

Los estudios del ADN como apoyo a la biología de la conservación de la fauna

(DNA studies as a supporting element for biology in the conservation of fauna)

Gómez-Moliner, Benjamín*; Madeira, M^a José; Elejalde, M^a Arantzazu; Cabria, M^a Teresa; Ruiz-González, Aritz; Chueca, L. Javier; Vergara, María; Razquin, Oihana
UPV/EHU. Fac. de Farmacia. Laboratorio de Zoología.
P^o de la Universidad, 7. 01006 Vitoria - Gasteiz
* benjamin.gomez@ehu.es

BIBLID [0212-7016 (2009), 54: 2; 351-386]

En este capítulo se exponen diferentes estudios en los que se utiliza la información presente en el ADN para abordar diferentes problemas de conservación de la Fauna, como son: (1) ayudar en la conservación de especies amenazadas, (2) conocer las características genéticas de las poblaciones, (3) estudiar la evolución, (4) la especiación y (5) los desplazamientos de los animales.

Palabras Clave: Biodiversidad. Conservación. Filogeografía. Dinámica poblacional. Evolución. Secuenciación. RFLPs. Microsatélites.

Atal honetan jasotako ikerlanek DNAREN informazioa erabiltzen dute, faunaren kontserbaziorako antzemandako hainbat arazori konponbidea emateko. Arazo horien artean honako hauek daude: (1) mehatxupean dauden espezieen kontserbazioa, (2) populazioen ezaugarri genetikoak ezagutzeari, (3) eboluzioa ikertzea, (4) espeziatzea eta (5) animalien joan-etorriak.

Giltza-Hitzak: Biodibertsitatea. Kontserbazioa. Filogeografia. Populazio-dinamika. Eboluzioa. Sekuentziatzea. RFLPak. Mikrosateliteak.

Dans ce chapitre, on présente différentes études où l'information tirée de l'ADN est utilisée pour aborder des problèmes de conservation de la faune, parmi lesquelles : (1) aide à la conservation des espèces menacées, (2) connaissance des caractéristiques génétiques des populations, (3) étude de l'évolution, (4) de la formation des espèces et (5) des déplacements des animaux.

Mots Clé : Biodiversité. Conservation. Philogéographie. Dynamique de population. Evolution. Séquençage. RFLP. Microsatellites.

La Biología de la Conservación es una ciencia multidisciplinar surgida como respuesta a la pérdida de diversidad biológica, o biodiversidad, producida por la expansión del ser humano. La pérdida actual de especies justifica que se hable de que estamos asistiendo a una sexta gran extinción, la cual, de seguir al ritmo actual, parece que incluso llegará a superar a las cinco grandes extinciones previas de las que tenemos información por el registro fósil. Los cuatro agentes principales que están conduciendo a esta sexta gran extinción han sido bautizados con el aforismo de “los cuatro jinetes del Apocalipsis” (Delibes, 2004), los cuales incluyen:

1. La pérdida del hábitat de las especies, originada por la modificación del medio, la contaminación y la fragmentación de los ambientes originales.
2. La sobreexplotación de los recursos naturales ocasionada por la recolección, la caza o la pesca efectuadas de forma indiscriminada e insostenible a largo plazo.
3. La introducción de especies exóticas invasoras que compiten con las nativas, modifican sus hábitats y son transmisoras de enfermedades.
4. Las interacciones sinérgicas por las cuales la extinción de unas especies produce extinciones en cadena de otras.

A estos factores que están provocando la disminución de las poblaciones, hay que sumar el riesgo de extinción inherente a tamaños poblacionales pequeños, provocado por problemas de índole demográfica y ambiental, así como por la pérdida de variabilidad genética.

Las consecuencias de la destrucción del complejo entramado de organismos y procesos ecológicos de los que dependemos, producto de un largo proceso evolutivo cifrado en miles de millones de años, son impredecibles en detalle, pero casi con total seguridad serán negativas tanto para el ser humano como para el resto de la vida sobre el planeta. Sabemos que las especies son los ladrillos sobre los que están contruidos los ecosistemas y que a medida que vamos perdiendo esos ladrillos, toda la vida sobre la tierra se ve afectada. La sociedad, o una parte relevante de ella, demanda que se conserven las especies, y lo hace por múltiples razones, desde un simple “porque sí” o “por su valor intrínseco” a los más complejos de “nos sentimos mejor si sabemos que ninguna especie se pierde” o “porque nuestro planeta no puede seguir perdiendo elementos”.

La Biología de la Conservación ha contribuido a intensificar el papel de los científicos en la gestión y conservación de los organismos vivos, tanto en el manejo de poblaciones *in situ*, incluyendo especies amenazadas, caza, pesca, gestión forestal y gestión de áreas protegidas, como en el manejo de poblaciones *ex situ*, mediante el mantenimiento y reproducción en cautividad de las especies más amenazadas. Además, la Biología de la Conservación busca mantener en el tiempo la diversidad biológica a tres niveles: genético,

específico y de ecosistemas. Así, la demografía y la ecología de poblaciones se ocupan de los análisis de viabilidad de las especies y poblaciones y analizan sus interacciones con su entorno para diagnosticar las eventuales causas de su declive. La biogeografía analiza las zonas geográficas más importantes para la conservación de la diversidad de especies (puntos calientes de biodiversidad o *hot-spots*) o el correcto diseño de las reservas.

Durante las últimas décadas, la conservación de la biodiversidad se viene dirigiendo, no sólo a preservar las especies y los hábitats donde éstas viven, sino también a mantener las poblaciones de una especie que difieren sustancialmente desde un punto de vista genético y/o ecológico. Estas poblaciones singulares de una misma especie constituyen Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs, utilizando el acrónimo de los términos en inglés), de forma que el conjunto de tales poblaciones reúne la variabilidad genética de la especie, originada a lo largo de innumerables generaciones. Gracias a ello, la Biología de la Conservación ha sumado nuevas disciplinas científicas que hasta hace poco tiempo estaban alejadas del ámbito de la conservación. Entre estas destaca la genética de la conservación, que se encarga de delimitar las unidades evolutivamente significativas susceptibles de acciones de conservación, complementando la labor de los taxónomos, así como de conservar la identidad y diversidad genética de las poblaciones y de diseñar las mejores estrategias de reproducción *ex situ*, utilizando para todo ello los estudios del ADN. Los diferentes tipos de ADN y algunas de las técnicas utilizadas para su estudio vienen detallados en las figuras 1-5.

La gestión correcta de las poblaciones naturales necesita tener una amplia y sólida información sobre su biología, ecología y dinámica poblacional (número de individuos, tasa de supervivencia, fecundidad, capacidad de dispersión, comportamiento, etc.), así como poder comprobar en todo momento el estado de estas poblaciones. Para obtener estos datos, muchas veces es preciso capturar repetidamente a los animales y hacer un seguimiento continuado, lo que es en muchos casos muy laborioso. Además, tratándose de especies raras y/o elusivas, los datos recogidos pueden presentar muchas lagunas, lo que hace que no siempre sea posible conocer el estado de las poblaciones. Incluso, existen situaciones en las que no es aconsejable molestar a los animales por el efecto negativo que las interferencias humanas pueden tener sobre su conservación. En estos casos, los estudios del ADN extraído de muestras no invasivas pueden ser de gran utilidad como complemento de otras modalidades de seguimiento y estudio, ofreciendo una información muy difícil de obtener por otros medios.

En este capítulo ofrecemos una visión global, desde nuestro ámbito de la Zoología, de lo que pueden aportar los estudios del ADN en los campos del estudio, gestión y conservación de las poblaciones de fauna salvaje. Para ello ofrecemos, a modo de ejemplos, una serie de trabajos concretos que se vienen realizando por el grupo de investigación del laboratorio de Zoología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco, sobre los siguientes temas:

- Conservación de especies en peligro de extinción, como por ejemplo, el visón europeo (*Mustela lutreola*).
- Preservación de las características genéticas de las poblaciones naturales, determinando el efecto que tienen las repoblaciones efectuadas con animales de granja sobre las poblaciones salvajes de la misma especie. Como ejemplo hemos seleccionado el caso de la trucha común (*Salmo trutta*), especie sobre la que se centra la pesca deportiva continental y que cuenta con numerosos aficionados en toda Europa.
- Procesos de la evolución animal e historia evolutiva de las especies, subespecies y poblaciones, con el fin de determinar cuáles están más estrechamente relacionadas entre sí (es decir, esclarecer sus relaciones filogenéticas), para de esta manera construir una clasificación natural de los organismos o "Árbol de la Vida" que refleje su historia evolutiva.
- Movimientos migratorios de las especies y poblaciones por el continente europeo como resultado de los cambios climáticos ocurridos durante las glaciaciones del Pleistoceno (últimos 600.000 años) ¿Cuáles fueron las zonas que sirvieron como refugio a las especies durante los máximos fríos glaciales? Como ejemplo representativo hemos elegido el grupo de los caracoles terrestres, interesante por su muy limitada capacidad de dispersión.
- Efecto de la fragmentación de los bosques sobre algunos animales estrechamente ligados a ellos. Estos estudios se pueden realizar a partir del ADN contenido en los excrementos que estas especies depositan para marcar su territorio. Como ejemplo describiremos el caso de la marta europea (*Martes martes*) y garduña (*Martes foina*). De esta manera podemos obtener datos empíricos que nos permitan comprobar la validez de los corredores ecológicos (zonas que se piensa que la fauna utilizará preferentemente para sus desplazamientos) previamente diseñados mediante modelos teóricos basados en la estructura del territorio y el paisaje.

Herramientas moleculares

Con el nombre de herramientas o métodos moleculares se hace referencia comúnmente a diferentes técnicas que se basan en el estudio del ADN (el conjunto del ADN de un organismo se denomina *genoma*). La utilización de estos métodos moleculares para conocer aspectos de la biología de la conservación y de estudios sobre evolución no es un simple fenómeno de moda. La explosión que han tenido estos estudios durante las últimas tres décadas ha venido ligada a la invención de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida por sus siglas en inglés (PCR), y a la estandarización de una metodología de laboratorio que permite actualmente obtener miles de millones de copias de la cadena de ADN en tan sólo unas pocas horas.

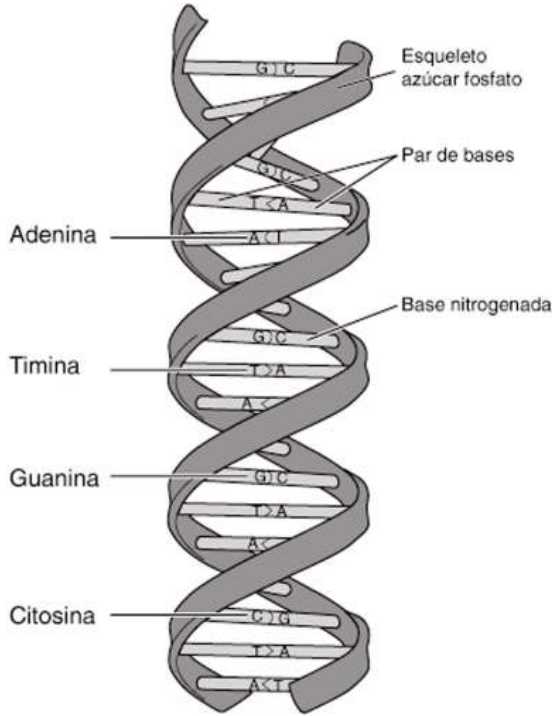


Figura 1. Representación de la estructura de la molécula de ADN, constituida por dos cadenas conteniendo 4 bases nitrogenadas diferentes (**A**: Adenina, **C**: Citosina, **T**: Timina, **G**: Guanina) y complementarias entre sí, de forma que las uniones entre ambas cadenas siempre son A-T y C-G.

La longitud de un fragmento de ADN la podemos representar en el número de pares de bases que contiene.

Aunque el ADN (Figura 1) es una molécula muy estable, a lo largo de la vida de un individuo, por diversas razones van apareciendo pequeños cambios (*mutaciones*) que, en algunos casos, se pueden transmitir de generación en generación. Estos cambios son el origen de las diferencias genéticas entre los individuos de una población, o polimorfismo poblacional. El estudio de estos lugares variables del genoma nos ofrece una gran información sobre la biología de las poblaciones, mientras que el número de diferencias que existen dentro de la misma región de ADN entre dos animales diferentes (distancia genética) puede ser tomada como medida de sus relaciones de parentesco (distancia filogenética). Hay regiones del ADN en las que las mutaciones ocurren con mayor frecuencia que en otras, es decir, su tasa de mutación es más rápida (regiones hipervariables). Así, en el caso de que los estudios se dirijan a comparar poblaciones de una misma especie, o incluso a analizar especies de un mismo género, deberemos dirigir estos estudios a las regiones hipervariables del ADN que serán las más informativas a estos niveles.

Entre las regiones más hipervariables del ADN celular destacan ciertas regiones del ADN mitocondrial (Figura 2) y los llamados microsatélites (Figura 4). Algunas de las técnicas más comúnmente utilizadas para estudiar estas regiones se describen en las figuras 2-5 a las que remitimos a los lectores más interesados.

