

La Biología Molecular como herramienta de investigación en Biogeografía y Biología de la Conservación

Jesús Duarte Duarte

Los avances en ingeniería genética y biología molecular han permitido desarrollar técnicas que, puestas al servicio de otras disciplinas y usadas como herramientas de investigación, han ayudado a salvar obstáculos antes impensables. Gracias a estas técnicas en los últimos años se está revisando toda la sistemática de los vertebrados, propuesta clásicamente a partir de caracteres morfológicos, estableciendo, a partir del análisis de secuencias de DNA, árboles filogenéticos mucho más precisos. Por ejemplo, se ha revisado toda la filogenia de las rapaces mediterráneas [Wink & Seibold, *Monograf. SEO*, 4: 335-344 (1996)] empleando DNA mitocondrial.

La biología molecular también está teniendo su aplicación en el campo de la **Biología de la Conservación**. El uso de marcadores moleculares, la técnica del "*DNA-fingerprinting*", el análisis de aloenzimas, los análisis RFLP, la secuenciación, el análisis de microsatélites o la PCR, permiten la identificación individual en especies amenazadas, análisis de viabilidad poblacional y variabilidad genética de poblaciones, o determinar parentescos, filogenias, grados de hibridación o introgresión y establecer así unidades de conservación de acuerdo con la estructura genética espacial (geográfica) de las poblaciones y sus grados de heterozigosidad e hibridación. Hay dos ejemplos clásicos en este campo.

Uno es el caso del topillo *Geomys colonus*, considerado una especie en peligro de extinción, y que tras un análisis RFLP de DNA mitocondrial resultó ser genéticamente indistinguible de las poblaciones más cercanas, las cuales estaban incluídas en una especie diferente (*G. pinetis*). Otro es el del tuátara neozelandés (*Sphenodon* spp.), para el que se pensaba que todas las poblaciones pertenecían a una misma especie. Tras el análisis genético resultó que había dos especies, una de las cuales estaba al borde de la extinción y requería medidas urgentes de conservación.

En biología de la conservación son especialmente importantes las pequeñas poblaciones. Estas poblaciones, normalmente aisladas a consecuencia de la fragmentación y la pérdida de hábitat, no sólo son más susceptibles por su tamaño a los disturbios ambientales o antropogénicos, sino que además corren el riesgo de sufrir fenómenos genéticos (deriva génica, cuellos de botella, etc...) que las lleven a la pérdida de variabilidad genética y por estocasticidad ambiental a la extinción. La tendencia de una población pequeña a extinguirse se conoce como efecto vórtice [Primack, *Essentials of Conservation Biology*, Sinauer Ass. (1993)]. Otro ejemplo clásico es la población de leones del cráter del Ngorongoro (Tanzania), que tras sufrir un cuello de botella en 1962 quedó reducida a 9 hembras y un macho. En 1990 la población tenía un tamaño en torno a 100 individuos aproximadamente, pero era poco viable: había reducido su variabilidad génica, su éxito reproductivo era bajo y además los machos presentaban graves anomalías espermáticas.

En las pequeñas poblaciones es importante determinar la población mínima para mantener la variabilidad genética y así el tamaño mínimo de población viable. Este es, por ejemplo, uno de los principales problemas del oso pardo (*Ursus arctos*) en la cordillera Cantábrica y en Pirineos. En la cordillera Cantábrica existen dos núcleos poblacionales de entre 20 y 60 osos separados y aislados. En Pirineos la población no alcanza los 10 ejemplares, también en dos núcleos aislados. Una población de oso de 30 a 70 individuos se extinguirá con un 95% de probabilidad en menos de 100 años según la calidad del medio que ocupe, las características genéticas de los individuos y la demografía de la población [Clevenger & Purroy, *Ecología del oso pardo en España*, Monografías MNCN-CSIC, (1991)].

Los tamaños mínimos pueden ser estimados combinando técnicas moleculares y estudios de selección y uso del hábitat. En el caso del rinoceronte africano (*Diceros bicornis*) se ha

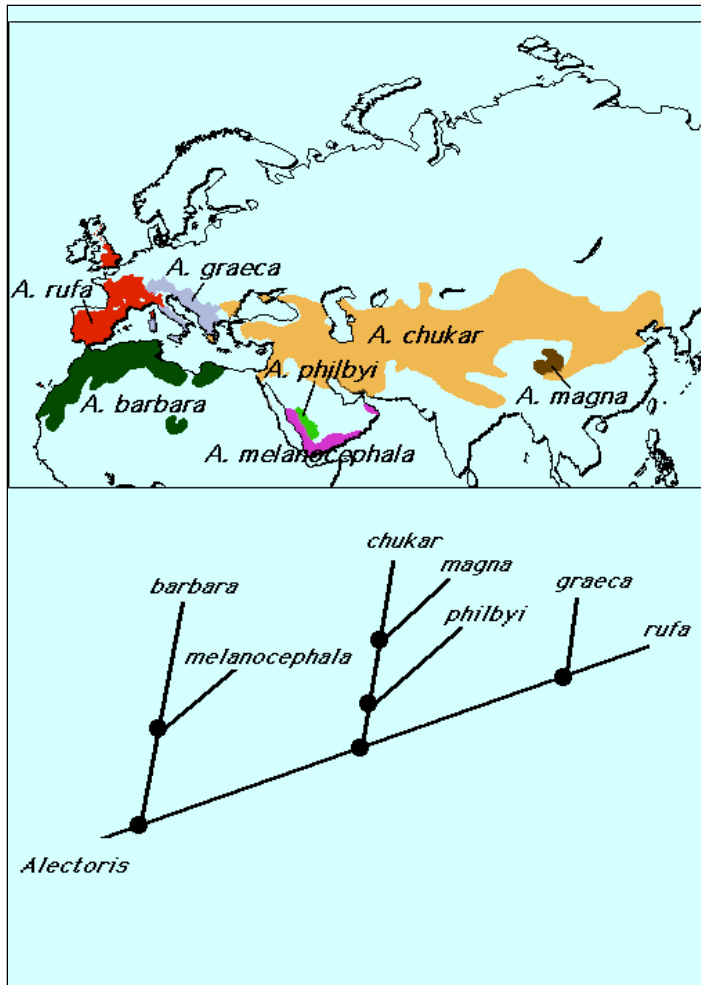
comprobado analizando la frecuencia de alelos del DNA mitocondrial que, aunque su tamaño es de unos 2000 ejemplares, la fragmentación de la población en unas 75 subpoblaciones aisladas ha provocado una pérdida importante de variabilidad [Ashley et al., *Conservation Biology*, **4**: 71-77 (1990)]. Actualmente es necesario una gestión de la población para incrementar la variabilidad génica y una gestión del hábitat para conectar las subpoblaciones aisladas permitiendo el flujo de individuos dispersantes e inmigrantes.

Incluso en el campo de la gestión de fauna, la biología molecular está encontrando aplicación. Recientemente se ha llevado a cabo un análisis de estado genético y grados de hibridación de las poblaciones de perdiz roja en toda la Península Ibérica [Arruga et al., *Cytogenetics Cell Genet*, **74**: 228 (1997)]. Se trata de un tema muy importante debido a la pérdida progresiva de variabilidad y del genoma silvestre de las poblaciones salvajes debido a las continuas sueltas de perdices de granja. Con el conejo se ha hecho algo similar [Van der Loo et al., *Gibier Faune Sauvage*, **14**(3): 427-449 (1997)] y además se trabaja en la generación de vacunas recombinantes para las distintas enfermedades que sufre esta especie, usando técnicas de PCR entre otras [Guittre et al., *Gibier Faune Sauvage*, **14**(3): 507-509 (1997)].

