

Análisis molecular de *Sciurus vulgaris hoffmanni* Valverde, 1967 (Rodentia: Sciuridae) e implicaciones para su conservación.

José Manuel Lucas & José Galián

Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España.

Resumen

Correspondencia

J.M. Lucas

E-mail: lucas@um.es

Recibido: 24 julio 2009

Aceptado: 27 de julio de 2009

Publicado on-line: 4 noviembre 2009

La población de ardilla roja de Sierra Espuña (Murcia) ha sido descrita como la subespecie *Sciurus vulgaris hoffmanni* en base a sus características morfológicas, su biología y su distribución. En este estudio se ha analizado un fragmento de la región control del ADN mitocondrial de dicha población y de otras poblaciones peninsulares. Estos datos se han analizado con el objetivo de determinar las peculiaridades genéticas de *S. v. hoffmanni* y su correspondencia con las peculiaridades ya reconocidas tanto morfológicas como ecológicas, así como la valoración de su estatus taxonómico de cara a la conservación. Los resultados indican la existencia de un solo haplotipo mitocondrial para Sierra Espuña, el cual no se ha observado en ninguna otra de las poblaciones analizadas. La diferenciación genética significativa ($F_{ST}=0,710$) y la situación de monofilia recíproca respecto a las poblaciones peninsulares permiten considerar a la población de Sierra Espuña como una unidad de manejo.

Palabras clave: Unidades de manejo, subespecies, conservación, estructura poblacional, ADN mitocondrial, *Sciurus vulgaris*.

Abstract

Molecular analysis of Sciurus vulgaris hoffmanni Valverde, 1967 (Rodentia: Sciuridae) and implications for its conservation.

The population of red squirrel from Sierra Espuña (Murcia) has been considered as the subspecies *Sciurus vulgaris hoffmanni* based on their morphology, biology and distribution. In this study a fragment of the control region of the mitochondrial DNA has been analyzed for this population together with other Iberian populations. These data have been analyzed with the objective of determining the genetic peculiarities of *S. v. hoffmanni* and their correspondence with the morphological and ecological peculiarities already described, as well as to evaluate its taxonomic status for conservation. The data indicate the existence of a single mitochondrial haplotype in the population of Sierra Espuña, which has not been observed in any other Iberian population. Significant genetic differentiation ($F_{ST}=0.710$) and reciprocal monophyly with respect to the peninsular populations allow to consider the population of Sierra Espuña as a Management Unit.

Key words: Management Unit, subspecies, conservation, population structure, mitochondrial DNA, *Sciurus vulgaris*, Spain.

Introducción

La familia Sciuridae, compuesta por 278 especies (Thorington & Hoffmann 2005), presenta actualmente problemas taxonómicos cuya resolución es fundamental para el conocimiento y conservación de los diferentes grupos. Desde los trabajos de Mercer & Roth (2003), Steppan et al. (2004) y Herron et al. (2004) ha quedado probada la necesidad de llevar a cabo un estudio más completo y exhaustivo a niveles más profundos de la familia. De esta manera, la clarificación de los niveles subespecíficos, los más desconocidos actualmente, es una tarea necesaria que permitirá estudiar la conservación de las diferentes subespecies, entendiendo como subespecie un agregado de poblaciones que habitan en una subdivisión geográfica del margen de la especie y que difieren en diversas características de otras poblaciones de la misma (Mayr & Ashlock 1991), representando además un linaje evolutivo diferenciado (Templeton 1998).

En este contexto, el uso de herramientas moleculares constituye un complemento a los métodos clásicos de clasificación morfológica, permitiendo el estudio de tantos caracteres como bases presente la secuencia de ADN a comparar, lo que implica por tanto el muestreo de un universo muchísimo más amplio de caracteres, comparado con el conjunto normalmente reducido de caracteres morfológicos, anatómicos, o ultraestructurales disponibles (De Luna et al. 2005). Más concretamente, el uso de ADN mitocondrial resulta muy apropiado para estudiar la historia evolutiva reciente de los organismos, debido a sus características estructurales y funcionales. Por esta razón, se ha empleado con frecuencia la región control o *D-Loop* del ADN mitocondrial a estos efectos, para la familia Sciuridae (Barratt et al. 1999, Trizio et al. 2005, Hale et al. 2004). Para ello, es común el análisis de haplotipos (configuraciones concretas de una secuencia), lo cual presenta la ventaja adicional de poder reconstruir las relaciones filogenéticas o genealógicas de los organismos, obteniendo mucha más información que con el mero análisis de frecuencias alélicas.

En Europa, el panorama subespecífico de la ardilla roja europea *Sciurus vulgaris*, una especie ampliamente distribuida por todas las regiones forestales Paleárticas desde la península Ibérica hasta la de Kamchatka (Thorington & Hoffmann

2005), es bastante incierto. No obstante, Corbet (1978) y Lurz et al. (2005) reconocen la existencia de 17 subespecies en Europa. Según estos autores, en la península Ibérica podemos encontrar 3 de estas subespecies: *S. v. fuscoater* (en el norte), *S. v. infuscatus* (centro y norte) y *S. v. hoffmanni* únicamente en Sierra Espuña (sureste peninsular). Esta última no fue descrita hasta 1967, cuando Valverde estudia once ejemplares de esta nueva población. Valverde (1967) finalmente concluye en proponerla como la subespecie *S. v. hoffmanni*, en base a consideraciones sobre las características morfológicas y la biología y distribución de este esquiúrido. Sin embargo, no se ha realizado ningún trabajo posterior que pueda poner a prueba esta hipótesis. En este sentido, el empleo de técnicas moleculares puede contribuir a la clarificación taxonómica de *S. v. hoffmanni*, y ayudar a comprender mejor la relación filogenética de la peculiar población de Sierra Espuña con el resto de poblaciones, complementando la información disponible en base a criterios ecológicos, morfológicos y de coloración (Cabrera 1905, 1914, Miller 1912, Valverde 1967, Sidorowicz 1971, Corbet 1978, Ferreira & Guerreiro 2002). Asimismo, un mejor conocimiento taxonómico y genético de la subespecie será crucial para poder abordar acciones de conservación y gestión de forma adecuada.

