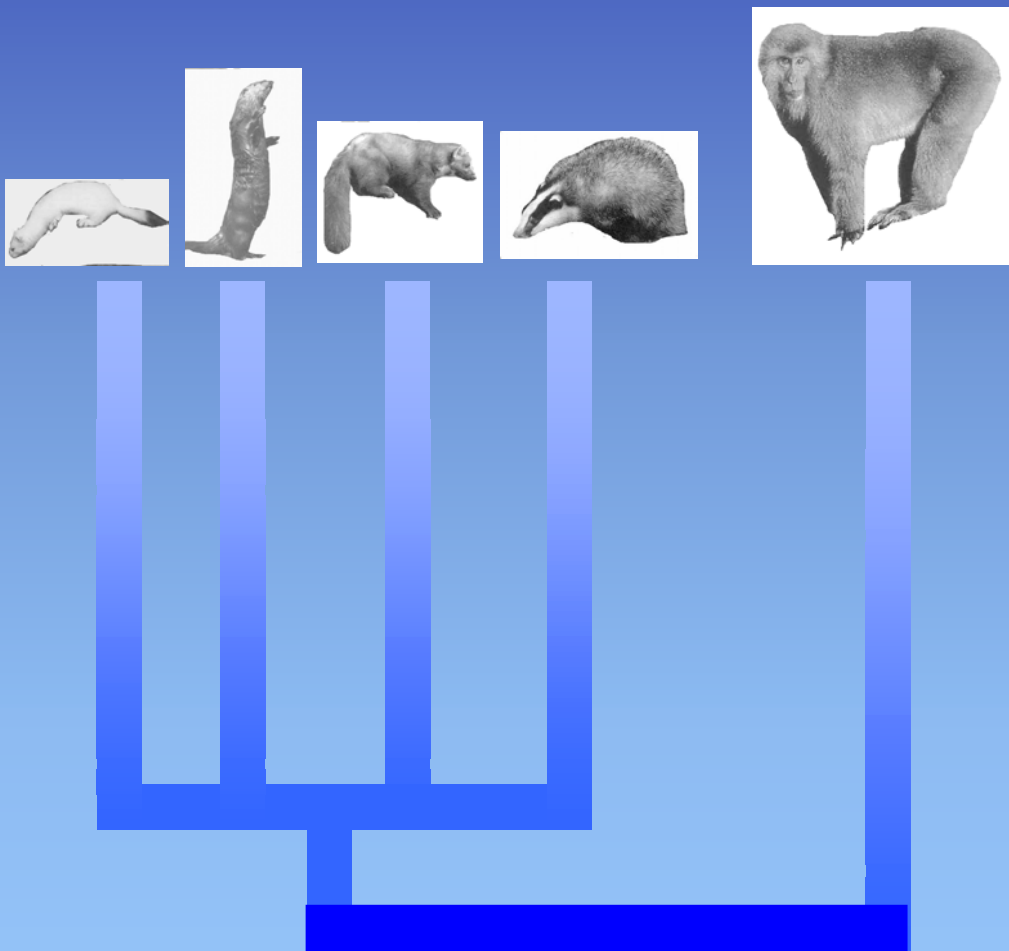


SISTEMÀTICA MOLECULAR, FILOGEOGRAFIA I GENÈTICA DE LA CONSERVACIÓ DE MUSTÈLIDS I DE MACACS

Josep Marmi i Plana
Tesi Doctoral



2004



Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

UNIVERSITAT POMPEU FABRA

***Sistemàtica molecular, filogeografia i
genètica de la conservació de mustèlids i de
macacs***

Memòria presentada per Josep M^a Marmi Plana per optar al grau de Doctor per
la Universitat Pompeu Fabra.

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Xavier Domingo i Roura
al Departament de Ciències Experimentals i de la Salut de la Universitat
Pompeu Fabra.

Dr. Xavier Domingo i Roura
Director de Tesi

Josep M^a Marmi i Plana

Barcelona, març de 2004

Dipòsit legal: B.43715-2004
ISBN: 84-688-8523-1

*Als meus pares per
haver-me ajudat tant
durant tots aquests
anys*

Als meus germans

A la Queralt

AGRAÏMENTS

En aquest apartat vull agrair l'ajuda que m'han ofert tot un seguit de persones des que em vaig començar a introduir en el món de la genètica de poblacions i de l'evolució molecular. Sobretot vull agrair als Drs Alfredo Ruíz i Xavier Domingo que em donessin una oportunitat per iniciar-me productivament en aquestes especialitats. Sota la supervisió del primer vaig cursar - juntament amb el col·lega Oscar Ramírez i dins de la llicenciatura de Biologia - l'assignatura de Pràctiques en Empreses i Institucions Públiques amb l'objectiu de realitzar un treball recopilatori d'estudis de diversitat genètica en fauna dels Països Catalans. Amb el segon, després de col·laborar-hi durant una mica més d'un any (entre el setembre de 1998 i el desembre de 1999), vaig iniciar la tesi doctoral que ara presento.

Al setembre de 1998 vaig començar a treballar amb en Xavier, en el Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals (CREAF) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). En aquesta institució, en Guerau Fernández i la Begonya Jaén van ser els primers que em van ajudar a aprendre les tècniques de biologia molecular que havia d'utilitzar per fer els experiments i en teoria estava supervisat per la Rogelia Lorente, una estudiant de màster mexicana molt trempada però que sempre desapareixia quan més la necessitava (Murphy??), doncs aquell any en Xavier començava a treballar a la Universitat Pompeu Fabra .