En el campo de la **Biogeografía** las técnicas moleculares también están ganando cada vez más adeptos. Recientemente se ha descrito una nueva especie de sapo partero (*Alytes dickhilleni*) endémica de las sierras béticas como fruto de una investigación sobre la diversidad genética de las poblaciones ibéricas de *Alytes* [Arntzen & García-Paris, *Bijdr. Dierk.*, **65**(1): 5-34 (1995)]. También se ha delimitado la distribución geográfica y las zonas de solapamiento de posibles subespecies de las diferentes poblaciones de *A. obstetricans* de acuerdo con un análisis de proteínas enzimáticas por electroforesis [García-Paris, *Rev. Esp. Herp.*, **9**: 133-138 (1995)]. Existen muchos más ejemplos, tales como: análisis comparativos de la distribución de plantas de acuerdo con análisis morfológicos y del DNA cloroplastidial [Fangan & Nordal, *Journal of Biogeography*, **20**(1): 55-62 (1993)]; estudio de las rutas de migración de la tortuga boba (*Caretta caretta*) usando marcadores moleculares en el DNA mitocondrial [Bowen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 3731-3734 (1995)]; estudios de la variabilidad de aloenzimas y factores determinantes para la conservación en comunidades de mamíferos [Tiedemann et al., *Biodiversity Letters*, **3**(3): 81-91 (1996)]; o incluso técnicas moleculares aplicadas a la biogeografía insular de MacArthur & Wilson con una especie de colibrí [Diamond, *Nature*, **374**: 765-766 (1995)]. La diversidad de especies y la distribución de una biota refleja la historia de unas respuestas evolutivas a cambios de hábitat producidos por la actividad geológica. Las secuencias de DNA de un taxón pueden ser usadas para inferir la especiación y la biogeografía histórica y ecológica del mismo [Riddle, *Trends in Ecology and Evolution*, **11**(5): 207-211, (1996)]; o para determinar si los patrones de distribución son debidos a procesos de vicarianza o dispersión [Lamb et al., *Journal of Mammalogy*, **78**(1): 117-133, (1997)].

Recientemente un equipo de investigación italiano ha revisado la filogenia de las perdices del Género *Alectoris* y llevado a cabo inferencias sobre la biogeografía histórica del taxón [Randi et al., *Abstract Booklet XXIIIrd IUGB Congress*, (1997)]. Para ello han analizado secuencias de tres genes presentes en el DNA mitocondrial (el citocromo b, la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa y la región controladora D-loop).

Se trata de un buen ejemplo de cómo, a partir de una hipótesis evolutiva inferida por técnicas moleculares, se reconstruye un proceso que dió lugar al patrón biogeográfico actual del taxón y que es consistente con la información geológica y paleontológica conocida. Además, se realizan predicciones para las especies no analizadas. Este trabajo es una continuación de su línea de investigación, y viene a confirmar los resultados que ya obtuvieron con el análisis de proteínas por electroforesis [Randi et al., *The Auk*, **109**(2): 358-367, (1992)] para el mismo grupo de gallináceas y para todas las Phasianidae en general [Randi et al., *Biochemical Systematics and Ecology*, **19**(3): 213-221, (1991)].



El Género *Alectoris* consta en el paleártico de siete especies (*A. rufa*, *A. chukar*, *A. graeca*, *A. magna*, *A. philbyi*, *A. melanocephala* y *A. barbara*), todas ellas muy similares morfológicamente, diferenciándose únicamente por el patrón de plumaje del rostro y la garganta. Presentan áreas de distribución alopátridas, excepto *A. melanocephala* y *A. philbyi*, que son simpátridas, pero se excluyen al explotar ambientes ecológicos diferentes. Existen varias zonas de parapatría entre algunas de las especies, en alguna de las cuales se produce hibridación de forma natural. Este patrón de alopatría dominante, hibridación natural en zonas de contacto de las distribuciones, similitud morfológica y exclusión ecológica en las zonas de simpatría, ha sido usado como base de la hipótesis de que el género es de reciente radiación e incompleta especiación [Blondel, *Biogeographie evolutive*, (1988)].

El equipo del Profesor Randi pone a prueba con las técnicas moleculares las

hipótesis evolutivas existentes para el género *Alectoris*. En estas hipótesis se propone la existencia de tres superespecies o formas ancestrales a partir de las cuales surgieron los linajes de las especies actuales.

La principal divergencia entre estas hipótesis radica en la discusión sobre el origen de *A. rufa*. Para algunos autores [Watson, *Evolution*, **16**: 11-19 (1962)] esta especie se originó a partir de poblaciones de *A. barbara* (una especie que se distribuye actualmente por todo el norte de Africa) que cruzarían el estrecho de Gibraltar y quedarían aisladas. De ser cierta esta hipótesis, *barbara* y *rufa* estarían muy cercanas filogenéticamente. Este autor propuso dos superespecies, una que incluía a *rufa*, *barbara*, *chukar*, *philbyi*; y otra que incluía a *graeca* y *magna*.

Para otros autores, *A. rufa* formaría parte de un mismo linaje con *graeca* y *chukar*, pero no con *barbara* ni con *philbyi*, por lo que *rufa* no pudo originarse a partir de *barbara*, sino de una forma ancestral *chukar* [Spano, *Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova*, **80**: 286-293 (1975)], o de una forma ancestral *graeca* [Bernard-Laurent, *Gibier Faune Sauvage*, 2: 79-96 (1984)].