Material y métodos

Muestreo y material biológico

Todas las muestras de ardilla roja analizadas proceden de animales encontrados muertos, en su gran mayoría atropellados (Fig. 1). Se analizaron 46 muestras de ardillas encontradas en 15 localizaciones diferentes, distribuidas en 7 comunidades autónomas (Tabla 2). Se obtuvieron ardillas completas de Sierra Espuña, Moratalla, Madrid, Sax y Almansa. Del resto de localizaciones se emplearon muestras de tejido procedentes de muslo, lengua y oreja almacenadas en etanol absoluto. Tanto las muestras de ardillas completas como las muestras de tejido conservadas en alcohol, fueron almacenadas en laboratorio a -20 °C.

Extracción de ADN

Para las muestras recibidas en etanol, se extrajo ADN total a partir de tejido muscular del muslo de la ardilla, excepto para las de Barcelona y Girona, de las que se procesó tejido de la oreja. El

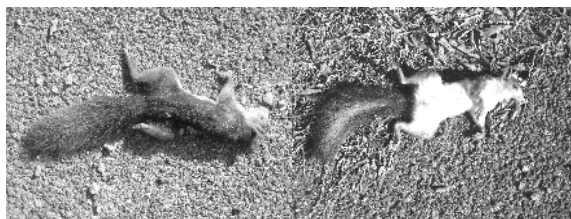


Figura 1. Ardillas atropelladas. Fotografía: Miguel Blázquez (4 de mayo de 2007).

Figure 1. Roadkill squirrels. Photograph: Miguel Blázquez (May 4, 2007).

tejido de los ejemplares completos se obtuvo en laboratorio en condiciones de esterilización, mediante la sección de fragmentos de músculo del muslo.

El ADN se ha extraído en la mayoría de las muestras usando el protocolo de purificación de ADN para tejido animal DNeasy[®] 96 Protocol (Qiagen[®]) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En algunas muestras se utilizó inicialmente el protocolo estándar de extracción con Chelex[®] (Walsh et al. 1991), colocando 2 mm² de tejido en una solución de 100 µl de Chelex al 5% y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml) e incubando la mezcla en el termociclador durante 60 minutos a 55°C, 15 minutos a 99°C, 1 minuto a 37°C y finalmente 15 minutos a 99°C para cada extracción.

Amplificación, purificación y secuenciación de ADN

Se amplificó un fragmento de la región control o *D-Loop* del ADN mitocondrial por PCR, empleando los cebadores universales de *Sciurus vulgaris* H16359 (Barratt et al. 1999) y RScont6 (Hale et al. 2004). Para la PCR se usaron cócteles preparados liofilizados puReTaq[™] Ready-To-Go[™] (PCR Beads) con un volumen de reacción de PCR de 25 µl que contenía 2,5 U de puReTaq ADN polimerasa, tampón de reacción compuesto por Tris-HCl (10 mM, pH 9 a 20°C), KCl (50 mM) y MgCl₂ (1,5 mM), 0,012 mg de BSA (*bovine serum albumin*), dNTPs 10 µl (200 µM), 0,6 µl (10 µM) de cada uno de los dos cebadores (H16359 y RScont6) y 2 µl de ADN de cada muestra. La PCR se llevó a cabo en un termociclador MJ Research thermocycler, modelo PTC-100[®], con un programa de amplificación consistente en una primera fase de desnaturalización a 96°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos (30 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C) y una fase de elongación final durante 10 minutos a 72°C. To-

dos los productos de PCR se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1,5 % y se visualizaron mediante luz ultravioleta para comprobar que la amplificación del fragmento era correcta. Asimismo los productos de PCR de las 46 muestras se purificaron según el protocolo estándar de precipitación con isopropanol y acetato amónico. Finalmente los productos purificados fueron secuenciados en ambas direcciones por el método Sanger (Sanger et al. 1977), mediante reactivos y protocolos del secuenciador automático *ABI Prism 3130* de Applied Biosystems[®] del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales de la Universidad de Murcia.

Análisis de las secuencias

Para cada muestra se obtuvo una secuencia consenso del fragmento de estudio, alineando las dos secuencias de cada una de las dos direcciones siguiendo el algoritmo Clustal W (Thompson et al. 1994). Asimismo, las 46 secuencias caracterizadas se alinearon con el mismo algoritmo para construir una matriz (alineamiento múltiple). Finalmente, las secuencias fueron colapsadas en haplotipos mediante TCS v1.21 (Clement et al. 2000). En base a los haplotipos obtenidos, se generó una matriz de distancias genéticas para las muestras procesadas (resumidas en los haplotipos descritos) con MEGA 4.0.2 (Tamura et al. 2007), con el fin de obtener información previa respecto a la relación de las secuencias entre sí. Además de las secuencias obtenidas en el presente trabajo, se incorporaron las obtenidas por Hale et al. (2004) y Finnegan et al. (2008) de otras muestras europeas (Reino Unido, Irlanda, Holanda, Suecia e Italia), correspondientes a 54 haplotipos diferentes. De la misma manera, se elaboró otra matriz que incorporaba también los haplotipos europeos.

Para el análisis de la estructura poblacional se realizó un análisis espacial de la varianza molecular (SAMOVA de sus siglas en inglés) implementado en SAMOVA 1.0 (Dupanloup et al. 2002), ejecutándose 100 procesos de “anidamiento” simulado para cada valor de K, registrándose los valores de varianza genética F_{ST} , F_{SC} y F_{CT} para cada número de grupos (K).

