

2. El rebezo cantábrico, filogeografía e historia evolutiva

Phylogeography and evolutionary history of the Cantabrian chamois (*Rupicapra pyrenaica parva*)

Ana Domínguez Sanjurjo, Fernando Rodríguez Vázquez,
Jesús Albornoz Pons y Trinidad Pérez Méndez



Ilustración: Raúl Alonso

RESUMEN

Hemos investigado las relaciones evolutivas entre las 10 subespecies reconocidas de *Rupicapra*, clasificadas en dos especies: *R. pyrenaica*, con las subespecies *parva*, *pyrenaica*, y *ornata*, y *R. rupicapra*, con *cartusiana*, *rupicapra*, *tatrica*, *carpatica*, *balcanica*, *asiatica*, y *caucasica*. Se estudió la variación para microsatélites y para el citocromo *b*. El análisis de micro-

satélites mostró una profunda divergencia entre las dos especies reconocidas. Las distancias genéticas entre pares de subpoblaciones están altamente correlacionadas con las distancias geográficas. Hemos identificado 3 linajes del citocromo *b*: clado Oeste en Iberia y Alpes occidentales, Central en los Apeninos y el Macizo de Chartreuse y Este en las poblaciones al este de los Alpes. Contrariamente a la sistemática actual, la filogenia del citocromo *b* sugiere la clasificación del rebeco en una sola especie, *R. rupicapra*, dado que las dos especies propuestas son polifiléticas. Se ha identificado accidentalmente un pseudogén nuclear del citocromo *b*. El análisis filogenético de las secuencias mitocondriales y nucleares muestra la concurrencia de linajes altamente diferenciados antes de las glaciaciones. Las fuertes oscilaciones climáticas del Cuaternario deben haber llevado a expansiones y contracciones de rango y consecuentemente a períodos alternos de contacto y aislamiento de linajes diferenciados. La barrera alpina ha tenido un papel importante en la diferenciación Este-Oeste.

Palabras clave: rebeco, *Rupicapra*, filogeografía, glaciaciones, DNA mitocondrial, taxonomía.

ABSTRACT

*We investigate the evolutionary relationships between 10 recognised chamois subspecies using microsatellite markers and mitochondrial cytochrome b gene. Traditionally the genus *Rupicapra* has been classified into 2 species: *R. pyrenaica*, with subspecies *parva*, *pyrenaica*, and *ornata*, and *R. rupicapra*, with subspecies *cartusiana*, *rupicapra*, *tatrica*, *carpatica*, *balcanica*, *asiatica* and *caucasica*. The microsatellites analysis indicated a deep divergence between the two recognised species. Genetic distances between pairs of populations were highly correlated with geographical distance. We identified 3 cytochrome b lineages: Clade West in Iberia and Western Alps; Clade Central in the Apennines and the Massif of Chartreuse; and Clade East present in populations to the east of the Alps. In contrast to the current systematics of the genus, phylogenies based on the cytochrome b suggest the classification of the 10 subspecies of chamois into a single species *R. rupicapra*, given that the 2 proposed species were polyphyletic. A nuclear pseudogene of cytochrome b was identified by chance. Phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial sequences shows the concurrence of highly differentiated lineages before the different glaciations. The strong climatic oscillations of the Quaternary must have led to expansions and contractions of population ranges creating successive contact and isolation events between the already differentiated lineages. The alpine barrier has played a substantial role in West-East differentiation.*

Key words: chamois, *Rupicapra*, phylogeography, ice ages, mtDNA, taxonomy.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Clasificación taxonómica y distribución actual.

El rebecho pertenece a la subfamilia Caprinae, dentro de la familia Bovidae. Las relaciones entre los distintos linajes de la subfamilia son todavía objeto de discusión (Hassanin y Douzery 1999). La clasificación taxonómica del género *Rupicapra* ha sido también sometida a continua revisión. Carolus Linnaeus en su “*Systema Naturæ*” (1758) agrupaba al rebecho junto con las cabras, al observar similitudes tanto en cornamenta como en dentición, nombrándolo *Capra rupicapra*. Fue Henri de Blainville (1816), naturalista francés, quien proporcionó género propio al rebecho (*Rupicapra rupicapra*); además estableció el orden de los Artiodáctilos tal como es aceptado hoy en día. Pero, incluso a este nivel, la sistemática no está definitivamente establecida, pues actualmente se propone que el orden pase a nombrarse Cetartiodáctilos al reunirse el orden de los Cetáceos y los Artiodáctilos (Price et al. 2005).

En cuanto a la clasificación de las poblaciones de *Rupicapra*, en 1845 el zoólogo francés Charles Lucien Bonaparte (sobrino de Napoleón) describió al rebecho pirenaico, otorgándole un nombre específico propio (*Rupicapra pyrenaica*). En 1913 Lydekker agrupaba a todas las poblaciones de rebecho en una única especie *Rupicapra rupicapra*. Camerano, un año después, hacía referencia a tres especies diferentes: *R. pyrenaica*, en la península Ibérica, *R. ornata*, en los Apeninos y *R. rupicapra* en el resto de los sistemas montañosos de Eurasia. Couturier (1938) y Dolan (1963) aceptaban una única especie, *R. rupicapra*, con 10 subespecies distintas (todos ellos citados en Masini y Lovari 1988).

En la actualidad, y atendiendo a datos morfológicos y de variabilidad para isoenzimas (enzimas codificados por distintos alelos de un gen, que se pueden distinguir por su movilidad electroforética) presentados por Lovari (1987) y por Nascetti et al. (1985), se reconocen un total de 10 subespecies diferentes agrupadas en dos especies, *Rupicapra pyrenaica* presente en el suroeste de Europa y *Rupicapra rupicapra* que se distribuye por el resto de Europa y en el Cáucaso. En total, el número de rebecos supera el medio millón, de los cuales la mayoría corresponden a la especie *R. rupicapra*. En principio, cada una de las diez subespecies de rebecho está confinada en un sistema montañoso (**Figura 1**).

La especie *R. rupicapra* agrupa a un total de siete subespecies que corresponden a las poblaciones presentes en el centro y este de Europa. De oeste a este tendríamos las siguientes subespecies: *cartusiana* (macizo francés de La Chartreuse), *rupicapra* (Alpes, principal núcleo de la especie), *tatrica* (Montes Tatra), *carpatica* (en los Cárpatos), *balcanica* (Península Balcánica), *asiatica* (Turquía) y *caucasica* (Cáucaso). En Europa, la población total

de esta subespecie se estimó en 440.000 individuos. Sin embargo, la única población grande es la de la subespecie *rupicapra*, mientras muchas de las otras son raras y/o en declive (Aulagnier, 2008).

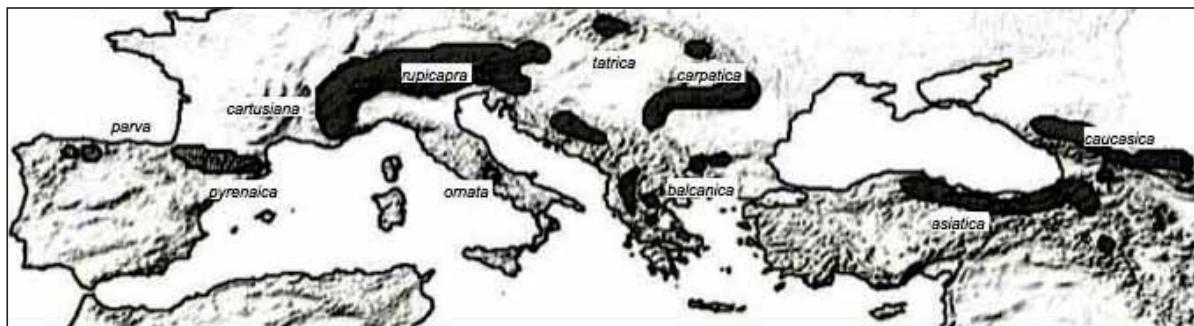


Figura 1. Distribución actual de las poblaciones de rebecho. En claro las subespecies de *Rupicapra pyrenaica* y en oscuro las subespecies de *R. rupicapra*.

La población de los Alpes (*Rupicapra rupicapra rupicapra*), está instalada en los países alpinos (Francia, Suiza, Austria, Italia, Alemania y Eslovenia). Esta subespecie, se ha introducido en la República Checa y también en países no europeos como son Nueva Zelanda y Argentina.

Las otras 6 subespecies de *R. rupicapra* están representadas por poblaciones mucho más reducidas. En particular, en el macizo de la Chartreuse vive una población aislada de rebecos que recibió la categoría de subespecie, *Rupicapra rupicapra cartusiana* (Couturier 1938). En este macizo tuvo lugar una insularización excepcional debida al aislamiento del rebecho alpino por un valle fluvial. Por su parte, la subespecie *R. r. balcanica* está muy fragmentada en pequeñas subpoblaciones. La subespecie *R. r. tatica* está representada por menos de 200 individuos y se ha catalogado como “en peligro crítico” (Critically Endangered, CR) en el año 2000 (Aulagnier et al. 2008).

La especie *R. pyrenaica* agrupa a los rebecos del suroeste de Europa. En total está representada por actualmente por más de 50.000 individuos. Se distinguen las subespecies *parva* (Cordillera Cantábrica), *pyrenaica* (Pirineos) y *ornata* (Abruzzos).

El rebecho de los Abruzzos (*Rupicapra pyrenaica ornata*), habita en la cordillera de los Apeninos, concretamente en el macizo de los Abruzzos, en Italia central. La subespecie *R. p. ornata* está estrictamente protegida por la legislación internacional, está incluida en el Apéndice II de la Convención de Berna y en el Anexo IV de la Directiva de Hábitats y Especies de la Unión Europea (Herrero et al. 2008).

El rebecho de los Pirineos (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) se distribuye por gran parte de la vertiente meridional de este macizo montañoso y se calcula que su número pasa de los 40.000 ejemplares.

Por lo que se refiere al rebecho cantábrico (*Rupicapra pyrenaica parva*; Cabrera 1910) y debido a la intensiva caza que sufrió en la primera mitad del siglo XX, la población original se fragmentó y desaparecieron las poblaciones marginales (Nores y Vázquez 1987). El núcleo oriental se extiende por las provincias de Asturias, Cantabria, León y Palencia. Este núcleo está formado por unos 15.000 individuos. En la vertiente occidental, constituida por unos 1.000 rebecos, se extiende por varias zonas de la Reserva Regional de Caza de Somiedo en Asturias y los terrenos limítrofes de la provincia de León (Ballesteros 1998).

1.2. Paleontología del género.

Los primeros fósiles de la subfamilia Caprinae corresponden al Mioceno superior, hace unos 10 millones de años (Alcalá y Morales 1997; Gentry 2000). Al contrario que la mayoría de los bóvidos, el registro fósil de los caprínidos es relativamente pobre debido a los hábitats montañosos en que han evolucionado (Simpson, 1945). La mayoría de los paleontólogos creen que los Caprini se originaron en Asia, pero Ropiquet y Hassanin (2005) consideran que su origen no está claro dado que la distribución de los caprínidos ha sido modificada de una forma muy importante durante el Pleistoceno, debido a las glaciaciones y grandes cambios climáticos que han tenido lugar.