Al febrer de 1999 en Xavier em va proposar incorporar-me a la Unitat de Biologia Evolutiva de la Universitat Pompeu Fabra. Els companys de la Unitat de Biologia Evolutiva m'han ajudat a millorar les tècniques apreses i me n'han ensenyat de noves amb molta paciència, dedicació i amabilitat. Ells són l'Aida Andrés, la Stephanie Plaza, en David Comas, l'Elena Bosch, l'Eva Mateu. Dins d'aquesta unitat vull agrair especialment l'ajuda oferida per la Mònica Vallès en els treballs d'extracció d'ADN de les mostres; pel Jordi Clarimón que m'ha explicat tots els secrets de les electroforesis en gels de poliacrilamida; pel Bernal Morera per haver pescat algunes de les seqüències de GenBank que he utilitzat; per l'Anna Pérez-Lezaun, per les vegades que m'ha ajudat a seqüenciar (també per les vegades que m'ha donat suport moral després dels terribles atacs d'ira de la Rosa Martínez) juntament amb en Roger Anglada (el deixeble de l'Anna en el Servei de Seqüenciació i d'Anàlisi de Fragments). Sóc conscient que dec uns quants pernils "jabugos" als cervells de la casa (que fan la seva vida a la "sala de

pensar”). En Francesc Calafell, l’Arcadi Navarro i l’Oscar Lao han tingut una paciència digna d’admirar amb mi i m’han ofert una ajuda impagable en les anàlisis de dades. També vull agrair en aquestes línies l’amistat que m’han ofert la Marta Soldevila, que ja es va convertir en una molt bona amiga meva quan estudiàvem a la UAB, i en Carles Lalueza-Fox, del qual admiro la seva saviesa i els seus treballs. En aquest darrer any s’han incorporat noves persones a la Unitat, la Lourdes Sampietro, l’Anna Ramírez, en Tomàs Marquès, l’Anna González, la Michelle Gardner, l’Andrés Moreno, la Gemma Berniell, l’Anna Ferrer, la Cristina Santa i en Ferran Casals, entre d’altres, que també s’han convertit en uns bons companys.

Les següents línies van dedicades a aquells que es van afegir posteriorment al projecte d’en Xavier després d’en Guerau, la Begonya, la Rogelia, la Rachel Whiteley i jo mateix. Començant una altra vegada pel Guerau (que es va reincorporar temporalment però ara a la UPF) i l’Anna Belém Ibarz amb els que vaig coincidir durant els primers anys a la UPF i que ara han seguit camins diferents. L’Anna actualment és a Oxford amb la intenció de començar un doctorat i en Guerau ja el té encarrilat a l’Hospital de Can Ruti. A ells dos els desitjo un munt d’èxits al llarg dels seus respectius camins. El següent en incorporar-se va ser en Joan Francesc López, un dels grans amics que he fet en aquesta casa i una de les persones que més m’ha ajudat. L’altra és l’Aïnhua Ferrando a la qual també li dec molt, sobretot després d’ajudar-me amb les delicades extraccions dels pèls de les brotxes d’afaitar. He de reconèixer que després de la incorporació d’ells dos la qualitat del treball del grup va millorar notablement. L’última onada de fitxatges va arribar amb l’aprovació del Projecte Europeu ”INPRIMAT”. Arrel d’això es van incorporar en el nostre grupet, a partir del novembre de 2002, l’Olga Andrés i en Francesc Bisbal. Tots ells també han demostrat ser uns bons companys de treball i el que és més important, uns bons amics. Cal dir aquí que l’Olga ha fet la feixuga feina de llegir-se aquesta tesi per corregir les faltes d’ortografia i gramàtica que a vegades se m’escapen. Al mateix temps que l’Olga, ens va arribar l’ajuda celestial del Bruno Guallar (el tito), com a gestor de projectes. A part d’encarregar-se de resoldre els “marrons de grup” que suposen la paperassa i la sol·licitud de projectes, m’ha ofert una valuosa ajuda en moltes ocasions. És com la nostra padrina i ell m’ha ajudat, per exemple, a fer notables progressos en el disseny i composició de seminaris amb el “Power Point”. Almenys ara les meves presentacions no són tan horteres com ho eren al principi. En Bruno també ha tingut la santa paciència d’ajudar-me en els múltiples i variats problemes de format que he patit a l’etapa final de

la tesi que teniu a les vostres mans. El setembre del 2003 s'ha incorporat al nostre grup en Thomas Kellermann, un estudiant alemany molt trempat, i més recentment, el mes de novembre, la Montserrat Bosch ha començat a treballar amb nosaltres com a "postdoc". Ella m'ha donat consells molt útils per acabar el meu recorregut pre-doctoral.

També agraeixo a l'Amarant Martínez, estudiant de la UPF a punt de llicenciar, l'ajuda oferta en el treball de la filogeografia del teixó i a un dels grans amics que he fet a fora del nostre grup, en Luís Magano li agraeixo el seu companyerisme i li desitjo molta sort en la seva nova feina. Per acabar, també tinc en compte l'ajuda desinteressada que m'ha ofert l'amic i biòleg Pere Aymerich, el qual, a part de deixar-me alguns llibres ben interessants, m'ha ensenyat, en diverses tertúlies de cafè, alguns punts de vista sobre el treball de camp que sovint els moleculars desconeixem.

Vull dir també, que la realització d'aquesta tesi no hagués estat possible sense el finançament de les següents institucions - Ministerio de Educación y Cultura (Ref. PB98-1064); Institut d'Estudis Catalans; European Commission (Ref. INPRIMAT QLRI-CT-2002-01325); Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació, Generalitat de Catalunya (Ref. 2001SGR 00285); People's Trust for Endangered Species, United Kingdom; Parfumerie Douglas Netherland B.V.; Fundació Territori i Paisatge, Caixa de Catalunya - la beca pre-doctoral que he gaudit durant aquests quatre anys concedida pel Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació, Generalitat de Catalunya (Ref. 2000FI-00698) – i tot un seguit de col·laboradors que ens han proporcionat mostres i que estan citats en els diferents capítols.

Per acabar, també vull donar les gràcies a l'Eulàlia Garcia-Franquesa, conservadora de vertebrats del Museu de Zoologia de Barcelona, per haver acudit als assatjos de la defensa pública d'aquesta tesi i ajudar-me a millorar la meva presentació.