En cuanto al análisis filogenético, se llevaron a cabo dos análisis para el conjunto de secuencias obtenidas en este estudio más las europeas: (1) clasificación por el método del vecino más cercano (*NJ*), a partir de la matriz de distancias genéti-

cas, empleando el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2-parámetros (Kimura 1980) y (2) máxima parsimonia, implementado en PAUP 4.0 b10 (Swofford 2002), a partir del alineamiento múltiple y realizando una búsqueda heurística con 10000 réplicas mediante el algoritmo TBR (*tree bisection recollection*). Para inferir las relaciones filogenéticas con mayor precisión (dado su carácter intraespecífico), se realizó también una red de haplotipos con el programa TCS v1.21 (Clement et al. 2000), que utiliza el principio de parsimonia estadística (PE), siguiendo las conexiones más parsimoniosas con una probabilidad igual o mayor que 0,95 (95%), como describe Templeton (1992). Las conexiones ambiguas se resolvieron siguiendo predicciones derivadas del principio de coalescencia según Posada & Crandall (2001).

Resultados

Secuencias

Para cada una de las 46 muestras, se obtuvo una secuencia de 395 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial. Se encontraron 22 posiciones polimórficas y un total de 12 haplotipos diferentes (Tabla 1). Sólo uno de los 12 haplotipos (H7) se encontró en más de una localización. Todas las muestras de Sierra Espuña compartieron un único haplotipo (H1) (Tabla 2).

La matriz de distancias genéticas (entre parejas de haplotipos) se obtuvo según el modelo evolutivo Kimura-2-parámetros (Kimura 1980), implementada en el programa MEGA 4.0.2 (Tamura et

H1	ACGCCGTATAGTAGAAGGTAGA
H2	ACGCGATATGGTAGAAGATAGG
H3	ACACGGTGTAAATAGAAGGTAGA
H4	ACACGGTATAATAGAAGGTAGA
H5	ACGCGGTATGGTAGAAGGTAAA
H6	ACGCGGAATAGTAGAAGGTGGA
H7	ACGTTGTATAGTAGAAGGTAGA
H8	ATGCGGTATAGTAGAGAGTAGA
H9	ATGCGGTATAGTAGGAGGTAGA
H10	ATGCTGTACAGTGGAAAGGTGGA
H11	ATGCGGTATGGTAGAAGGTAGA
H12	GCGCGGTATAAAAAAAGGCAGA

Tabla 1. Composición de bases en las 22 posiciones polimórficas para cada uno de los 12 haplotipos mitocondriales.

Table 1. Base composition at the 22 polymorphic sites for each of the 12 mitochondrial DNA haplotypes.

HAPLOTIPO	MUESTRA	LOCALIZACIÓN (PROVINCIA)
H1	SVH1	MURCIA (SIERRA ESPUÑA)
	SVH2	
	SVH3	
	SVH4	
	SVH5	
	SVH6	
	SVH7	
	SVH8	
	SVH9	
	SVH10	
	SVH11	
	SVH12	
	SVH13	
	SVH14	
	SVH15	
	SVH16	
	SVH17	
	SVH18	
	SVH19	
	SVH20	
H2	sv1	LÉRIDA
H3	sv2	CASTELLÓN
H4	sv3	CASTELLÓN
H5	sv4	LA CORUÑA PONTEVEDRA LUGO
	sv5	
	sv6	
	sv7	
	sv10	
	sv11	
	sv15	
	sv16	
	sv17	
	sv20	
	sv21	
sv22		
H6	sv8	CANTABRIA
H7	sv9	ALBACETE
	sv13	ALICANTE
H8	sv12	MADRID
H9	sv14	LA CORUÑA
H10	sv19	LA CORUÑA
H11	sv23	GERONA
	sv25	
H12	sv27	BARCELONA
	sv29	
	sv30	

Tabla 2. Relación de haplotipos, junto con las 46 muestras que los comparten y localización (provincias) de las mismas.

Table 2. Haplotypes sample codes and sample sites of the 46 individuals of *S. vulgaris* analysed.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	AY-H11	AY-H12
H1		[0.006]	[0.005]	[0.004]	[0.004]	[0.004]	[0.004]	[0.005]	[0.004]	[0.006]	[0.004]	[0.006]	[0.008]	[0.006]
H2	0.013		[0.007]	[0.006]	[0.005]	[0.006]	[0.006]	[0.007]	[0.006]	[0.008]	[0.005]	[0.008]	[0.009]	[0.008]
H3	0.010	0.018		[0.003]	[0.006]	[0.006]	[0.006]	[0.006]	[0.006]	[0.007]	[0.006]	[0.006]	[0.008]	[0.006]
H4	0.008	0.015	0.003		[0.005]	[0.005]	[0.005]	[0.006]	[0.005]	[0.007]	[0.005]	[0.006]	[0.007]	[0.006]
H5	0.008	0.010	0.013	0.010		[0.005]	[0.005]	[0.006]	[0.005]	[0.007]	[0.004]	[0.007]	[0.008]	[0.007]
H6	0.008	0.015	0.013	0.010	0.010		[0.005]	[0.006]	[0.005]	[0.006]	[0.005]	[0.007]	[0.008]	[0.006]
H7	0.005	0.015	0.013	0.010	0.010	0.010		[0.006]	[0.005]	[0.006]	[0.005]	[0.007]	[0.008]	[0.007]
H8	0.010	0.018	0.015	0.013	0.013	0.013	0.013		[0.004]	[0.006]	[0.004]	[0.007]	[0.009]	[0.007]
H9	0.008	0.015	0.013	0.010	0.010	0.010	0.010	0.008		[0.006]	[0.004]	[0.007]	[0.008]	[0.007]
H10	0.013	0.023	0.021	0.018	0.018	0.013	0.013	0.015	0.013		[0.006]	[0.008]	[0.009]	[0.007]
H11	0.008	0.010	0.013	0.010	0.005	0.010	0.010	0.008	0.005	0.013		[0.007]	[0.008]	[0.007]
H12	0.015	0.023	0.015	0.013	0.018	0.018	0.018	0.021	0.018	0.026	0.018		[0.004]	[0.007]
AY-H11	0.023	0.031	0.023	0.021	0.026	0.026	0.026	0.028	0.026	0.034	0.026	0.008		[0.006]
AY-H12	0.015	0.023	0.015	0.013	0.018	0.013	0.018	0.021	0.018	0.021	0.018	0.021	0.013	

Tabla 3. Matriz de distancias genéticas para los haplotipos caracterizados y los dos haplotipos de Barcelona (AY178462-H11 y AY178463-H12) de Hale et al. (2004), disponibles en la base de datos GenBank. En el área inferior izquierda se presentan los valores de distancia (entre 0 y 1), y en el área superior derecha el error estándar (entre corchetes).