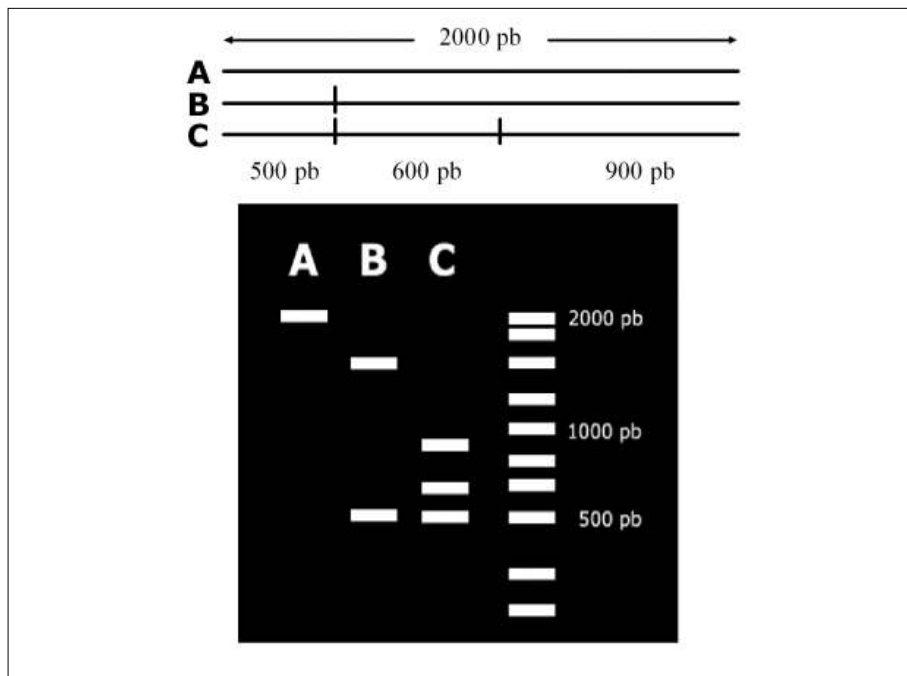


Figura 5. Representación de la técnica de RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción). Una misma cadena de ADN de 2000 pares de bases (pb) de longitud es tratada con un enzima de restricción en tres ejemplares diferentes. En el ejemplar A, no existe ningún punto de restricción, por lo que la cadena de ADN no es seccionada en ningún punto y mantiene su longitud de 2000 pb. En el ejemplar B existe un único punto de restricción a 500 pb, por lo que el resultado del tratamiento enzimático da lugar a dos fragmentos de restricción, uno de 1500 pb y otro de 500 pb. En el ejemplar 3 existen dos puntos de restricción, a 500 pb y a 1100 pb, por lo que el resultado da lugar a tres fragmentos, de 500 pb, 600 pb y 900 pb de longitud. El resultado puede verse al separar los fragmentos de ADN en función de su longitud, como se aprecia en el recuadro adjunto. La fila de la derecha contiene fragmentos de ADN de longitud conocida (regla molecular) que nos permiten medir la longitud de los fragmentos resultantes de la digestión enzimática.

1. EL VISIÓN EUROPEO: UNA ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

Los estudios que estamos desarrollando sobre visón europeo (*Mustela lutreola*) pueden servir como ejemplo de cómo la gestión y conservación de especies amenazadas se puede beneficiar de los datos aportados mediante la aplicación de las técnicas moleculares.

El visón europeo es, junto con el lince ibérico, uno de los carnívoros más amenazados de Europa, estando catalogado bajo la figura de especie "En Peligro de Extinción". Se trata de una especie que está estrechamente ligada al medio acuático, viviendo en los cauces de los ríos, arroyos, lagunas, zonas pantanosas, canales, marismas y zonas costeras. Hasta el Siglo XIX su área de distribución ocupaba la totalidad del centro y norte de Europa, desde los

Montes Urales y Círculo polar Ártico hasta las proximidades del Mediterráneo y del Mar Negro. En las últimas décadas se ha producido un declive rápido y generalizado de la especie, la cual está restringida actualmente a tres áreas desconectadas entre sí, sin posibilidades de migración de individuos entre ellas (Figura 6). Una constituye la población nor-oriental, extendida por el centro y norte de Rusia, la de mayor extensión. La segunda es la población sur-oriental limitada al Delta del Danubio, en Rumanía. Por último existe un tercer núcleo, conocido como la población occidental, que se extiende por el oeste de Francia y norte de España (Palazón 1997). Actualmente, las poblaciones francesa y española se encuentran también desconectadas entre sí (Figura 6).

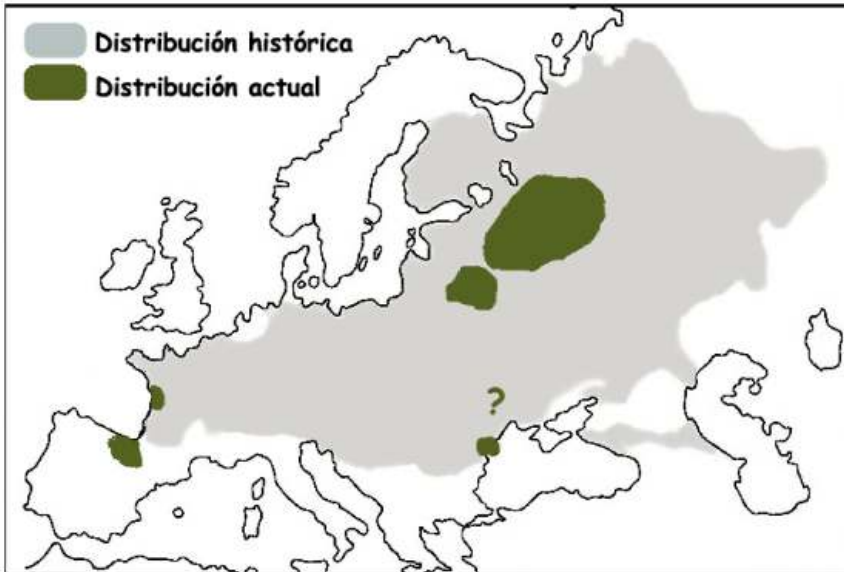


Figura 6. Modificado de Macdonald y col. 2002. Mapa representando la distribución histórica en gris y actual en verde del visón europeo. Esta especie, hasta hace unos 200 años ocupaba todo el centro y norte de Europa, desde más allá de los Montes Urales hasta las costas atlánticas. Hoy sólo quedan tres poblaciones aisladas entre sí: una en Rusia, la de mayor extensión; otra en Rumanía, en el delta del Danubio, más pequeña, aunque sus verdaderos límites geográficos no se conocen; y otra en el extremo occidental, comprendiendo el oeste de Francia y el norte de España. La regresión de la población francesa de visón europeo, ocurrida durante las últimas décadas, ha resultado en la desconexión entre las poblaciones francesa y española de la especie.

Entre las causas de este rápido declive, se barajan varios aspectos como la sobrecaza, la polución o la degradación del hábitat. Es posible que estos factores estén produciendo en las poblaciones de visón europeo una pérdida drástica de variabilidad genética. Por otro lado, la competencia y la introducción de enfermedades infecciosas por el visón americano *M. vison*, una especie exótica invasora en Europa, son otros de los agentes que parecen estar incidiendo negativamente en la supervivencia del visón europeo (Mañas et al.,

2001). El visón americano procede de América del Norte y es la única especie del género que se cría en granjas con fines peleteros para fabricar abrigos de visón. Esta especie americana ha sido introducida en numerosos enclaves de Europa, incluidas muchas áreas de la Península Ibérica por los escapes de las granjas y por liberaciones intencionadas efectuadas por grupos autodenominados como protectores de los animales. Además, se han descrito varios posibles casos de hibridación del visón europeo con el turón *M. putorius* (Davison et al., 2000), lo que puede también estar contribuyendo al declive de ambas especies. Un macho de turón puede cruzarse con varias hembras de visón europeo, impidiendo que ese año estas hembras se reproduzcan normalmente con machos de su misma especie. Los cruces de turones con visones europeos dan lugar a híbridos estériles, por lo que ambas especies se ven afectadas negativamente por estas hibridaciones.

Ante el peligro de extinción del visón europeo, se han diseñado planes de recuperación e iniciado actuaciones para detener la regresión de sus poblaciones. Dentro de estos planes, ocupa un lugar muy importante el estudio de las características genéticas de las tres poblaciones de la especie.

Las experiencias acumuladas en el campo de la Biología de la Conservación, han demostrado que la supervivencia de una especie depende en gran medida de su potencial evolutivo. Las características del medio ambiente están en continuo cambio, tanto por la presión de las actividades humanas, como por los cambios climáticos que se suceden de forma natural. Por ello, las especies deben ser conservadas como unidades dinámicas con la suficiente capacidad de evolucionar que les permita hacer frente a los cambios ambientales y minimizar, de esta manera, el riesgo de extinción por factores genéticos. El potencial evolutivo de una especie o población y, en consecuencia, su capacidad para adaptarse a un medio ambiente que está en continuo cambio, depende, entre otros factores, de su mayor o menor variabilidad genética. Así, el futuro de una especie o población que sea muy homogénea genéticamente (poca variabilidad genética), estará seriamente comprometido.

Como ejemplo que ilustra muy bien la relación entre variabilidad genética y supervivencia de una especie, podríamos tomar el caso del guepardo (*Acionys jubatus*), el cual se encuentra entre las especies que tienen una menor variabilidad genética, debido a una drástica reducción del número de individuos de la especie en el pasado. Como consecuencia de ello, es una de las especies más amenazadas del planeta, presentando varios indicios de depresión por endogamia o consanguinidad, debido a los sucesivos cruces entre ejemplares muy cercanamente emparentados. Así, los ejemplares de guepardo son muy susceptibles a enfermedades, la tasa de mortalidad juvenil es muy alta y los adultos presentan varias anomalías reproductivas, como una baja calidad espermática. Todos estos aspectos redundan negativamente en la capacidad de supervivencia de la especie.

Un primer estudio que hemos realizado en visones europeos ha consistido en la caracterización de la variabilidad genética de las tres únicas poblaciones que sobreviven. Para ello, hemos utilizado inicialmente la secuenciación de un

fragmento hipervariable del ADN mitocondrial: la región control (ver Figura 2). Estos estudios nos han permitido conocer que las tres poblaciones de visón europeo tienen diferentes niveles de variabilidad genética, siendo la población oriental la que presenta los mayores valores de polimorfismo (Cabria et al., 2006). Por el contrario, esta misma región del genoma de los individuos estudiados de Francia y España es idéntica en todos ellos, o lo que es lo mismo, la población occidental es monomórfica para este marcador genético. La población rumana, por su parte, presenta valores intermedios de polimorfismo.

En una segunda etapa, con el fin de profundizar en el estudio de las tres poblaciones de visón, hemos puesto a punto varios microsátélites (ver figura 4) específicos de visón, utilizando las regiones del genoma que presentan los mayores niveles de variabilidad. Estos estudios han corroborado los datos obtenidos mediante secuenciación de ADN mitocondrial, indicando que la población occidental se encuentra genéticamente muy empobrecida, siendo su variabilidad genética muy baja, lo cual representa un riesgo adicional para su supervivencia a largo plazo.

Entre las actividades ya iniciadas para recuperar las poblaciones de esta especie, figura la reproducción en cautividad para realizar posteriores repoblaciones. Así, se han puesto en marcha varios centros que se dedican a la cría de la especie en instalaciones adecuadas, trabajando con ejemplares de la población nor-oriental o con ejemplares de la población occidental. Las actividades a medio y largo plazo de estos centros de cría en cautividad se verían muy favorecidas si pudieran intercambiar individuos reproductores, lo que permitiría evitar caer en problemas de consanguinidad. Pero estos cruces exigen tener previamente la certeza de que las poblaciones actualmente aisladas de visón europeo son una misma unidad genética, es decir, una única Unidad Evolutivamente Significativa. Los estudios que hemos realizado, utilizando las dos técnicas mencionadas, nos han permitido confirmar que las tres poblaciones de visón europeo son muy similares genéticamente, constituyendo todas ellas una única Unidad Evolutivamente Significativa. Según nuestros resultados, las similitudes encontradas entre los ejemplares de las tres poblaciones de visón europeo, demuestran que las poblaciones occidental y rumana no suponen más que un subconjunto de la población rusa. Por ello, debemos considerar que, desde el punto de vista genético, las tres poblaciones analizadas pueden ser gestionadas de forma conjunta. Las diferencias genéticas encontradas entre las tres poblaciones actuales demuestran que todas ellas proceden de un mismo proceso de expansión por Europa, posterior al último máximo glacial (hace alrededor de 18.000 años), a partir de ejemplares provenientes de un único refugio en el que sobrevivieron durante la última glaciación.

Adicionalmente, podemos mencionar que los microsátélites desarrollados para visón europeo, nos permiten también evaluar las características genéticas de los reproductores fundadores utilizados en los programas de cría en cautividad, así como hacer un seguimiento de las características genéticas de las nuevas generaciones nacidas en cautividad. Con estos datos se puede proceder a diseñar los cruces entre individuos que permitan mantener los niveles más altos de variabilidad genética en la población cautiva.

Debemos señalar que el ADN mitocondrial se hereda exclusivamente por vía materna, por lo que nos da información únicamente de la ascendencia matrilineal (desde la madre a los hijos e hijas). Estos resultados, complementados con estudios de secuenciación del cromosoma Y, de herencia padre-hijo (patrilineal), en combinación con los estudios de microsatélites, nos han permitido certificar la naturaleza híbrida de ejemplares que presentaban aspectos morfológicos entre visón europeo y turón, e identificar otros híbridos no detectados por los estudios morfológicos. En función de estos resultados hemos seleccionado los marcadores que nos permiten diagnosticar de forma precisa estos híbridos. Actualmente estamos procediendo a cuantificar la dimensión del problema de la hibridación entre estas dos especies (Figura 7): secuenciación cromosoma Y para visón y turón.