PRESENTACIÓ	11
INTRODUCCIÓ	15
1. La classificació dels éssers vivents i la conservació de la biodiversitat	
1.1 Cap a on va la taxonomia actual?	16
1.2 Caràcters morfològics i caràcters moleculars	19
1.3 El paper de la variació intraespecífica	23
1.4 La sistemàtica molecular i la conservació de la fauna	27
2. Els marcadors genètics	
2.1 Genoma mitocondrial i genoma nuclear	33
2.2 El gen citocrom <i>b</i>	35
2.3 Les regions flanquejants de regions repetitives nuclears	36
2.4 La regió control de l'ADN mitocondrial	38
3. Els mustèlids	
3.1 Distribució, descripció i història evolutiva	42
3.2 Taxonomia confusa	47
3.3 Estatus i conservació a nivell mundial	49
4. El teixó euroasiàtic	
4.1 Distribució, descripció i història evolutiva	50
4.2 Importants diferències morfològiques	51
4.3 Estatus i conservació	53
5. Els macacs	
5.1 Distribució, descripció, taxonomia i història evolutiva	54
5.2 Història evolutiva del grup "Fascicularis"	56
5.3 Els genomes mitocondrial i nuclear discrepen sobre l'evolució de les espècies de macacs	58
5.4 Els macacs rhesus i japonès	60
OBJECTIUS	63
RESULTATS	67
Capítol I: Phylogeny, Evolutionary History and Taxonomy of the Mustelidae Based on Sequences of the <i>cyt b</i> Gene and a Complex Repetitive Flanking Region	69

Capítol II: <i>Badgers Are Divided into Four Clearly Separated Taxonomic Units Across Eurasia</i>	101
Capítol III: <i>Inquiring into the Origin of Badger Hair Used in the Manufacturing of Shaving Brushes</i>	125
Capítol IV: <i>Radiation and Phylogeography in the Japanese Macaque, Macaca fuscata</i>	137
DISCUSSIÓ GENERAL	149
1. Com hem de classificar els éssers vivents?	150
2. L'etern debat sobre la classificació de les espècies	155
3. Els factors que han influït en la diferenciació dels mamífers euroasiàtics	161
4. Algunes reflexions sobre la conservació de la biodiversitat	
• Genètica i conservació de la biodiversitat	165
• Sistemàtica i conservació de la biodiversitat	170
• Noves eines pel control del tràfic il·legal d'espècies amenaçades	173
• La conservació de la biodiversitat més enllà de gens i espècies	175
BIBLIOGRAFIA	179
ANNEXOS	209
<i>Phylogeny, subspeciation and genetic structure of the Eurasian badger (Meles meles) in the Iberian Peninsula and the World</i>	210
<i>The IUCN Red List of Threatened Species 1994 Categories & Criteria (v.2.3)</i>	222



PRESENTACIÓ

12 - PRESENTACIÓ

Els mustèlids (família Mustelidae) i els macacs (gènere *Macaca*) són dos grups de mamífers amb notables incongruències en les seves taxonomies i que tenen nombroses espècies en perill d'extinció. El treball que presento és el resultat d'una recerca que ha tingut com a finalitat resoldre alguns dels punts conflictius de les taxonomies d'aquests grups i aportar nous arguments per la gestió de les espècies més amenaçades que hi estan incloses, mitjançant l'aplicació de la metodologia proporcionada per la sistemàtica molecular i la filogeografia. Una part del treball ha estat centrada en l'estudi dels orígens i de la història evolutiva d'aquests taxons, la qual cosa ha estat tinguda en compte a l'hora de discutir sobre els dos problemes anteriors. El treball s'ha realitzat comparant la informació obtinguda de diferents regions dels genomes nuclear i mitocondrial, amb el registre fòssil, la paleogeografia, la biogeografia i la distribució geogràfica actual dels mustèlids i dels macacs.

La *introducció* d'aquesta tesi comença amb una visió general sobre la situació en què es troba la taxonomia actualment, seguida d'una explicació més extensa dels pros i contres de la utilització de dades moleculars o morfològiques per ordenar els éssers vivents i inferir les seves relacions filogenètiques, i del paper que pot desenvolupar la sistemàtica molecular en la gestió i la conservació de la fauna. Seguidament es descriuen les principals classes de marcadors genètics (mitocondrials i nuclears) posant èmfasi sobretot en els utilitzats en aquesta tesi (el gen citocrom *b*, la regió control i les seqüències flanquejants de regions repetitives nuclears). La introducció acaba amb una descripció dels taxons que he estudiat – la família “Mustelidae”; el teixó euroasiàtic, *Meles meles*; i el gènere *Macaca* (principalment el macac japonès, *Macaca fuscata*, i el rhesus, *Macaca mulatta*) – incloent informació sobre les seves distribucions geogràfiques, el registre fòssil, el què es coneix de la seves històries evolutives i els principals problemes que presenten tant a nivell de sistemàtica i taxonomia com de gestió i conservació.

Els principals *objectius* que es volen assolir en aquesta tesi són reconstruir filogènies i clarificar taxonomies a nivell interespecífic (en el cas dels mustèlids); clarificar taxonomies a nivell intraespecífic (en els casos del teixó euroasiàtic i del macac japonès); estudiar processos de divergència i diferenciació genètica ocorreguts en mamífers de distribució euroasiàtica durant el Plistocè així com durant la colonització de l'arxipèlag del Japó (en els casos de les martes comuna, gibel·lina i japonesa, del teixó euroasiàtic i del macac japonès); i explorar l'aplicació dels resultats obtinguts a la

gestió d'espècies i de poblacions d'elevat interès conservacionista o que estiguin en perill d'extinció.

Els *resultats* obtinguts apareixen en quatre capítols. El primer capítol és un article, acceptat per la revista *Zoologica Scripta*, on s'ha realitzat una filogènia molecular de la família "Mustelidae" utilitzant tota la informació del gen citocrom *b* disponible a la base de dades molecular "GenBank" que hem sumat a seqüències del mateix gen obtingudes al nostre laboratori, i també seqüències flanquejants de la regió repetitiva nuclear *Mel08*, descrita per primera vegada pel nostre grup. El segon capítol és un article que enviarem properament a *Molecular Ecology* on s'ha realitzat una filogeografia del teixó a nivell euroasiàtic amb seqüències de la regió control de l'ADN mitocondrial. El tercer capítol és un article que està en preparació on s'estudia l'aplicació de la variabilitat trobada a la regió control i al gen citocrom *b* per monitoritzar productes derivats del teixó com poden ser les brotxes d'afaitar. El darrer capítol és un article que està publicat a la revista *Molecular Phylogenetics and Evolution* on s'ha estudiat el procés d'especiació i la filogeografia del macac japonès comparant seqüències de la regió control d'aquesta espècie amb les de poblacions xineses de rhesus.