Table 3. Genetic distance matrix of the characterized haplotypes including two haplotypes from Barcelona (AY-H11 and AY-H12) from Hale et al. (2004) available in GenBank. Upper part of the matrix refers to the distance values (between 0-1) and lower part of the matrix shows standard errors (in square brackets).

et al. 2007). Para la elaboración de la matriz se incluyeron dos haplotipos de Barcelona, procedentes del trabajo de Halle et al. (2004) (Tabla 3). La mayor distancia genética se observó entre los haplotipos AY178462-H11 (Barcelona) y H10 (Ferro) con un 3,4% ($0,034 \pm 0,009$) y la menor entre H4 y H3 (ambos de Castellón) con un 0,3% ($0,003 \pm 0,003$).

Estructura poblacional

Para estudiar la estructura poblacional se excluyeron del análisis las muestras sv14 y sv15 pues no se conocía su localización geográfica exacta, y las muestras sv1, sv8 y sv12 que son eliminadas automáticamente por el programa SAMOVA al estar formadas por un único individuo. Las poblaciones fueron determinadas en función de la proximidad geográfica de las muestras. En el análisis, el valor de F_{CT} fue elevado en todos los casos, y creciente con K hasta alcanzar el máximo en $K=12$ ($F_{CT}=0,65642$). Se observó un valor muy elevado de F_{ST} en todos los agrupamientos, con valores entre 0,76936 (máximo) y 0,70978 (mínimo). Siguiendo las indicaciones de Dupanloup et al. (2002) se encontró un número óptimo de 12 grupos ($K = 12$), con un valor de $F_{CT} = 0,65642$. Para determinar las poblaciones europeas se emplearon los haplotipos más representativos de cada región. (Tabla 4).

Neighbor-joining (NJ)

La clasificación mediante la distancia al vecino

más cercano (NJ) se implementó en MEGA 4.0.2 (Tamura et al. 2007), usando el modelo Kimura-2 parámetros (Kimura 1980). El soporte de los nodos fue evaluado con el *bootstrap* para determinar la confianza de los clados con 2000 réplicas, escogiendo el árbol de *bootstrap* consenso siguiendo la regla del 50% (*majority rule*). Finalmente, se obtuvo un solo árbol de mínima distancia genética (Fig. 2). La topología del árbol muestra tres grupos que incluyen todas las muestras ibéricas excepto las de Almansa y Sax, la de Cantabria y una de Galicia (sv19) que ocupan una posición basal. El grupo 1 incluye a las muestras de Sierra Espuña, siendo el grupo hermano del resto de muestras ibéricas y europeas. El grupo 2 está formado por las muestras de Castellón, Barcelona y resto de Europa, y el grupo 3 por las ardillas del centro y norte de la Península.

Máxima parsimonia (MP)

El análisis de MP se realizó en PAUP 4.0 b10 (Swofford 2002), a través de una búsqueda heurística con 10000 réplicas mediante el algoritmo TBR. Con el análisis de MP se obtuvieron 290 árboles igualmente parsimoniosos, de los cuales se obtuvo el árbol consenso mediante la regla del 50% (*majority rule*), que incluye los grupos monofiléticos que aparecen en al menos el 50 % de estos 290 árboles. Se obtuvo también el árbol de *bootstrap* consenso por la misma regla, y se colocaron sobre los nodos del árbol de MP los valores de soporte obtenidos (Fig. 3). La topología del

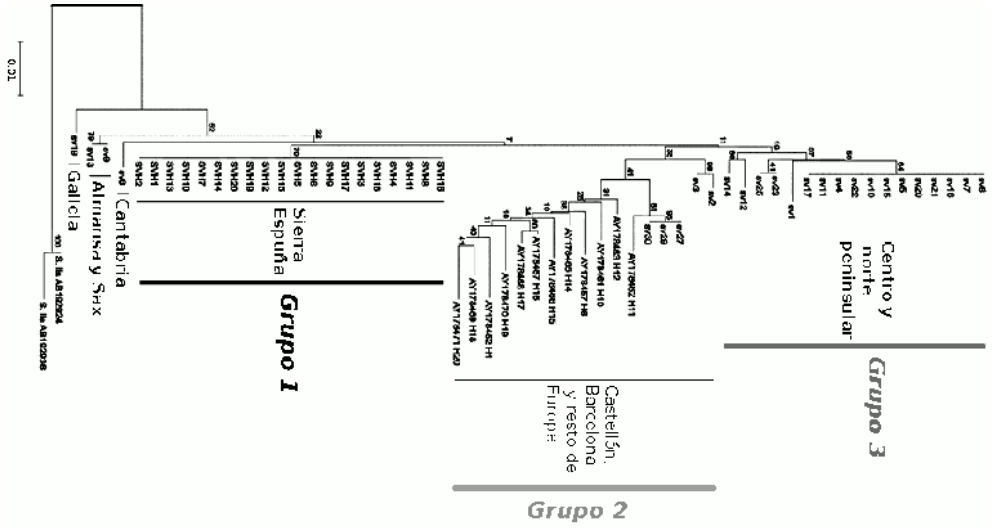


Figura 2. Árbol de neighbor-joining con bootstrap, condensado para valores de bootstrap mayores de 50. Las ramas son proporcionales a la distancia genética. Se incluyen detalles de localización geográfica y agrupamiento de los clados principales. Los grupos principales, resultados de la topografía del árbol, aparecen marcados en diferentes intensidades de gris.