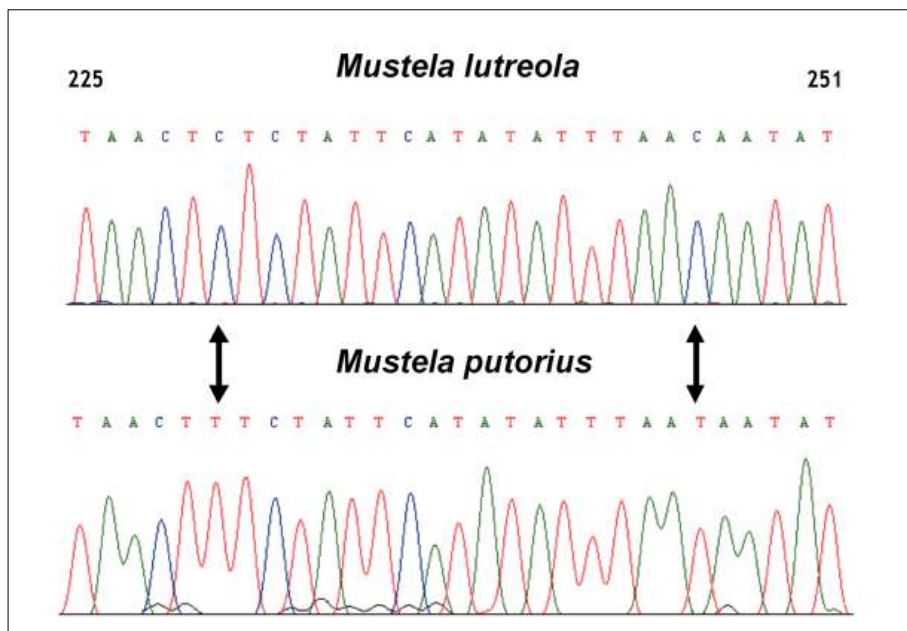


Figura 7. Porción de una secuencia del cromosoma Y mostrando la misma región (bases 225 a 251) para dos especies: Visón europeo y turón. Se observan dos secuencias que difieren en las bases existentes en las posiciones 230 y 248 (Citosina para visón europeo y Timina para turón en ambas posiciones). El resto de posiciones de la cadena de ADN son invariables, es decir, idénticas para ambas especies. Los dos cambios identificados son específicos de especie. La comparación de las secuencias de una misma región del ADN, nos permite conocer parámetros tales como distancias genéticas entre especies o poblaciones, tiempos de separación entre linajes, o comparar niveles de polimorfismo intrapoblacional. Además, permite realizar un seguimiento de los linajes matrilineales (ADNmt, que se hereda de las madres a toda su descendencia), de linajes patrilineales (cromosoma Y, que se hereda de padres a hijos, sólo por vía masculina), o de ambos en conjunto (ADN nuclear no sexual).

En resumen, las técnicas de estudio del ADN nos han permitido conocer las características genéticas de las tres poblaciones actualmente supervivientes del visón europeo y determinar la gran homogeneidad genética de

la población occidental que puede desembocar en un fenómeno de debilitamiento poblacional. Estos mismos estudios han permitido concluir que las tres poblaciones de visón europeo constituyen una misma unidad evolutivamente significativa. Así, todas ellas provienen de un proceso de recolonización del continente europeo ocurrido durante los últimos 18.000 años desde un único refugio glacial. Estos resultados permiten gestionar de forma conjunta las tres poblaciones de la especie, lo que es de gran trascendencia sobre todo para los programas ya en marcha de reproducción en cautividad de la especie y cuya finalidad es la reintroducción. Además, nos permiten estudiar la hibridación entre el visón europeo y el turón.

2. LA TRUCHA COMÚN Y LOS PROBLEMAS INHERENTES A LA HIBRIDACIÓN

Es ampliamente conocido que la hibridación entre poblaciones distintas puede representar un efecto beneficioso, lo que ha dado en denominarse “vigor híbrido” que se refiere a las mejores características que presentan los híbridos con respecto a los ejemplares de las poblaciones puras de cada progenitor. Este “vigor híbrido” ha sido utilizado para efectuar mejoras artificiales de animales criados en granjas o de plantas cultivadas. No obstante, en las poblaciones naturales, la hibridación entre linajes animales muy distintos conlleva un problema que puede conducir al debilitamiento de la población híbrida, y que se conoce bajo el nombre de depresión por exogamia.

Con el fin de explicar el concepto de depresión por exogamia y el riesgo que conlleva, podemos hacer referencia brevemente al caso ocurrido con la cabra de los Montes Tatra, cadena montañosa del centro de Europa. Esta cabra (*Capra ibex*) se extinguió en Eslovaquia por efecto de la sobrecaza, tras lo que se quiso reintroducir la especie. Para ello, en un primer tiempo se utilizaron ejemplares austriacos de la especie, ecológica y genéticamente muy similares a los de la población extinguida, y la reintroducción fue un éxito. Pero con el fin de aumentar el número de individuos de esta población reintroducida se quiso reforzar con nuevos ejemplares, esta vez procedentes de Turquía y de la península del Sinaí, diferentes tanto desde el punto de vista genético como ecológico. Los ejemplares de ambas procedencias se cruzaron y los híbridos resultantes mostraban características intermedias. Una característica de estos híbridos consistía en que las hembras parían a los cabritos en febrero, en vez de en primavera. La capacidad de supervivencia de los recién nacidos en el mes más frío del año en una cadena montañosa de centroeuropa era mínima, representando un claro ejemplo de depresión genética o debilitamiento poblacional por cruces efectuados entre poblaciones distintas. En el caso citado, el desajuste reproductivo vino causado por una adaptación diferente al clima entre las poblaciones donante y la receptora.

Este problema de la depresión por exogamia afecta a varias especies de interés en la caza y pesca deportivas (perdiz, codorniz, conejo, trucha, entre otras). Una actuación muy común que persigue aumentar el número de piezas disponibles en un coto, consiste en efectuar repoblaciones con individuos de granja, procedentes de otras regiones geográficas y que se cruzan con los

autóctonos, siendo en muchos casos muy diferentes genéticamente unos individuos de otros. La conservación del patrimonio genético de las poblaciones locales es una de las principales preocupaciones para los responsables de la gestión de la fauna (Administraciones española y autonómicas, y gestores del medio natural), tal y como queda recogido por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 1998) y por la legislación española (Ley 42/2007).

La trucha común es un elemento fundamental de los ecosistemas fluviales de toda Europa, siendo además la especie de mayor interés en la pesca deportiva de aguas continentales y constituye un buen ejemplo del problema de la hibridación como amenaza a la conservación de la biodiversidad. Dentro de Europa, la península Ibérica constituye una región geográfica muy importante de diversidad genética de trucha común (punto caliente de biodiversidad o "hot-spot"), conteniendo poblaciones cuya composición genética es diferente de la que presentan otras poblaciones europeas (Suárez et al., 2001). Así, de los cinco linajes de trucha común descritos para el conjunto de Europa, tres se hallan presentes en la península Ibérica. Además, los estudios realizados coinciden en señalar la presencia de al menos 5 linajes ibéricos muy diferentes desde el punto de vista genético y que deberían considerarse como las mínimas Unidades Evolutivamente Significativas, que son:

1. las poblaciones de la región Cantábrica;
2. las poblaciones del Duero;
3. el resto de poblaciones de la región Atlántica;
4. las poblaciones del Ebro y otras cuencas orientales;
5. las poblaciones del sur de la Península Ibérica (región andaluza).

En los últimos años, sus poblaciones naturales han venido sufriendo un declive general debido a tres factores principales, como son: la degradación y destrucción del hábitat natural de esta especie, la sobreexplotación de las poblaciones naturales como efecto de la pesca deportiva, y la introducción de truchas procedentes de otras zonas geográficas (Laikre, 1999; Ferguson, 2004). Como medida compensatoria ante la disminución de capturas y con el fin principal de satisfacer la demanda de los pescadores, la medida básica de gestión llevada a cabo se ha fundamentado durante varias décadas en el desarrollo de programas de repoblación, basados en la introducción de ejemplares domésticos cultivados en piscifactoría y de origen predominantemente centroeuropeo. Este tipo de repoblaciones, suponen hoy en día, uno de los principales problemas de conservación de la diversidad de las poblaciones ibéricas y europeas de trucha común. Por un lado, las repoblaciones utilizan ejemplares de unas características genéticas muy homogéneas, por lo que su siembra en diferentes zonas geográficas supone a la larga una uniformidad genética a nivel global, con la consiguiente pérdida de poblaciones singulares. Un segundo problema consiste en el riesgo de depresión por exogamia (ver primer párrafo de este capítulo) resultante del cruce entre ejemplares centroeuropeos, de repoblación, y ejemplares de poblaciones adaptadas durante miles de generaciones a unas condiciones fluviales diferentes a las propias de los ríos centroeuropeos.

Nuestros estudios de trucha común, se han centrado en las poblaciones existentes en la Comunidad Autónoma Vasca y regiones adyacentes (La Rioja, Navarra), con el fin de determinar mediante la utilización de diferentes marcadores, la variabilidad y estructuración genética de las diferentes poblaciones, tanto cantábricas como mediterráneas, de trucha común en esta zona geográfica. Tras conocer las características genéticas de las poblaciones locales, hemos procedido a analizar el efecto que han tenido sobre ellas las repoblaciones efectuadas con ejemplares centroeuropeos y a cuantificar la proporción del genoma centroeuropeo que se ha asentado en las poblaciones ibéricas. Esta introducción de genomas diferentes a los de la población es lo que se denomina introgresión genética. Para estudiarla, hemos utilizado un gen específico del genoma nuclear (denominado LDH-C), que tiene la gran ventaja de que nos permite detectar una variante propia de los animales de piscifactoría (LDH-C*90) y otra propia de las poblaciones de trucha común de la península ibérica (LDH-C*100), tal y como se recoge en la Figura 8.

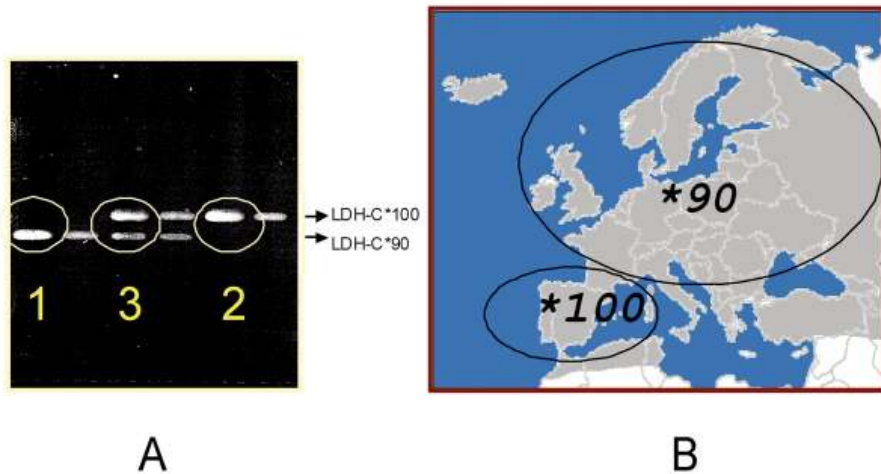


Figura 8:

A: Fotografía que representa la forma en que visualizamos los tres genotipos posibles para el gen nuclear LDH-C en la trucha común: La variante *90 de ese gen tiene menor tamaño que la variante *100, por lo que queda situada algo más abajo. Observamos tres situaciones diferentes:

1. Las dos copias corresponden a la variante *90 (homocigoto 90/90, genotipo de trucha de repoblación centroeuropea), por lo que observamos una sola banda situada en la línea inferior.
2. Las dos copias son de la variante *100 (homocigoto 100/100, representativo de las truchas de la península Ibérica), lo que observamos como una sola banda superior.
3. Una copia es de la variante *90 y la otra de la variante *100 (heterocigotos 100/90, correspondiente a los ejemplares híbridos entre los anteriores) lo que se observa como una doble banda.

B: Mapa que representa la distribución geográfica original de las variantes LDH-C*90 y LDH-C*100 en las poblaciones de trucha común europea.

Además, hemos analizado un fragmento del ADN mitocondrial, para el cual se han definido 5 variantes genéticas (denominadas haplotipos), matrilineales, presentes en los ríos de la Comunidad Autónoma Vasca y provincias limítrofes. Cada haplotipo queda designado por una combinación de cinco letras:

- **AAAAA:** Haplotipo característico de las truchas atlánticas, incluyendo tanto a las pertenecientes a las poblaciones cantábricas autóctonas, como a las centroeuropeas de repoblación. El origen autóctono o introducido de una trucha que presente este hapotipo no puede ser identificado. Aquellas que, además, presentan únicamente la variante de ADN nuclear LDH-C*100, serán truchas cantábricas. Las que presentan sólo la variante LDH-C*90 son truchas centroeuropeas provenientes de las repoblaciones efectuadas para fines de pesca deportiva. Las truchas que contienen ambas variantes son híbridas entre las truchas cantábricas, autóctonas, y las repobladas en años anteriores.
- **ABACA:** Haplotipo propio de las truchas cantábricas y atlánticas de la Península ibérica.
- **BBCDA, BBAAA y BBBDA:** Haplotipos mediterráneos, que dentro del País Vasco son propios de las poblaciones de truchas de los afluentes del Ebro.

Cuando una trucha presenta cualquiera de los cuatro haplotipos que no corresponden a las truchas de repoblación (ABACA, BBCDA, BBAAA y BBBDA) conjuntamente con la variante LDH-C*90 propia de las truchas centroeuropeas, sabemos que se trata también de un híbrido entre truchas autóctonas del río estudiado y ejemplares repoblados, provenientes estos últimos de líneas domésticas de piscifactoría.