Finalment, a l'últim apartat d'aquesta tesi es fa una *discussió general* on s'interpreten conjuntament tots els resultats obtinguts.



INTRODUCCIÓ

16 - INTRODUCCIÓ

1. LA CLASSIFICACIÓ DELS ÉSSERS VIVENTS I LA CONSERVACIÓ DE LA BIODIVERSITAT

1.1 Cap a on va la taxonomia actual?

La taxonomia és la ciència que s'encarrega d'anomenar i de classificar els éssers vivents i, per tant, es considera un dels pilars fonamentals de la biologia. Va ser fundada a partir del sistema de classificació binomial creat per Carolus Linnaeus (1707-1778) fa uns 250 anys i durant una bona part de la seva història ha sigut principalment descriptiva. La taxonomia Linneana va ser revisada el segle XIX i es van introduir noves i complexes regles de nomenclatura per definir les espècies, la descripció de les quals es basava en un individu tipus que era la referència principal per les futures comparacions. Des d'aleshores els individus tipus normalment es dipositen en les col·leccions dels principals museus de zoologia o d'història natural, tant a nivell nacional com mundial. Amb la introducció d'aquests nous protocols es volia superar la primera crisi de la taxonomia, ja que es corria el perill de que els taxònoms descrivissin espècies noves ignorant si d'altres ja ho havien fet, la qual cosa hagués desencadenat en un sistema confús i caòtic que condemnaria la taxonomia al seu fracàs. La reforma del segle XIX també va tenir en compte la revisió de les regles per definir les categories taxonòmiques superiors a les espècies i va ser el primer intent per tenir una taxonomia unificada.

Actualment la taxonomia descriptiva està passant per una altra crisi a causa de la manca de professionals, recursos i a que la seva popularitat, en relació amb d'altres parts de la biologia, ha disminuït notablement. Un dels principals problemes que té la taxonomia dels nostres dies és que el seu coneixement en molts grups depèn d'especialistes d'edat avançada, l'experiència dels quals es pot arribar a perdre una vegada es retirin de la seva vida professional. Per acabar d'agreuja el problema, la docència en aquest camp és limitada i els estudiants de biologia solen estar poc motivats per cursar les assignatures que hi estan relacionades. D'altra banda, interpretar el treball dels taxònoms del segle XIX sovint és una feina difícil a la qual la majoria de taxònoms actuals ha de dedicar una bona part de la seva carrera professional, tant revisant les inadequades i defectuoses descripcions publicades com buscant per tots els museus del món especimens tipus que, a més a més, solen estar en condicions molt precàries. En alguns grups taxonòmics la complexa sinonímia i el material tipus dispers fan quasi impossible qualsevol intent de revisió. Un altre problema que es planteja és que encara avui moltes noves espècies es descriuen en publicacions de poca tirada i dispersió, sense

comprovar si realment ja s'havien descrit en altres publicacions semblants anteriorment, de manera que la reforma del segle XIX encara no ha aconseguit assolir un dels seus principals objectius. De fet molta informació taxonòmica es troba en monografies cares o en revistes de baixa circulació disponibles solament en biblioteques especialitzades [Godfray 2002].

El panorama desolador que afecta a la taxonomia descriptiva contrasta amb la cada vegada més evident necessitat de quantificar i catalogar la biodiversitat i d'entendre les relacions històriques entre els organismes; el primer pas que cal fer per evitar que es consolidi el que alguns autors, com els prestigiosos biòlegs Robert M May, Edward O Wilson i Paul R Ehrlich, consideren la sisena extinció en massa. Paradoxalment, la taxonomia descriptiva té un lloc dins d'una de les disciplines que s'encarreguen de l'estudi de la biodiversitat en què s'està treballant més en les darreres dècades, la sistemàtica. Segons Quicke [1993] la taxonomia és una part més de la sistemàtica i en conjunt ambdues ciències s'encarreguen de descriure i denominar nous taxons, construir claus d'identificació i posar els organismes en un sistema adequat de classificació tenint en compte aspectes relacionats amb la seva història evolutiva, la genètica i els processos d'especiació, a més a més de la semblança en determinats caràcters diagnòstic. Segons tot això, el concepte de filogènia està íntimament lligat al de taxonomia i el seu objectiu és estudiar les relacions d'afinitat i de parentesc dels éssers vivents intentant explicar l'origen dels grups d'organismes [Tinaut i Ruano 2002].

La sistemàtica evolutiva està establerta en els principis de la sistemàtica tradicional – formulats per George Gaylord Simpson (1902-1984) i basats en la fenètica – que recentment han estat revisats d'acord amb els principis cladistes proposats per Willi Henning (1913-1976) [Hickman i al. 2003]. L'objectivitat, la racionalitat i l'establiment de grups naturals són arguments a favor de la metodologia cladista [Minelli 1993]. Les principals aportacions que ha fet la cladística a la sistemàtica tradicional són l'ordenació dels organismes segons el punt més recent del seu procés de divergència i la substitució dels grups parafilètics per subgrups monofilètics, respectant la resta de grups taxonòmics. També s'ha intentat incorporar la informació aportada per la metodologia cladista al sistema Linneà evitant, sempre que ha estat possible, l'alteració de la nomenclatura clàssica [Wiley 1979; Nixon i Carpenter 2000]. Una revisió taxonòmica estrictament cladista suposaria un problema important ja que elevaria enormement el nombre de taxons, i complicaria extraordinàriament la seva

18 - INTRODUCCIÓ

integració en el sistema Linneà [Laborda i Dominguez 2000]. Hi ha cladistes, però, que argumenten que les categories Linneanes no són necessàriament naturals ni comparables en estudis evolutius. Així, alguns d'aquests autors han proposat noves definicions pels noms dels taxons o fins i tot eliminar les categories taxonòmiques tradicionals [Ax 1987; De Queiroz i Gauthier 1990]. Un exemple d'això el representa PhyloCode (<http://www.phylocode.org>), on es proposa substituir la nomenclatura Linneana per un sistema uninominal per anomenar els clades i en referència explícita a la filogènia.

