,797; diversidad nucleotídica = 0,0007). Analizando el gen COI, el más variable de los dos marcadores utilizados en este trabajo, se encontraron 13 moléculas diferentes de ADN o haplotipos. Además, tras estudiar la secuencia del fragmento 16S, se detectó por primera vez diversidad genética en las poblaciones españolas con este marcador, en concreto 8 haplotipos.

Los análisis realizados muestran que existe un marcado patrón de distribución de la variabilidad genética presente en las poblaciones españolas de cangrejo de río, fundamentalmente por la localización geográfica de las variantes genéticas más frecuentes; confirmando los resultados obtenidos con los marcadores nucleares SSR. En España se pueden distinguir dos grandes grupos genéticos (Figura 5). El primero de ellos, el denominado grupo *Norte* engloba a las poblaciones de Asturias, Burgos, León, Navarra y Álava; mientras que el segundo grupo, el grupo *Centro*, reúne a las poblaciones del resto del país. Además, es posible apreciar subestructura, dentro del grupo *Norte* se diferencian las poblaciones situadas en las inmediaciones de la Cordillera Cantábrica de las cercanas a los Montes Vascos, con la población de León en una posición intermedia ya que posee

características genéticas de ambas áreas. En el grupo *Centro* esta subestructura es más tenue aunque es posible diferenciar las poblaciones de la cuenca del Ebro de aquellas que habitan el resto de los cursos de agua. Este trabajo confirmó que la cuenca del Ebro es una zona de contacto entre los grupos genéticos *Norte* y *Centro* (Matallanas *et al.*, 2016).

Los patrones de distribución geográficos de la variabilidad genética constituyen un aspecto fundamental para la gestión de las poblaciones de organismos catalogados como especies *vulnerables*; especialmente en poblaciones reducidas y aisladas como las del cangrejo de río que corren un mayor riesgo de extinción. Asimismo, los niveles de variabilidad genética y sus patrones de distribución apoyan que esta especie lleva largo tiempo establecida en España.

En conjunto, la información proporcionada por los últimos trabajos mencionados ofrece una visión más amplia y precisa de la estructura genética de esta especie en nuestro país y por consiguiente, sirve de apoyo a los gestores de esta especie.

## Resumen

El cangrejo de río es una especie clave en la regulación de los ecosistemas en los que habita. En España era, hasta hace pocas décadas, una especie emblemática que proporcionaba, además, grandes beneficios económicos y socioculturales. Los trabajos genéticos realizados en las poblaciones españolas de cangrejo de río, y especialmente los más recientes que hemos comentado, ponen de manifiesto que es arriesgado extraer conclusiones acerca de esta especie en España a partir de un número reducido de muestras pertenecientes a regiones geográficas próximas. Quizá por ello los primeros trabajos científicos, donde el muestreo tanto en número de poblaciones como de individuos por población fue reducido y el marcador genético resultó no ser el más adecuado, no revelaron variación genética en las poblaciones españolas de cangrejo de río.

Conforme se ha aumentado el número de poblaciones analizadas en todo el país, y de ejemplares por población, se ha observado que la especie presenta un cierto nivel de variabilidad genética en España, en ocasiones comparable al que presentan otras poblaciones europeas de *Austropotamobius*. De hecho, en los últimos trabajos publicados se han detectado trece variantes de ADN en el marcador mitocondrial COI y ocho variantes en el marcador 16S. La diversidad haplotípica mitocondrial de la especie en España es de 0,77 y la diversidad nucleotídica 0,0007, mientras que la heterocigosis nuclear ronda el 0,2. Además existe una clara diferenciación de los cangrejos españoles en función de su procedencia, identificando, a partir de ADN mitocondrial y nuclear, dos grupos genéticos denominados '*Norte*' y '*Centro*'.

La información genética descubierta debe incluirse en los planes de recuperación de esta especie para que los esfuerzos realizados sean eficaces. El conocimiento de los niveles y patrones de variabilidad genética que albergan las poblaciones de cangrejo de río es un aspecto esencial para este fin, ya que la pérdida de variabilidad genética y la endogamia, inevitable en poblaciones pequeñas, hace que las poblaciones naturales tengan un mayor riesgo de extinción.