Los fósiles de los parientes más próximos del rebecho son extremadamente raros y dispersos, aún en relación a otros caprínidos (Masini y Lovari 1988). Por ello existen opiniones diversas y contradictorias sobre las relaciones filogenéticas entre las pocas formas vivientes y las muchas formas fósiles descritas. Se propuso que *Phachygazella grangeri*, que habitó el centro y sur de Asia a principios del Plioceno (hace unos 5 millones de años), pudo ser una forma de rupicaprínido próxima al ancestro del rebecho (Theenius y Hofer 1960). Sin embargo, especies próximas como *Neotragocerus* en Norteamérica y *Myotragus* en las Islas Baleares ya se habían dispersado en el Plioceno temprano, posiblemente a partir de un ancestro del Mioceno (Masini y Lovari 1988).

Los escasos datos paleontológicos disponibles apuntan a que el género *Rupicapra* pertenecería, junto con el fósil europeo *Procampioceras* y quizás el fósil norteafricano *Numidocapra*, a una rama filética ya diferente durante el periodo Villafranchiano (hace más de 2 millones de años) del resto de los rupicápridos (Gentry 1978). *Procampioceras* puede haber sobrevivido en Europa del Este hasta el principio del Pleistoceno Medio, hace unos 800.000 años.

Los primeros fósiles de *Rupicapra* propiamente dicho se hallaron en un yacimiento prehistórico del pirineo francés, el de la gruta de Caune d'Arago, cerca del pueblo de Tautavel y corresponden al Pleistoceno me-

dio. La aparición de fósiles de *Rupicapra* después de un periodo en el que aparentemente no existían rupicáridos en la zona, sugiere una migración desde el este de Europa durante un periodo frío, pues sus fósiles se encuentran asociados a la fauna de climas fríos. Masini y Lovari (1988) sugieren que el rebezo, o su antecesor directo, puede haber alcanzado Europa durante el Pleistoceno medio o el Pleistoceno Inferior (hace, al menos, 800.000 años) y relacionan su migración con los grandes cambios en la fauna que tuvieron lugar durante el Villafranchiano marcado por la llegada a Europa de olas de taxa procedentes de ambientes fríos o abiertos.

Los fósiles de Caune de l'Arago son del final de la glaciación de Mindel o principios del Riss (entre 400.000 y 350.000 años antes del presente, AP). En Pirineos, el suroeste de Francia, en Provenza, Alpes italianos, Apeninos y Hungría se han encontrado restos del periodo Riss (entre 300.000 y 130.000 años AP), lo que confirmaría la dispersión europea de *Rupicapra* a finales del Pleistoceno Medio. Hasta ahora la única documentación conocida del rebezo durante el periodo interglaciar Riss-Würm proviene de dos zonas de elevada altitud de los Alpes suizos, lo que sugiere una restricción del rango de distribución del rebezo a las zonas más elevadas. Sin embargo, durante las glaciaciones del periodo Würm (80.000-12.000 años AP), los fósiles de rebezo llegaron a ser relativamente numerosos, y con una distribución más amplia y continua que en la actualidad (Masini 1985; Lovari 1987; Masini y Lovari 1988). Los restos del Würm se encontraron principalmente en sitios de baja altitud de los sistemas montañosos principales. Esta distribución sugiere que los fríos glaciales del Würm deben haber desplazado al rebezo de las grandes alturas.

Los depósitos del Pleistoceno normalmente consisten en restos fragmentados de los cuales sólo los cuernos pueden ser usados en taxonomía; lo que dificulta la clasificación de los rebecos fósiles (Masini 1985). Se discute sobre la asignación de un fósil de los Pirineos franceses del periodo Riss al tipo *pyrenaica* o al *rupicapra*. Se conoce más sobre el tipo de los fósiles de rebezo del Würm y del Holoceno. Se identificaron fósiles del Würm temprano en la Cordillera Cantábrica y en los Pirineos, que fueron clasificados como *R. pyrenaica*. En los Apeninos se recuperaron fósiles posteriores, del Würm y del Holoceno, correspondientes al tipo *R. pyrenaica ornata*. Se describió *R. rupicapra* en Hungría, el arco alpino y el norte de los Apeninos en el Würm y en el Cáucaso, en fósiles del Holoceno.

Se ha sugerido, por tanto, que los rebecos del tipo *R. pyrenaica* habrían evolucionado directamente de los individuos llegados al oeste de Europa durante el Pleistoceno Medio, mientras que *R. rupicapra* puede haber

evolucionado en el este de Europa o en Asia Menor durante un tiempo de aislamiento geográfico. Posteriormente, y debido a la aridez creciente de las regiones del Mediterráneo y del Mar Negro, *R. rupicapra* se debió extender hacia el oeste no después del final del Würm rompiendo el rango de *R. pyrenaica* aunque no se habría extendido más allá del norte de los Apeninos y el oeste de los Alpes. Entonces, *R. pyrenaica* se habría separado en dos grupos: *R. p. parva* y *R. p. pyrenaica* por un lado y *R. p. ornata* por otro (Lovari y Scala 1980; Masini 1985; Masini y Lovari 1988). Al llegar el Holoceno, el actual periodo interglaciar, los rebecos verían restringido su hábitat de nuevo y poco a poco quedarían aisladas en los puntos más elevados de Europa y Asia Menor.

1.3. Diferenciación genética entre poblaciones y especies.

La diversidad genética existente en las poblaciones es la base material de la cual dependen los procesos de adaptación y especiación. Los niveles de variabilidad elevados confieren a las especies la capacidad de responder a amenazas como pueden ser las enfermedades, depredadores o cambios ambientales tanto a largo como a corto plazo (Amos y Harwood 1998). Por tanto la valoración de los niveles de variación genética existentes en las poblaciones, ya sean naturales o domésticas, es de gran importancia tanto para el conocimiento de la historia evolutiva de una especie como para la elaboración de programas de conservación genética. Los marcadores genéticos tienen también gran utilidad de cara a la realización de estudios ecológicos, organización social y paternidad.

Un aspecto importante de los polimorfismos genéticos, es que permiten la comparación directa de los niveles de diferenciación genética entre cualquier grupo de organismos, ya sea dentro de la especie o entre especies diferentes. Esto nos da la oportunidad de emplear estos polimorfismos genéticos para llevar a cabos estudios a distintos niveles a lo largo de la jerarquía filogenética. Estos niveles irían desde la identidad genética de un individuo o estudios de paternidad, al estudio de la macroevolución, o lo que es lo mismo, el estudio de las relaciones filogenéticas entre distintas especies, pasando por toda una serie pasos intermedios (Avise 2004).

Dentro de las utilidades potenciales del estudio de la diversidad genética podemos destacar tres relacionadas con el estudio de la evolución y diferenciación de las poblaciones:

Subdivisión poblacional. Cuando existe subdivisión de una población, es inevitable la existencia de alguna diferenciación genética entre las distintas subpoblaciones que puede ser el resultado de que la selección natural favorezca diferentes genotipos en distintas subpoblaciones pero también de procesos aleatorios en la transmisión genética de una generación a la siguiente o de efectos fundadores en las subpoblaciones (Hartl y Clark

1997). La estructura subdividida de las poblaciones ha sido revelada en numerosas especies a partir de la utilización de marcadores moleculares y parece estar influenciada por una amplia variedad de factores, entre ellos la naturaleza del sistema de apareamiento y el nivel de intercambio genético entre subpoblaciones (Avise 2004).

Aislamiento y diferenciación filogeográfica. La filogeografía busca correlacionar la congruencia entre las historias evolutivas, demográficas y de distribución de taxones con su particular asentamiento ecológico y geológico de una región, determinando también la cronología de su diversificación evolutiva (Bermingham y Moritz 1998). La Filogeografía es un campo de estudio que concierne a los principios y procesos que gobiernan las distribuciones geográficas de las líneas genealógicas, especialmente aquellas dentro de especie y entre especies relacionadas. Esta disciplina se centra explícitamente en los componentes históricos o filogenéticos de la estructura poblacional; cómo pudo haber sido influenciada por la deriva genética, el flujo génico, la selección natural u otras fuerzas evolutivas (Avise 2004). En términos más amplios, la contribución más importante de la filogeografía a la biología ha sido destacar las conexiones estrechas que inevitablemente existen entre la demografía, la geografía y la genealogía y distribución de linajes, construyendo un puente empírico entre dos campos como son la genética de poblaciones y la biología filogenética.

El estudio de la diferenciación genética entre poblaciones en relación a su distribución geográfica permite inferir los procesos evolutivos que han llevado a que una especie presente su estructura filogeográfica actual. La distribución geográfica actual de los organismos depende tanto de parámetros históricos como ecológicos. Así, se sabe que los períodos fríos del Cuaternario en Europa han tenido una gran influencia en la cantidad y distribución de la variedad genética intraespecífica tanto en plantas como en animales (Taberlet et al. 1998). Actualmente, un número cada vez mayor de estudios basados en polimorfismos de ADN nos da una idea de la influencia que las glaciaciones del Pleistoceno han tenido en la expansión y contracción del área de distribución de las especies y su evolución (Hewitt 1996; Hewitt 2004; Avise et al. 1998; Taberlet et al. 1998).

Clasificación taxonómica y Conservación. Una aplicación importante de los marcadores moleculares es la identificación de subespecies, subdivisiones poblacionales naturales que se encuentran un paso por debajo del rango de especie. Se cree que la diferenciación genética en subespecies es un reflejo del aislamiento geográfico, en el que no existe intercambio genético entre los distintos grupos poblacionales durante un periodo de tiempo suficiente para que la subdivisión genética de la población sea reconocible a nivel de fenotipo externo, y/o por su implicación en la adaptación de la

subespecie a su medio. La combinación de estudios morfológicos, etológicos y moleculares ha permitido la revisión de clasificaciones en subespecies de distintos grupos de animales (O'Brien 1994).

La filogenética molecular, estima las relaciones evolutivas entre especies y niveles jerárquicos más elevados utilizando marcadores moleculares. Después de que las barreras reproductivas se han constituido y el proceso de especiación ha sido completado, los caracteres moleculares continúan evolucionando de una forma más o menos dependiente del tiempo, de tal forma que la distancia genética entre los taxones nos da una idea de la magnitud del tiempo evolutivo que los separa de su ancestro común.

En el campo de la conservación, varios son los objetivos buscados a partir del estudio de marcadores moleculares. Por una parte la descripción de los cambios genéticos que afectan a una población en peligro y la aplicación de estos marcadores para llevar a cabo un manejo adecuado de las poblaciones amenazadas (O'Brien 1994). Por otra la definición de las unidades y poblaciones a conservar. Se han definido dos conceptos que son el de ESUs (*Evolutionary Significant Units*) o unidades evolutivas significativas, y el de MUs (*Management Units*) o unidades de manejo (Moritz 1994; Moritz 1996). Las MUs se corresponderían con grupos de poblaciones demográficamente independientes, mientras que las ESUs representarían a grupos de poblaciones históricamente aisladas que reunirían en su conjunto la diversidad evolutiva de un taxón. Así las MUs serían las unidades adecuadas para controlar las respuestas de las poblaciones a impactos ambientales y de manejo, mientras que las ESUs constituirían las unidades más amplias que las acciones de conservación tienden a preservar (Moritz, 1996).

Las ESUs han sido definidas genéticamente como unidades de conservación (poblaciones o grupos de poblaciones) que muestran diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los loci nucleares y que son recíprocamente monofiléticas para el ADN mitocondrial. Son, por tanto, esencialmente equivalentes a las especies definidas bajo el concepto filogenético (Vogler y DeSalle 1994) y reflejan una separación filogeográfica histórica. Las MUs por su parte están basadas en las diferencias en las frecuencias de los alelos, sin importar las relaciones filogenéticas entre éstos y son las unidades de conservación a pequeña escala dado que contienen la diversidad de la especie (Moritz 1996).

La identificación de ESUs y MUs es importante de cara al manejo de poblaciones, especialmente cuando se realiza un manejo y recuperación activa de las mismas, por ejemplo mediante reintroducciones, ya que esto nos permitirá tomar decisiones en la conservación de especies con un mayor grado de información y evitar así mezclar individuos de poblaciones genéticamente divergentes (Firestone et al. 1999).

1.4. Variabilidad genética y filogenia del género *Rupicapra*.

Los estudios previos de variabilidad genética y de filogenia del género *Rupicapra* no son abundantes. Una serie de trabajos se limitan a estudiar la variabilidad genética y estructura de alguna de las subespecies de rebe-
co. Así, basándose en isoenzimas, Pemberton et al. (1989) estudiaron la
población cartusiana (*R. r. cartusiana*) y Pérez-Barbería et al. (1996) la
población cantábrica (*R. p. parva*). Esta población fue también estudiada
por nuestro grupo (Pérez et al. 1996) para ADN minisatélite. Finalmente,
la población de rebecos de Austria de la subespecie *R. r. rupicapra*, ha sido
ampliamente estudiada mediante ADNmt e isoenzimas (Schaschl et al.
2003). También se han llevado a cabo estudios de variabilidad genética en
loci del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las subespecies
parva y *pyrenaica* (Alvarez-Busto et al. 2007) y en el rebe-
co alpino (Schaschl et al. 2004; Mona et al. 2008). Todos estos trabajos demostraron, en
mayor o menor medida, una estructuración de las poblaciones de rebe-
co en subpoblaciones.

Los estudios sobre taxonomía y filogenia del género *Rupicapra* son es-
casos. Lovari y Scala (1980, 1984) han revisado la clasificación del género
sobre la base de caracteres morfológicos. Algunos artículos comparan dos
o tres de las subespecies propuestas para *loci* enzimáticos (Nascetti et al.
1985) o para ADNmt (Hammer et al. 1995; Randi et al. 2002; Kmet et
al. 2002). Estos trabajos están muy limitados por el reducido número de
muestras utilizado.

En los trabajos que presentamos a continuación, liderados por nuestro
grupo en la Universidad de Oviedo, se estudia la diversidad poblacional,
filogeografía y taxonomía del género *Rupicapra* mediante el estudio del
ADN. Se analizan distintos tipos de marcadores, ADN nuclear micro-
satélite (Pérez et al. 2002), ADN mitocondrial (Rodríguez et al. 2009)
y un pseudogén (copia no funcional de un gen) mitocondrial que hemos
identificado en el núcleo (Rodríguez et al. 2007). Estos tres tipos de mar-
cadores, que se describirán con más detalle en el apartado de Material y
Métodos, presentan distintas características que los hacen útiles para estu-
diar los sucesos evolutivos que han tenido lugar a distintos tiempos antes
del presente. La información obtenida mediante microsatélites permite
hacer inferencias a niveles bajos de diferenciación tal como poblaciones
geográficamente aisladas. El ADN mitocondrial permite estudiar niveles
superiores de diferenciación, es idóneo para estudios filogeográficos al ni-
vel de subespecie y de especies próximas. En taxonomía, la variación para
ADNmt está siendo muy utilizada últimamente para valorar la clasifica-
ción intraespecífica. Dado que las mutaciones se acumulan en los linajes
de organismos a lo largo del tiempo, se podría hacer un símil con un reloj
en el que las secuencias microsatélite representarían el segundero y el ADN

mitocondrial representaría el minutero. Así el ADNmt es útil en tiempos de divergencia del orden de centenas de miles de años, mientras que los microsatélites lo son para tiempos de decenas de miles de años. Por último, se ha estudiado además la variación en secuencia para un pseudogén mitocondrial identificado en el núcleo. La acumulación de mutaciones en el núcleo es mucho más lenta que en la mitocondria, siguiendo con el símil del reloj, el cambio de secuencia en el núcleo representaría la aguja de las horas. Por ello, un gen transferido al núcleo queda “congelado” sin sufrir apenas cambios respecto a la copia originalmente transpuesta por lo que puede ser considerado como un fósil viviente del gen mitocondrial.

Los objetivos que perseguimos con estos trabajos son estudiar los efectos de los cambios históricos y geográficos en la diversificación de las especies y poblaciones actuales de rebecho. Atendiendo a la distribución geográfica actual de los distintos linajes genéticos se pueden inferir sucesos de fragmentación y aislamiento de poblaciones y grandes migraciones, y relacionarlos con los grandes cambios climáticos que tuvieron lugar en Europa en el Cuaternario. Esta información se puede comparar con otros estudios filogeográficos y tratar de llegar a conclusiones más generales sobre la evolución y la especiación. Por otro lado, la comparación de las distintas subespecies de rebecho para marcadores genéticos permite analizar las discontinuidades entre grupos y relacionarlas con las discontinuidades observadas a nivel morfológico, que originalmente se utilizaron para definir los distintos grupos taxonómicos, contribuyendo así a la clasificación taxonómica. En último término, el análisis de la diversidad genética de las distintas poblaciones permite valorar la endogamia sufrida por las mismas y su capacidad de adaptación. El análisis de la distribución de la diversidad dentro de población nos proporciona además información sobre su estructura más o menos fragmentada. Toda esta información tiene también relevancia desde el punto de vista de la conservación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Muestras.

En total se analizaron 239 muestras de rebecho pertenecientes a las 10 subespecies reconocidas. Estas muestras fueron colecciónadas en la Universidad de Oviedo (156) y en la Universidad de Viena (83) que participó en el estudio de ADN mitocondrial. Las muestras fueron donadas por una variedad de personas e Instituciones que van desde biólogos y universidades a asociaciones de cazadores, guardas de caza o taxidermistas. El tipo de muestra fue también de lo más heterogéneo dependiendo del lugar de procedencia y de la facilidad para conseguir uno u otro tejido. Se dispuso de muestras de hígado, músculo, piel, pelo, diente o hueso. Las

muestras de hígado, músculo o piel fueron fijadas en alcohol 95% para su posterior traslado al laboratorio. Las muestras de hueso o diente se nos remitían, una vez descarnadas, sin ningún tipo de medida especial de conservación. Para el análisis de ADN microsatélite se dispuso de 147 muestras (véase la Tabla 1) entre las que no estaban representadas las subespecies *R. r. cartusiana* y *R. r. asiatica* y otras como *R. r. tatraica* y *R. p. ornata* lo estaban pobemente. Para el análisis de ADN mitocondrial, gracias a la colaboración con otras universidades, pudimos contar con muestras de las 10 subespecies (véase la Tabla 2). El número de muestras analizado para ADN microsatélite fue de 147, mientras que para ADN mitocondrial se analizaron 189 muestras, 97 de las cuales fueron incluidas en el estudio de los dos tipos de marcadores.

2.2. Marcadores de ADN.

ADN microsatélite. Los marcadores microsatélites, también llamados STR (del inglés Simple Tandem Repeats, Repeticiones Simples en Tándem) fueron descritos por primera vez en 1989 (Tautz 1989). Son marcadores nucleares que se caracterizan por poseer unidades repetidas de un motivo de 1-6 pares de bases, variando el número de repeticiones de un marcador entre 10 y 60 por regla general. Debido a su excepcional variabilidad y facilidad de análisis están considerados como los marcadores genéticos más poderosos para el análisis intrapoblacional y comparación de poblaciones de una especie (Goldstein y Pollock 1997). Es típico observar marcadores con más de diez alelos y en algún caso se han encontrado hasta 56 alelos en un solo marcador.

Los marcadores microsatélite se han hecho muy populares por su utilización en la identificación individual en genética forense o en investigaciones policíacas y también en pruebas de paternidad. Presentan gran número de ventajas técnicas como su facilidad de obtención, su distribución a lo largo de todo el genoma y las mínimas cantidades de ADN necesarias (incluso partiendo de ADN muy degradado) que los convierten en los marcadores más utilizados actualmente para análisis de poblaciones.

En nuestros estudios sobre rebecho hemos adaptado marcadores microsatélites que habían sido descritos en cabra (15 marcadores) y vaca (15 marcadores) para su utilización en rebecho. De los 30 marcadores probados hemos rechazado 7 de manera que los análisis filogenéticos se hicieron con 23 marcadores microsatélite.

ADN mitocondrial. En animales superiores, el ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula pequeña y circular de un tamaño de 16-20 kilobases. Está formada por 37 genes relacionados con la oxidación y además hay una región conocida como lazo-D (D-loop), que es el sitio de inicio de la replicación y transcripción.

Esta molécula presenta unas propiedades muy deseadas e ideales a la hora de realizar análisis filogenéticos (Avise et al. 1987) como son:

- Está distribuida universalmente (en todos los organismos superiores), pudiendo hacer comparaciones homólogas entre una gran variedad de organismos.
- Fácil de aislar y analizar.
- Tiene una estructura genética simple.
- Evoluciona a un ritmo bastante alto; hasta 15 veces más rápido que el ADN nuclear.
- Se hereda estrictamente por vía materna.

El ADN mitocondrial ha proporcionado a los evolucionistas una herramienta extensiva y de fácil acceso adecuada para hacer inferencias genealógicas a un nivel intraespecífico o entre especies próximas. El ritmo rápido de sustitución nucleotídica (sustitución de una base por otra en el ADN de un linaje) respecto a las secuencias nucleares junto con el tipo especial de herencia materna sin recombinación, ofrece ventajas para el análisis filogenético.

Con la llegada de la secuenciación del ADN mediada por PCR (del inglés polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa), los análisis de poblaciones basados en ADNmt se han multiplicado y en la actualidad son los más utilizados en estudios de filogeografía y evolución de especies próximas.

Para nuestro análisis hemos utilizado un fragmento de 349 pares de bases del gen mitocondrial que codifica para el citocromo *b*.

Numts; pseudogénes de origen mitocondrial. En ocasiones existe ADN, homólogo al ADN mitocondrial (ADNmt) pero integrado en el genoma nuclear (descrito por primera vez en 1967 por Du Buy y Riley). Estas copias de genes mitocondriales localizadas en el núcleo (Numts) han perdido su función y son por lo tanto lo que se denomina pseudogénes (secuencias que parecen genes pero no lo son porque han perdido su función). Los pseudogénes acumulan mutaciones sin el filtro de la selección natural.

En los estudios filogenéticos se produce a veces la inclusión no intencionada de pseudogénes cuando una especie tiene Numts parálogos a la región de ADNmt de interés. Esto se debe a que los cebadores usados en la PCR podrán hibridar con los Numts tanto o más que con la secuencia mitocondrial y en ese caso el producto amplificado será el pseudogén nuclear. La presencia inadvertida de Numts puede llevar a la realización de filogenias moleculares, que aunque sean creíbles y bien soportadas estadísticamente, son en realidad incorrectas. Por ejemplo, se han confundido Numts humanos con ADNmt de dinosaurio al amplificar como contaminantes y no ser reconocidos (Zischler et al. 1995a).

A pesar de todos los problemas prácticos que pueden acarrear, los Numts pueden ser usados como marcadores genéticos como propuso Arctander (1995):

La presencia de un Numt en un locus específico puede ser usada como marcador genético, pues si está en más de un taxón indica que poseen un ancestro común. La presencia o ausencia de Numts en *loci* específicos servirían para determinar el orden de ramificación filogenética de diferentes especies. Los números de copias de Numt pueden también ser usados como marcador genético en variedades de plantas, tal y como se hace con los elementos transponibles.

Los Numts pueden usarse para trazar estados ancestrales de ADNmt en determinados sitios nucleotídicos (Lopez et al. 1997; Lü et al. 2002). El conocimiento independiente de estos estados ancestrales puede ayudar a resolver filogenias mitocondriales donde existan ambigüedades. Esto es particularmente útil en humanos, donde se han usado Numts para enraizar filogenias de poblaciones (Zischler et al. 1995b).

En nuestros análisis del gen del citocromo *b* de rebeco nos encontramos con secuencias que presentaban una mutación de cambio de pauta de lectura. Estas mutaciones resultan letales dado que cambian totalmente la proteína que consecuentemente pierde su funcionalidad. El estudio de estas secuencias permitió demostrar que se trataba de copias no funcionales del gen que se había transpuesto al núcleo (*pseudogén*), permaneciendo una copia funcional en la mitocondria. El pseudogén del citocromo *b*, accidentalmente identificado, fue posteriormente incluido en el análisis de la historia evolutiva del rebeco.

2.3. Técnicas experimentales.

En general las técnicas utilizadas para el estudio consisten en la extracción de ADN, la amplificación de las secuencias de interés utilizando cebadores específicos y aplicando la técnica de la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) y el análisis de los productos de la amplificación, ya sea análisis del tamaño del producto obtenido, ya sea su secuencia.

Extracción de ADN. Se utilizaron distintos protocolos de extracción de ADN en función del tejido disponible en cada caso. Básicamente, los métodos para aislar ADN consisten en romper las células, degradar las proteínas mediante enzimas y detergente, y precipitar el ADN con alcohol. En general, debido al tipo de muestras disponibles, se obtiene ADN muy fragmentado y en baja concentración que sólo es válido para analizar secuencias de pequeño tamaño por PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica fue introducida por Mullis en 1985 (en 1993 este descubrimiento le valió el

Premio Nobel) y revolucionó la biología molecular. La técnica consiste en obtener un gran número de moléculas de un fragmento particular y pequeño de ADN partiendo de cantidades mínimas de molde y unos cebadores específicos de la secuencia concreta de ADN que se quiere amplificar.

Análisis del tamaño de fragmentos de ADN. En el caso de los marcadores microsatélites las diferencias se revelan como diferencias en el tamaño de los fragmentos amplificados. La determinación del tamaño se hizo por electroforesis capilar. Los fragmentos amplificados se someten a un campo eléctrico que les hace correr por un capilar a distinta velocidad dependiendo de su tamaño.

Secuenciación de ADN. En la actualidad las técnicas de secuenciación resultan rápidas y relativamente baratas. Tras la amplificación por PCR, los fragmentos del gen del citocromo *b* (o en su caso el pseudogén del citocromo *b*) fueron secuenciados por el método de la terminación de cadena con terminadores fluorescentes en un secuenciador automático.

3. RESULTADOS

Como hemos dicho, los distintos marcadores utilizados, microsatélites, gen mitocondrial del citocromo *b* y pseudogén nuclear del citocromo *b* presentan distintas tasas evolutivas y por tanto nos hablan de la historia evolutiva del rebecho en distintas épocas, desde las más recientes hacia las más remotas. Presentaremos los resultados en ese orden.

3.1. Análisis de la variación para marcadores microsatélite

Los datos sobre variabilidad en las distintas poblaciones de rebecho para los 23 marcadores microsatélites incluidos en el estudio se presentan en la **Tabla 1**. El número medio de alelos por locus fue de 7,78. En conjunto 3 marcadores resultaron monomórficos y considerando únicamente a la población cantábrica, 6 marcadores fueron monomórficas. El número total de alelos fue 179, de ellos 132 están presentes en *R. pyrenaica* y 148 en *R. rupicapra*.

Las heterocigosidades esperadas (igual a la diversidad en diploides) varían entre 0,38 y 0,51. En general, las heterocigosidades observadas son ligeramente más bajas que las esperadas, indicando así un exceso general de homocigotos, que en el caso de las subespecies *R. r. carpatica* y *R. r. balcanica* alcanza valores significativos ($p<0,001$). Un análisis de varianza de las heterocigosidades individuales observadas revela diferencias entre poblaciones ($F_{8,130}=10,28$; $P=4,5*10^{-11}$). Las poblaciones de los Alpes, los Pirineos y el este de la Cordillera Cantábrica son significativamente más variables ($\alpha= 0,05$) que las poblaciones de Cárpatos, Cáucaso y del Oeste

de la Cordillera Cantábrica. El único individuo de los Apeninos analizado es menos heterocigoto (sólo para dos marcadores) que cualquier otro ya sea de las poblaciones de *R. rupicapra* o *R. pyrenaica*.

Tabla 1. Estadística descriptiva de la variación para marcadores microsatélites.

ESPECIE	SUBESPECIE	ÁREA	n	LP	A	PA	P-HW	He	Ho
<i>Rupicapra pyrenaica</i>	<i>parva</i>	W	19,00	0,68	3,00	2	0,1856	37,91	36,16
	<i>parva</i>	E	21,00	0,76	3,72		0,3800	44,92	45,13
	<i>pyrenaica</i>	W	24,00	0,76	4,44	12	0,1069	44,40	44,02
	<i>pyrenaica</i>	E	17,00	0,76	4,16		0,2278	43,01	39,13
<i>Rupicapra rupicapra</i>	<i>ornata</i>		1,00	0,08	1,08	2	-	-	8,70
	<i>rupicapra</i>	W	18,00	0,83	4,08	2	0,3373	50,77	47,58
	<i>rupicapra</i>	E	11,00	0,83	3,71		0,1143	48,15	46,25
	<i>tatrica</i>		2,91	0,79	2,29	1	0,7848	46,96	42,75
	<i>carpatica</i>		17,00	0,79	3,04	3	0,0007	37,78	30,69
	<i>balcanica</i>		6,78	0,74	3,09	5	0,0005	48,76	35,61
	<i>caucasica</i>		6,43	0,58	2,83	6	0,1733	37,74	32,09

n, número medio de individuos genotipados por locus (igual al número de individuos excepto en *tatrica*, *balcanica* y *asiatica* en que algunas amplificaciones fallaron debido a baja calidad del ADN); LP, proporción de loci polimórficos; A, número medio de alelos por locus; PA, número de alelos únicos; P-HW, Probabilidad exacta asociada a la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg; He, heterocigosidad esperada o diversidad en %; Ho, Heterocigosidad observada en %.

Para estudiar las relaciones entre todos los individuos y la diferenciación entre poblaciones se realizó un árbol filogenético (por el método de Unión al Vecino, en inglés “Neighbor-Joining”) con 143 individuos (3 individuos para los cuales el genotipo *multilocus* era incompleto fueron eliminados de este análisis). El árbol se basa en la proporción de alelos compartidos por cada par de individuos. En la Figura 2 se pueden ver importantes diferencias entre aquellas subpoblaciones que pertenecen a diferentes especies. El individuo de los Apeninos y uno de los individuos de los Balcanes, sin embargo, no agruparon tan próximamente a su grupo específico como el resto de individuos. También se puede apreciar una gran diferenciación entre poblaciones geográficamente aisladas, reconocidas como subespecies, e incluso entre subpoblaciones. La proporción de la variación (medida por el estadístico F_{ST} de Wright) entre pares de subpoblaciones está entre el 5% y el 13%. En concreto, el valor de F_{ST} para las dos subpoblaciones cantábricas fue de 0,13.

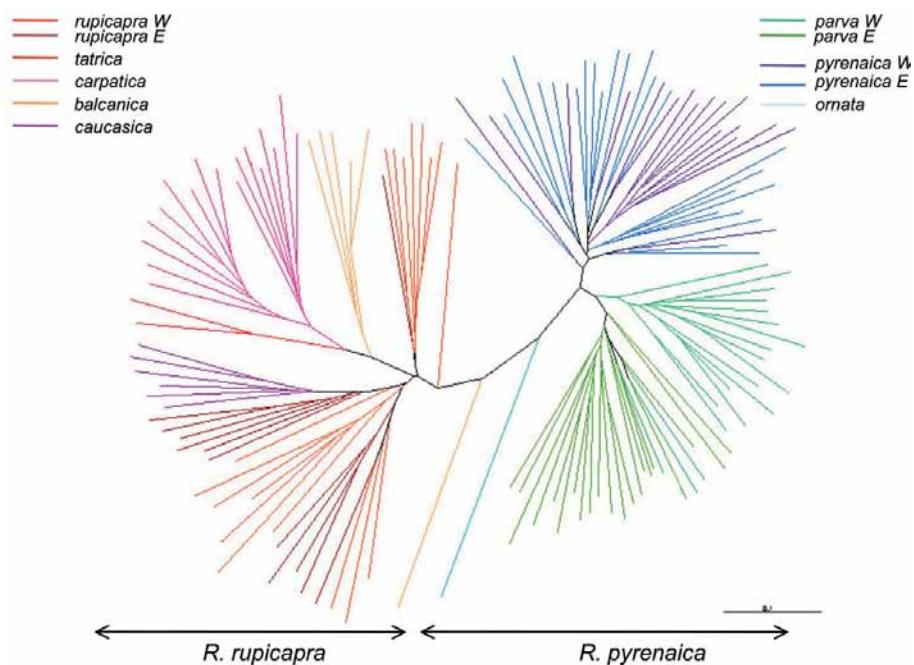


Figura 2. Árbol construido por el método de “unión al vecino” a partir de las distancias entre todos los pares de individuos para microsatélites.

En 17 de los 23 marcadores analizados se encontraron alelos únicos de especie, 30 para *R. pyrenaica* y 47 para *R. rupicapra*. De estos, solo un locus (el locus SR-CRSP-06) puede ser considerado como diagnóstico, pues presenta un total de seis alelos en *R. pyrenaica* con un rango en tamaño comprendido entre 143 y 153 pares de bases, mientras que en *R. rupicapra* sólo se encontraron dos alelos de tamaños 139 y 141 pb. Entre los alelos únicos de especie, 33 fueron además específicos de subespecie. Es un hecho a destacar que la población de Apeninos con sólo un individuo muestreado presentara dos alelos únicos.

Las relaciones entre las distintas poblaciones y subpoblaciones se analizaron mediante diferentes estimadores de distancia genética, dando todos ellos resultados similares. Cuando representamos las distancias (en este caso se representa la distancia ($\delta\mu$)² específicamente diseñada para microsatélites) calculadas entre pares de poblaciones y subpoblaciones frente a la distancia geográfica entre ellas (Figura 3), podemos ver la existencia de una clara correlación ($r=0,66$) entre ambas medidas ($P=0,00034$, test de Mantel). Puede observarse que la relación entre distancias genéticas y geográficas es similar tanto al nivel de pares de poblaciones dentro de especies como en los pares de poblaciones entre especies, pero las distancias medias son mayores en este último caso. Del mismo modo podemos comprobar que los pares intraespecíficos que incluyen la población de Apeninos mues-

tran distancias genéticas mayores de lo que esperaríamos por sus distancias geográficas si nos basamos en los valores de la línea de regresión. Debemos recordar, no obstante, que estas comparaciones incluyen un único individuo para la población de Apeninos.

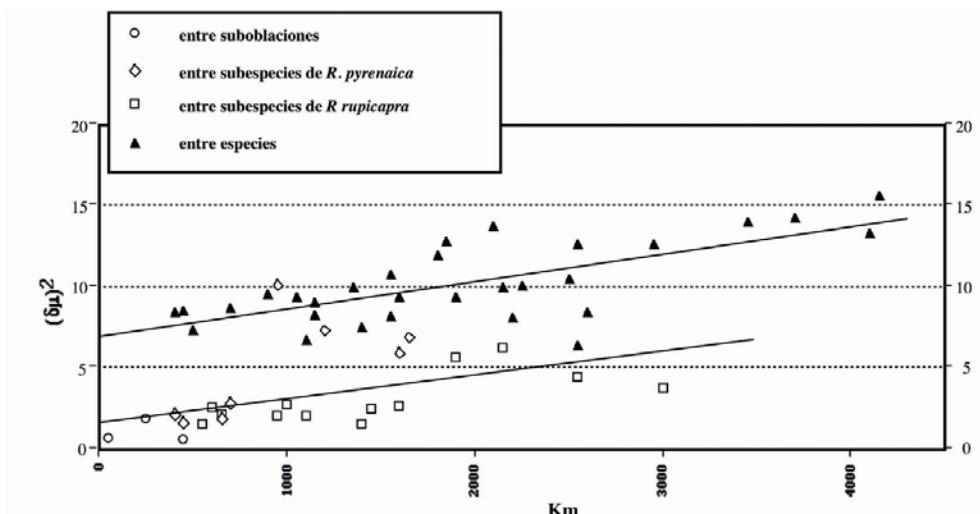


Figura 3. Relación entre distancias genéticas ($\delta\mu$)² entre pares de poblaciones y distancias geográficas.

A partir de las matrices obtenidas con las distancias genéticas se elaboraron distintos tipos de árboles filogenéticos (UPGMA y “Neighbor-Joining”) que nos ofrecen el mismo resultado. El conjunto de poblaciones analizadas se agrupa en dos ramas cada una de las cuales representa una de las dos especies propuestas, *R. pyrenaica* y *R. rupicapra*.

El árbol construido a partir de las distancias genéticas ($\delta\mu$)² por el método UPGMA se presenta en la Figura 6 donde se puede apreciar que encaja de una manera bastante evidente con el mapa de las áreas de distribución geográfica del rebecho.

3.2. Análisis de la variación para la secuencia del gen mitocondrial del citocromo *b*.

El alineamiento de las secuencias (de una longitud de 349 nucleótidos) en los 189 individuos mostró 20 haplotipos (o variantes de la secuencia) diferentes. Los haplotipos fueron numerados consecutivamente según se iban identificando. Durante la experimentación, como ya hemos dicho, se produjo la amplificación no intencionada de un pseudogén nuclear del citocromo *b*. Los números 14 y 15 fueron asignados a haplotipos correspondientes al pseudogén, de forma que los números de los haplotipos mitocondriales van del 1 al 22, excepto el 14 y el 15. En el conjunto de los haplotipos se identi-

ficaron 27 sitios polimórficos que presentaron 27 sustituciones de bases. De las 27 sustituciones 23 fueron del tipo “transición” (cambio de A por G o de C por T y viceversa, incluyen un tercio de los cambios posibles) y 4 fueron “transversiones” (cualquiera de las otras sustituciones que representan dos tercios de las posibles). Con respecto a su efecto sobre la proteína, 21 sustituciones fueron sinónimas (la mutación no produce cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína y por tanto no altera su funcionalidad) y 6 fueron no sinónimas (mutaciones que cambian la secuencia de la proteína y que por lo tanto pueden tener una efecto sobre la función de la misma). Las medidas de diversidad (Tabla 2) fueron altas. La subespecie *R. rupicapra rupicapra*, de los Alpes, mostró una diversidad mucho mayor que el resto y en particular la diversidad nucleotídica de la muestra procedente de Val di Susa en los Alpes más occidentales fue muy elevada. Las subespecies *balcanica*, *cartusiana* y *ornata* mostraron diversidades extremadamente bajas.

Las relaciones filogenéticas entre todos los haplotipos fueron analizadas mediante la construcción de árboles. Distintos métodos, ya sean basados en distancia genética entre haplotipos, en máxima verosimilitud o en parsimonia, dieron la misma topología (**Figura 4**).

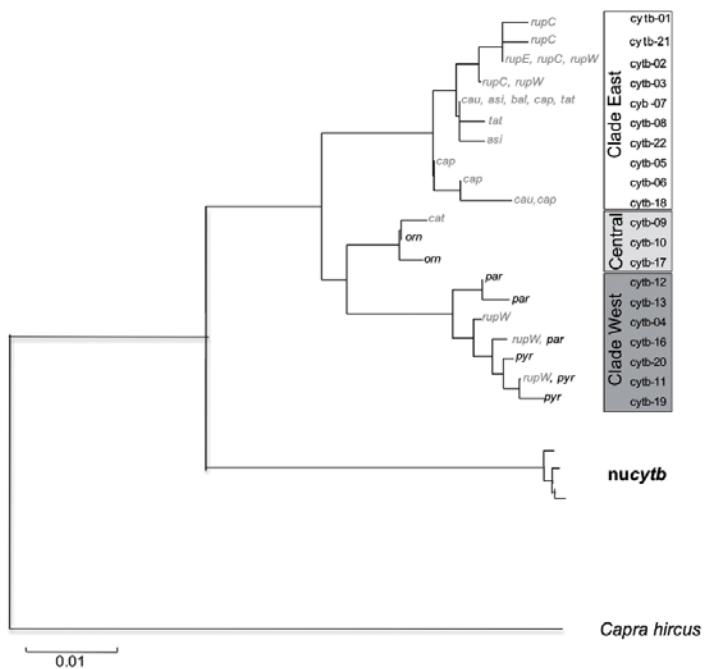


Figura 4. Árbol construido por el método de “unión al vecino” a partir de las distancias entre secuencias del citocromo *b*, que representa las relaciones entre distintos haplotipos. Al final de cada rama se dan los nombres abreviados de las poblaciones en las que se identificaron los distintos haplotipos mitocondriales, en gris poblaciones de *R. rupicarpa* y en negro las poblaciones de *R. pyrenaica*.

Los 20 haplotipos se dividen en tres grupos o clados (clado: una de las ramas principales de un árbol evolutivo) principales que fueron denominados Clado Oeste, Clado Central y Clado Este, atendiendo a la procedencia geográfica de las muestras que los presentan. En el árbol se presentan también los haplotipos correspondientes al pseudogén nuclear del citocromo *b* (que comentaremos más adelante) y un haplotipo de la cabra, *Capra hircus*, como grupo externo.

Las relaciones evolutivas entre los 20 haplotipos mitocondriales fueron analizadas también mediante la construcción una red (Median-Joining Network). Este método difiere de los, más tradicionales, árboles filogenéticos en que, al contrario que en aquellos, haplotipos presentes en la actualidad pueden ocupar nodos intermedios. La red de haplotipos (Figura 5) muestra el agrupamiento de los mismos en los tres grandes clados ya descritos.

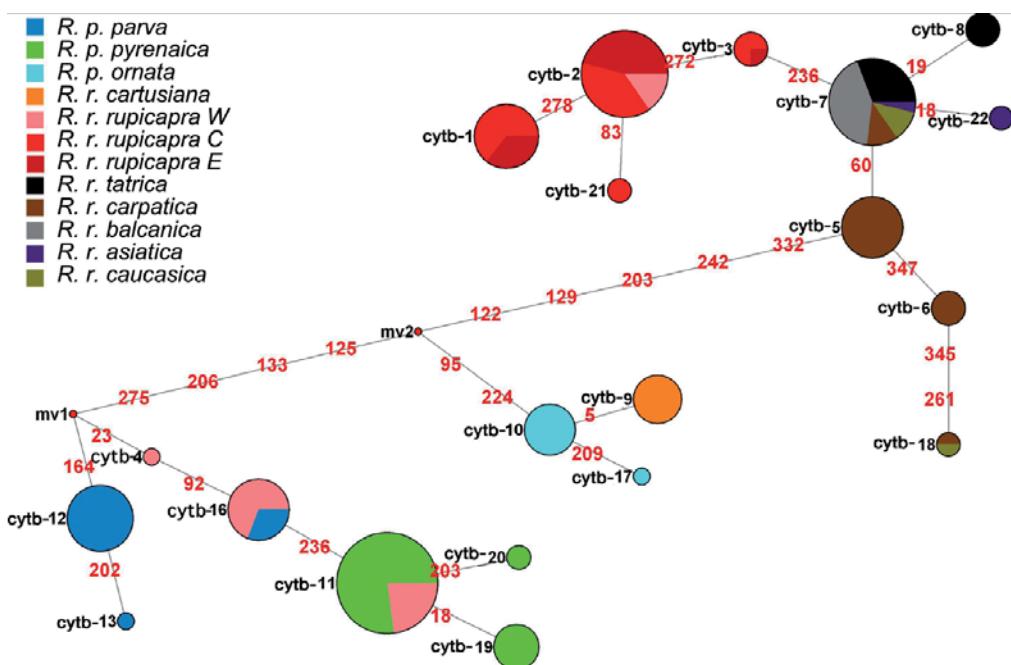


Figura 5. Red de los haplotipos de la secuencia mitocondrial del citocromo *b*. Las áreas de los pasteles corresponden a frecuencias de los haplotipos y se representa la proporción correspondiente a cada subespecie en distintos colores.

En la figura se muestra además la frecuencia de los distintos haplotipos y su distribución geográfica. El clado Oeste (West) está representado por 7 haplotipos muestreados en la Cordillera Cantábrica, los Pirineos y los Alpes Occidentales. El clado Central esta representado solamente por 3 haplotipos muestreados en los Apeninos y el Macizo de Chartreuse, en los Alpes franceses. Por último, el clado Este (East) es el más diverso y está

representado por 10 haplotipos muestrados en Europa Central, los Balcanes, Turquía y el Cáucaso. En la **Figura 6** se sintetiza la distribución de los tres clados principales sobre el mapa de Europa y oeste de Asia.

3.3. Relaciones filogenéticas entre el pseudogén nuclear y el gen mitocondrial del citocromo *b*.

Como hemos dicho, en el estudio de las secuencias del gen del citocromo *b* nos encontramos accidentalmente con un pseudogén nuclear. Vamos a describir sucintamente cómo fue identificado el pseudogén. Al amplificar la secuencia del citocromo *b*, por PCR y utilizando cebadores universales (no específicos para rebecho) nos encontramos con haplotipos que tenían una inserción en la posición 50 de la región codificante del gen. La inserción de un nucleótido al principio de la secuencia producía un cambio en la pauta de lectura dando lugar al cambio de la secuencia de la proteína desde ese punto y por tanto a una proteína no funcional. Esta información permite suponer que nos encontramos con una copia no funcional del gen, lo que se denomina pseudogén. Se conocen múltiples casos, en otros organismos, de la existencia de pseudogenes que son copia de un gen mitocondrial que se transpuso al núcleo perdiendo su funcionalidad. En nuestro caso, hemos comprobado la localización nuclear del pseudogén haciendo extracciones diferenciales de ADN. En 8 individuos se hicieron dos extracciones de ADN: una extracción estándar en la que se obtiene ADN total y una extracción específica de ADN mitocondrial. Tal como esperábamos, cuando se amplifica la secuencia del citocromo *b* utilizando como molde el ADN mitocondrial sólo obtenemos la copia funcional del gen, en cambio cuando se utiliza como molde el ADN total se obtienen por PCR las dos copias gen y pseudogén. La amplificación accidental indeseada del pseudogén nos obligó a diseñar cebadores específicos de la secuencia del gen mitocondrial de citocromo *b* de rebecho para el estudio de su evolución. Estos cebadores específicos producen un fragmento de 349 nucleótidos interno al fragmento amplificado con los cebadores universales que era de 402 nucleótidos.

Por otro lado, el análisis de la secuencia del pseudogén resultó útil debido a que un pseudogén mitocondrial que se transpone al núcleo puede considerarse como un fósil vivo. Esto es así debido a que las tasas de sustitución de nucleótidos en el núcleo de vertebrados son entre 5 y 10 veces menores que en la mitocondria. Un gen mitocondrial que se transpone al núcleo queda “congelado” (acumulando pocos cambios) en su nueva ubicación y por lo tanto nos sirve para conocer estados ancestrales de la evolución del gen.

Se obtuvieron ambas secuencias, del pseudogén y del gen, de cada uno de 8 individuos, 4 de la especie *R. pyrenaica* (los 4 cantábricos) y 4 de la especie *R. rupicapra* (1 del área occidental de los Alpes y 3 de la muestra

oriental). Del análisis filogenético de las 16 secuencias obtenidas utilizando la secuencia de *Capra hircus* como grupo externo se obtienen dos clados uno correspondiente al pseudogén y otro al gen mitocondrial. En la Figura 4 se incluyen las ramas correspondientes al pseudogén. La comparación del número medio de sustituciones por sitio entre las copias mitocondriales con la estima correspondiente en las copias nucleares muestra una tasa 6.86 veces mayor en la mitocondria que en el núcleo.

La comparación entre las secuencias del pseudogén y del gen del citocromo *b* de *Rupicapra* con las de las 14 especies de la tribu caprini “sensu lato”, según Ropiquet y Hassanin (2005), muestran que el pseudogén se originó después de la división de la rama que dio lugar a *Rupicapra*. El análisis de las sustituciones ocurridas en la rama del pseudogén hasta la separación entre las dos especies de *Rupicapra* muestra que todas ellas son funcionales y que por lo tanto el pseudogén corresponde a una rama ancestral que estuvo “viva” hasta un momento próximo a la separación de las dos especies de *Rupicapra*.

4. DISCUSIÓN

4.1. Variabilidad genética.

Atendiendo a la variación dentro de subespecie para ADN microsatélite en los casos en que disponemos muestras de distintas áreas, *parva*, *pyrenaica* y *rupicapra*, nos encontramos con valores de diferenciación genética significativos entre subpoblaciones que están alrededor del 10%, lo que indica un valor moderado de diferenciación genética, según Wright. Si se asume que las subpoblaciones están en equilibrio migración-deriva esto nos daría una estima de 2.1 migrantes (Nm) por generación. Valores de Nm menores de la unidad darían lugar a una diferenciación genética elevada, llevando a la fijación, por deriva, de alelos alternativos en diferentes poblaciones. Si Nm excede la unidad, puede originarse alguna diferenciación, pero no se llegan a fijar alelos alternativos. Valores de Nm mucho mayores que uno equivaldrían a panmixia. Si con el ADN minisatélite (Pérez et al. 1996) no encontrábamos diferencias significativas entre ambas subpoblaciones de rebecho cantábrico, Los estudios enzimáticos llevados a cabo en estas mismas poblaciones (Pérez-Barbería et al. 1996) arrojaron unos valores de diferenciación genética muy similares a los obtenidos para el análisis de marcadores microsatélites con un valor de $F_{ST}=0,072$. El cálculo del migrantes en las poblaciones cantábricas de rebecho presenta importantes limitaciones debido a que dichas poblaciones no están en una situación estable. El número de generaciones transcurrido desde que existen las barreras es limitado y éstas son crecientes, con lo que presumiblemente las subpoblaciones están aún en un proceso de diferenciación.

De los 23 *loci* microsatélite utilizados para el estudio de la filogeografía del rebecho, 20 resultaron polimórficos al considerar las 8 subespecies, tres más de los que habíamos encontrado cuando el estudio se había limitado a los individuos de la población cantábrica. El número de alelos por locus fue de 7,78. Las poblaciones de rebecho, consideradas por separado, presentan una media de tres o cuatro alelos por *locus* y una diversidad entre el 37% y el 56%. Estas estimas de la diversidad genética de las poblaciones son bajas si las comparamos con los valores descritos para otras especies de artiodáctilos, ya sean de especies domésticas o salvajes, (Bancroft et al. 1995; Forbes et al. 1995; MacHugh et al. 1997; Fickel y Reinsch, 2000) y comparables a las diversidades descritas en el ciervo de América del Norte, el wapiti (Polziehn et al. 2000). En el estudio de poblaciones asturianas llevado a cabo con marcadores minisatélites también se observaron bajos valores de variabilidad, comparables a los que se obtenían para especies de animales domésticas. Por el contrario, los niveles de diversidad nucleotídica para el citocromo *b*, un marcador que refleja una historia evolutiva más antigua, son comparables a los publicados para otros géneros de Artiodáctilos en Europa (Randi et al. 1998, 2004; Hundertmark et al. 2002).

Las diferencias entre poblaciones en los valores de diversidad genética, ya sea para microsatélites o para el citocromo *b*, están relacionadas con el tamaño de las mismas. Así, la población de los Alpes, representada en la actualidad por muchos miles de individuos, es la que mostró mayor diversidad. Por otro lado, el alto valor de diversidad nucleotídica en la población se puede relacionar con la mezcla de linajes diferentes que debieron colonizar los Alpes occidentales tras las glaciaciones como ha sido sugerido por Schaschl et al. (2003). Las subespecies *ornata* y *cartusiana*, clasificadas actualmente como “vulnerable” (Herrero et al. 2008; Alagnier et al. 2008), mostraron diversidades extremadamente bajas para el citocromo *b* y el único individuo de los Apeninos analizado para microsatélites presentó también una bajísima heterocigosidad. Los bajos valores de diversidad en estas subespecies se deben atribuir a su reducido tamaño de población. La subespecie *ornata* estuvo a punto de extinguirse por dos veces en el siglo XX, una a principios de siglo y otra en los años 40 (Lovari 1985) y se recuperó hasta un número de unos 1100 animales en 2006. La subespecie *cartusiana* pasó por un tamaño crítico de menos de 200 individuos en los años 80 y se recuperó hasta alcanzar los 2000 aproximadamente, en 2006 (Aulagnier et al. 2008).

Aunque las diferencias entre las heterocigosidades observadas y esperadas para microsatélites, fueron significativas solamente en las poblaciones de los Cárpatos y de los Balcanes, las heterocigosidades observadas fueron en general más bajas de lo esperado, lo cual denota una estructura espacial de dichas poblaciones. Si observamos el mapa de distribución del rebecho

en Europa (Figura 1), vemos como la distribución de la población de los Balcanes es discontinua, con grandes distancias de separación entre los distintos focos de distribución de la subespecie. Este hecho explica la existencia de una subestructura poblacional que se evidencia en la diferencia entre la heterocigosidad observada y esperada. La estructuración genética de las poblaciones puede explicarse de acuerdo con la biología y la organización social de esta especie. Las hembras de rebecho se reúnen en rebaños que se mueven dentro de un espacio limitado. Los machos, por su parte, viven en pequeños grupos o como individuos solitarios y frecuentemente migran distancias superiores a los 50 Km para reproducirse (Hamr 1985). Junto a su organización social y biología, la distribución espacial del rebecho y el intercambio entre rebaños se encuentra limitada por la fuerte influencia de las actividades humanas en la subdivisión del hábitat. Además, las poblaciones de rebecho que ocupan un ambiente de montaña, se dividen en áreas más o menos continuas de distribución donde el rebecho se organiza en rebaños pequeños. La estructuración de poblaciones de esta especie en subpoblaciones es puesta de manifiesto por la diferenciación entre muestras dentro de cada población. Moritz (1994) sugiere que las regiones con frecuencias alélicas diferentes significativamente y por tanto con bajas tasas de migración son importantes desde un punto de vista de manejo local y las define como unidades de manejo (MUs). Desde esta perspectiva, puede indicarse que las subpoblaciones locales de rebecho, dentro de una misma población, son significativamente diferentes unas de otras, presentando incluso alelos exclusivos, y así es importante el prevenir posibles descensos poblacionales con el fin de evitar la pérdida de variabilidad genética.

4.2. Taxonomía del género *Rupicapra*.

En la actualidad el rebecho se clasifica en dos especies, *R. pyrenaica* y *R. rupicapra* (Grubb 1993). Sin embargo, la taxonomía del género ha sido objeto de revisiones continuas como ya se ha dicho. Camerano (1914) distingüía la especie *Rupicapra ornata* además de las dos actualmente aceptadas. Posteriormente las 10 subespecies fueron consideradas una sola especie por Couturier (1938) y Dolan (1963) y, más recientemente, han sido agrupadas en dos especies (Nascetti et al. 1985).

El análisis del ADN mitocondrial proporciona información filogenética que es frecuentemente utilizada para diagnosticar especies usando el “concepto filogenético de especie” (Vogler y DeSalle 1994). Las unidades evolutivamente significativas (ESU, del inglés evolutionary significant units), esencialmente equivalentes a las especies definidas según el concepto filogenético, han sido definidas como grupos de individuos recíprocamente monofileticos para ADN mitocondrial y que también muestran diferencias significativas en las frecuencias alélicas de *loci* nucleares (Moritz 1994).