En els darrers anys han sortit una multitud d'iniciatives a Internet per capturar el coneixement taxonòmic i per facilitar el seu ensenyament i divulgació. En són alguns exemples "Species2000" (<http://www.usa.sp2000.org>), que té com a objectiu enumerar totes les espècies ja conegudes; i "The Tree of Live Web Project" (<http://tolweb.org/tree/>), que vol proporcionar informació descriptiva i filogenètica de tots els grups d'organismes. També han aparegut propostes per evitar que la taxonomia, i de rebot la sistemàtica, es converteixin en un exemple del clàssic mite de la Torre de Babel. Godfray [2002] proposa la integració de tota la taxonomia dins d'un únic portal d'Internet subjecte a revisions periòdiques realitzades per experts. La primera revisió de la taxonomia d'un determinat grup taxonòmic es faria d'acord amb les normes establertes per la Comissió Internacional de Nomenclatura Zoològica i inclouria la descripció tradicional de cada taxó, la localització del material tipus i informació addicional com seqüències d'ADN, fotografies, il·lustracions i sinonímies per mantenir el contacte amb la literatura antiga. Aquesta primera versió es posaria a disposició de la comunitat de taxònoms via Internet i a partir dels canvis proposats esdevindria la taxonomia unitària del grup. Qualsevol futura proposta de modificació hauria de passar per un equip de revisors i en cas de ser acceptada es publicaria en una nova revisió de la web.

Lee [2002] adverteix que un rigorós control de qualitat és imprescindible perquè un projecte com el de Godfray tingui èxit. Tautz i al. [2003] estan a favor d'una proposta com l'anterior però proposen que les seqüències d'ADN siguin un referent a tenir en compte tant o més important que l'individu tipus. A més a més, respecte a la nomenclatura proposen que les seqüències d'ADN han de ser les principals referències per evitar els problemes que comporten els freqüents canvis de noms deguts a les contínues revisions del sistema Linneà. Això no suposaria l'eliminació de la nomenclatura Linneana, doncs aquesta serviria per la comunicació entre els experts,

mentre que la identificació inequívoca dels organismes es faria exclusivament a partir de les seqüències d'ADN. Aquestes dues propostes poden ser un primer pas per solucionar la delicada situació en què es troba la taxonomia però també han rebut crítiques. La proposta de Godfray ha estat criticada perquè és possible que molts investigadors que resideixen en països pobres i que en molts casos no poden accedir a Internet tinguin moltes dificultats per accedir a la informació. A més a més aquests investigadors seran els que més necessitaran poder disposar d'aquesta informació, doncs en molts casos viuen en zones que són punts calents de biodiversitat i/o d'extinció [Knapp i al. 2002]. Seberg i al. [2003] fan una dura crítica a la taxonomia basada en seqüències d'ADN. Entre d'altres coses argumenten que això encara pot agreujar molt més la discriminació dels taxònoms dels països pobres i que la utilització de seqüències d'ADN en taxonomia no està exempta de problemes, com es veurà en el següent apartat.

1.2 Caràcters morfològics i caràcters moleculars

Com s'acaba de veure, un punt important de discussió entre els sistemàtics és quins caràcters són els més adequats per classificar i estudiar l'evolució dels éssers vivents. Actualment hi ha dues tendències principals, la comparació de caràcters morfològics i la comparació de caràcters moleculars. També es pot tenir en compte la informació procedent d'altres fonts com per exemple l'ecologia, l'etologia o la biogeografia. Els caràcters morfològics van ser els primers que es van utilitzar per classificar els éssers vivents i estudiar les seves relacions filogenètiques ja que són els subjectes d'observació més immediata del que es vol classificar. En les comparacions morfològiques s'examinen les formes i les mides de diferents estructures dels organismes vius i fòssils així com els seus orígens ontogènics. En els vertebrats s'utilitzen generalment mesures del cos o de diferents parts de l'esquelet (p.e. el crani), característiques dentals o del tegument (p.e. esquames, pelatge). Una característica dels caràcters morfològics de gran utilitat és que es poden obtenir directament dels organismes fòssils convertint-se en proves directes de processos evolutius quan són comparats al llarg del temps geològic i amb els seus descendents actuals [Gauthier i al. 1988].

La sistemàtica molecular compara regions del genoma que són ortòlogues, és a dir, les que deriven de la mateixa seqüència ancestral a partir d'un procés d'especiació [Graur i Li 2000; Brown 2002]. La proximitat evolutiva entre els diferents organismes

20 - INTRODUCCIÓ

estudiats es mesura mitjançant el grau de diferenciació entre les regions ortòlogues analitzades i s'assumeix que l'arbre basat en el gen o la regió de l'ADN estudiada és representatiu de la filogènia dels organismes. Les filogènies moleculars sovint estan basades en segments d'ADN selectivament neutres els quals no estan involucrats en l'adaptació de l'espècie i, per tant, no estan influenciats per la selecció natural. En aquestes regions de l'ADN s'assumeix que l'acumulació de les mutacions és constant en el temps, la qual cosa és molt útil per datar quan es van separar els diferents llinatges. D'aquí ha sortit la idea que aquestes regions funcionen com un "rellotge molecular" [Zuckerlandl i Pauling 1965]. Molts gens són homòlegs fins i tot entre taxons molt divergents i la taxa d'evolució varia àmpliament entre els diferents gens i entre les regions no codificants, cosa que permet estudiar les relacions filogenètiques entre els organismes a diferents escales temporals, des del que avui són diferents individus o poblacions d'una mateixa espècie fins a llinatges que van divergir fa centenars de milions d'anys [Crozier 1997]. La utilització de dades moleculars presenta altres característiques interessants. La variació molecular es basa únicament en el genotip i per tant és heretable. Els caràcters moleculars no són ambigus – A, G, C, T són fàcilment reconeixibles mitjançant tècniques de seqüenciació – ; són fàcils de quantificar i d'analitzar estadísticament; la detecció d'homologies és relativament fàcil i són molt abundants [Graur i Li 2000].