Los resultados de los últimos trabajos científicos muestran que las poblaciones de cangrejo de río de España deberían considerarse como una unidad genética singular, independiente de las ya propuestas en el resto de Europa tal y como se ha propuesto en varios estudios. A su vez esta unidad de conservación estaría compuesta por dos unidades de gestión correspondientes a los grupos genéticos definidos como *Norte* y *Centro*, cuya estructura genética, además, no es homogénea ya que las poblaciones de los Montes Vascos se pueden distinguir de las de la Cordillera Cantábrica en el grupo *Norte* y las poblaciones de la cuenca del Ebro de las restantes en el grupo *Centro*.

En definitiva, el cangrejo de río, nuestro único cangrejo de agua dulce, con una función fundamental en nuestros ecosistemas y en grave declive, debe ser conservado. Para ello es indispensable incluir información genética en los planes de recuperación como garantía de su futuro en nuestras aguas epicontinentales.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALLENDDORF, F. W. Y LUIKART, G. H. (2007): *Conservation and the Genetics of Populations*, Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts.
- ALONSO, F. (2012): *Austropotamobius pallipes*. En: VV.AA., Bases ecológicas preliminares para la conservación de las especies de interés comunitario en España: Invertebrados, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid.
- ALONSO, F.; TEMIÑO, C.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. (2000): “Status of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858), in Spain distribution and legislation”, *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture*, 356, pp. 31-54.
- AVISE, J. C. (2000): *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Massachusetts, USA, Harvard University Press.
- AVISE, J. C. (2004): *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* (2ª Edición), Sinauer, Sunderland, MA.
- BEROIZ, B.; CALLEJAS, C.; ALONSO, F.; OCHANDO, M.<sup>a</sup> D. (2006): “Tiempo para la esperanza: salvemos al cangrejo de río autóctono”, Servicio NotiWEB de madri+d, <http://www.madrimasd.org/informacionIDI/noticias>.
- BEROIZ, B.; CALLEJAS, C.; ALONSO, F.; OCHANDO, M.<sup>a</sup> D. (2008): “Genetic structure of Spanish white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) populations as determined by RAPD analysis: reasons for optimism”, *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18, pp. 190-201.
- DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.; RUEDA, A.; CASTIEN, E.; BASCONES, J. C. (1997b): “A plan of restoration in Navarra for the native freshwater crayfish species of Spain, *Austropotamobius pallipes*”, *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture*, 347, pp. 625-637.
- FÜREDER, L.; GHERARDI, F.; HOLDICH, D.; REYNOLDS, J.; SIBLEY, P.; SOUTY-GROSSET, C. (2010): *Austropotamobius pallipes*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species, Version 2010.4. <http://www.iucnredlist.org/details/2430/0> [consulta: 14 marzo 2016].
- GERBER, A.S.; LOGGINS, R.; KUMAR, S.; DOWLING, T. E. (2001): “Does non-neutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genome?”, *Annual Review of Genetics*, 35, pp. 539-566.