Figure 2. Neighbor-joining tree with bootstrap, condensed for bootstrap values > 50. Branch length is proportional to the genetic distance. Details of the localities and grouping of the main clades are included. The three main groups are marked in different grey intensities.

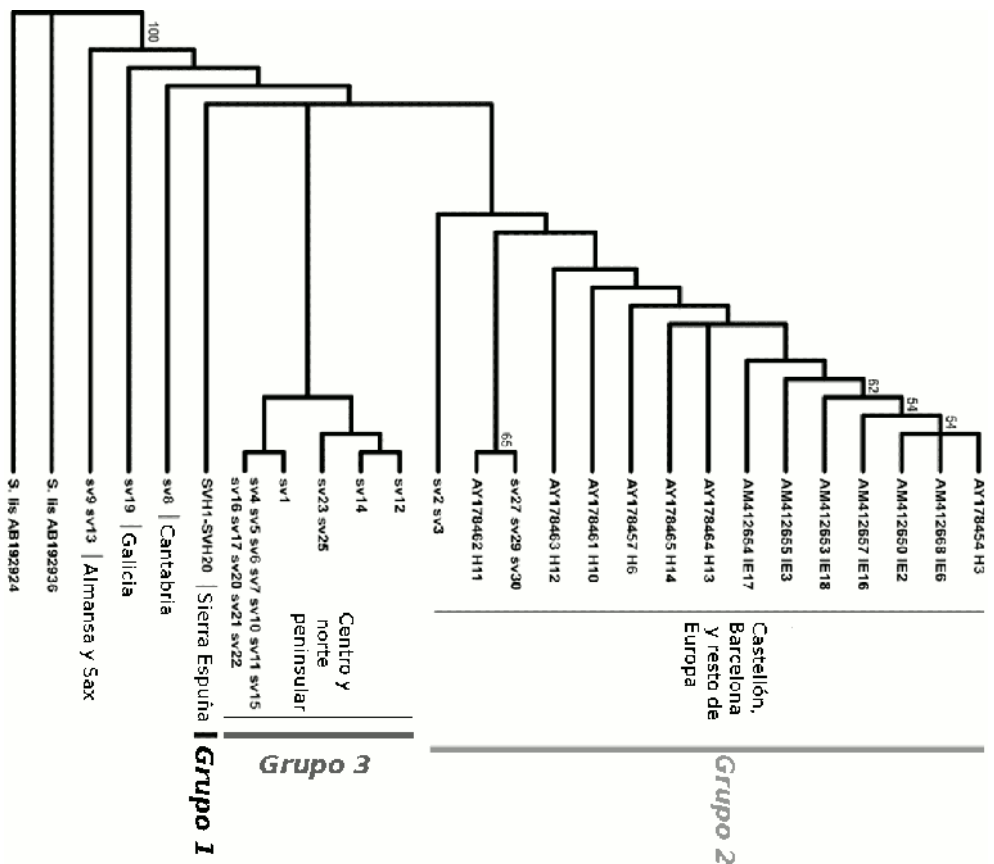


Figura 3. Árbol consenso de máxima parsimonia con valores consenso de bootstrap. Se indican las localizaciones geográficas de los principales clados, y los tres grupos más importantes que se pueden definir a partir de la topología del árbol.

Figure 3. Maximum parsimony strict consensus tree with bootstrap. The geographic locations of the main clades and the three main groups deduced from the topology of the tree are indicated.

árbol consenso coincide con el de *NJ*, en cuanto a la posición basal de las muestras de Cantabria, Almansa y Sax y la muestra sv19 de Galicia. Los grupos 1, 2 y 3 obtenidos en el análisis de *NJ* se recuperan en este análisis pero constituyendo una politomía, que no permite resolver las relaciones entre ellos.

Red haplotípica

Se creó la red de haplotipos para los haplotipos peninsulares y los 8 haplotipos europeos, seleccionados por ser representantes de los clados europe-

os principales obtenidos por nuestro análisis filogenético (Fig. 4). Se produjeron tres ciclos homoplásticos que fueron resueltos por el criterio de distancia geográfica en todos los casos, siguiendo lo dispuesto por Posada & Crandall (2001). El haplotipo de Sierra Espuña se observó más próximo al de Almansa y Sax (H7) y más alejado del haplotipo AY-H11 de Barcelona. Asimismo se observaron dos linajes principales, uno peninsular y otro europeo, conectados por los haplotipos de Barcelona. El grupo externo, representado por *Sciurus lis*, quedó enraizado con el linaje peninsular. Al no haber haplotipos compartidos (a ex