El estudio conjunto del gen LDH-C y de las variaciones genéticas de los linajes matrilineales (haplotipos mitocondriales) sobre poblaciones de truchas de 1) ríos nunca repoblados, 2) tramos fluviales en los que las repoblaciones se detuvieron hace más de una década, y 3) tramos fluviales en los que las repoblaciones se han seguido realizando hasta el presente, nos ha permitido conocer cual es la situación de cada río. También hemos podido analizar la alteración genética resultante de las repoblaciones realizadas con ejemplares centroeuropeos y el efecto que ha tenido la supresión de estas prácticas de repoblación. Como resultado de estos estudios hemos podido determinar que, en muchos ríos cantábricos, el cese de las repoblaciones ha conducido a una eliminación paulatina de ejemplares centroeuropeos y de los híbridos entre éstos y las truchas ibéricas, de forma que las poblaciones acaban recuperando por sí mismas sus características originales. Por el contrario, en algunos ríos cantábricos y en la mayoría de las poblaciones de los afluentes del río Ebro, la presencia de genes centroeuropeos se mantiene en valores altos, sin que se observen indicios de su recuperación a pesar de que las repoblaciones se detuvieron hace ya varios años (Figura 9). En este último caso se deben efectuar medidas complementarias para acabar recuperando finalmente las características genéticas de las poblaciones de trucha propias de estos ríos y la biodiversidad que estas poblaciones representan para la especie.

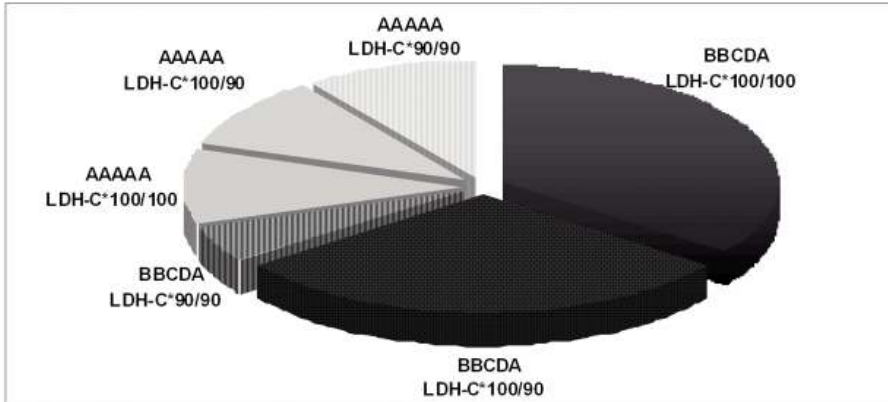


Figura 9: Gráfico representando las combinaciones genéticas obtenidas para los haplotipos mitocondriales y LDH-C en una población de truchas mediterráneas (Ebro en Álava) que mantiene una gran proporción de genes autóctonos. La presencia del alelo LDH-C*90 es indicativa de la existencia de genes de piscifactoría (centroeuropeos). La presencia del haplotipo mitocondrial AAAAA es igualmente indicativa de genes de piscifactoría. Únicamente las truchas que presentan la combinación genética BBCDA – LDH-C*100/100 (el 30% de la población) están libres de introgresión genética. Las que presentan la combinación AAAAA – LDH-C*90/90 son ejemplares de piscifactoría, soltados en la última repoblación. Las demás combinaciones genéticas son resultantes del cruce entre truchas del Ebro y de piscifactoría.

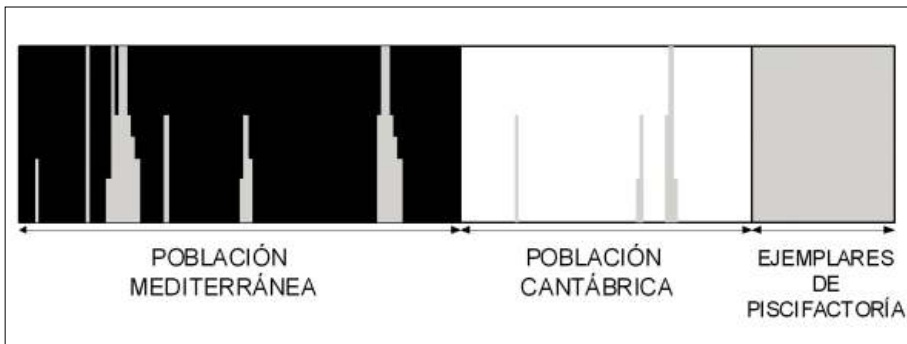


Figura 10: Gráfico que muestra la composición genética de cada trucha para diferentes poblaciones estudiadas: una población mediterránea, una cantábrica y una de piscifactoría, obtenida mediante el nuevo método desarrollado. Cada uno de los tres recuadros representa una población. La diferente longitud de los recuadros indica el número de individuos analizados: 60 en la población mediterránea, 40 en la cantábrica y 20 en la línea de piscifactoría. En blanco se representan los genes autóctonos de las truchas cantábricas. En negro los genes autóctonos de las truchas mediterráneas. En gris los genes de truchas de líneas domésticas de piscifactoría.

Cada línea representa las características genéticas de cada ejemplar analizado (se han suprimido los límites de cada línea para una mejor visualización global del gráfico; el grosor de cada línea puede observarse en los segmentos grises). La presencia de un segmento gris en una trucha de las poblaciones mediterránea o cantábrica, indica que ese ejemplar contiene genes autóctonos, de piscifactoría, cuyo porcentaje es proporcional a la longitud del segmento gris. Sólo las truchas que aparecen representadas por una barra negra homogénea (en las mediterráneas) o blanca homogénea (en las cantábricas), están completamente libres de contaminaciones genéticas provenientes de las repoblaciones efectuadas durante décadas.

Diferentes Gobiernos Autonómicos han comenzado a aplicar medidas alternativas para evitar nuevos casos de hibridación con ejemplares centroeuropeos. Así, se están obteniendo alevines de piscifactoría a partir de reproductores locales, que tienen la ventaja de que son de las mismas características genéticas que las truchas de los ríos donde van a ser introducidos. Esto podrá contribuir a reducir el problema de la hibridación en aquellas poblaciones que no se recuperan de forma natural. No obstante, tenemos el gran problema de que la hibridación afecta ya a muchas de las poblaciones locales, por lo que no tenemos la certeza de que los ejemplares tomados de los ríos para ser utilizados como reproductores locales, se encuentren libres de genes foráneos. El simple estudio del gen LDH-C no es suficiente para certificar la ausencia de genes foráneos en ríos que han sido repoblados, ya que muchos híbridos de segunda y posteriores generaciones pueden ser pasados por alto.

Con el fin de poder certificar la ausencia de caracteres híbridos en cualquier ejemplar de trucha común que pueda pasar a formar parte del conjunto de reproductores con los que iniciar líneas de piscifactoría locales, hemos procedido a desarrollar un método basado en el estudio de nueve microsatélites (Figura 10). Este método es plenamente efectivo para identificar genes centroeuropeos en truchas ibéricas, así como para determinar si un ejemplar es híbrido de primera o de segunda y posteriores generaciones, permitiendo además identificar si un ejemplar es propio de un río cantábrico, del Ebro o del Duero, o descendiente de un cruce entre ejemplares de cualesquiera de estas poblaciones. Ello nos permite también hacer un seguimiento de traslocaciones ocurridas entre ríos cantábricos y del Ebro, problema que hemos podido constatar que ha ocurrido en varias ocasiones. La aplicación de este método de análisis sobre cualquier ejemplar de trucha común nos permite, en consecuencia, conocer si sus características genéticas son las adecuadas para utilizarlo como reproductor en un programa de repoblaciones locales. Los análisis se efectúan sobre unas pocas escamas obtenidas mediante un leve raspado de la superficie del pez, lo que no afecta a su supervivencia.

Como resumen de este capítulo, los estudios desarrollados sobre trucha común han permitido definir los diferentes linajes de la especie en Europa, confirmando que la Península Ibérica contiene una alta diversidad genética de esta especie, la cual es preciso conservar. Los estudios se han dirigido a conocer el efecto que las repoblaciones con truchas de líneas domésticas, de piscifactoría, procedentes de Centroeuropa, tienen sobre las poblaciones salvajes locales. Los resultados reflejan que el problema de alteración de las características genéticas de las poblaciones locales es más acuciante y permanente en las poblaciones del Ebro que en las de los ríos cantábricos. Adicionalmente, hemos podido desarrollar un método de certificación individual que nos permite garantizar si un ejemplar está completamente libre de genes de truchas foráneas. Esta certificación es fundamental para poder seleccionar reproductores con los que obtener alevines en cautividad destinados a repoblaciones de los ríos locales. De esta forma se puede realizar una adecuada gestión de esta especie, de gran interés en la pesca deportiva fluvial, conforme a la legislación actual, tanto europea como española y local.

3. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN ANIMAL E HISTORIA BIOGEOGRÁFICA DE LAS ESPECIES, SUBESPECIES Y POBLACIONES: LOS CARACOLES TERRESTRES COMO MODELO

Desde que surgió la vida hace unos 3.500 millones de años, los seres vivos se han ido diferenciando a lo largo de las generaciones por un proceso de evolución continua que ha dado origen a las cerca de 1.500.000 especies que conocemos en la actualidad. A partir de que Darwin (1809-1882) publicara sus ideas acerca de la evolución (Darwin, 1859), los biólogos estamos intentando reconstruir la historia evolutiva de todos los organismos y representarla gráficamente en forma de árbol filogenético, en el que queden recogidas las relaciones de parentesco de todos los seres vivos. Este árbol se denomina "Árbol de la Vida" o "Tree of Life". La Sistemática es la ciencia que se encarga de la clasificación de las especies en función de su historia evolutiva o filogenia. Esta clasificación se ha intentado con el registro fósil, pero es fragmentario e incompleto. También con los estudios de morfología comparada y fisiología comparada, pero nos hemos encontrado con que los cambios evolutivos ocurridos en los aspectos morfológicos y fisiológicos son, muchas veces, de gran complejidad y no se ha conseguido reconstruir completamente la historia evolutiva de la vida. No obstante, estos estudios han permitido conocer las principales líneas evolutivas, aunque todavía existen muchas controversias. Así, en lo que se refiere a la Zoología, todavía no existe un acuerdo sobre cuántos tipos animales existen, entendiendo por tipos, las mayores agrupaciones en que puede subdividirse el reino animal. Pero estas controversias se acrecientan a la hora de definir otras agrupaciones de rango inferior (clase, orden, familia, género, especie, población).

Los avances de Biología Molecular han dado un empuje a la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre los organismos. Así, la Sistemática Molecular utiliza la información presente en el ADN para reconstruir árboles filogenéticos que reflejen las relaciones evolutivas entre los organismos. Uno de los objetivos de la Sistemática consiste en describir, clasificar y dar un nombre a las especies, géneros, familias, etc. existentes, en función de sus relaciones evolutivas (Eshbaugh, 1995; Systematics Agenda 2000).

La Sistemática Molecular ha proporcionado un conjunto de datos adicionales, complementarios de los morfológicos, paleontológicos y fisiológicos con los que proceder a la construcción del "Árbol de la Vida" y ha permitido a los especialistas una aproximación al establecimiento de las relaciones filogenéticas entre las especies a distintos niveles de la clasificación. Los datos moleculares son complementarios de los morfológicos. Así, los estudios del genoma nos permiten delimitar grupos de organismos estrechamente emparentados entre sí y determinar sus relaciones filogenéticas, mientras que los datos morfológicos nos permiten conocer cómo se ha producido la diversificación de un conjunto de organismos y su evolución morfológica a partir de una estructura común. Como consecuencia de la gran importancia que ha ido adquiriendo este campo científico, en los últimos años han aparecido varias revistas científicas periódicas especializadas en los estudios de filogenia molecular: *Molecular Ecology*; *Molecular Phylogenetics and Evolution*; *Conservation Genetics*, entre otras.

Para resolver incertidumbres de sistemática y clasificación en moluscos terrestres, hemos optado por determinar la secuencia nucleotídica de algunos genes porque esta técnica proporciona el conjunto de caracteres discriminantes más potente para realizar análisis filogenéticos (Avise, 1994; 2000; Palumbi, 1996). Además, una vez que un gen es secuenciado, esa secuencia se puede utilizar para futuras comparaciones con otras especies que quieran añadirse al análisis.

Hasta ahora nos hemos centrado en los géneros *Iberus* y *Pyrenaearia* (ver Figuras 11, 13 y 14 más adelante), y en algunos otros dentro de un estudio más global que persigue la caracterización del conjunto de los moluscos terrestres. Se trata en todos los casos de géneros que contienen varias especies endémicas de la Península Ibérica, algunas de las cuales se encuentran amenazadas, tal y como aparece recogido en varios catálogos autonómicos y en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (<http://www.iucnredlist.org/>). En todos los casos, los estudios persiguen actualizar la clasificación de cada grupo, que hasta ahora ha estado basada únicamente en la forma de la concha y del aparato reproductor y que ha conducido a un total desacuerdo entre los varios especialistas de estos géneros.

Los datos procedentes de la secuenciación de ADN nos han permitido delimitar el número de especies que contiene cada uno de estos géneros, conocer sus relaciones de parentesco y determinar cómo ha ocurrido su evolución morfológica y su dispersión geográfica en relación con los datos paleoclimáticos. Algunas especies son nuevas para la ciencia, no habiendo sido reconocidas previamente como tales en función de los datos morfológicos, mientras que otras especies descritas por diferencias morfológicas no son en realidad más que simples variedades de una única especie. Estos resultados nos han llevado a adquirir una nueva interpretación de las especies y de las poblaciones singulares existentes dentro de los géneros *Iberus* y *Pyrenaearia* lo que nos permite concretar el grado de amenaza de cada especie o de poblaciones intraespecíficas y proponer medidas adecuadas para su conservación.