Hi ha hagut intensos debats entre els experts sobre quins d'aquests caràcters són els més adequats per la sistemàtica o per inferir filogènies [Patterson i al. 1993]. Alguns autors consideren que els caràcters moleculars són poc convinents [p.e. Kluge 1983] mentre que d'altres pensen que els morfològics són enganyosos i poc informatius [p.e. Sibley i Ahlquist 1987; Lamboy 1994]. Molts dels conflictes entre la sistemàtica molecular i la taxonomia clàssica o morfològica sovint són fruit de l'evolució morfològica convergent dels organismes durant els processos de radiació produint fenotips semblants en llinatges no relacionats filogenèticament [Schluter 2000]. La semblança morfològica entre espècies críptiques sovint en complica la seva discriminació mitjançant els caràcters morfològics mentre que utilitzant dades moleculars es poden arribar a distingir clarament [Mayer i von Helversen 2001]. La convergència morfològica fins i tot es pot presentar a nivells taxonòmics superiors, per exemple en gèneres i subfamílies, com és el cas de la subfamília "Melinae" (els teixons) dins dels mustèlids (vegeu l'apartat 3.2). Altres inconvenients que presenten els caràcters morfològics són els següents: la variació pot estar influïda en major o menor

grau per l'ambient ja que es mesuren caràcters fenotípics; a vegades s'utilitzen caràcters difícilment quantificables que poden tenir un cert grau de subjectivitat i d'ambigüitat; sovint no evolucionen d'una manera regular [Graur i Li 2000; Brown 2002]. Un obstacle molt difícil de superar per la sistemàtica basada en morfologia és la complicació que representa realitzar comparacions entre taxons que van divergir molt enrera en el temps – fins i tot dins dels vertebrats – a causa de les poques homologies que presenten [Crozier 1997].

Malgrat que els caràcters moleculars tenen avantatges respecte els morfològics seria erroni considerar-los la “Pedra Rosetta” de la sistemàtica ja que també presenten problemes [Brower i al. 1996]. Per exemple, les filogènies de gens no sempre coincideixen amb les de les espècies. Encara que la regió escollida sigui veritablement ortòloga – i no sigui fruit, per exemple, d'una duplicació gènica (paràloga) – els arbres de gens i la filogènia real dels organismes poden ser diferents a causa de classificacions de llinatges incomplertes, retenció de polimorfismes ancestrals, flux gènic (entre poblacions) i hibridació (entre espècies) [Moritz i Hillis 1996]. Segons Hewitt [2001], un o dos loci independents poden ser suficients per obtenir resultats fiables a nivells taxonòmics superiors al d'espècie mentre que a nivell intraespecífic n'aconsella la utilització d'un nombre major. Anteriorment, Wiens [1999] ja havia proposat també utilitzar diferents loci que no estiguin lligats i, sinó, mostrejar més d'un individu per espècie. Les taxes de mutació no sempre són constants entre diferents grups d'organismes o al llarg del temps, la qual cosa dificulta l'aplicació dels rellotges moleculars en aquests casos [Strauss 1999]. A més a més, el temps de divergència dels gens no té perquè coincidir amb el temps de divergència de les poblacions o de les espècies. Encara que la divergència dels gens generalment coincideix amb la dels taxons quan el temps de divergència entre unitats taxonòmiques és gran, les incongruències apareixen quan es volen datar esdeveniments recents, com per exemple les diversificacions ocorregudes durant el Plistocè [Knowles i Maddison 2002]. Per tant, per datar correctament aquests esdeveniments és important comparar les datacions obtingudes a partir de diferents loci i veure també si són consistents amb les obtingudes a partir d'altres fonts (p.e. paleontologia, paleogeografia, morfologia). Vist tot això, seria un error prescindir totalment de la informació procedent dels mètodes tradicionals com la morfologia, l'anatomia, la fisiologia o la paleontologia, ja que la informació obtinguda a partir de les diferents fonts pot complementar les llacunes que presenten cada una d'elles per separat.

22 - INTRODUCCIÓ

Cal tenir en compte que la taxonomia basada en caràcters morfològics encara és la pedra angular sobre la qual s'han ordenat les diverses categories d'organismes [Petitpierre 1985]. A més a més, el desenvolupament de la sistemàtica molecular tampoc ha suposat una àmplia refutació de les hipòtesis generades pels morfòlegs, tot i que els resultats obtinguts mitjançant tècniques moleculars poden ser rellevants en situacions en què la variació morfològica és limitada o la homologia dels caràcters morfològics és poc clara [Moritz i Hillis 1996]. La informació paleontològica és de gran utilitat per calibrar els rellotges moleculars [Graur i Li 2000]. Igualment, les filogènies moleculars poden completar les discontinuïtats filogenètiques que sovint presenten les filogènies basades en fòssils ja que el registre fòssil és incomplet en molts grups d'organismes [Hewitt 2001]. Els caràcters moleculars també poden ser molt útils per mapar l'evolució de caràcters morfològics, comportamentals i ecològics [Kambysellis i Craddock 1997; Wells i Henry 1998]. Així, segons Hewitt [2001], en un futur proper podria ser possible produir arbres basats en gens per caràcters crítics en els processos d'especiació. Moritz i Hillis [1996] opinen que els estudis que incorporin dades morfològiques i moleculars proporcionaran millors descripcions i interpretacions de la diversitat biològica que els que estiguin basats en una sola font d'informació, encara que també reconeixen que alguns problemes sistemàtics es poden resoldre millor mitjançant dades morfològiques i d'altres mitjançant dades moleculars. Vrana i al. [1994] i Flynn i Nedbal [1998], per exemple, han analitzat conjuntament la variació morfològica i molecular per estudiar les relacions filogenètiques dels taxons inclosos dins de l'ordre "Carnivora". En canvi, altres autors com per exemple Miyamoto i Fitch [1995] opinen que els grups de dades individuals sempre haurien de ser analitzats separadament. Cal tenir en compte que diferents grups de dades poden estar evolucionant en resposta a diferents processos i en aquest cas una anàlisi combinada podria ser menys informativa i més errònia que una o més anàlisis individuals.