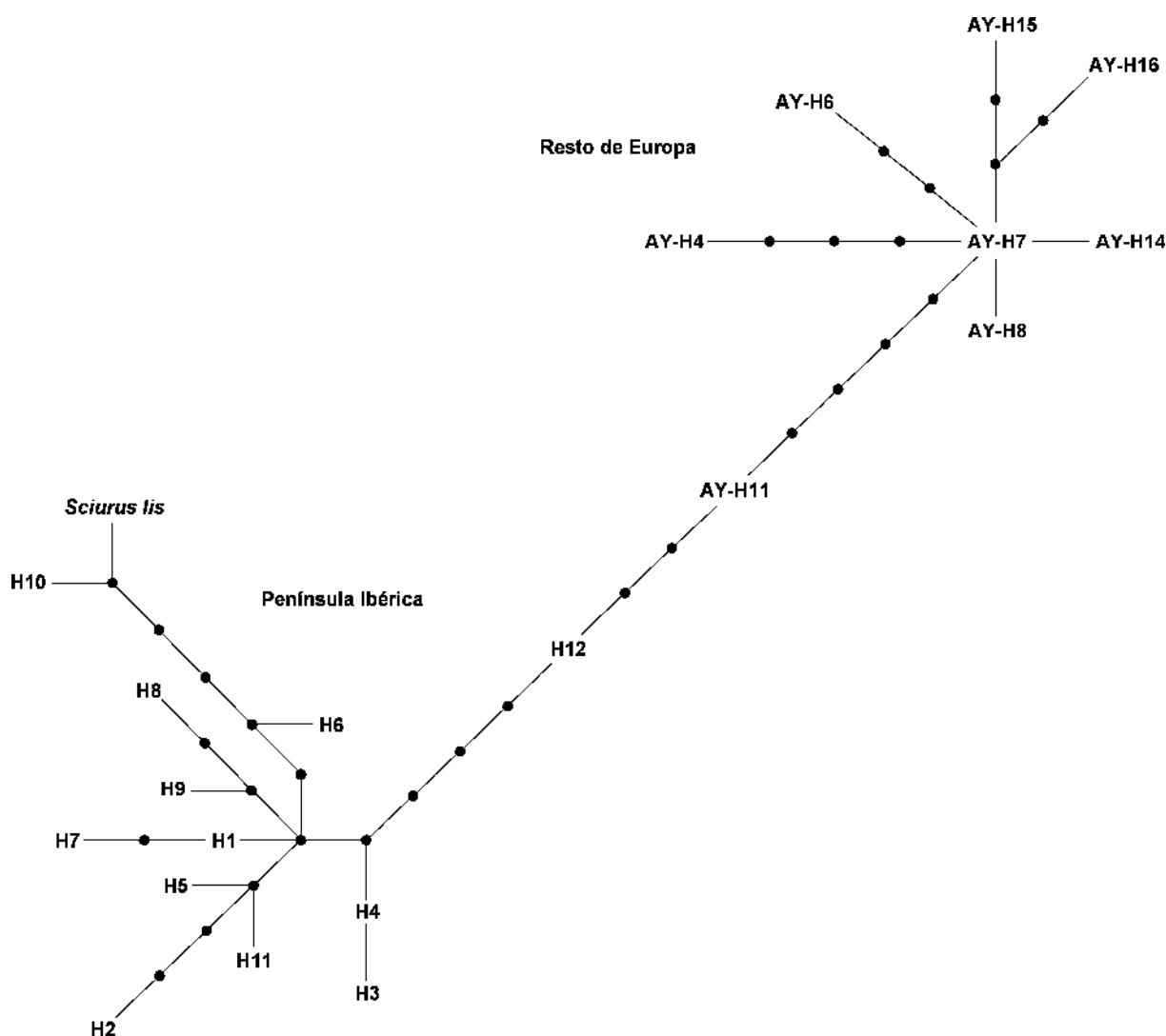


Figura 4. Red haplotípica de parsimonia con probabilidad igual o mayor del 95%. Cada línea representa un paso mutacional y cada nodo, representado por puntos, indica haplotipos necesarios para explicar la evolución del siguiente estado, haplotipos que no han sido observados en las muestras analizadas. Se indica el enraizamiento con *Sciurus lis*.

Figure 4. The estimated 95% haplotype network. Each line represents a single mutational step and each node represented by dot indicates haplotypes states that are necessary intermediates between sampled haplotypes but that were not observed in the samples analyzed. The network has been rooted with *Sciurus lis*.

cepción de H7), las frecuencias de cada haplotipo correspondieron prácticamente a la frecuencia de muestreo en cada localidad, lo cual no representa las frecuencias haplotípicas correctamente. La frecuencia, por tanto, no se representó gráficamente.

Discusión

Análisis molecular de *Sciurus vulgaris*

El resultado más relevante del presente estudio es la existencia de un único haplotipo de la región control del ADN mitocondrial para *Sciurus vulgaris* en la población analizada de Sierra Espuña. Este resultado contrasta con la variabilidad encontrada en otras poblaciones europeas de ardilla roja en las que se han determinado haplotipos distintos en diferentes localidades. Este haplotipo encontrado en la población de Sierra Espuña no se ha encontrado en ninguna otra localidad de la península Ibérica ni de Europa (Hale et al. 2004, Finnegan et al. 2008). Este hecho confirma la peculiaridad genética de la población de Sierra Espuña y estaría en consonancia con las peculiaridades morfológicas y ecológicas descritas por Valverde (1967), que considera la población de Sierra Espuña como una subespecie diferenciada de *Sciurus vulgaris*, para la cual propone el nombre subespecífico de *hoffmanni*.

La distancia genética muestra valores similares para todas las muestras, encontrando como haplotipos más próximos (0,3%) los dos de Castellón (H3 y H4) y como más lejanos (3,4%) al haplotipo AY178462-H11 de Barcelona (Hale et al. 2004) y H10 de Ferrol, lo cual está en acuerdo con lo obtenido en la red haplotípica de parsimonia.

Se han identificado 12 nuevos haplotipos ibéricos, no encontrados en ninguna de las muestras de Europa analizadas con anterioridad al presente trabajo (Hale et al. 2004 y Finnegan et al. 2008). La diversidad haplotípica de las poblaciones peninsulares de *Sciurus vulgaris* es relativamente baja en comparación a las poblaciones del resto de Europa, y se han descrito haplotipos únicos, no compartidos en zonas geográficas relativamente distantes. Esto indica un fuerte aislamiento de las poblaciones peninsulares entre sí, a pesar de las posibles translocaciones de individuos de una población a otra.

En el análisis de la estructura poblacional el valor de F_{CT} es elevado en todos los casos, lo que

indica una marcada variabilidad entre los grupos definidos (Dupanloup et al. 2002). El elevado valor de F_{ST} indica una fuerte fijación de los haplotipos en los diferentes grupos, presentando una diferenciación genética elevada ($F_{ST}>0,25$) para cada uno de ellos. A pesar de la incompleta representatividad geográfica de las muestras a nivel peninsular y su escaso número, se obtuvieron 12 grupos con máxima diferenciación ($F_{CT}=0,65642$). Estos agrupamientos muestran a la población de Sierra Espuña junto a las muestras de Almansa y Sax, estas últimas consideradas en una misma población, lo que indica que la distancia geográfica y la variabilidad genética entre estas dos poblaciones es pequeña en comparación con la que presentan frente a los otros agrupamientos.