- GRANDJEAN, F.; FRELON-RAIMOND, M.; SOUTY-GROSSET, C. (2002): "Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius*: one species or several?", *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture*, 367, pp. 671-680.
- GRANDJEAN, F.; GOUIN, N.; SOUTY-GROSSET, C.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. (2001): "Drastic bottlenecks in the endangered crayfish species, *Austropotamobius pallipes* in Spain with inference to its colonization history", *Heredity*, 88, pp. 1-8.
- GRANDJEAN, F.; SOUTY-GROSSET, C.; RAIMOND, R.; HOLDICH, D. M. (1997): "Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*", *Freshwater Biology*, 37, pp. 493-501.
- LINDQVIST, O. (1988): "Restoration of native European crayfish stocks", *Freshwater Crayfish*, 7, pp. 6-12.
- MARTIN, J. W.; CRANDALL, K. A.; FELDER, D. L. (2009): *Decapod crustacean phylogenetics*, Boca Raton, FL: Taylor & Francis/CRC.
- MATALLANAS, B.; OCHANDO, M.<sup>a</sup> D.; ALONSO, F.; CALLEJAS, C. (2013): "Phylogeography of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius italicus*) in Spain: inferences from microsatellite markers", *Molecular Biology Reports*, 40, pp. 5327-5338.
- MATALLANAS, B.; OCHANDO, M.<sup>a</sup> D.; ALONSO, F.; CALLEJAS, C. (2016): "Update of genetic information for the white-clawed crayfish in Spain, with new insights into its population genetics and origin", *Organisms Diversity & Evolution*, DOI 10.1007/s13127-016-0268-4.
- MOÑINO, A. V.; PERÁN, J.A.; URBANO, J.; PÉREZ, L.; MARTÍNEZ, S.; TOMÁS, A.; JOVER, M. (2003): "Características poblacionales del cangrejo de río autóctono (*Austropotamobius pallipes*) en la cuenca del río Turia en Valencia", *AquaTic*, 18, pp. 15-24.
- MORITZ, C. (2002): "Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it", *Systematic Biology*, 51, pp. 238-254.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. (1986): "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction", *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, pp. 263-273.
- OWEN, C. L.; BRACKEN-GRISSOM, H.; STERN, D.; CRANDALL, K. A. (2015): "A synthetic phylogeny of freshwater crayfish: insights for conservation", *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 370: 20140009. DOI: 10.1098/rstb.2014.0009.
- PARDO, L. (1950-1951): *Apuntes para la historia de la pesca continental española*, Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, Madrid.
- PASCUAL, M.; AQUADRO, C. F.; SOTO, V.; SERRA, L. (2001): "Microsatellite variation in colonizing and Palearctic populations of *Drosophila subobscura*", *Molecular Biology and Evolution*, 18, pp. 731-740.
- PEDRAZA-LARA, C.; ALDA, F.; CARRANZA, S.; DOADRIO, I. (2010): "Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, pp. 327-342.
- PRIMMER, C. R.; ELLEGREN, H.; SAINO, N.; MOLLER, A. P. (1996): "Directional evolution in germline microsatellite mutations", *Nature Genetics*, 13, pp. 391-393.
- PULLANDRE, N.; MODICA, M.V.; ZHANG, Y.; SIROVICH, L.; BOISSELIER, M.-C.; CRUAUD, C.; HOLFORD, M.; SAMADI, S. (2011): "Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups", *Molecular Ecology*, 21, pp. 2671-2691.
- RACH, J.; DESALLE, R.; SAKAR, I. N.; SCHIERWATER, B.; HADRYN, H. (2008): "Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata", *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275, pp. 237-247.

- SANTUCCI, F.; IACONELLI, M.; ANDREANI, P.; CIANCHI, R.; NASCETTI, G.; BULLINI, L. (1997): "Allozyme diversity of European crayfish of the genus *Austropotamobius*", *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture*, 347, pp. 663-676.
- SCHILDERSMAN, P. A. E. L.; MOONEN, E. J. C.; MAAS, L. M.; WELLE, I.; KLEINJANS, J. C. S. (1999): "Use of Crayfish in Biomonitoring Studies of Environmental Pollution of the River Meuse", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, pp. 241-525.
- SOUTY-GROSSET, C.; REYNOLDS, J. D. (2009): "Current ideas on methodological approaches in European crayfish conservation and restocking procedures", *Knowledge and management of aquatic ecosystems*, 394-395: 01. DOI: 10.1051/kmae/2009021
- TORRE, M.; RODRÍGUEZ, P. (1964): *El cangrejo de río*, Servicio Nacional de Pesca Fluvial y Caza, Ministerio de Agricultura, Madrid.
- TRONTELJ, P.; MACHINO, Y.; SKET, B. (2005): "Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, pp. 212-226.
- WILSON, A. C.; CANN, R.L.; CARR, S. M.; GEORGE, M. JR.; GYLLENSTEN, U. B.; HELMBYCHOWSKI, M.; HIGUSHI, R. G.; PALUMBI, S. R.; PRAGER, E. M.; SAGE, R. D.; STONEKING, M. (1985): "Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics", *Biological journal of the Linnean Society of London*, 26, pp. 375-400.
- XIAO, J.-H.; WANG, N.-X.; LI, Y.-W.; MURPHY, R. W.; WAN, D.-G.; NIU, L.-M.; HU, H.-Y.; FU, Y.-G.; HUANG, D.-W. (2010): "Molecular approaches to identify cryptic species and polymorphic species within a complex community of fig wasps", *PLoS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0015067.
- ZARAZAGA, M. (1993): *Estudios genéticos de poblaciones astacícolas españolas*, Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza.