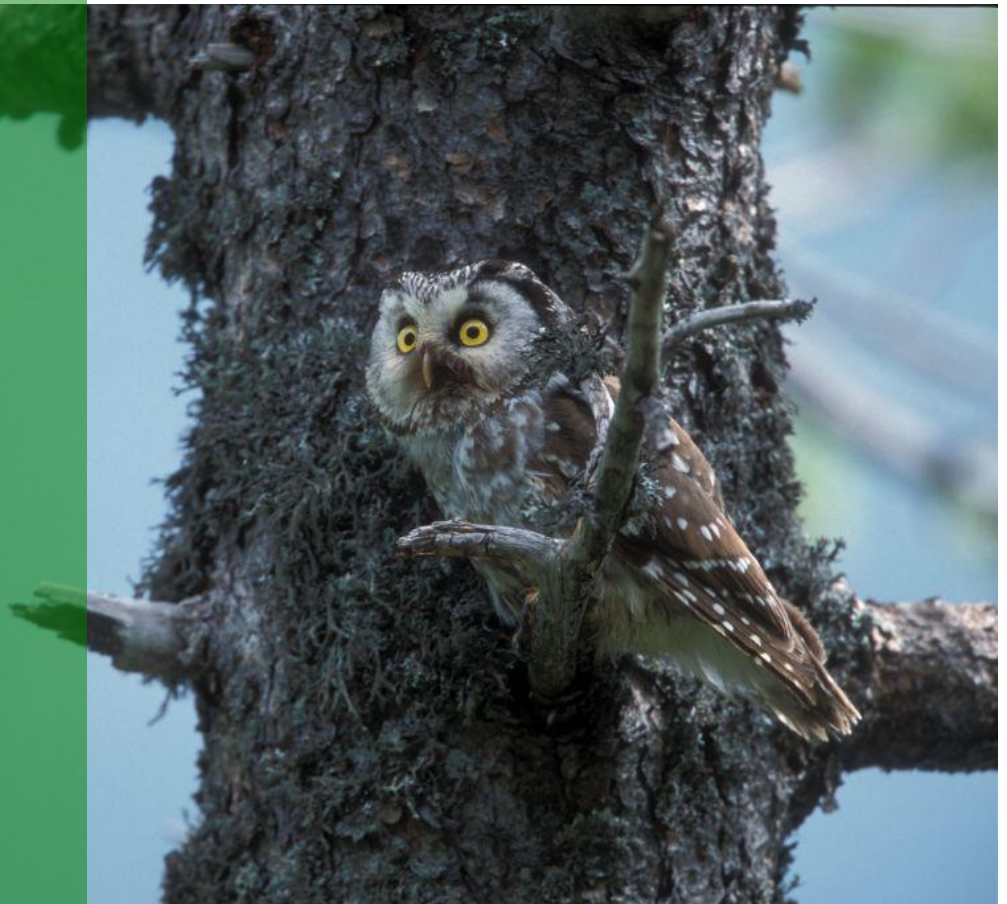


Anàlisi genètic de la població de mussol pirinenc a Catalunya



Raimon Mariné Bellido
Dr. Juli Broggi i Obiols



Resum

El mussol pirinenc *Aegolius funereus* és una de les espècies de vertebrats més recent descobriment a Catalunya. Malgrat la seva àrea de distribució és força extensa, la població catalana de mussol pirinenc es troba al límit sud de la seva àrea de distribució mundial.

La seva àmplia distribució al nord d'Europa provoca que, a nivell de les directives europees de conservació d'hàbitats i ocells, el mussol pirinenc sigui una espècie no prioritària. Tanmateix, les seves poblacions es troben aïllades i es poden considerar amenaçades a nivell local. La gestió forestal, la desaparició del seu hàbitat per la construcció i ampliació de dominis esquiables en ambients forestals, la seva baixa taxa de reproducció i la baixa mida de les poblacions pirinenques fan que la supervivència futura de les seves poblacions sigui seriosament amenaçada.

La distribució de recursos tècnics i econòmics en projectes de conservació ve determinada en gran mesura pel grau d'amenaça que pateixen les espècies a nivell de les directives Aus i Hàbitats. En el cas del mussol pirinenc, una espècie amenaçada a nivell de les seves poblacions ibèriques, les prioritats de conservació i, com a conseqüència, els recursos que s'hi destinen, es determinen en funció del conjunt de les poblacions europees, sense considerar el seu grau d'amenaça local.

El projecte que es presenta es va iniciar l'any 2005 i ha comptat amb la col·laboració del Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya, del Ministeri de Medi Ambient del Govern d'Andorra i de la Universitat d'Oulu (Finlàndia). L'objectiu principal, basat en l'aïllament mil·lenari de la població pirinenca de mussol pirinenc, és reivindicar la importància de conservació de l'espècie mitjançant la demostració de diferències genètiques entre les poblacions ibèriques de l'espècie i les nòrdiques. A tal efecte, s'han recollit nombroses mostres genètiques de mussol pirinenc, especialment de femelles i polls. Els mascles, molt més petits que les femelles, requereixen un esforç de captura més intens i aquest s'ha de desenvolupar fora del període reproductor.