Recentment s'han realitzat estudis filogenètics analitzant conjuntament arbres obtinguts a partir de l'anàlisi separada de diferents caràcters (morfològics o moleculars). Els arbres consens obtinguts s'anomenen *supertrees*. S'han descrit diferents mètodes per construir aquests "super-arbres": el MRP (*Matrix Representation with Parsimony*) [Baum 1992; Ragan 1992]; el mètode de Lanyon [Lanyon 1993]; l'algoritme MinCut [Semple i Steel 2000]; i els *semi-strict supertrees* [Goloboff i Pol 2002]. Malgrat el seu potencial, aquests mètodes són criticats perquè generalment els agrupaments obtinguts no solen ser representatius de la filogènia real quan els arbres originals presenten

conflictes entre ells. D'altra banda, el resultat final no representa una hipòtesi filogenètica ja que és un arbre consens i, per tant, els agrupaments creats difícilment són representatius dels diferents caràcters utilitzats. Això suposa un altre inconvenient ja que intentar mapar caràcters en un "super-arbre" és un objectiu molt difícil d'aconseguir [Goloboff i Pol 2002].

1.3 El paper de la variació intraespecífica

Els polimorfismes poden tenir un impacte significatiu en les anàlisis filogenètiques i tenen un gran valor a l'hora de delimitar espècies i en l'estudi de l'evolució dels caràcters [Wiens 1999]. Però malgrat tenir un paper tan important en els estudis microevolutius i de processos d'especiació, la variació intraespecífica no s'ha tingut gaire en compte pels que estudien processos macroevolutius fins fa relativament poc temps. La sistemàtica morfològica s'ha centrat majoritàriament en els caràcters discrets o fins i tot qualitius a l'hora de reconstruir filogènies entre espècies, i sovint ha exclòs aquells que presenten variació intraespecífica o que són quantitius, els valors dels quals sovint es solapen entre diferents espècies [Poe i Wiens 2000]. La sistemàtica molecular tampoc n'ha sigut una excepció representant, en molts casos, les diferents espècies dins d'una filogènia mitjançant una o molt poques seqüències [p.e. Masuda i Yoshida 1994; Ledge i Arnason 1996; Koepfli i Wayne 1998]. En sistemàtica molecular, els polimorfismes tenen fins i tot una major rellevança ja que poden donar lloc a conclusions errònies en filogènies d'espècies que tenen grans mides poblacionals o que tenen temps de divergència recents. En aquests casos les diferents espècies poden retenir, per exemple, polimorfismes ancestrals.

A part de classificar i de reconstruir la filogènia d'espècies diferents, un altre dels objectius dels sistemàtics és definir els límits de cadascuna d'elles cosa que no sempre és fàcil i aquí, tal com s'ha dit al principi d'aquest apartat, l'anàlisi de la variació intraespecífica hi té un paper molt important. Actualment es segueixen dues estratègies principals, una basada en caràcters diagnòstic i l'altra basada en topologies d'arbres filogenètics d'haplotips, individus o poblacions [Wiens 1999]. En el primer cas sovint s'han descrit les espècies mitjançant caràcters invariants a nivell intraespecífic i no solapants a nivell interespecífic els quals permeten assumir l'absència de flux gènic. No obstant, aquest criteri no té en compte que en moltes espècies que s'han separat massa recentment possiblement encara no s'han fixat caràcters diagnòstic, els quals es podrien considerar erròniament poblacions que encara mantenen un cert grau de flux gènic.

24 - INTRODUCCIÓ

D'altra banda els caràcters diagnòstic fixats generalment estan determinats a partir d'un número limitat d'individus molt inferior al necessari per descartar estadísticament que puguin ser polimòrfics, la qual cosa significa que aquest criteri s'ha de prendre amb una certa prudència. Per detectar un polimorfisme amb una freqüència de l'1% en un caràcter potencialment fixat amb una probabilitat d'un 95% cal una mostra igual o superior a 150 individus [Swofford i Berlocher 1987; Rannala 1995]. Una alternativa als caràcters fixats pot ser la utilització de diferències de freqüències ja que si entre dues espècies es detecten freqüències molt diferents entre les variants dels caràcters pot significar que entre elles el flux gènic és escàs o absent. El problema que es planteja en aquest cas és triar quin o quins valors de freqüències són els adequats per definir el límit. Alguns autors han proposat diferents solucions: comparar les distàncies genètiques, les quals incorporen diferències de freqüència, de casos dubtosos amb les d'espècies ben definides [Highton 1998]; comparar la relació entre distàncies genètiques i geogràfiques [De Queiroz i Good 1997]; o utilitzar estimadors de flux gènic entre poblacions (p.e. l'estadístic F_{ST}) proporcionats per la genètica de poblacions [Porter 1990].

La delimitació d'espècies basada en la topologia d'arbres filogenètics no presenta problemes quan els individus que pertanyen a dues espècies potencials queden clarament separats en grups diferents. El problema apareix quan determinats individus d'una espècie establerta a priori no s'agrupen dins del mateix grup. Hibridació, classificació de llinatges incompleta, presència d'espècies críptiques o mostreig insuficient són possibles explicacions d'aquest resultat. Un altre problema que presenta aquest mètode és quin criteri s'ha de seguir a l'hora de decidir quins llinatges són espècies i quins són simplement clades intraespecífics. Un criteri que s'ha suggerit és utilitzar múltiples gens no lligats i considerar espècies aquells grups que siguin congruents en els diferents arbres de gens, doncs s'assumeix que dins d'una mateixa espècie els arbres de gens no són congruents a causa del flux gènic i a la manca de resolució dels llinatges de gens [Avice i Ball 1990]. El problema que hi ha és que no es sap quants gens s'han d'analitzar per descartar la possibilitat de trobar resultats incongruents. Un altre criteri s'ha proposat a partir de l'assumpció de què les filogènies d'haplotips entre espècies han de ser concordants amb la geografia mentre que les intraespecífiques mostren discordança amb la geografia (p.e. els individus d'una mateixa localitat o població poden no agrupar-se junts suggerint que hi ha flux gènic entre poblacions) [Slatkin i Maddison 1989].