El análisis de microsatélites de 8 de las 10 subespecies propuestas separó claramente dos grupos correspondientes a las dos especies reconocidas lo que da algún soporte a la clasificación actual. Sin embargo, las dos especies reconocidas, *R. pyrenaica* y *R. rupicapra*, fueron polifiléticas (polifilético: que tiene varias ramas de un árbol evolutivo) para el citocromo *b* (véase la **Figura 6**). Los clados Oeste (W) y Central (C) están representados en ambas especies mientras el clado oriental (E) se encuentra solamente en *R. rupicapra*. Es interesante observar que *R. r. cartusiana* junto con *R. p. ornata* forman un clado independiente, el clado Central. La subespecie *cartusiana* no estaba incluida en nuestro primer análisis de microsatélites pero se ha descrito que presenta diferencias con otras poblaciones de *R. rupicapra* con respecto a isoenzimas (Pemberton et al. 1989). En nuestro laboratorio estamos realizando el análisis de esta subespecie para marcadores microsatélites que ayudarán a esclarecer la situación. La población de los Alpes italianos occidentales (*R. r. rupicapra* W) es polifilética con un haplotipo (cytb-02) perteneciente al clado E y dos haplotipos del clado W (cytb-11 y cytb-16). El clado Oeste (W) fue identificado en 16 individuos alpinos que agrupan junto con las poblaciones de Alpes del Este, Tatra, Cárpatos, los Balcanes y el Cáucaso en el análisis de microsatélites. Esta observación es una evidencia de la hibridación en el pasado entre las dos especies propuestas. En conclusión, al contrario a la clasificación actual del género en dos especies, la filogenia del citocromo *b* sugiere la clasificación en una sola especie *R. rupicapra* como había sido considerado por Couturier (1938) y Dolan (1963). (ver **Capítulo 1**, sobre el nombre asignado a la especie en este libro).

4.3. Filogeografía e historia evolutiva.

Según Masini y Lovari (1988), el rebecho o su antecesor directo puede haber llegado a Europa como un inmigrante tardío durante el Pleistoceno Inferior o el Pleistoceno Medio, desde el suroeste de Asia. El centro de dispersión del antecesor del rebecho pudo ser una región montañosa al oeste del Himalaya, y la migración hacia el oeste debe haber tenido lugar a través de las cordilleras del Sistema Alpino (Lovari 1987). La distribución geográfica actual de los haplotipos del citocromo *b* muestra una diferenciación este-oeste compatible con esta hipótesis. Utilizando la tasa de sustitución de nucleótidos de 0.63% sustituciones por millón de años (MA), calculada para el citocromo *b* de bóvidos (Hassanin y Douzery 1999), la diferenciación entre los clados Este y Oeste permite hacer una estimación de tiempo de divergencia que sería de 3.1 MA. Estos tiempos de divergencia señalan la presencia de antecesores de rebecho en Europa ya en el Plioceno lo que se puede relacionar con la ocurrencia (Masini y Lovari 1988) de una rama filética próxima al rebecho ya en el Villafranchiano.

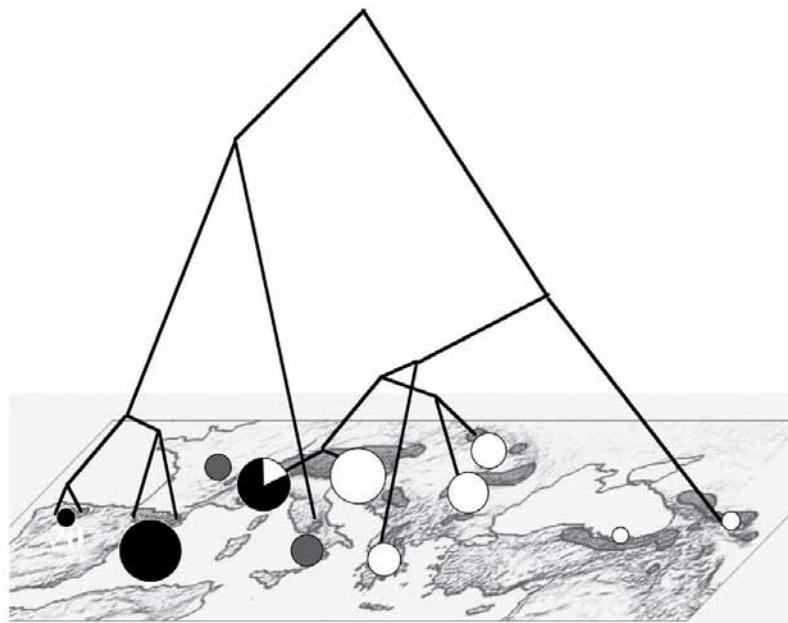


Figura 6. Filogeografía del rebezo. El árbol representa relaciones entre subespecies basadas en marcadores nucleares (microsatélites) y los pasteles corresponden a la distribución de los tres clados de la secuencia mitocondrial (citocromo *b*): clado oeste en negro, central en gris y este en blanco.

Considerando la diferenciación entre el pseudogén y los linajes mitocondriales nos encontramos que el pseudogén procede de un linaje mucho más antiguo que los linajes actuales. El tiempo de divergencia entre el linaje que dio lugar al pseudogén y los que nos encontramos en la actualidad fue calculado en 6.4 MA (Rodríguez et al. 2007) lo que correspondería al Mioceno Superior o Principios del Plioceno; esto es, mucho antes de la separación de los linajes actuales. Es interesante el hecho de que todos los cambios (sustituciones de nucleótidos) acumulados en el pseudogén hasta el tiempo de la divergencia de las especies actuales fueron cambios propios de un gen mitocondrial funcional. Los cambios acumulados en el pseudogén después de la especiación son los típicos de un pseudogén, que no está sujeto a la selección natural. Esta observación apunta a que el pseudogén surgió a partir de un linaje mitocondrial actualmente extinto pero que coexistió con los linajes actuales, al menos hasta el tiempo de su separación que coincidiría más o menos con la transposición del pseudogén al núcleo. La observación de la transposición relativamente reciente al núcleo de un linaje altamente divergente parece el resultado de poblaciones que evolucionan por separado, aisladas y después entran en contacto e hibridan. Este linaje extinto fosilizado en el núcleo podría indicar la llegada a Europa de dos ondas migratorias, una de ellas muy antigua, del final del Mioceno.

La distribución geográfica actual de los linajes vivos del citocromo *b* se puede relacionar con el aislamiento de las poblaciones durante las glaciaciones y con rutas de recolonización (Taberlet et al. 1998, Hewitt 2004). Las placas de hielo de los Alpes y de los Pirineos durante los máximos glaciales deben haber constituido barreras que limitaron el contacto entre poblaciones que ya mostraban un patrón de aislamiento por distancia previo. El clado Oeste presumiblemente quedó aislado al sur de los Pirineos, en la Península Ibérica. El clado Central debe de corresponder al aislamiento del rebeco, probablemente entre los Pirineos y los Alpes y el clado Este debió de quedar aislado al este de los Alpes. La recolonización postglacial fue limitada principalmente por la barrera alpina. El clado Oeste debió recolonizar los Alpes occidentales y concurrió allí con el linaje venido del este que ocupó la mayor parte de los Alpes. Las poblaciones que constituyen el clado Central, o bien se quedaron aisladas durante los máximos glaciales en las áreas que ocupan o la población del sur recolonizó los Alpes oeste y fue posteriormente dividida por el flujo de individuos del linaje oriental a los Alpes occidentales.

Cuando se comparan los datos de ADN mitocondrial con los obtenidos a partir de microsatélites se ve que para estos últimos la distancia genética entre pares de poblaciones depende de la distancia geográfica indicando la existencia de flujo genético entre poblaciones contiguas. También se puede observar el efecto de los Alpes como barrera al flujo genético. La imagen un poco diferente que se puede extraer de los dos tipos de marcadores se puede relacionar con su modo de evolución. Los microsatélites narran la historia reciente, de centenas o miles de años, de las poblaciones mientras que el ADN mitocondrial arroja luz sobre una historia más antigua (Emerson y Hewitt 2005). Las diferencias entre linajes del citocromo *b* indican que se separaron antes de las grandes oscilaciones climáticas del cuaternario. Estos datos coinciden con los estudios de filogeografía comparada en Europa (Taberlet et al. 1998) en que la diferencia entre linajes se puede explicar en el contexto de la divergencia entre tres áreas (que posteriormente constituyeron refugios) por aislamiento por distancia. Las contracciones y expansiones de rango de las poblaciones debidas a las oscilaciones climáticas habrían dado lugar a la eliminación de los haplotipos de las zonas glaciales. La recolonización postglacial posterior muestra una zona de sutura en los Alpes donde los distintos linajes se encuentran e hibridan.

Todos estos datos sugieren que la historia evolutiva del género *Rupicapra* está marcada por grandes migraciones antiguas seguidas de eventos históricos de expansión, contracción e hibridación entre linajes altamente diferenciados dependientes en gran medida de las grandes oscilaciones climáticas del cuaternario.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el "Ministerio de Educación y Ciencia" (CGL2004-06010 y CGL2007-64315). Queremos destacar la destacada colaboración de Sabine Hammer (Vienna University). Anita Haiden (Vienna) y Ana Corao (Oviedo) proporcionaron asistencia técnica.

Las siguientes instituciones y personas han colaborado en la recogida de muestras: Gobiernos del principado de Asturias (Consejería de Agricultura) y Aragón (Diputación General de Aragón), Guardas de Caza de Asturias y Aragón, Camino Real Hunting, Rita lorenzini, Jacques Michalet, Natalia Martinkova, Javier Pérez-Barbería, Carlos Nores, L. Rossi, Juan Carlos del Campo, Juan Bejar, Paloma Barracina, H. Papaioannou, M. Brown, Dr. W. Gasienica-Byrcyn, Dr. T. Skalski, J. Meana, S. Erceg, P. Veinberg, J. Badridge, Álvaro Mazón, Michal Adamec, Richard Kraft, Juan Herrero, Athanassios I. Sfougaris, Friederike Spitzemberger.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcalá, L., Morales, J. 1997.** A primitive caprine from the Upper Vallesian of La Roma 2 (Alfambra, Teruel, Aragón, Spain). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 324, 947-953.
- J Alvarez-Busto, J., García-Etxebarria, K., Herrero, J., Garin, I. and Jugo, B.M. 2007.** Diversity and evolution of the Mhc-*DRB1* gene in the two endemic Iberian subspecies of Pyrenean chamois, *Rupicapra pyrenaica*. *Heredity* 99, 406-413.
- Amos, W., Harwood, J. 1998.** Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 353, 177-186.
- Arctander, P. 1995.** Comparison of a mitochondrial gene and a corresponding nuclear pseudogene. *Proc. Biol. Sci.* 262, 13-19.
- Aulagnier, S., Giannatos, G. & Herrero, J. 2008.** *Rupicapra rupicapra*. In: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 February 2009.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987.** Intraspecific phylogeography-the mitochondrial-DNA bridge between population-genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522.
- Avise, J.C., Walker, D., Johns, G.C. 1998.** Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 265, 1707-1712.
- Avise, J.C. 2004.** *Molecular markers. Natural history and evolution*. Second ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Ballesteros, F. 1998.** *Las especies de caza en España. Biología, ecología y conservación*. Oviedo: Estudio y gestión del medio.