La present proposta pretèn aconseguir finançament per a la captura de mascles de mussol pirinenc, durant la tardor i l'hivern de 2007, així com la gravació de cants territorials dels mascles. Els mascles capturats seran anellats i mesurats i se'ls prendran mostres de sang per completar el ventall de mostres genètiques de la població catalana de l'espècie. L'obtenció d'aquestes mostres és essencial per a la determinació i descripció completa d'una nova subespècie de mussol pirinenc, com a eina fonamental a l'hora d'establir els futurs criteris de conservació de l'espècie a Catalunya. A tal efecte, es sol·licita la col·laboració econòmica de la Fundació Territori i Paisatge.

I. Justificació de l'estudi: la importància de la genètica en la conservació del mussol pirinenc a Catalunya

1.1. Introducció

Malgrat el fet que moltes espècies paleàrtiques tinguin una distribució força extensa (Vaurie 1959, 1965, Cramp *et al.* 1977-1994), aquesta es troba sovint condicionada per interrupcions en la seva continuïtat. Com a conseqüència, s'han endegat processos evolutius atenent a l'aïllament geogràfic i -en menor mesura- a l'especiació simpàtrica, produint taxons locals que, sense un estudi específic de la seva dinàmica, poden acabar extingint-se sense que l'home se'n adoni.

Les anàlisis genètiques han esdevingut una eina rellevant en l'estudi d'espècies amenaçades o en perill (Moritz 1994, Haig & Avise 1996, Shepherd & Burns 2007). Mercès a l'ús dels marcadors genètics, s'ha pogut començar a estudiar la història evolutiva de cada població, de forma que es pugui deduir l'existència d'unitats taxonòmiques per sota del concepte d'espècie que requereixin una gestió específica (Moritz 1994, Knapen *et al.* 2003, Shepherd & Burns 2007). Aquests marcadors genètics ens informen de la història d'una població mitjançant la informació continguda en els seus gens. Aquests contenen una sèrie de característiques que, examinades amb la metodologia de laboratori adequada, poden permetre reconstruir els patrons històrics de divergència respecte als gens de les poblacions veïnes, i així ens permeten avaluar el grau d'interferència genètica entre diferents poblacions al llarg del temps.

Aquestes tècniques moleculars permeten mesurar la 'distància genètica' entre diferents poblacions a partir de l'assumpció prèvia de l'existència d'una taxa constant de divergència de la seqüència dels nucleòtids. Per als gens continguts al citocrom mitocondrial b, aquesta taxa de divergència constant s'ha estimat en un 2% per cada milió d'anys (Newton 2003). D'aquesta manera, si dues poblacions diferents mostren un 4% de variació en la divergència de l'estructura del citocrom b, s'estima que van divergir de l'ancestre comú uns dos milions d'anys enrere. En d'altres paraules, ja portarien un mínim de dos milions d'anys sense bescanvi genètic significatiu entre ambdues poblacions. Això s'explica, normalment, atenent a diversos processos d'aïllament geogràfic, que es produeixen generalment quan la variació en la distribució d'un taxó fa que una població quedi aïllada de la distribució general per mor d'alguna barrera geogràfica (una serralada, un desert, o una gran extensió d'aigua, per exemple).

L'estudi de la evolució d'aquests processos permet, en darrera instància, establir la història filogenètica, és a dir, l'evolució de cada una de les branques evolutives en que s'ha anat produint una divergència genètica partint d'un ancestre comú. Això és el que s'anomena una anàlisi cladística, o en d'altres paraules, el mètode per a reconstruir la història evolutiva o filogènia de cada taxó (o unitat taxonòmica), mitjançant la identificació de les seqüències de les

branques de diferenciació a partir de l'estat dels caràcters derivats compartits per cada població. En el cas de les tècniques mol·leculars, s'avaluen els tipus de gens que comparteixen o no les diferents poblacions.

1.2. L'ús de les tècniques mol·leculars

1.2.1. La hibridació de l'ADN

Com s'ha avançat en la introducció, les eines actuals per poder establir les relacions filogenètiques entre els ocells s'estudien a partir d'anàlisis de l'ADN, el qual pot donar, informació precisa sobre la 'distància genètica' entre diferents espècies o poblacions d'ocells. La mol·lècula d'ADN està composta per una doble hèlix, que consta de dues cadenes llargues complementàries. Cadascuna de les cadenes està feta per quatre tipus de petites bases de nucleòtids, la seqüència dels quals contenen tota la informació genètica transferida des dels pares als seus descendents. Per tal de dur a terme els anàlisis, l'ADN s'extreu normalment de la sang, encara que també es pot obtenir d'altres teixits per a segons quins tipus d'anàlisis.