El género *Iberus* constituye un modelo para estudiar el proceso de la evolución de la forma de la concha en caracoles terrestres. Dentro de este género se encuentran los caracoles terrestres de mayores dimensiones de la fauna ibérica, lo que se ha dado en denominar *Iberus gualtieranus complex* (IGC), conteniendo varias especies de validez incierta, algunas de las cuales se vienen recolectando de forma indiscriminada con fines gastronómicos. Dentro del complejo IGC se reúnen caracoles terrestres cuyas conchas tienen 3 formas diferentes muy características (Figura 11): 1) la forma *alonensis* de concha redondeada y abertura simple; 2) la forma *campesinus*, también redondeada, pero con una abertura ancha y aplanada; y 3) la forma *gualtieranus* con concha aplanada, con una angulosidad muy marcada por toda su periferia y con la superficie adornada por un relieve muy llamativo.

Nuestros primeros trabajos con este complejo se han dirigido a resolver, mediante estudios de secuenciación de ADN, el número de especies que componen este género, comparando los datos moleculares con los morfológicos

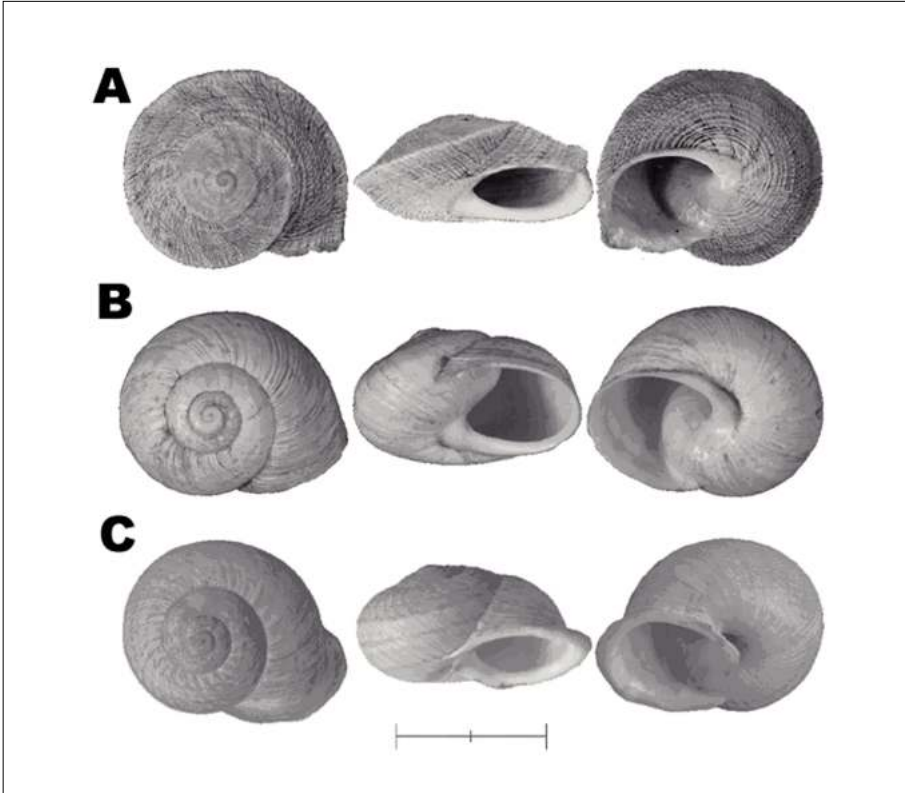


Figura 11. Representación de las tres formas básicas de los *Iberus* de gran tamaño. A: *Iberus gualtieranus* con concha angulosa y de ornamentación muy marcada; B: *Iberus alonensis* con concha redondeada y borde de la abertura simple; C: *Iberus campesinus*, con concha redondeada y borde de la abertura extensamente reflejado. Escala: 2 cm.

(Figura 12). Nuestros resultados nos han permitido comprobar que existe una gran concordancia entre la forma de la concha y los datos moleculares en *Iberus gualtieranus gualtieranus* e *I. campesinus*. No obstante, dentro de *I. alonensis*, se han encontrado varios linajes evolutivos muy diferenciados, lo que nos ha permitido identificar la existencia de varias especies que la morfología había pasado por alto. Estas constituyen especies gemelas (especies muy similares morfológicamente pero que realmente constituyen especies diferentes). Algunas de estas especies son nuevas para la ciencia y se encuentran en proceso de descripción.

Posteriormente, hemos ampliado el estudio a la totalidad del género *Iberus*, que comprende unas 20 especies, tres de ellas con conchas aplanadas, de periferia muy angulosa y cubiertas de un relieve muy marcado: *I. gualtieranus gualtieranus*, *I. cobosi* e *I. rositai* (Figura 13). El resto de especies presentan una periferia redondeada y las conchas son casi lisas, sin el relieve característico de las anteriores.

Iberus gualtieranus complex (IGC)

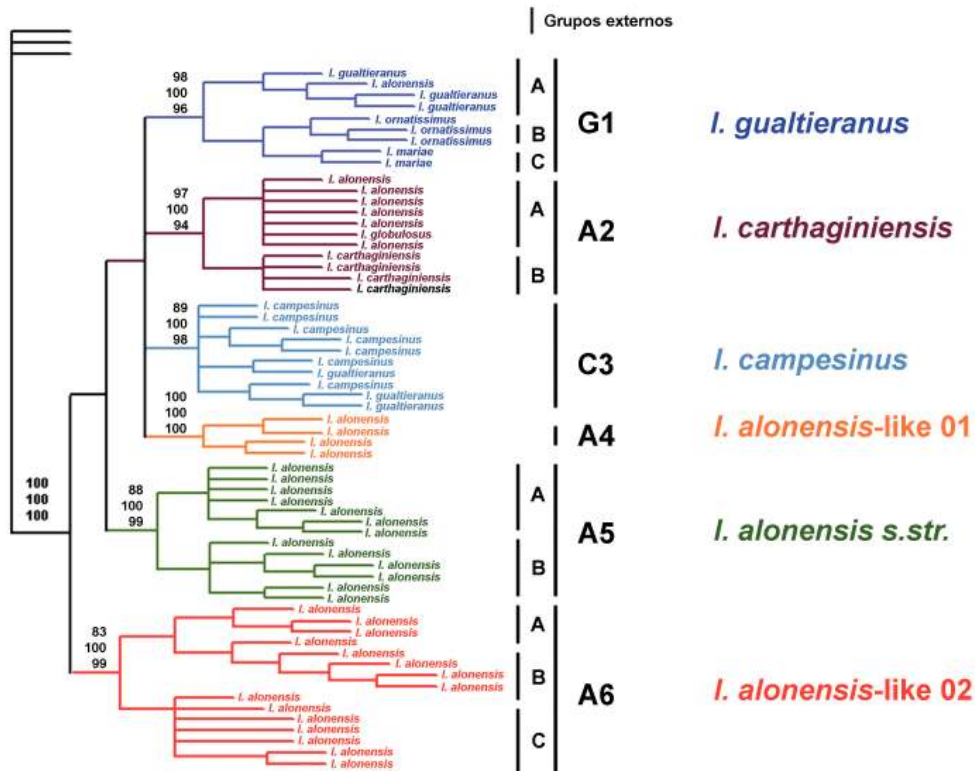


Figura 12. Cladograma representando las agrupaciones filogenéticas obtenidas en el conjunto de *Iberus gualtieranus* complex. Se observan seis grandes agrupaciones (G1-A6), que representan a las seis especies que consideramos que existen dentro del complejo. A su derecha se indican los nombres específicos de cada una. Hay dos especies nuevas para la ciencia, ambas pertenecientes a la forma *alonensis*, que están en proceso de descripción.

En los caracoles terrestres se han descrito varios casos de presencia de especies con conchas aplanadas y de especies con conchas redondeadas dentro del mismo género. Una cuestión que quisimos resolver era la de si las formas originales fueron las redondeadas o las aplanadas y, en consecuencia, qué forma evolucionó a partir de la forma ancestral. Dentro del grupo de los caracoles se han descrito casos en los que las formas redondeadas se originaron a partir de ancestros aplanados y la contraria, en la que las formas aplanadas evolucionaron a partir de ancestros con conchas redondeadas.

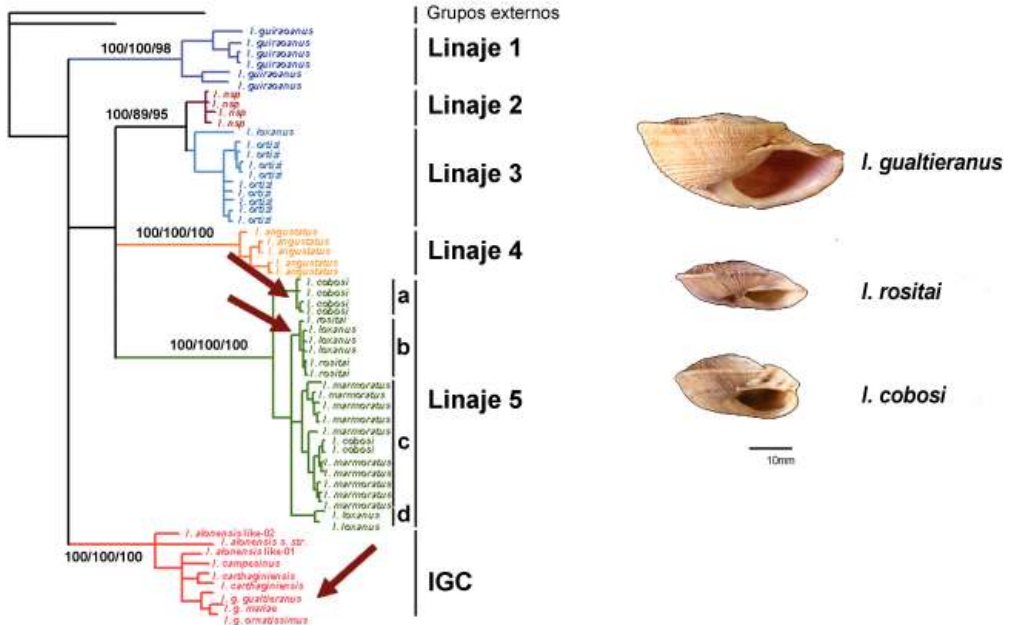


Figura 13. Cladograma representando las agrupaciones filogenéticas obtenidas para todo el género *Iberus*. El grupo IGC recoge las especies de la Figura 12. Además, se observan otras 5 agrupaciones, una de las cuales (linaje2 comprende una especie nueva para la ciencia, pendiente de descripción). A la derecha se representan las tres especies que poseen una concha aplanada, aquillada y de ornamentación marcada (*I. gualtieranus*, *I. rositai* e *I. cobosi*). Las flechas del cladograma indican la posición filogenética ocupada por estas tres especies dentro del conjunto del género. El resto del cladograma está ocupado por especies con conchas redondeadas, incluyendo aquellas que constituyen la base del cladograma. Ello nos dice que las conchas aplanadas se han formado de manera independiente a partir de conchas redondeadas.

El árbol filogenético obtenido mediante la secuenciación de ADN, nos ha permitido conocer que las conchas angulosas y aplanadas aparecen en tres linajes diferentes dentro del género *Iberus*. Además, en los tres casos, las conchas presentan una escultura muy marcada. Algunos investigadores han considerado que estas tres especies de concha angulosa estaban más estrechamente relacionadas entre sí que con respecto a las otras especies de *Iberus* en función de sus similitudes conculológicas (Ibáñez y Alonso, 1978). No obstante, los resultados moleculares demuestran que las conchas angulosas, aplanadas y con fuerte ornamentación de estas tres especies constituyen una combinación de caracteres que se ha originado repetidamente en diferentes épocas, zonas geográficas y linajes. Estas conchas han aparecido al menos tres veces de manera independiente en *Iberus*, lo que podemos afirmar al constatar que aparecen separadas entre sí en el árbol filogenético obtenido (Figura 13). En los tres casos, estas conchas angulosas, aplanadas y con marcada escultura se han originado a partir de procesos evolutivos diferentes, y siempre a partir de caracoles que presen-

taban conchas redondeadas. El carácter ancestral o primitivo de las conchas redondeadas frente a las angulosas y aplanadas queda testificado por la posición de las especies de caracoles con conchas redondeadas en las ramas que ocupan la base del árbol filogenético obtenido para la totalidad de especies del género (Figura 13).

Uno de los principales enigmas acerca de la evolución de los caracoles con conchas aplanadas o aquilladas consiste en conocer las razones que han originado estas formas conquiológicas. Parece claro que, en *Iberus*, las formas aplanadas y angulosas han surgido como una adaptación a las condiciones del hábitat donde se encuentran: suelos calizos de naturaleza cárstica en los que predomina la roca desnuda, con escasa vegetación y con profundas fisuras. El comportamiento de *I. gualtieranus gualtieranus* ha sido examinado recientemente por Moreno-Rueda (2006) quien indica que esta subespecie utiliza habitualmente dos hábitats diferentes: un refugio en fisuras de rocas verticales cuando está inactivo, y desplazamientos horizontales sobre suelos rocosos desnudos cuando se encuentra activo en busca de alimento. De la misma forma, la estructura del suelo de las zonas cársticas donde habitan las otras dos especies de conchas aplanadas, *I. rositai* e *I. cobosi*, proporciona estos mismos hábitats: fisuras verticales y plataformas horizontales de rocas desnudas. Así, nos encontramos con que las preferencias de hábitat y la forma de la concha aparecen estrechamente relacionadas en *Iberus*, género en el que los caracoles de conchas angulosas y aplanadas viven siempre en ambientes áridos o semi-áridos en montañas de naturaleza cárstica del sudeste de Andalucía. Estos caracoles encuentran refugio dentro de estrechas y profundas fisuras verticales para protegerse del sol y del viento durante los secos periodos, cuando reposan aletargados disminuyendo sus actividades fisiológicas al mínimo (Alonso e Ibáñez, 1978; Moreno-Rueda, 2006), condición en que pueden sobrevivir durante años en espera de tiempos lluviosos. Por el contrario, los caracoles de conchas redondeadas más cercanos filogenéticamente viven en zonas de sustrato arcilloso, donde pueden enterrarse para su reposo cuando las condiciones ambientales son muy secas. Los moluscos terrestres son muy susceptibles a la deshidratación, especialmente en un ambiente tan árido como el sureste de Andalucía. De acuerdo con López-Alcántara et al. (1983; 1985) y (Moreno-Rueda, 2002; 2007), las conchas aplanadas en *Iberus* son consideradas una adaptación morfológica para poder acceder al interior de fisuras rocosas donde los caracoles están protegidos contra la deshidratación y contra los depredadores cuando están inactivos.