La topología de los árboles obtenidos en los análisis de *MP* y *NJ*, coinciden en mostrar la existencia de tres grupos diferenciados: uno formado exclusivamente por las ardillas de Sierra Espuña (Grupo 1); otro grupo formado por las ardillas de Castellón, Barcelona y resto de Europa (Grupo 2); y otro gran clado formado por las ardillas del centro y norte de la Península (Grupo 3). La ardilla de Cantabria (sv8) y una de La Coruña (sv19), junto con las ardillas de Almansa y Sax (sv9 y sv13), aparecen siempre en una posición basal con respecto a los tres grupos anteriores, aunque con bajo soporte de *bootstrap*. No obstante, el bajo soporte estadístico obtenido en estos análisis filogenéticos es esperable para análisis intraspecíficos (DeSalle et al. 2002).

La red haplotípica generada para las secuencias ibéricas y europeas revela una estructura genética que permite identificar un linaje compuesto por las muestras europeas, más relacionadas con las muestras ibéricas de Barcelona, así como otro linaje para las ardillas peninsulares. Dentro de la Península, las muestras de Sierra Espuña están más próximas a las de Almansa (Albacete) y Sax (Alicante), como cabría esperar por la proximidad geográfica. Las del centro y norte de la Península parecen dividirse en tres grupos, uno de ellos enraizado con el grupo externo (*Sciurus lis*), formado por H6 (Cantabria) y H10 (una ardilla de Galicia), lo que se podría explicar de dos formas: que este linaje sea el más antiguo de la Península, al compartir un ancestro común con *Sciurus lis*; o que las relaciones genealógicas estén falseadas debido al muestreo insuficiente y/o a las posibles translocaciones de ardillas en algunos puntos de la

Península. En Cataluña se determinaron dos haplotipos, H11 para Gerona y H12 para Barcelona, que se diferenciaron claramente en la red haplotípica, agrupándose las ardillas de Gerona con las del norte de la Península y las de Barcelona con las de Castellón, relacionándose estas últimas, como se dijo anteriormente, con el linaje europeo. De los tres haplotipos encontrados en Galicia, uno de ellos (H5) es compartido por 14 ejemplares, mientras que H9 y H10 se encuentran en un solo individuo cada uno, lo que indicaría la necesidad de un mayor esfuerzo de muestreo para determinar si se trata de haplotipos fijados en la población o de translocaciones de individuos procedentes de otras localidades.

Es necesario mencionar la discrepancia observada entre las muestras de Sierra Espuña y las de Almansa (Albacete) y Sax (Alicante), según los resultados obtenidos mediante la red haplotípica y el SAMOVA, y los del análisis filogenético. Esta discrepancia consiste en que dichas muestras están estrechamente relacionadas con las de Sierra Espuña en el análisis de la red haplotípica y de SAMOVA mientras que en el análisis filogenético ocupan una posición basal. La proximidad geográfica indicaría como más plausible la hipótesis sugerida por la red haplotípica y el análisis de SAMOVA. Alternativamente, según la hipótesis sugerida por el análisis filogenético, la posición basal de las muestras de Almansa y Sax se explicaría como resultado de translocaciones deliberadas de individuos de otras localidades más septentrionales.

A pesar de estas discrepancias, los tres tipos de análisis muestran que la población de Sierra Espuña mantiene una identidad propia, que sería coincidente con el grupo *infuscatus-hoffmanni* determinado por Valverde (1967) mediante criterios morfológicos. Esta identidad propia tan diferenciada, puede explicarse porque la población debió sufrir un cuello de botella muy importante a finales del siglo XIX debido a la deforestación masiva de Sierra Espuña (Codorníu 1900), tras la que quedaron pequeños bosquetes en zonas relativamente aisladas. Por tanto, la población se vería fuertemente mermada y restringida a esas áreas boscosas que sólo albergarían una población mínima, perdiendo gran parte de la variabilidad genética del acervo poblacional. Esta situación crítica, comenzó a mejorar a partir de 1891, cuando empiezan los trabajos de reforestación de Juan

Ángel de Madariaga, José Musso y Ricardo Codorníu. En la actualidad, la población se encuentra totalmente recuperada en cuanto a número de individuos, como muestran las habituales observaciones de este esciúrido a lo largo de toda la sierra, zonas agrícolas e incluso urbanas, donde también se pueden contemplar en jardines con ejemplares de *Pinus halepensis*. Sin embargo, pese a este elevado número de individuos actuales, la diversidad genética es muy reducida a juzgar por la existencia de un haplotipo único en el fragmento analizado de la región control del ADN mitocondrial. Este hecho contrasta con la alta diversidad genética encontrada en Sierra Espuña para otros organismos, como por ejemplo el coleóptero *Tomicus destruens* (Gallego & Gallián 2008), en el cual se encontraron 52 haplotipos para la región Citocromo Oxidasa I del ADN mitocondrial. El impacto diferente causado por la deforestación en la diversidad genética de un vertebrado (ardilla) y un invertebrado (coleóptero) se podría explicar por las diferencias de tamaño, de requerimientos nutritivos y de hábitat.

Implicaciones para la conservación

De acuerdo con Moritz (1994) y Moritz et al. (1995), la diferenciación genética de la población de Sierra Espuña, *a priori*, cumple el criterio para constituir una unidad de manejo (*MU*) en cualquier estrategia de conservación a corto plazo. Esta población, además de poseer una diferenciación genética significativa ($F_{ST} = 0,71077$), presenta monofilia recíproca en base al análisis filogenético de distancia genética (Fig. 2) con respecto a las demás poblaciones peninsulares, mostrándose como un grupo claramente diferenciado en todos los árboles, incluido el análisis de parsimonia, lo que refuerza esta distinción.