Una de les tècniques mol·leculars amb més implantació per a aquests estudis és la de la hibridació d'ADN. Aquest mètode es basa en el fet de que l'estructura de la cadena de l'ADN és formada per una doble tira de material genètic. A partir de processos basats en l'aplicació d'altres temperatures, s'intenta trencar l'estructura original de la cadena d'ADN, i mitjançant l'ús d'alguns agents químics, tornar-la a unificar.. D'aquesta manera s'obtenen les parelles complementàries, i les que no aconsegueixen unificar-se ja que les parelles de bases d'aquests genomes que no tornen a unificar-se no són complementàries. Així s'identifiquen les dissociacions de genomes entre diferents mostres d'ADN, establint fins a quin punt hi ha divergències evolutives entre diferents organismes. Si els exemplars analitzats són taxonòmicament divergents (per ex. si provenen de diferents famílies), les seqüències obtingudes seran prou diferenciades i la seva alineació molt pobre, de forma que es poden identificar respecte dels individus pertanyents a una mateixa espècie o grup taxonòmic proper.

A partir d'aquest mètode, s'han anat construït filogènies precises per cada cop més grups d'ocells (Sibley & Ahlquist 1990). Aquest treball de reconstrucció i reinterpretació de les filogènies dels ocells del món s'ha fet durant molts anys, però ha estat més important i precís en les reinterpretacions de les categories taxonòmiques superiors (famílies i ordres), que semblen avui dia ben establertes gràcies a aquesta revolució metodològica (Sibley & Ahlquist 1990, Sibley & Monroe 1990). No obstant, al nivell de les categories taxonòmiques inferiors encara queda molt estudi per fer-se, per poder establir fins a quin punt les subespècies descrites ho són realment, i també per saber si les poblacions aïllades de moltes espècies poden tenir una categoria taxonòmica pròpia, no estudiada encara o simplement no aparent per exàmens morfològics superficials.

1.2.2. Els 'rellotges mol·leculars' o marcadors genètics

Mercès a la possibilitat de convertir les distàncies genètiques entre espècies o poblacions a una escala temporal, es poden construir arbres taxonòmics. Això significa que es poden separar taxons amb un origen comú i determinar les relacions de les branques temporals d'acord amb el moment en que van començar la divergència, en un marc temporal relatiu. Per poder convertir el temps relatiu en un temps absolut, és necessari calibrar la hibridació de l'ADN amb les evidències fòssils que indiquen les dates de divergència aproximada, o almenys amb les dates dels fenòmens geològics en que es van produir fragmentacions del territori, de manera que es puguin inferir moments concrets teòrics en que van començar els processos de divergència.

Tanmateix cal considerar que, per tal de poder assumir els principis exposats, les taxes de canvi o mutació de l'ADN han de ser més o menys constants independentment del grup d'ocell que tractem. Això encara s'està estudiant, i de fet se sap que aquesta taxa de divergència o mutació en els gens pot ser més ràpida en petits passeriformes que en ocells de mida més gran, o en altres paraules, en els ocells que arriben abans a la maduresa sexual (en els passeriformes això passa en el seu primer any de vida) respecte als que tarden més d'un any en poder reproduir-se per primer cop (Wu & Li 1985, Martin & Palumbi 1993, Nunn & Stanley 1998, Newton 2003).

Després de la revolució de l'aplicació del mètode desenvolupat per Sibley & Ahlquist (1990), d'hibridació de mol·lècules d'ADN, va aparèixer una tecnologia encara més sofisticada, la qual va permetre no només analitzar la totalitat de la cadena mol·lecular de l'ADN, sinó precisament només les seqüències de nucleòtids compresos dins d'una cadena d'ADN. Això ha permès, per tant, comparar un fragment equivalent de l'ADN entre diferents espècies, i determinar les bases dels nucleòtids entre el mateix tipus de fragment entre diferents espècies o poblacions. Una comparació de la proporció de las bases de nucleòtids que difereixen entre les espècies o poblacions ens dona una mesura alternativa de la divergència genètica. Com més grans siguin els fragments analitzats i major el nombre de bases de nucleòtids, més robustos seran els resultats. A més, una comparació acurada de la seqüència dels nucleòtids entre les diferents espècies o poblacions analitzades permet reconstruir l'ordre en que van passar cada una de les substitucions, i per tant, això permet una reconstrucció evolutiva dels grups analitzats (siguin espècies o poblacions diferents d'una mateixa espècie). En algunes regions de l'ADN sembla que aquesta taxa de substitució també és constant al llarg del temps, el que indica que es poden traslladar directament aquestes taxes de substitució a dates de divergència.

El que realment importa d'aquest avanç en l'estudi dels nucleòtids, és que es tracta d'un mètode que pot ésser aplicat per veure les taxes de divergència, en el temps, no només de les categories més elevades, com les famílies o els ordres, sinó també de les categories inferiors, com les espècies i subespècies. Això implica, per tant, que la primera aproximació feta per Sibley & Ahlquist, acurada per les categories taxonòmiques superiors, ara també es pot estudiar

per a veure les taxes de divergència en les categories inferiors, siguin espècies o subespècies. I que aquest fet permet, en darrera instància, establir el grau de divergència d'una població aïllada per tal d'examinar si es tracta d'una entitat taxonòmica pròpia (sigui subespècie o espècie) i, per tant, poder gestionar correctament, en termes de biodiversitat, casos concrets.

En conclusió, l'ADN mitocondrial ha estat l'eina essencial per a l'estudi taxonòmic de les espècies i subespècies, especialment perquè és la part de la informació genètica de cada individu que conté una major taxa de polimorfisme a nivell intraespecífic i es troba, per tant, subjecta a una major taxa de mutacions genètiques. Aquest fet indica que les tècniques d'estudi de l'ADN mitocondrial resolten correctament l'accés a un examen de les diferències que puguin haver-hi entre taxons estretament relacionats, que probablement hagin divergit a dins dels darrers milions d'anys. En d'altres paraules, es tracta de poblacions geogràfiques que poden ser reconegudes a partir de mètodes genètics, però no atenent a evidències morfològiques (Baker et al. 1995, Helbig et al. 1995, 1996, Newton 2003). Alguns casos paradigmàtics han estat descrits en ocells de poblacions europees, com per ex. les subespècies del mosquiter comú *Phylloscopus collybita* (Helbig et al. 1996), en les que han estat reconegudes algunes de les descrites durant els principis del segle XX, però obviades per la taxonomia posterior fins que –mitjançant tècniques mol·leculars– s'ha comprovat que el grau de divergència era suficient com per a acceptar-les com a subespècies. Al mateix temps van comprovar que les poblacions de les Illes Canàries haurien de ser considerades una espècie diferent, *Phylloscopus canariensis*, tractament avui dia ja acceptat en obres de referència generals (per ex. del Hoyo et al. 2006). D'altra banda, el que es considerava antigament com a subespècie ibèrica, *Phylloscopus brehmii* (avui dia reclassificada a la nomenclatura com a *Phylloscopus ibericus*, Svensson 2001), en realitat és en sí mateixa una espècie pròpia. Aquestes anàlisis, tanmateix, han provocat al mateix temps que s'estudiessin amb més detall les característiques morfològiques d'aquestes noves espècies (noves només com a proposta científica), el que ha derivat fins i tot en que ara es coneixi que realment també hi ha diferències morfològiques evidents com per poder identificar *Phylloscopus ibericus* respecte a *Phylloscopus collybita*, tant per qüestions estructurals del plomatge, com per coloració, estratègia de muda i les característiques bioacústiques (Svensson 2001, Monteagudo et al. 2003, Onrubia et al. 2003, Salomon et al. 2003).

En resum, s'ha de considerar que espècies que presenten una uniformitat morfològica (aparent) al llarg d'una àmplia distribució poden presentar variacions genètiques importants, entre poblacions definides abruptament per accidents geogràfics, no per canvis clinals. Aquestes variacions genètiques restarien amagades darrera d'una pretesa uniformitat morfològica (Zink et al. 1995, Omland et al. 2000).

1.3. El cas concret del mussol pirinenc a Europa

El coneixement actual sobre la taxonomia del mussol pirinenc al món descriu que aquest espècie té 7 subespècies, 6 d'aquestes presents a Euràsia i una a Nordamèrica (Koopman *et al.* 2005).

D'aquestes 6 descrites al continent eurasiàtic, tres es troben distribuïdes al nord del continent lligades als boscos boreals, especialment la taigà (*Aegolius funereus funereus*, *A.f. sibericus* i *A.f. magnus*), mentre que les altres tres es troben aïllades en hàbitats similars de serralades situades més al sud, al Càucas (*A.f. caucasicus*), al Tien Shan, Kazakhstan (*A.f. pallens*) i al centre de Xina (*A.f. beickianus*). La població nordamericana s'accepta com una subespècie independent, *A.f. richardsoni*, ocupant els boscos boreals de la meitat nord del continent fins a Alaska, però també internant-se per les zones culminals de serralades situades més al sud, com les Muntanyes Rocalloses (Hayward *et al.* 1987).

Malgrat que aquestes subespècies han estat descrites en base a criteris de diferències morfològiques i de coloració, hi ha un solapament evident en els caràcters quan s'examinen exemplars concrets a dins de l'àrea de distribució de cada una de les subespècies. Els valors mitjans funcionen, per tant, per a parlar de poblacions, més que no pas per a discriminar individus aïllats.

Recentment es va fer un estudi per estudiar el grau de divergència genètica de l'ADN mitocondrial de les diferents subespècies eurasiàtiques (Koopman *et al.* 2005). Els resultats d'aquest estudi indiquen que el grau de divergència entre *A.f. funereus* i *A.f. sibericus* va ser pràcticament nul, fins i tot comparant mostres d'animals de les zones més extremes de la distribució. Això suggereix que probablement les variacions descrites pels mussols pirinencs de la població boreal eurasiàtiques no corresponen a subespècies sinó simplement a una variació clinal. Aquí és important recordar que les gradacions clínals que poden produir diferències morfològiques o genètiques al llarg de gradients en distribucions molt àmplies descartarien que es pogués parlar de taxons o subespècies. Per poder dir que una població és realment un taxó s'ha d'haver descartat que no sigui només una petita variació clinal dins d'un gradient més gran (Mayr 1963, 1970, Newton 2003). No es van analitzar dades de les poblacions de les muntanyes d'Àsia, ni de les del sud d'Europa i Orient Mitjà (poblacions a Turquia i el Càucas). Els autors recomanen de manera explícita que es facin investigacions sobre aquestes, aspecte encara no desenvolupat en cap de les poblacions aïllades en regions de muntanya.

1.4. Les glaciacions quaternàries i la distribució d'algunes espècies pirinenques

El Període Quaternari va ser dominat per oscil·lacions climàtiques que van originar repetits processos glacials i interglacials. Els rangs de distribució de les espècies es van desplaçar contínuament cap al sud durant els períodes freds i cap al nord durant els períodes més calents. Quan la temperatura baixava, les poblacions septentrionals de moltes espècies s'extingien, però aquestes sobreviuen als refugis del sud, tenint com a conseqüència l'aïllament de poblacions en diferents refugis i la reducció en la seva mida. Aquests processos han deixat senyals evidents en la configuració genètica de les espècies i, fins i tot, han estat causa d'especiació.

La darrera glaciació a Europa va començar fa 120.000 anys, essent més freda fa uns 18-20.000 anys, quan la capa de gel continental va cobrir Europa i l'oest d'Euràsia fins uns 50 ° N de latitud. Euràsia i Nordamèrica estaven connectades mitjançant Beríngia, una immensa llengua de gel de 1.500 km d'amplada. L'escalfament va començar fa uns 13.000 anys, i durant els darrers 8.000 anys, el clima ha estat aproximadament igual que l'actual. Durant la darrera glaciació, la conca mediterrània va gaudir d'un clima temperat i es considera que va acollir tres refugis faunístics principals: les penínsules Ibèrica i Itàlica i els Balcans.

Quan el gel va començar a retrocedir després de la darrera glaciació Weichseliana, les poblacions refugiades van començar la seva expansió cap al nord. Al continent europeu, diferents característiques geogràfiques van condicionar les rutes migratòries.

Europa es pot considerar com una gran península connectada amb Àsia. La Mediterrània al sud, així com diverses serralades (els Alps, els Pirineus i els Càrpats) constitueixen autèntiques barreres per a la fauna. Les regions septentrionals van ser colonitzades generalment des dels refugis d'Ibèria i els Balcans, o a partir de grans zones sense gel de l'est d'Euràsia, mentre que la Península Italiana va ser tradicionalment aïllada a causa de la presència de la barrera alpina.

Durant el darrer pic glacial, la temperatura a la Península Ibèrica era de 10 a 12 graus superior a l'actual. El clima era més sec i les oscil·lacions tèrmiques eren menors. Posteriorment a la retirada del gel, les temperatures van anar pujant i certes espècies animals i vegetals començaren la seva retirada cap a latituds més septentrionals. Algunes espècies adaptades a ambients freds van perviure a la serralada pirinenca i encara les trobem a data d'avui. En són exemples la perdiu blanca, el picot negre, el gall fer i el mussol pirinenc. Per tant, les glaciacions han esdevingut la causa principal de la distribució actual del mussol pirinenc. Es tracta d'una població de gran interès biogeogràfic, aïllada de la resta de poblacions europees i un autèntic tresor genètic de les muntanyes andorranes.

1.4.1. Estimacions del temps necessari per que es formi una subespècie

Considerant que les espècies descrites i acceptades en general per la comunitat científica, en alguns ocells de les Illes Britàniques, són el resultat d'un procés d'aïllament menor de 8.000 anys (Newton 2003), sembla molt probable que la població de mussol pirinenc dels Pirineus, aïllada com a mínim uns 10.000 anys (Arribas 2004), quan es va produir el final del procés de retrocés de la darrera glaciació, ha tingut temps suficient per desenvolupar una divergència genètica que permeti classificar-la com un taxó propi a nivell de subespècie.

El problema de quan temps és necessari per que es desenvolupi un nou taxó, en aquest cas una subespècie, es va examinar inicialment amb els casos de taxons que viuen en illes, calculant des de quin moment van deixar d'estar connectades a la massa continental més propera (Mayr 1963). Moltes d'aquestes illes tenen subespècies que clarament han derivat de les formes continentals. Les Illes Britàniques es van separar del continent europeu fa uns 7500 anys. De les 155 espècies que nidifiquen regularment en aquest arxipèlag, tenen 33 que són subespècies pròpies, i fins i tot 2 que són intermitges entre subespècie i espècie (*Lagopus lagopus scoticus* i *Loxia scotica*; Newton 2003).