Los moluscos terrestres también nos permiten conocer los movimientos expansivos y regresivos de las poblaciones de fauna en relación a los cambios climáticos ocurridos en épocas pasadas. El segundo ejemplo de los estudios que estamos realizando con caracoles terrestres es el referente al género *Pyrenaearia* (Figura 14). Las especies que integran este género habitan exclusivamente en la Península Ibérica y varias de ellas están catalogadas como especies amenazadas (Gómez-Moliner et al., 2001). Todas ellas habitan exclusivamente en los sistemas montañosos de la región Pirenaico-cantábrica, en las sierras situadas en las proximidades de la costa catalana

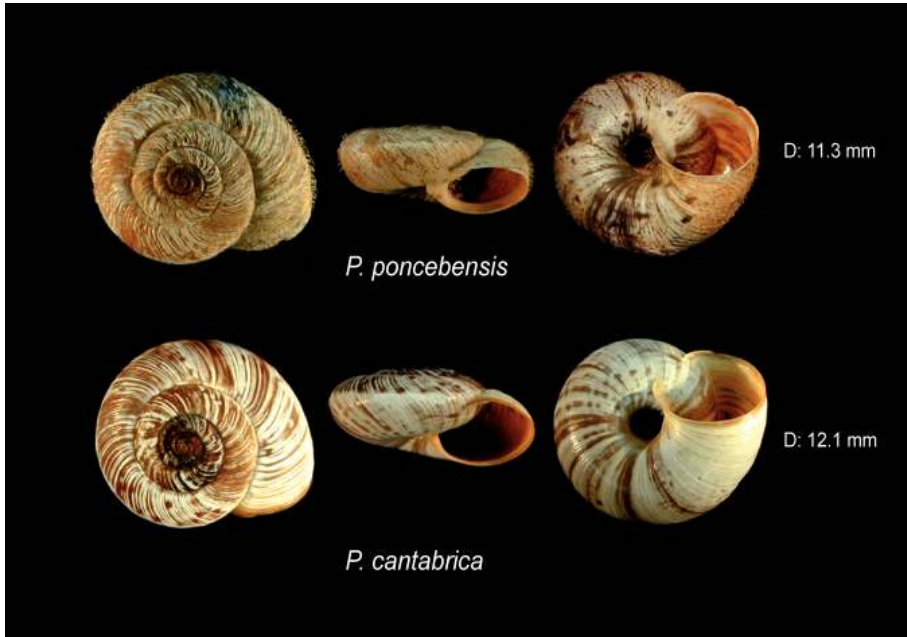


Figura 14. Fotografías de las conchas de dos morfoespecies de *Pyrenaearia* de las montañas cantábricas. *P. poncebensis* ha sido tradicionalmente considerada como especie diferente por la presencia de pequeños pelos de material proteico que recubren su concha. Los estudios filogenéticos han demostrado que este carácter aparece como una adaptación ecológica a vivir en paredes calcáreas no iluminadas por el sol. Por ello hemos invalidado *P. poncebensis* como especie propia, incluyendo este nombre en la sinonimia de *P. cantabrica*.

(sierras Pre-litorales de Cataluña), así como en el macizo del Moncayo, única localidad en la que habita dentro del Sistema Ibérico. Preferentemente viven en montañas calcáreas y en altitudes superiores a 1.000 m, debido a lo cual los integrantes de este género han sufrido un proceso de especiación particular en cada sistema montañoso.

La marcada preferencia de varias especies de *Pyrenaearia* por vivir en elevadas altitudes montañosas, ha conducido a que cada montaña se haya comportado como una isla, donde la población residente en una montaña no ha mantenido contactos con poblaciones existentes en otras montañas, con los valles actuando como barreras a la migración de individuos entre diferentes sistemas montañosos. Este aislamiento ha conducido a que en cada sistema montañoso haya tenido lugar un proceso de especiación particular, de forma similar a lo que ocurre en las especies que habitan en un archipiélago de islas, separadas entre sí por amplias zonas marinas. Este proceso múltiple de especiación insular ha tenido lugar tanto en los fondos de algunos valles (en altitudes de 300-500 m) como en las cotas más altas de varios macizos montañosos (entre 1.000 y 2.500 m de altitud).

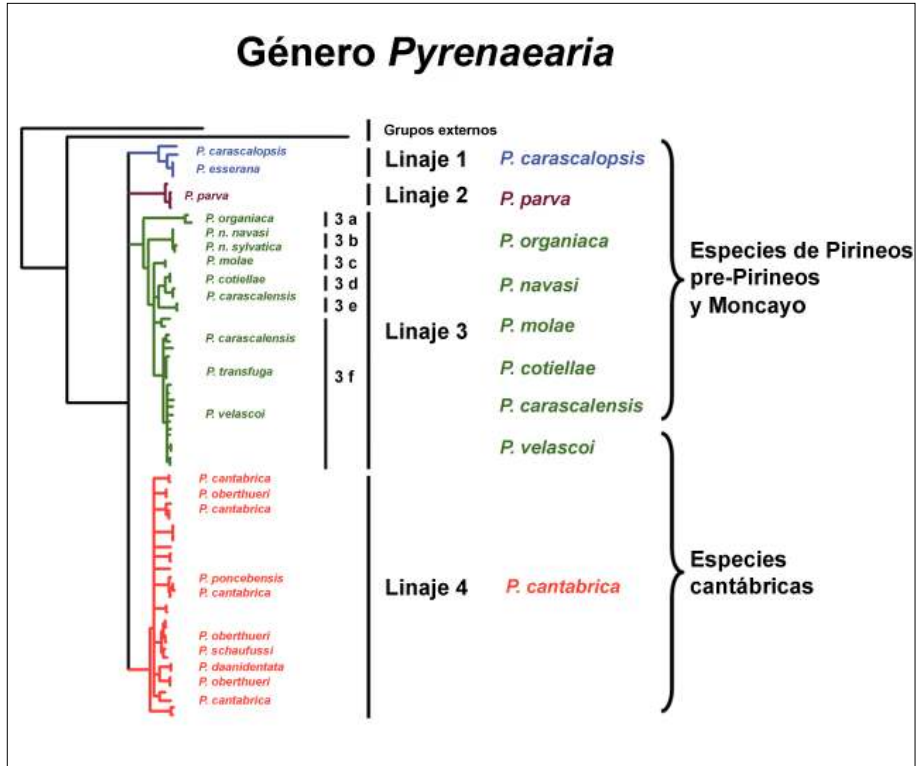


Figura 15. Representación de los linajes evolutivos identificados para *Pyrenaearia*. Existen cuatro grupos principales: 1- *P. cantabrica* que se extiende por la cordillera Cantábrica, desde Asturias hasta Navarra; 2- Grupo del complejo *P. carascalensis* que se extiende por el eje central de los Pirineos, desde Huesca a Navarra, alcanzando los Montes Vascos en la cordillera Cantábrica (*P. velascoi*) y el Moncayo (*P. navasi*); 3- *P. carascalopsis*, presente en una pequeña región de los Pirineos axiales, en la zona fronteriza entre Huesca y Lleida; 4- *P. parva*, restringida al pre-Pirineo oriental.

Al igual que en el caso de *Iberus*, el primer paso ha consistido en corroborar, mediante estudios de secuenciación del ADN, la validez de las especies tradicionalmente descritas en función de la morfología, así como en determinar sus relaciones filogenéticas. Una vez resuelta esta cuestión, hemos podido estudiar cómo ha ocurrido su especiación y su dispersión geográfica en relación con las últimas glaciaciones ocurridas durante el Pleistoceno (último millón de años).

Los resultados de nuestros estudios filogenéticos reflejan la existencia de cuatro linajes o agrupaciones principales dentro de *Pyrenaearia* (Figura 15), separados entre sí por valores de divergencia genética comprendidos entre el 6% y el 10%. Estos porcentajes nos dicen cómo de diferentes son entre sí dos secuencias de ADN. Así, una divergencia genética del 10% nos indica que el 90% de la secuencia de ADN es idéntica entre dos especies y

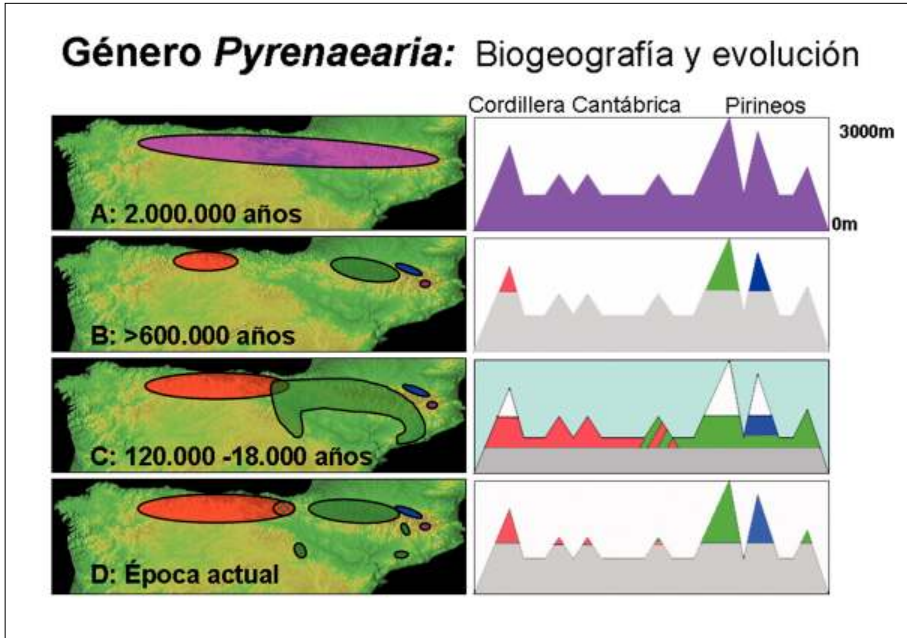


Figura 16. Representación esquemática y simplificada de los desplazamientos geográficos ocurridos en el género *Pyrenaearia*, como resultado de los sucesivos periodos de enfriamiento y calentamiento ocurridos durante las cuatro grandes glaciaciones del final del Pleistoceno (últimos 600.000 años). La mayor parte de las especies de *Pyrenaearia* están adaptadas a las frías condiciones climatológicas de las cumbres de las montañas, habitando por encima de 1.000 m de altitud en la actualidad.

A: En un primer momento, hace unos 2.000.000 de años, el género se distribuía por toda la región Pirenaico-cantábrica comprendiendo probablemente una única especie.

B: Durante los periodos templados que precedieron a la primera glaciación (Günz, hace unos 600.000 años), varias poblaciones quedaron aisladas en las cumbres más elevadas, iniciando un proceso de especiación por aislamiento geográfico. Ello condujo a la aparición de, al menos, *P. cantabrica*, *P. carascalensis*, *P. carascalopsis* y *P. parva*.

C: Durante la última glaciación (Würm, 120.000 - 18.000 años), las cumbres más altas quedaron cubiertas de hielos perpetuos, por lo que las especies que habían permanecido aisladas tuvieron que emigrar a cotas más bajas, lo que permitió recolonizar territorios más amplios y llegar a establecer reconexiones entre especies que en los periodos previos estuvieron aisladas, tal y como sabemos que ha ocurrido con *P. velascoi* (especie perteneciente al complejo pirenaico *P. carascalensis*) y *P. cantabrica* en los Montes Vascos. Estos procesos de aislamiento y reconexión se han venido sucediendo repetidamente durante las cuatro últimas glaciaciones y periodos templados interglaciales del Pleistoceno.

D: Las temperaturas más cálidas que siguieron al último máximo glacial (desde hace 18.000 años hasta la actualidad), han tenido como consecuencia la desaparición de la mayor parte de las especies del género en cotas inferiores a los 800 m de altitud, lo que ha conducido a otro nuevo aislamiento de las poblaciones de cada especie de *Pyrenaearia* en las cumbres de los principales montes. Desde entonces estamos asistiendo a un nuevo proceso de especiación por aislamiento, donde cada cumbre montañosa se comporta como una isla para cada población.

el 10% restante es diferente. Para algunos caracoles terrestres se ha calculado que el 1% de divergencia genética entre dos poblaciones se obtiene tras 100.000 años de aislamiento entre ellas (Thomaz et al., 1996; Hayasi y Chiba, 2000). Si utilizamos dicha proporción, tendríamos que la separación entre los cuatro linajes principales se habría producido hace entre 600.000 y 1.000.000 de años, durante el Pleistoceno. En consecuencia, la separación entre los cuatro linajes basales de *Pyrenaearia* ha sido, probablemente, anterior al inicio de las glaciaciones del Pleistoceno, de forma similar a como ha sido propuesto para otros grupos animales (Hewitt, 1996; Taberlet et al., 1998).