- Bancroft, D.R., Pemberton, J.M., King, P.** 1995. Extensive protein and microsatellite variability in an isolated, cyclic ungulate population. *Hered.* 74, 326-336.
- Bermingham, E., Moritz, C.** 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol. Ecol.* 7, 367-379.
- Blainville, H. de** 1816. Prodrome d'une nouvelle distribution systématique du Regne animal. *Bull. Sci. Soc. Philom.* Paris.
- Bonaparte, C. L.** 1845. Catalogo Metodico dei Mammiferi Europei. *Valenciennes*, Milan, 36 pp.
- Cabrera, A.** 1910. Proposición. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural.* 10, 201-202.
- Camerano, L.** 1914. Ricerche intorno ai camosci (Parte Ia, Iia, IIIa). *Mem. R Accad. Sci. Torino (Cl Sci Fis Mat Nat).* 64(4), 1-82, 64(12), 1-88, 65(14), 1-82.
- Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora.** OJ L 206, 22.7.1992, p.7 Consolidated version 01.01.2007. Annex IV: animal and plant species of community interest in need of strict protection, p.50.
- Couturier, M.A.J.** 1938. *Le chamois.* Grenoble: B. Arthaud.
- Dolan, J.M.** 1963. Beitrag zur systematischen Gliederung des Tribus Rupicaprini Simpson, 1945. *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* 1, 311-407.
- Du Buy, H. G., Riley, F. L.** 1967. Hybridization between the nuclear and kinetoplast DNA's of *Leishmania enriettii* and between nuclear and mitochondrial DNA's of mouse liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 57, 790-797.
- Emerson, B.C., Hewitt, G.M.** 2005. Phylogeography. *Curr. Biol.* 15, R367-R371.
- Fickel, J., Reinsch, A.,** 2000. Microsatellite markers for the European Roe deer (*Capreolus capreolus*). *Mol. Ecol.* 9, 994-995.
- Firestone, K.B., Elphinstone, M.S., Sherwin, W.B., Houlden, B.A.** 1999. Phylogeographical population structure of tiger quolls *Dasyurus maculatus* (Dasyuridae: Marsupialia), an endangered carnivorous marsupial. *Mol. Ecol.* 8, 1613-1625.
- Forbes, S.H., Hogg, J.T., Buchanan, F.C., Crawford, A.M., Allendorf, F.W.** 1995. Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. *Mol. Biol. Evol.* 12, 1106-1113.
- Gentry, A.W.** 1978. Bovidae. En: *Evolution of American Mammals* (eds. V.J. Maglio, H.B.S. Cooke) p. 540-572. Cambridge: Harvard Univ. Press.
- Gentry, A.W.** 2000. The Ruminant radiation. En: *Antelopes, Deer, and Relatives. Fossil Record, Behavioral Ecology, Systematics, and Conservation.* (eds. E.S. Vrba, G.B. Schaller), p. 11-25. New Haven: Yale University Press.

- Goldstein, D.B., Pollock, D.D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.* 88, 335-342.
- Grubb, P. 1993. Family Bovidae. En: *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*. (eds. D.E. Wilson, D.M. Reeder). p. 393-414. Washington (DC): Smithsonian Institution Press.
- Hammer, S., Nadlinger, K., Hartl, G.B. 1995. Mitochondrial DNA differentiation in chamois (genus *Rupicapra*): implications for taxonomy, conservation, and management. *Acta Theriol.* 3, 145-155.
- Hamr, J. 1985. Seasonal Home Range Sizes and Utilisation by Female Chamois (*Rupicapra rupicapra*) in Northern Tyrol. En: *The Biology and Management of Mountain Ungulates*. (ed. S. Lovari). p 107-116. London: Croom Helm.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1997. *Principles of population genetics*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Hassanin, A., Douzery, E.J.P. 1999. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13, 227-243.
- Herrero, J., Lovari, S. & Berducou, C. 2008. *Rupicapra pyrenaica*. En: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 February 2009.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247-276.
- Hewitt, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the quaternary. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359, 183-195.
- Hundertmark, K.J., Shields, G.F., Udina, I.G., Bowyer, R.T., Danilkin, A.A., Schwartz, C.C. 2002. Mitochondrial phylogeography of moose (*Alces alces*): Late Pleistocene divergence and population expansion. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22, 375-387.
- Kmet, V., Pristas, P., Janoscova, A., Janiga, M. 2002. Porovnanie nukleotidovych sekvencii genu pre cytochrom *b* u kamzikov. En *Chamois Protection*. (eds. M. Janiga, J. Svajda), p 35-39. Rosenberg: TESFO.
- Linnæus, C. 1758. *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomus I. Editio decima, reformata. Holmiæ. Salvius.
- López, J.V., Culver, M., Stephens, J.C., Johnson, W.E., O'Brien, S.J. 1997. Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 14, 277-286.
- Lovari, S., Scala, C., 1980. Revision of *Rupicapra* genus. I. A statistical re-evaluation of Couturier's data on the morphometry of six chamois subspecies. *Boll. Zool.* 47, 113-124.

- Lovari, S., Scala, C. 1984.** Revision of *Rupicapra* Genus IV. Horn biometrics of *Rupicapra rupicapra asiatica* and its relevance to the taxonomic position of *Rupicapra rupicapra caucasica*. *Z. Saugetierkd.* 49, 246-253.
- Lovari, S. 1985.** Behavioural repertoire of the Abruzzo Chamois, *Rupicapra pyrenaica ornata* Neumann, 1899 (Artiodactyla: Bovidae). *Säugtierkundl Mitt.* 32, 24.
- Lovari, S. 1987.** Evolutionary aspects of the biology of Chamois. *Rupicapra* spp. (Bovidae, Caprinae). En: *the biology and management of capricornis and related mountain antelopes*. (ed. H. Soma). p 51-61. London: Croom Helm.
- Lü, X.M., Fu, Y.X., Zhang, Y.P. 2002.** Evolution of mitochondrial cytochrome *b* pseudogene in genus *Nycticebus*. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2337-2341.
- Lydekker, R. 1913.** *Catalogue of the Ungulate Mammals of British Museum (Natural History)*. London: Printed by order of the Trustees.
- MacHugh, D.E., Shriver, M.D., Loftus, R.T., Cunningham, P., Bradley, D.G., 1997.** Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattles (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146, 1071-1086.
- Masini, F. 1985.** Würmian and Holocene Chamois of Italy. En: *The Biology and Management of Mountain Ungulates*. (ed. S. Lovari). p 31-44. London: Croom Helm.
- Masini, F., Lovari, S. 1988.** Systematics, phylogenetic-relationships, and dispersal of the chamois (*Rupicapra* spp.). *Quat. Res.* 30, 339-349.
- Mona, S., Crestanello, B., Bankhead-Dronnet, S., Pechioli, E., Ingrosso, S., D'Amelio, S., Rossi, L., Meneguz, P.G., Bertorelle, G. 2008.** Disentangling the effects of recombination, selection, and demography on the genetic variation at a major histocompatibility complex class II gene in the alpine chamois. *Mol. Ecol.* 17, 4053-4067.
- Moritz, C. 1994.** Defining evolutionarily-significant-units for conservation. *Trends. Ecol. Evol.* 9, 373-375.
- Moritz, C. 1996.** Uses of molecular phylogenies for conservation. En *New uses for new phylogenies*. (eds. P.H. Harvey, A.J.L. Brown, J.M. Smith, S. Nee) p 203-214 Oxford: Oxford University Press.
- Mullis, K., Faloona F. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol.* 155, 335-350.
- Nascetti, G., Lovari, S., Lanfranchi, P., Berducou, C., Mattiucci, S., Rossi, L., Bullini, L. 1985.** Revision of *Rupicapra* genus. III. Electrophoretic studies demonstrating species distinction of chamois populations of the Alps from those of the Apennines and Pyrenees. En: *Biology and management of mountain ungulates*. (ed. S. Lovari), p. 56-62. London: Croom-Helm.

- Nores, C., Vázquez, V.M. 1987. *La conservación de los vertebrados terrestres asturianos*. Madrid: Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo, Centro de Publicaciones.
- O'Brien S.J. 1994. Genetic and phylogenetic analysis of endangered species. *Annu. Rev. Genet.* 28, 467-489.
- Pemberton, J.M., King, P., Lovari, S., Bauchau, V. 1989. Genetic variation in the Alpine chamois, with special reference to the subspecies *Rupicapra rupicapra cartusiana*, Couturier, 1938. *Z. Saugetierkd.* 54, 243-250.
- Pérez, T., Albornoz, J., García-Vazquez, E., Domínguez, A. 1996. Application of DNA fingerprinting to population study of chamois (*Rupicapra rupicapra*). *Biochem. Genet.* 34, 313-320.
- Pérez, T., Albornoz, J., Domínguez, A. 2002. Phylogeography of chamois (*Rupicapra* spp.) inferred from microsatellites. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 524-534.
- Pérez-Barbería, F.J., Machordom, A., Fernández, J., Nores, C. 1996. Genetic variability in Cantabrian chamois (*Rupicapra pyrenaica parva* Cabrera, 1910). *Z. Saugetierkd.* 61, 276-284.
- Polziehn, R.O., Hamr, J., Mallory, F.F., Strobeck, C., 2000. Microsatellite analysis of North American wapiti (*Cervus elaphus*) populations. *Mol. Ecol.* 9, 1561-1576.
- Price, S.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Gittleman, J.L. 2005. A complete phylogeny of the whales, dolphins and even-toed hoofed mammals (Cetartiodactyla). *Biol. Rev.* 80, 445-473.
- Randi, E., Mucci, N., Pierpaoli, M., Douzery, E. 1998. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 265, 793-801.
- Randi, E., Mucci, N., Janiga, M. 2002. Mitocondrial DNA analyses on Tatra chamois. En *Chamois Protection*. (eds. M. Janiga, J. Svajda), p 31-34. Rosenberg: TESFO.
- Randi, E., Alves, P.C., Carranza, J., Milosevic-Zlatanovic, S., Sfougaris, A., Mucci, N. 2004. Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: The effects of historical genetic subdivisions and recent non-equilibrium dynamics. *Mol. Ecol.* 13, 3071-3083.
- Rodríguez, F., Albornoz, J., Domínguez, A. 2007. Cytochrome *b* pseudogene originated from a highly divergent mitochondrial lineage in genus *Rupicapra*. *J. Hered.* 98, 243-249.
- Rodríguez, F., Hammer, S., Pérez, T., Suchentrunk, F., Lorenzini, R., Michallet, J., Martinkova, N., Albornoz, J., Domínguez, A. 2009. Cytochrome *b* Phylogeography of Chamois (*Rupicapra* spp.). Population Contractions, Expansions and Hybridizations Governed the Diversification of the Genus. *J. Hered.* 100, 47-55.

- Ropiquet, A., Hassanin, A. 2005.** Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 36, 154-168.
- Schäschl, H., Kaulfus, D., Hammer, S., Suchentrunk, F. 2003.** Spatial patterns of mitochondrial and nuclear gene pools in chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) from the Eastern Alps. *Heredity*. 91, 125-135.
- Schäschl, H., Goodman, S.J., Suchentrunk, F. 2004.** Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). *Dev. Comp. Immunol.* 28, 265-277.
- Simpson, G.G. 1945.** The principles of classification and a classification of mammals. *Bulletin American Museum Natural History* 85, 1-350.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G., Cosson, J.F. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.* 7, 453-464.
- Tautz, D. 1989.** Hipervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res.* 17, 6463.
- Thenius, E., Hofer, H. 1960.** *Stammesgeschichte der Säugetiere*. Berlin: Springer-Verlag.
- Vogler, A.P., DeSalle R. 1994.** Diagnosing units of conservation management. *Conserv. Biol.* 8, 354-363.
- Zischler, H., Hoss, M., Handt, O., von Haeseler, A., van der Kuyl, A.C., Goudsmit J. 1995a.** Detecting dinosaur DNA. *Science*. 268, 1192-1193.
- Zischler, H., Geisert, H., von Haeseler, A., Pääbo, S. 1995b.** A nuclear 'fossil' of the mitochondrial D-loop and the origin of modern humans. *Nature*. 378, 489-492.