Algunes característiques addicionals, com ara la freqüència i duració de les síl·labes del cant d'aquesta mateixa població de mussol pirinenc, semblen diferir de les veus gravades al nord d'Europa (Eloïsa Matheu com pers.). La veu és precisament un dels elements clau en l'aïllament reproductiu i, per tant, en que es pugui produir un procés de diferenciació taxonòmica. Tot i ser preliminars, aquestes dades inicials suggereixen que cal contemplar una anàlisi dels paràmetres genètics per tractar de comprovar fins a quin punt hi ha una divergència. Avui dia els elements de comunicació vocal, amb estudis amb *playback*, són una de les eines clau, conjuntament amb els anàlisis d'ADN mitocondrial, per descriure nous taxons (Alström 2001).

Per últim, cal considerar també que la possibilitat d'intercanvi genètic entre la població dels Alps i la dels Pirineus és molt baixa, atesa la manca de continuïtat dels hàbitats entre les dues serralades. Tot i que al nord d'Europa es coneix que l'espècie pot desenvolupar comportaments migratoris i irruptius, allà els condicionaments d'hàbitat i alimentaris, i la mida de la població, afavoreixen aquest procés, mentre que en les poblacions aïllades dels Alps i els Pirineus, la menor població, menor disponibilitat d'hàbitat òptim, i menor disponibilitat de zones homogènies amb una alta disponibilitat de molts recursos alimentaris (i.e. territoris d'alta qualitat), conviden a pensar en que no hi ha d'haver comportament migratori en les dues serralades, i que, per tant, no hi deu arribar flux genètic extern al Pirineu, on la població de mussol pirinenc té un caràcter al·lopàtric.

D'altres espècies que han quedat aïllades als Pirineus (o altres carenes muntanyenques ibèriques) han desenvolupat subespècies pròpies. És el cas de *Lagopus muta pyrenaica*, i *Perdix perdix hispaniensis* (Clavell *et al.* 2006). En els dos casos es tracten de taxons que viuen en hàbitats d'alta muntanya, es

troben separats de l'àrea de distribució principal europea de la pròpia espècie (no hi ha, per tant, flux genètic amb l'àrea disjunta), i tenen un reduït potencial de dispersió i colonització de noves àrees. Aquests factors es donen també en el mussol pirinenc.

1.4.2. Conclusions generals

L'ús de les tècniques moleculars adequades pot permetre identificar taxons no descrits en poblacions que hagin experimentat un grau suficient d'aïllament geogràfic com per desenvolupar una divergència genètica suficient.

L'aplicació d'aquestes tècniques a un cas concret com el mussol pirinenc (*Aegolius funereus*), una espècie aïllada geogràficament des de les darreres glaciacions pleistocèniques respecte de les poblacions properes (Alps i nord d'Europa), es suggereix com una necessitat immediata donat el seu estatus de conservació (Vulnerable, Dalmau-Ausàs & Mariné 2004). Establir si la població pirinenca és una nova subespècie permetria afegir més raons objectives per les aplicacions de plans de gestió i estudi dels taxons amenaçats a Catalunya. Donat que el període d'aïllament mínim que ha experimentat aquesta població (més de 10.000 anys, Arribas 2004) és suficient com per a desenvolupar una divergència en forma de subespècie, és recomanable prendre les mesures oportunes per poder comprovar si es tracta realment d'una subespècie pròpia.

Una estratègia d'aquest tipus estaria en consonància amb els nous enfocaments en biologia de la conservació, que defensen uns anàlisis més objectius de la biodiversitat, basats en el coneixement de les filogènies i en el grau d'aïllament genètic de cada població (Haig *et al.* 2006, Rubinoff 2006).

II. Anàlisi genètica de la població. Treball específic per al mussol pirinenc

La variació genètica és un requisit imprescindible per a l'evolució de les espècies i per a la seva supervivència en un ambient canviant (capacitat d'adaptació). Aquesta variació s'introdueix a les poblacions mitjançant processos de mutació, o bé per immigració. El patró de variació genètica es troba afectat per nombrosos factors que actuen a diferents escales temporals.

En una escala temporal relativament curta, aquests factors inclouen l'estructura social, el sistema d'aparellament, la capacitat de dispersió, l'associació parental amb la descendència i la fragmentació de l'hàbitat (des d'una interpretació relativa a la dispersió). Tot plegat deriva en patrons concrets de flux genètic, recombinació, selecció natural i deriva genètica.