Por otro lado, los valores de divergencia genética obtenidos dentro del linaje 3 fueron de entre el 2,2% y el 5,5%. Según estos valores de divergencia y aplicando la misma tasa de divergencia, la separación entre los seis subgrupos existentes dentro del linaje 3 (grupos 3 a-f de Figura 15) habría podido tener lugar durante las glaciaciones y periodos interglaciales del Pleistoceno, a partir de la glaciación de Günz, hace aproximadamente unos 600.000-500.000 años, hasta la última glaciación de Würm (iniciada hace 150.000 años). Según estos valores, la especiación dentro de los cuatro linajes filogenéticos principales de *Pyrenaearia* debe haber ocurrido durante los ciclos de enfriamiento y calentamiento ocurridos como consecuencia de las glaciaciones del Pleistoceno, que han sido particularmente intensos durante los últimos 600.000 años.

Durante las glaciaciones del Pleistoceno, las poblaciones de *Pyrenaearia*, adaptadas a las frías condiciones de las cimas de las montañas, tuvieron que migrar desde las cumbres donde permanecieron refugiadas en los periodos templados interglaciales, hacia altitudes inferiores en los valles de la región Cantabro-Pirenaica y del valle del Ebro, obligadas por las nieves perpetuas que cubrieron las cumbres montañosas (Figura 16). En algunos casos, este desplazamiento hacia altitudes inferiores permitió expansiones del rango de distribución de las especies adaptadas a condiciones climáticas frías. Como resultado de tales expansiones, las poblaciones que habían estado aisladas durante los cientos de miles de años que duraron las épocas templadas interglaciales, volvieron a contactar entre sí. Estos nuevos contactos, o contactos secundarios, reunieron a linajes que habían sufrido procesos evolutivos independientes debido a su prolongado aislamiento durante los periodos templados). La presencia de linajes pirenaicos (*Pyrenaearia velascoi*) en los Montes Cantábricos obedece al último de estos procesos expansivos, iniciado hace 150.000 años (inicio del enfriamiento de la última glaciación, Würm). Por el contrario, durante los periodos interglaciales, más templados, los rangos de distribución geográfica fueron haciéndose más pequeños, quedando limitados a refugios interglaciales situados mayoritariamente en las cumbres montañosas, donde nuevamente se produjeron sucesos de especiación insular. El proceso de especiación más reciente en *Pyrenaearia* se ha iniciado con la última deglaciación, habiendo comenzado aproximadamente hace unos 16.000 años, de forma que el calentamiento ocurrido desde el último máximo glacial (Würm 18.000 años) ha provocado la reducción en el rango de distribución de las especies de afinidades subalpinas y su consi-

guiente aislamiento en los principales sistemas montañosos, situación que podemos observar hoy al analizar la distribución actual de las especies y poblaciones del género.

Resumiendo, los caracoles terrestres nos sirven como modelo para conocer cómo tiene lugar la evolución. Los estudios del genoma permiten comparar las especies descritas en función de la forma de la concha (morfoespecies) con los linajes identificados mediante las secuencias del ADN (especies filogenéticas). Estos estudios de filogenia molecular nos permiten identificar especies gemelas, diferentes genéticamente pero muy similares en su forma, previamente ignoradas. Al mismo tiempo, son utilizados para comprobar la validez de morfoespecies distintas. Otra aplicación de estos estudios consiste en determinar el grado de parentesco entre especies diferentes, tras lo que podemos analizar cómo ha ocurrido la evolución morfológica de un conjunto de organismos. También utilizamos los caracoles terrestres como modelo para conocer cómo ha ocurrido su dispersión geográfica y reconstruir su historia en función de los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno, especialmente a lo largo de las últimas cuatro grandes glaciaciones iniciadas hace unos 600.000 años.

4. LOS ESTUDIOS NO INVASIVOS DE FAUNA: LA MARTA EUROPEA

La marta europea (*Martes martes*) es un mamífero del orden de los carnívoros, de mediano tamaño y muy estrechamente ligado a masas forestales bien conservadas. Constituye un ejemplo de la utilidad de los estudios genéticos no-invasivos como método de seguimiento de especies amenazadas y de difícil detección visual.

Las técnicas de biología molecular aplicadas sobre muestras obtenidas mediante muestreos no-invasivos, hacen referencia a una metodología de muestreo mediante la cual el ADN se obtiene sin necesidad de capturar, dar muerte o molestar al animal (Taberlet y Luikart 1999). Como materiales fuente de ADN pueden utilizarse pelos o plumas recogidos en el campo o, más habitualmente, excrementos que siempre contienen restos de células intestinales del propio animal que ha depositado ese excremento. Estos métodos suponen una importante ventaja en el estudio de especies elusivas, raras o amenazadas, en las que la obtención de muestras mediante la captura (técnicas invasivas) no es factible o es perjudicial para la especie. Los carnívoros, por su difícil detección visual, son uno de los grupos taxonómicos más estudiados mediante las técnicas no invasivas de recolección de muestras. Así, actualmente son metodologías que se han generalizado para hacer seguimientos de osos (Bellemain y Taberlet 2004), lobos (Lucchini et al. 2002), gatos silvestres (Palomares et al. 2002), lince ibérico (Alda et al., 2008) y mustélidos, entre otros. Es esta última familia de los mustélidos a la que pertenece la marta europea.

La Marta (*Martes martes*) es un carnívoro estrictamente forestal cuyas poblaciones presentan una distribución espacial discontinua como resultado

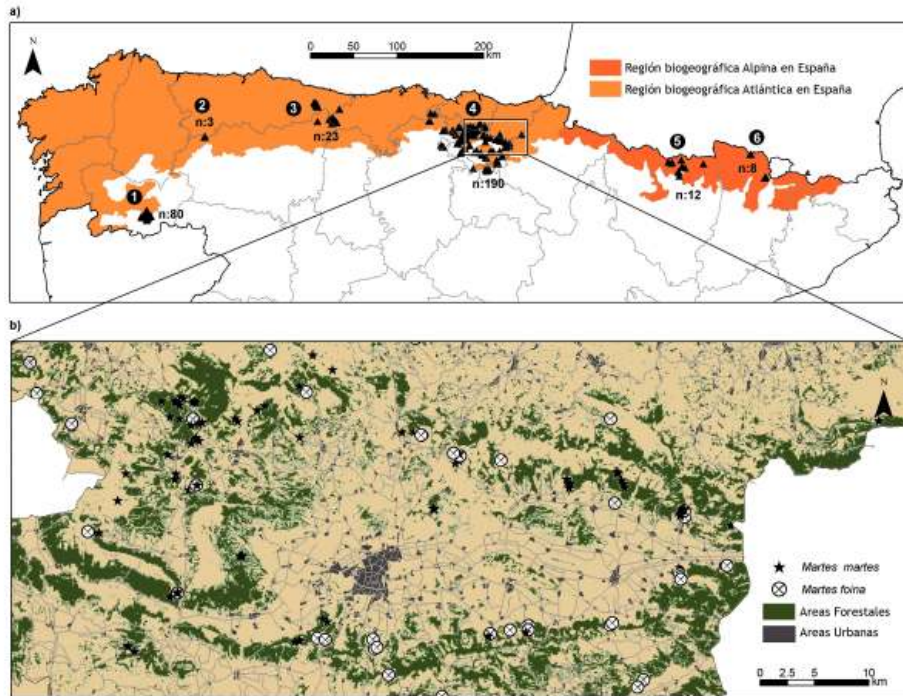


Figura 17: a) Área de distribución potencial de la marta, mostrando la localización de las seis poblaciones de esta especie que se están utilizando para analizar la conectividad del paisaje sobre esta especie estrictamente forestal. b) Detalle de las muestras que se están analizando procedentes de los dos pasillos forestales transversales (en verde) más importantes del País Vasco: Gorbea-Aralar al norte y Sierra de Árcamo-Urbasa al sur. El núcleo urbano principal corresponde a Vitoria. Estos dos pasillos forestales juegan un papel fundamental en la conectividad de poblaciones de especies forestales entre la Cordillera Cantábrica y los Pirineos. Las estrellas negras representan las identificaciones de marta (*Martes martes*) y los círculos blancos las de garduña (*Martes foinea*). Las muestras se han identificado a partir del ADN extraído de excrementos recogidos en el campo (muestréos no invasivos).

del proceso de fragmentación a que se han visto sometidos los bosques en toda la región cántabro-pirenaica. Posee, además, una capacidad de dispersión limitada y se trata por tanto de una especie sensible a las distancias a recorrer entre las manchas forestales disponibles y a las resistencias que oponen los diferentes usos del suelo (infraestructuras viarias, cultivos, urbanizaciones, etc.) al desplazamiento de los individuos. Debido a su ecología se considera una especie indicadora de la capacidad de las especies estrictamente forestales para desplazarse entre los fragmentos de bosques, hábitat del que depende.

Una de las principales consecuencias de la fragmentación del hábitat es una disminución en la conectividad, es decir, de la facilidad con la que los individuos de una población pueden desplazarse entre los fragmentos

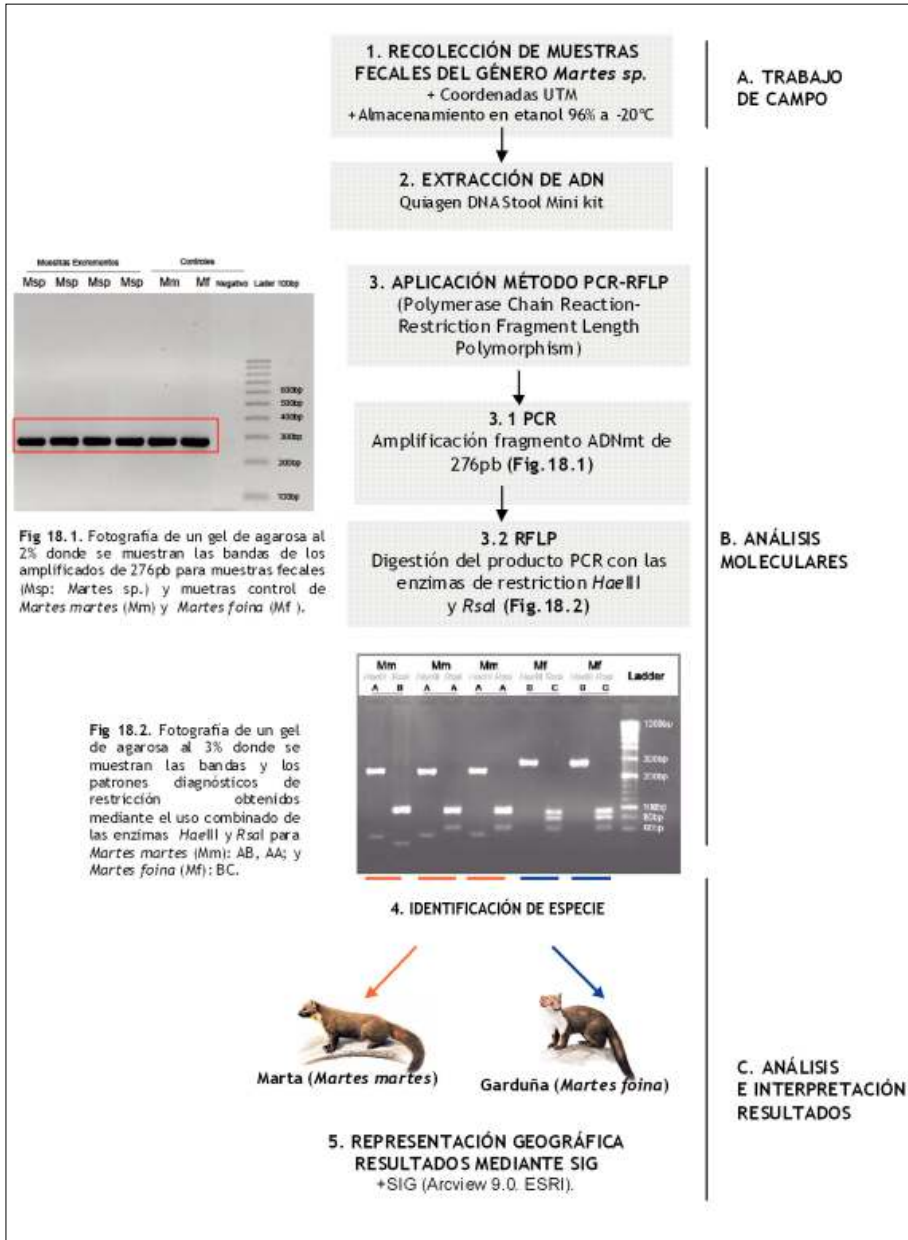


Figura 18. Esquema representativo de la metodología utilizada en los análisis de muestras fecales (muestreos no invasivos) de marta y garduña.

del hábitat del que dependen, en el caso de la marta, las áreas forestales. Consecuentemente, la capacidad de migración de los individuos y, en particular, su facultad para dispersarse, puede verse alterada por la fragmentación (Coulon et al. 2004). Esta alteración puede tener dramáticas consecuencias en las poblaciones, en parte debido a la dificultad de que los individuos de una especie se desplacen desde un fragmento de hábitat bien conservado a otro. La reducción de individuos migrantes entre poblaciones, conduce a una mayor endogamia y a una pérdida de diversidad genética dentro de los fragmentos (Frankham et al. 2002).