Usando matrices de distancias génicas, los autores construyeron un dendrograma que relacionaba las 4 especies analizadas (*barbara*, *rufa*, *graeca* y *chukar*). A la vez, realizaron un análisis cladista, generando árboles filogenéticos hasta obtener el más parsimonioso, usando como grupos externos a *Perdix perdix* y *Phasianus colchicus*. La conclusión fue que *A. rufa* y *A. graeca* eran grupos hermanos que tenían un ancestral común con *A. chukar*, y ésta a su vez con *A. barbara*. Los resultados permitían corroborar la hipótesis de Bernard-Laurent y refutar la de Watson, ambas construidas con criterios morfológicos.

Las distancias génicas encontradas sugerían que las especies de *Alectoris* no se originaron todas de forma contemporánea, a partir de la fragmentación de la población de un ancestral común, sino al

menos a partir de tres olas de especiación alejadas en el tiempo.

En un intento de calibrar el reloj molecular y datar la divergencia genética, los autores proponen el valor de 22,9 millones de años como equivalente a una unidad de distancia génica para este taxón. Según esto y las evidencias fósiles y paleobiogeográficas, construyen una hipótesis de biogeografía histórica del taxón, que además explica las preferencias ecológicas de estas especies por los espacios abiertos.

Hace 6 millones de años surgieron dos linajes de *Alectoris*, el de *chukar* y el de *barbara*, a partir de un ancestral común, como consecuencia del cambio climático que favoreció la extensión del bioma estepárico, la aridez y la desecación y desaparición del estrecho de Gibraltar. Este clima árido favoreció la dispersión de especies adaptadas a la estepa como éstas. Casi al mismo tiempo, la formación de la cordillera de los Cárpatos creó una barrera este-oeste en Europa central que separó el Mediterráneo del mar Sarmático (una extensión del antiguo mar Caspio) y probablemente dividió la población ancestral. El linaje *barbara* se extendió hacia el oeste, por el litoral mediterráneo *africano*, especiándose y originando a *barbara* y *melanocephala*. Mientras, el linaje *chukar* se extendió hacia el este, por el litoral del Sarmático. *A. barbara* cruzaría eventualmente el estrecho, lo cual explica la existencia de fósiles de esta especie en Francia, razón por la cual Watson había supuesto que era el ancestral de *A. rufa*.

Hace 4 millones de años, el ancestral *chukar* se dispersó hacia el oeste de Europa, dando lugar al linaje *graeca-rufa* tras la barrera de los Cárpatos. Tan sólo hace 1,8 millones de años, al principio de las glaciaciones pleistocénicas, la población del ancestral *graeca-rufa* se fragmentó, originándose las dos especies (al tiempo que se extinguía *barbara* en Francia) gracias a las contracciones del hábitat estepárico debidas a los cambios climáticos glaciares. El calentamiento postglaciar y la deforestación que sufrió Europa en el Holoceno favorecieron la expansión por toda la cuenca mediterránea de las especies actuales de *chukar*, *graeca* y *rufa*, hasta el punto de contactar las poblaciones en los bordes de sus áreas de distribución.

Según este modelo, la especie *graeca* nunca alcanzó Asia central, zona de distribución de *chukar* y *magna*, por lo que la superespecie de Watson *graeca-magna* no puede ser cierta, y de hecho aún no se han encontrado fósiles de *graeca* en esta zona. La especie *magna* surgiría de la fragmentación de la población ancestral de *chukar* en su primera expansión desde el este de Europa hacia Asia. El parecido en el plumaje entre *magna* y *graeca* es más resultado de una convergencia que de un ancestral común.

Las dos especies simpátricas, *philbyi* y *melanocephala*, se originarían durante la primera ola de especiación, la primera a partir del linaje *chukar* y la segunda del linaje *barbara*. Entrarían en contacto en la zona de la península arábiga, evolucionando hacia una exclusión ecológica que permitiese su simpatría.

La inclusión en el análisis molecular de estas tres especies habrá de confirmar en un futuro si estas últimas predicciones son ciertas o no.

Jesús Duarte Duarte es doctorando en Biología Animal en la Universidad de Málaga