Para la conservación a largo plazo, es conveniente determinar unidades evolutivas significativas (*ESU*). Según Moritz (1994), el criterio genético para determinar *ESU*'s es el de reconocer en el grupo monofilia recíproca para haplotipos mitocondriales y observar divergencia significativa en la frecuencia de alelos de loci nucleares. En este aspecto, sólo queda ampliar el número de muestras para conseguir niveles considerables de significación y estudiar marcadores genéticos de ADN nuclear para poner a prueba la hipótesis de que la población de Sierra Espuña constituye también una unidad evolutiva significativa (*ESU*).

Agradecimientos

Agradecemos a la Dirección General del Medio Natural y en especial a Juan de Dios Cabezas la financiación de este trabajo. A Néstor Yelo por las ideas aportadas y su interés en este estudio, así como por las muestras colectadas. Asimismo agradecemos a las siguientes personas la colaboración en la recolección de individuos completos atropellados o muestras de tejido: Carlos L. Baiget, Martín Surroca (C.R.F. Forn del Vidre), Pablo Sierra, Luis A. Rabanal, Antonio Ortuño, José Manuel López, Augusto de Castro, Alberto Álvarez, Ángel Albert, a la Sociedad Gallega de Historia Natural, Elena Obón Losada, a Francesc Carbonell del C.R.F. de Torreferrussa, Andrés García, Lidia Lorca, Juanto Gandía, Xosé Pardavila, Eugenio J. Martínez y al resto del cuerpo técnico del Parque Regional de Sierra Espuña. Agradecemos también a los miembros del Área de Biología Animal del Departamento de Zoología y Antropología Física de la Universidad de Murcia su ayuda en los trabajos de laboratorio, en especial a Obdulia Sánchez, y a Diego Gallego, Pilar De la Rúa, Carlos Ruiz y Carmelo Andújar en el análisis de datos. Finalmente, agradecemos a Josep Piqué y Margarida Guerreiro por su ayuda con la bibliografía y a Miguel Blázquez por su fotografía.

Referencias

- Barratt EM, Gurnell J, Malarky G, Deaville R & Bruford MW. 1999. Genetic structure of fragmented populations of red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in Britain. *Molecular Ecology* 8: S55-S63.
- Cabrera A. 1905. Las ardillas de España. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 5: 225-231.
- Cabrera A. 1914. Fauna Ibérica, Mamíferos. Museo Nacional de Ciencias Naturales, 1ª-edición, Madrid.
- Clement M, Posada D & Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.
- Corbet GB. 1978. The mammals of the Palaearctic Region: a taxonomic review. British Museum (Natural History). Cornell University Press, London.
- Codorniu R. 1900. Apuntes relativos a la repoblación forestal de la Sierra de Espuña. Tipografía Provincias de Levante. Murcia.
- De Luna E, Guerrero JA & Taracena TC. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica* 15: 351-370.
- DeSalle R, Giribet G & Wheeler W. 2002. Techniques in Molecular Systematics and Evolution. Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin.
- Dupanloup I, Schneider S & Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
- Ferreira AF & Guerreiro M. 2002. Estudo da dinâmica populacional do esquilo-comun (*Sciurus vulgaris*) no Parque Florestal de Monsanto. Informe Técnico. Parque ecológico de Monsanto. Lisboa.
- Finnegan LA, Ceiridwen JE & Rochford JM. 2008. Origin of, and conservation units in, the Irish red squirrel (*Sciurus vulgaris*) population. *Conservation Genetics*. *Conservation Genetics* 9: 1099-1109.
- Gallego D & Galián J. 2008. Hierarchical structure of mitochondrial lineages of *Tomicus destruens* (Coleoptera, Scolytidae) related to environmental variables. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 41: 331-339.
- Hale ML, Lurz PWW & Wolff K. 2004. Patterns of genetic diversity in the red squirrel: footprints of biogeographic history and artificial introductions. *Conservation Genetics* 5: 167-179.
- Herron MD, Castoe TA & Parkinson LC. 2004. Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1015-1030.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Lurz PWW, Gurnell J & Magris L. 2005. *Sciurus vulgaris*. Mammalian Species No. 769, American Society of Mammalogists.
- Mayr E & Ashlock PD. 1991. Principles of Systematic Zoology. Mc Graw-Hill, New York.
- Mercer JM & Roth VL. 2003. The effects of Cenozoic global change on squirrel phylogeny. *Science* 299: 1568-1572.
- Miller Jr GS. 1912. Catalogue of the mammals of Western Europe (Europe exclusive of Russia) in the collection of the British Museum. British Museum (Natural History), London, 1019 pp.
- Moritz C. 1994. Defining Evolutionarily Significant Units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.
- Moritz C, Lavery S & Slade R. 1995. Using allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management. *American Fisheries Society Symposium* 17: 249-262.
- Posada D & Crandall KA. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 37-45.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academic Sciences* 74: 5463.
- Sidorowicz J. 1971. Problems of subspecific taxonomy of squirrel (*Sciurus vulgaris*). *Zoologischer Anzeiger* 187: 123-142.
- Steppan SJ, Storz BL & Hoffmann RS. 2004. Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 703-719.

- Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tempelton AR. 1992. Human origins and analysis of mitochondrial DNA sequences. *Science* 255: 737-739.
- Templeton AR. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: Testing hypothesis about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7: 381-397.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thorington Jr RW & Hoffmann RS. 2005. Family Sciuridae, En: D.E. Wilson, Reeder D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World*. pp. 754. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Trizio IB, Crestanello B, Galbusera P, Wauters LA, Tosi G, Matthysen E & Hauffe H. 2005. Geographical distance and physical barriers shape the genetic structure of Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in the Italian Alps. *Molecular Ecology* 14: 469-481.
- Valverde JA. 1967. Notas sobre vertebrados. III. Nueva ardilla del SE español y consideraciones sobre las subespecies peninsulares. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Biol.)* 65: 225-248.
- Walsh PS, Metzger DA & Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.