Tenint en compte una escala temporal més llarga, la variació genètica està estructurada per canvis vicariants en el medi que provoquen canvis en la mida poblacional i l'aïllament que provoca la reducció del flux genètic entre les poblacions. En d'altres paraules, la constitució genètica d'una espècie o població està formada per la combinació d'aquesta sèrie de processos, passats i presents. Tanmateix, tenint en compte els patrons genètics actuals d'una espècie, resulta difícil distingir si aquests són atribuïbles a canvis passats o relativament recents. El polimorfisme genètic i el canvi evolutiu a llarg termini són dues etapes del mateix procés evolutiu. Una possibilitat per estimar els papers relatius de la vicariància i la dispersió és sospesar les escales de l'anàlisi fil·logeogràfic – la taxa evolutiva del sistema de marcadors i l'amplitud geogràfica del mostreig.

El Període Quaternari va ser dominat per oscil·lacions climàtiques que van originar repetits processos glacials i interglacials. Els rangs de distribució de moltes espècies (entre elles el mussol pirinenc) es van desplaçar contínuament cap al sud durant els períodes freds i cap al nord durant els períodes més calents. Quan la temperatura baixava, les poblacions septentrionals de moltes espècies s'extingien, però aquestes sobreviuen als refugis del sud, tenint com a conseqüència l'aïllament de poblacions en diferents refugis i la reducció en la seva mida. Aquests processos han deixat senyals evidents en la configuració genètica de les espècies i, fins i tot, han estat causa d'especiació.

La darrera glaciació a Europa va començar fa 120.000 anys, essent més freda fa uns 18-20.000 anys, quan la capa de gel continental va cobrir Europa i l'oest d'Euràsia fins uns 50 ° N de latitud. L'escalfament va començar fa uns 13.000 anys, i durant els darrers 8.000 anys, el clima ha estat aproximadament igual que l'actual (Webb i Bartlein 1992). Durant la darrera glaciació, la conca mediterrània va gaudir d'un clima temperat i es considera que va acollir tres refugis: les penínsules Ibèrica i Itàlica i els Balcans (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 2004). Quan el gel va començar a retrocedir després de la darrera glaciació

Weichseliana, les poblacions refugiades van començar la seva expansió cap al nord. Al continent europeu, diferents característiques geogràfiques van condicionar les rutes migratòries. Europa és en realitat una gran península connectada amb Àsia. La Mediterrània al sud, així com diverses serralades (els Alps, els Pirineus i els Càrpats) constitueixen autèntiques barreres per a la fauna. Les regions septentrionals van ser colonitzades generalment des dels refugis d'Ibèria i els Balcans, o a partir de grans zones sense gel de l'est d'Euràsia, mentre que la península italiana va ser tradicionalment aïllada a causa de la presència de la barrera alpina (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 2004).

El projecte que es presenta intenta revelar els efectes dels efectes virarians històrics en l'estructura genètica i l'història evolutiva del mussol pirinenc (*Aegolius funereus*), així com examinar si les rutes de colonització d'aquesta espècie són congruents amb les rutes generals proposades en la bibliografia científica disponible. Un altre objectiu és estimar els papers relatius de la vicariància i la dispersió en l'estructura genètica actual, utilitzant marcadors moleculars amb diferents taxes d'evolució, patrons d'heretabilitat i escales geogràfiques. Finalment, l'objectiu més interessant des del punt de vista de la conservació del mussol pirinenc, és esbrinar si la distància genètica entre la població pirinenca de l'espècie i les poblacions del centre i el nord d'Europa és prou gran com per poder descriure una nova subespècie pirinenca.

2.1. Marcadors moleculars

Com a marcador molecular, el DNA mitocondrial (mtDNA) té nombrosos avantatges. En primer lloc, evoluciona més ràpidament que el DNA nuclear en general. Les diferents regions del genoma mitocondrial tenen taxes d'evolució diferents, permetent triar les regions més favorables per testar les nostres hipòtesis. El mtDNA està considerat com un marcador neutral, s'hereta per via materna en la majoria d'espècies i generalment no recombinava. Els individus són generalment homoplàsmics per a un haplotip mitocondrial. Aquestes característiques impliquen que cada mol·lècula posseeix una història genealògica pròpia.

La regió control del mtDNA és la regió primària no codificadora, i és la responsable de la regulació de la transcripció i la replicació. La taxa de mutació del mtDNA (10^{-8}), especialment la de la regió control, és molt adient per detectar els processos històrics que han format les subespècies i l'estructura poblacional d'una espècie.

Els microsatèl·lits com a marcadors nuclears proporcionaran l'explicació sobre diversos aspectes de la nostra investigació. Els marcadors mitocondrials heretats per via materna només proporcionen informació de les femelles, mentre que els microsatèl·lits nuclears són heretats de manera biparental i proporcionen informació per ambdós sexes. La taxa de mutació dels microsatèl·lits es troba generalment entre els valors 10^{-3} i 10^{-5} , la qual cosa fa possible la detecció d'esdeveniments més recents que amb el mtDNA. En el cas del mussol pirinenc, **s'han optimitzat set loci microsatèl·lits** per a la present investigació.