El grado de aislamiento de las poblaciones forestales como consecuencia del efecto de la fragmentación del hábitat puede ser analizado mediante la cuantificación del grado de diferenciación genética entre poblaciones. Para ello podemos utilizar algunas técnicas de estudio del ADN (ver Figuras 3-5: secuenciación de ADN, PCR-RFLP, microsatélites). Estas mismas técnicas pueden aportar información sobre los movimientos migratorios preferentes de los individuos (Rousset, 2001), lo que permitirá evaluar la utilización de las zonas teóricas de máxima conectividad para especies forestales, previamente establecidas por las propias características del paisaje (IKT, 2005). Este trabajo constituye una línea de investigación dentro del novedoso campo de "Genética del Paisaje (*Landscape Genetics*)", estudios que relacionan la estructura espacial de los patrones genéticos (aislamiento de poblaciones por distancia geográfica, barreras a la migración y al flujo genético entre poblaciones, deriva genética, consanguinidad, etc.) con variables paisajísticas (Manel et al. 2003).

La genética del paisaje es una valiosa herramienta para el estudio de la conectividad entre fragmentos del hábitat, permitiendo analizar en qué grado el paisaje facilita o dificulta los desplazamientos de la fauna. Este estudio se encuentra actualmente en realización, utilizando como fuente de ADN muestras no-invasivas, relativamente accesibles gracias al comportamiento de la marta de marcar el territorio con sus excrementos. El ámbito territorial de estudio abarca la totalidad de la cordillera Cantábrica y Pirineos, desde Galicia hasta Cataluña (Figura 17-a), con un mayor enfoque al papel del pasillo vasco-navarro (ejes montañosos transversales) que conecta ambos sistemas montañosos (Figura 17-b).

Una primera dificultad que tuvimos que resolver fue la de poder determinar con seguridad que los excrementos recogidos pertenecían a la marta y no a su congénere la garduña (*Martes foina*). La garduña es una especie de hábitos más generalistas y cohabita con la marta en los ámbitos forestales. Para ello, hemos desarrollado un método de discriminación, mediante PCR-RFLP entre los excrementos de ambas especies (método detallado en la Figura 18), indistinguibles por su forma u olor, y que nos ofrece una fiabilidad del 100% (Ruiz-González et al. 2008). El método desarrollado permite, además, discriminar los excrementos de ambos mustélidos con respecto a los excrementos de cualquier otro carnívoro, como zorros, gatos, jinetas, etc.

Con esta técnica esperamos poder determinar la estructuración genética de las poblaciones de marta, estudiar las interacciones entre la marta y la

garduña en las zonas en las que cohabitan, y evaluar la influencia de la estructura del paisaje sobre las posibilidades de desplazamiento de la marta entre los fragmentos forestales, entre otras. La aplicación de estos conocimientos a casos concretos como el de la marta permitirá una mejor gestión de las especies forestales.

A modo de resumen de esta sección, la marta europea es una especie indicadora del efecto de la fragmentación forestal sobre especies propias de bosques bien conservados. Los estudios del ADN extraídos de los excrementos con que marcan sus territorios (muestreos no invasivos) nos están permitiendo delimitar su área de distribución, una de las peor conocidas de los vertebrados ibéricos. Además, queremos estudiar el uso que hace del hábitat y su interacción con la garduña, especie más generalista, principalmente en aquellas zonas donde ambas especies coexisten. Por otro lado, queremos estudiar la organización espacial de las poblaciones de marta y la diferenciación genética de las mismas. Con esta información estamos procediendo a evaluar la influencia de las características del paisaje sobre las posibilidades de desplazamiento de los animales forestales. Las variables analizadas incluyen la distancia entre bosques y las características de los territorios situados entre las manchas forestales, con diferente grado de permeabilidad para el paso de fauna, así como la presencia de infraestructuras viarias. Nuestro ámbito de trabajo con esta especie se circunscribe a la totalidad de la cordillera Cantábrica y Pirineos, centrándonos en los sistemas montañosos transversales del País Vasco y Navarra como ejes conectores entre ambas cordilleras.

5. CONCLUSIÓN

Como acabamos de ver, las herramientas moleculares pueden aportar mucha información en el conocimiento de las poblaciones de especies salvajes, siendo complementarias de otros métodos más clásicos de investigación. Las principales ventajas de los estudios moleculares son: a) que ofrecen información de una manera relativamente rápida, si bien, en muchos casos, exige desarrollar técnicas específicas para estudiar una especie determinada; b) que permite utilizar métodos no invasivos para hacer un seguimiento de las especies más amenazadas.

Entre las aplicaciones de los estudios del genoma a la gestión y conservación de la biodiversidad, podemos destacar las siguientes:

1. Preservar el legado que la evolución ha ido generando hasta la actualidad: Estudios de filogenia, de biogeografía y de los procesos de evolución y especiación, así como de delimitación de unidades evolutivamente significativas.
2. Mantener la diversidad genética o polimorfismo de las poblaciones: Estudios de fragmentación y aislamiento de poblaciones, de diferenciación genética interpoblacional y de pérdida de variabilidad genética, así como de identificación de casos de endogamia.

3. Conservar las especies y unidades evolutivamente significativas: Apoyar los programas de cría en cautividad de especies amenazadas e identificar y cuantificar los problemas de hibridación y de introgresión genéticas.

5.1. Entidades financiadoras y colaboradores

Los trabajos que quedan reflejados en este capítulo han sido posibles gracias a la financiación concedida por diferentes entidades, así como a la colaboración de numerosas personas que nos han ayudado en la obtención de las muestras. Entre las primeras podemos citar al Ministerio de Medio Ambiente, a las tres Diputaciones Forales de la Comunidad Autónoma Vasca, al Gobierno Vasco, Gobierno de Navarra, Gobierno de La Rioja y la Universidad del País Vasco. Gran parte de la financiación ha sido recibida a través de diferentes proyectos: Europeos (LIFE 00/NAT/E7229; LIFE 00/NAT/E7331, LIFE 00/NAT/E7335), del Ministerio de Educación y Ciencia (REN2002-00716/GLO; CGL2005-01966/BOS) y de la Universidad del País Vasco (00076.125-EA-7876/2000; 00076.310-E-15256/2003; GIU06/09). Los estudios de marta europea se encuadran dentro de un proyecto Universidad-Empresa, en colaboración con IKT, financiado por la UPV/EHU y el Departamento de Biodiversidad del Gobierno Vasco. Queremos expresar nuestro agradecimiento a las numerosas personas que nos han ayudado en la recolección de muestras, especialmente al servicio de guardería de los Parques Nacionales de Picos de Europa, de Ordesa y Monte Perdido y de Aigües Tortes i Estany de Sant Maurici; a los Servicios de Guardería de las Diputaciones de la CAV y de los Gobiernos de Navarra y La Rioja; al personal de la Asociación Visión Europeo, al grupo de "Estudio de Recursos Faunísticos en ríos de Bizkaia, UPV/EHU" dirigido por la Dra. Ana Rallo, a D. Ramiro Asensio de la Federación de Pesca de Álava, al personal de Ekolur y a otras muchas personas que de forma particular nos han aportado material para nuestros análisis.

BIBLIOGRAFÍA

- ALDA, F.; INOGÉS, J.; ALCARAZ, L.; ORIA, J.; ARANDA, A.; DOADRIO, I. "Looking for the Iberian lynx in central Spain: a needle in a haystack?" *Animal Conservation* 11: 297-305, 2008.
- ALONSO, M.R.; IBÁÑEZ, M. "El género *Iberus* Montfort 1810 (Pulmonata: Helicidae)". 1 *Iberus rositai* Fez 1950. *Archiv für Molluskenkunde* 108:185-192, 1978.
- AVISE, J.C. *Molecular markers, natural history, and evolution*. New York: Chapman and Hall, 1994.
- AVISE, J.C. *Phylogeography. The history and formation of the species*. Cambridge MA: Harvard University Press, 2000.
- BELLEMAIN, E.; TABERLET, P. "Improved non invasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) feces". *Molecular Ecology Notes* 4: 519-522, 2004.

- CABRIA, M.T.; GONZÁLEZ, E.G.; GÓMEZ-MOLINER, B.J.; ZARDOYA, R. "Microsatellite markers for the endangered European mink (*Mustela lutreola*) and closely related mustelids". *Molecular Ecology Notes* 7:1185-1188, 2007.
- COULON, A.; COSSON, J.F.; ANGIBAULT, J.M.; CARGNELUTTI, B.; GALAN, M.; MORELLET, N.; PETIT, E.; AULAGNIER, S.; HEWISON, A.J.M. "Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach". *Molecular Ecology* 13, 2841-2850, 2004.
- DARWIN, C. *El origen de las especies mediante la selección natural*. John Murray. Londres, 1859.
- DAVISON, A. "Mustelids in a molecular world". *Small Carnivore Conservation* 23: 15-16, 2000.
- DELIBES, M. *Vida. La naturaleza en peligro*. Ed. Temas de hoy, 2001.
- ESHBAUGH, W.H. "Systematics Agenda 2000: an historical perspective". *Biodiversity and Conservation* 4: 455-46, 1995.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- GÓMEZ-MOLINER, B.J.; MORENO, D.; ROLÁN, E.; ARAUJO, R.; ÁLVAREZ, R.M. *Protección de moluscos en el catálogo nacional de especies amenazadas*. Reseñas Malacológicas X.I. Sociedad Española de Malacología, 2001.
- HAYASHI, M.; CHIBA, S. "Intraspecific diversity of mitochondrial DNA in the land snail *Euhadra peliomphala* (Bradybaenidae)". *Biological Journal of The Linnean Society*, 81: 417-425, 2000.
- HEWITT, G.M. "Post-glacial re-colonization of European biota". *Biological Journal of The Linnean Society*, 68: 87-112, 1999.
- IBÁÑEZ, M.; ALONSO, M.R. "El género *Iberus* Montfort 1810 (Pulmonata: Helicidae)". 2 *Iberus cobosi* n sp. *Archiv für Molluskenkunde* 108:193-200, 1978.
- IKT, S.A. *Red de Corredores Ecológicos de la Comunidad Autónoma de Euskadi*. Vitoria-Gasteiz: Dirección de Biodiversidad del Gobierno Vasco, 2005.
- IUCN Guidelines for re-introductions*. IUCN/SSC. Re-troductions Specialist Group. IUCN. Gland Suisse and Cambridge, 1998.
- Ley 42/2007. Ley de 13 de diciembre del Patrimonio Natural y la Biodiversidad. BOE núm. 229: 51275-31327.
- LÓPEZ-ALCÁNTARA, A.; RIVAS, P.; ALONSO, M.R.; IBÁÑEZ, M. "Origen de *Iberus gualtierianus*. Modelo evolutivo". *Haliotis* 13:145-154, 1983.
- LÓPEZ-ALCÁNTARA, A.; RIVAS, P.; ALONSO, M.R.; IBÁÑEZ, M. "Variabilidad de *Iberus gualtierianus* (Linneo, 1758) (Pulmonata, Helicidae)". *Iberus* 5: 83-112, 1985.
- LUCCHINI, E.; FABBRI, E.; MARUCCO, F.; RICCI, S.; BOITANI, L.; RANDI, E. "Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps". *Molecular Ecology* 11:857-868, 2002.
- MANEL, S.; SCHWARTZ M.K.; LUIKART G.; TABERLET, P. "Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics". *Tree* 18(4):189-197, 2003.
- MAÑAS, S.; CEÑA, J.C.; RUIZ-OLMO, J.; PALAZÓN, S.; DOMINGO, M.; WOLFINBARGER, J.B.; BLOOM, M.E. "Aleutian mink disease parvovirus in wild riparian carnivores in Spain". *Journal of Wildlife Disease* 37(1): 138-144, 2001.

- MORENO-RUEDA, G. "Selección de hábitat de *Iberus gualtierianus*, *Rumina decollata* y *Sphincterochilla candidissima* (Gastropoda: Pulmonata) en una sierra del sureste español". *Iberus* 20:55-62, 2002.
- MORENO-RUEDA, G. "Habitat use by the arid-dwelling land snail *Iberus g. gualtierianus*". *Journal of Arid Environment*, 67:336-342, 2006.
- MORENO-RUEDA, G. "Refuge selection by two sympatric species of arid-dwelling land snails: different adaptive strategies to achieve the same objective". *Journal of Arid Environment*, 68:588-598, 2007.
- PALAZÓN, S. *Distribución, morfología y ecología del visón europeo (Mustela lutreola Linnaeus, 1761) en la Península Ibérica*. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, 1997.
- PALOMARES, F.; GODOY, J.A.; PIRIZ, A.; O'BRIEN, J.; JOHNSON, W.E. "Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx". *Mol Ecol.* 11, 2171–2182, 2002.
- RUIZ-GONZÁLEZ, A.; RUBINES, J.; BERDIÓN, O.; B.J., GÓMEZ-MOLINER. "A non-invasive genetic method to identify the sympatric mustelids pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*): preliminary distribution survey on the northern Iberian Peninsula". *European Journal of Wildlife Research*, 54: 253–261, 2008.
- SUÁREZ, J.; BAUTISTA, J.M.; ALMODÓVAR, A.; MACHORDOM, A. "Evolution of the mitochondrial control region in Palaeartic brown trout (*Salmo trutta*) populations: The biogeographical role of the Iberian Peninsula". *Heredity* 87: 198-206, 2001.
- TABERLET, P.; WAITS, L.P.; LUIKART, G. "Noninvasive genetic sampling: look before you leap". *Tree* 14, 323–327, 1999.
- TAYLOR, P.D.; FAHRIG, L.; HENEIN, K.; MERRIAM, G. "Connectivity is a vital element of landscape structure". *Oikos* 68 (3), 571-573, 1993.
- THOMAZ, D.; GUILLER, A.; CLARKE, B. "Extreme divergence of mitochondrial DNA within species of pulmonate land snails". *Proceedings Royal Society London B* 266: 75-83, 1996.