2.2. Variabilitat genètica, estructura de les poblacions i fil·logeografia del mussol pirinenc a Europa

El conjunt de variabilitat genètica en la població europea de mussol pirinenc serà estimada a partir de les seqüències de les regions control mitocondrials i dels microsatèl·lits nuclears. L'estructura de la població serà analitzada mitjançant una anàlisi de la variància molecular. S'utilitzaran diferents metodologies per avaluar el flux genètic.

A partir de les dades dels microsatèl·lits s'estimarà la variació genètica, tot calculant la riquesa al·lèlica, l'heterozigosi i el d^2 (la diferència elevada al quadrat entre dos al·lèls del mateix loci). Aquesta estimació pot proporcionar una bona mesura de la consanguinitat i de la barreja de poblacions que l'heterozigosi. Les dades ha de servir també per estimar la mida efectiva de cada població i per estudiar les seves estructures genètiques.

Ateses les diferents taxes evolutives dels marcadors que s'han d'estudiar, serà possible testar, a partir dels patrons de variabilitat genètica, l'efecte relatiu dels

esdeveniments històrics, la vicariància i els esdeveniments recents (com ara la fragmentació de l'hàbitat o la dispersió), sobre l'estructura genètica actual.

2.2.1. Hipòtesis

a) *Mida efectiva de les poblacions*

Durant el darrer període glacial, la llengua de gel continental cobria el nord d'Europa i l'oest d'Euràsia fins aproximadament 50 ° N de latitud. Tanmateix, la taigà oriental va romandre gairebé lliure de gel, fins i tot durant el període més fred. Malgrat el nord d'Europa estava cobert pel gel, es van conservar grans superfícies de taigà cap al sud i l'est de les masses de gel continentals. Per tant, resulta possible que les espècies amb rangs de distribució paleàrtics tinguessin millors oportunitats de supervivència i que les poblacions més orientals no minvessin de manera sensible. Aquest fet és conegut per diverses espècies europees, tot i que no se'n sap res pel que fa al mussol pirinenc. **La nostra primera hipòtesi prediu que les poblacions orientals d'aquesta espècie tenen una gran diversitat genètica i, per tant, mides poblacionals efectives grans.**

Contràriament, durant la darrera glaciació, moltes poblacions es van recloure en "refugis", reduint-se la seva mida poblacional, per tornar a incrementar-se quan el clima es tornava més càlid. **La nostra segona hipòtesi prediu que les poblacions occidentals de mussol pirinenc mostren signes de recents colls d'ampolla, causats per la reducció dels seus rangs de distribució, i que aquests poden ser datats en la darrera glaciació** (seria el cas de la població pirinenca).

b) *Fragmentació de l'hàbitat*

El procés d'acceleració de la fragmentació de l'hàbitat causat per les activitats humanes pot dividir les poblacions d'algunes espècies en subpoblacions. L'impacte humà sobre els hàbitats i, de retruc, sobre l'estructura genètica de les poblacions, és força recent a escala evolutiva. **La nostra hipòtesi prediu que les poblacions europees de mussol pirinenc són més fragmentades que les asiàtiques i que hi trobem més diferenciació genètica en els microsatèl·lits que en el mtDNA. Intentarem esbrinar si la població pirinenca de mussol pirinenc és un residu de la darrera glaciació, o bé ha estat "recentment" fundada a partir d'individus procedents dels Alps.**

La investigació esmentada s'ha realitzat conjuntament amb els següents investigadors de la Universitat d'Oulu (Finlàndia):

Dr. Juli Broggi i Obiols

Dra. Laura Kvist, professora d'Evolució Molecular i Ecologia.

Dr. Markku Orell, catedràtic d'Ecologia Animal i Ecologia de Poblacions.
Dr. Kari Koivula, professor d'Ecologia Animal i Ecologia del Comportament.
Dr. Seppo Rytkönen, professor d'Ecologia Animal i Ecologia de Poblacions.

Per part de la universitat de Lund (Suècia), hi col·labora el Dr. Staffan Bensch, professor auxiliar d'Ecologia Molecular i de Poblacions.




Finalment, per part de l'Institut für Zoologie alemany, hi col·labora el Dr. Martin Päckert.

Les mostres genètiques a analitzar provenen de les poblacions pirinenques (Andorra, Aragó i Catalunya), de la Península Escandinava, de Sibèria, d'Alemanya i dels Alps.

GENER ***FEBRER*** ***MARÇ*** ***ABRIL*** ***MAIG*** ***JUNY*** ***JULIOL*** ***AGOST*** ***SETEMBRE*** ***OCTUBRE*** ***NOVEMBRE*** ***DESEMBRE***



ANY
2007

 LOCALITZACIÓ DE TERRITORIS
 SEGUIMENT DE LA REPRODUCCIÓ
 ANÀLISI GENÈTIC DE LA POBLACIÓ (PRESA DE MOSTRES)