Una altra vessant de gran rellevança de l'estudi de la variació intraespecífica el representa la filogeografia, disciplina que es va començar a definir a finals dels anys 80 [Avice i al.1987]. La filogeografia integra metodologies i coneixements procedents de la genètica molecular, la genètica de poblacions, la demografia, l'etologia, la filogènia, la paleontologia i la geografia històrica i ha estat proposada com el pont que uneix les perspectives micro- i macroevolutives [Avice 1998; Kuchta i Meyer 2001]. La filogeografia es diferencia de la genètica de poblacions clàssica perquè està centrada explícitament en la història, i sobretot en el passat biogeogràfic, d'una espècie. Concretament s'encarrega de l'estudi dels processos històrics involucrats en la distribució geogràfica dels llinatges de gens i, com a subordinada de la biogeografia, es centra en les relacions intraespecífiques o entre espècies filogenèticament molt properes [Avice i al.1987; Knowles i Maddison 2002]. Cal dir també que les filogeografies poden ser de gran utilitat per obtenir una taxonomia més objectiva a nivell intraespecífic.

Inicialment la majoria dels estudis filogeogràfics estaven centrats en la detecció de patrons significatius d'estructura genètica poblacional, mentre que en els darrers anys s'intenten desenvolupar eines estadístiques més potents per inferir la història i els processos subjacents a aquesta estructura i oferir-ne explicacions objectives [Knowles i Maddison 2002]. Avice [1998] suggeria que la filogeografia en un futur proper s'havia de centrar en tres punts principals: la concordança entre genealogies obtingudes a partir de múltiples loci no lligats dins d'una mateixa espècie; la concordança entre la localització geogràfica de les particions obtingudes en els arbres de gens entre múltiples espècies codistribuïdes; i la concordança entre les particions dels arbres de gens i els límits de les províncies biogeogràfiques tradicionalment reconegudes. A partir de la informació genealògica i geogràfica obtinguda es poden arribar a inferir els processos demogràfics i històrics que han determinat l'evolució dels llinatges dins d'una mateixa espècie [Kuchta i Meyer 2001]. No obstant, Knowles i Maddison [2002] creuen que la història d'una espècie no pot ser fàcilment inferida només a partir de genealogies de gens a causa dels múltiples esdeveniments que poden haver ocorregut en el passat (p.e. expansions demogràfiques, colls d'ampolla, vicariances, migracions, extincions de llinatges). Fins ara diferents testos estadístics s'han utilitzat tant per testar la significança d'estructures poblacionals [p.e. l'Anàlisi de la Variança Molecular, AMOVA, Excoffier i al. 1992], com hipòtesis específiques sobre aspectes biogeogràfics i demogràfics de les poblacions ancestrals [p.e. l'Anàlisi de *Pairwise Differences*, Rogers i Harpending 1992]. Els models de genètica de poblacions apareguts recentment

i basats en la teoria de la coalescència proporcionen eines estadístiques complementàries per estimar paràmetres demogràfics com per exemple mides poblacionals efectives, taxes de migració, temps de divergència i fluctuacions demogràfiques; i permeten realitzar contrastos d'hipòtesi [p.e. Kuhner i al. 1998; Beerli i Felsenstein 1999]. El principal problema que presenten aquests mètodes, però, és que generalment assumeixen històries poblacionals molt simples a l'hora d'estimar els paràmetres [Knowles i Maddison 2002]. Segons aquests darrers autors hi ha tres àrees que actualment són vitals pel desenvolupament de la filogeografia: la parametrització dels models; trobar estratègies de cerca a través d'una gran multitud d'històries alternatives; i definir criteris per jutjar quina o quines d'aquestes històries expliquen les dades adequadament. La idea és trobar un mètode que sigui capaç d'analitzar la gran multitud de processos i històries que poden estar involucrats en el passat i present d'una espècie i a la vegada que pugui testar estadísticament les diferents hipòtesis generades. En altres paraules, que la filogeografia integri eines estadístiques que permetin la generació de models evolutius explícits que incloguin geografia i història i, a més a més, es puguin contrastar les hipòtesis.

Com s'ha dit abans, mitjançant la filogeografia comparativa, és a dir, comparant patrons filogeogràfics de diferents espècies codistribuïdes que presentin llinatges distribuïts geogràficament de forma concordant, es poden descobrir els factors històrics comuns o divergents que han influït en la seva evolució, així com l'efecte que tenen determinades barreres geogràfiques sobre el flux gènic entre les seves poblacions [Bermingham i Avise 1986; Joseph i al. 1995]. Uns exemples clàssics de filogeografia integrativa són la gran multitud d'estudis que s'han realitzat sobre els processos de recolonització postglacial en espècies animals i vegetals distribuïdes a Europa i que han estat sintetitzats en els treballs de Taberlet i al. [1998] i de Hewitt [1999]. Comparant els diferents casos, aquests autors han proposat l'existència de quatre refugis glacials a Europa (les penínsules Ibèrica, Itàlica i Balcànica i un de més oriental localitzat entre les mars Negra i Càspia). No obstant, les diferents espècies presenten diferents patrons de colonització depenent dels efectes que hagin provocat sobre elles les diferents barreres geogràfiques (p.e. els Pirineus o els Alps) i les glaciacions. Sembla ser, però, que els models proposats per aquests autors són una simplificació de la realitat, doncs estudis més recents suggereixen l'existència de refugis glacials críptics localitzats a latituds més septentrionals com per exemple a l'Europa Central o fins i tot a les illes Britàniques o la península Escandinava [Stewart i Lister 2001]. Encara que molts

estudis filogeogràfics del Vell Món s'han centrat a Europa, en els darrers anys hi ha un interès creixent a estudiar espècies de distribució euroasiàtica [Mahmut i al. 2002; Ludt i al. en premsa].

1.4 La sistemàtica molecular i la conservació de la fauna

Els estudis filogenètics tenen aplicacions importants en la gestió i la conservació de les espècies. El reconeixement de categories sistemàtiques (subespècies, espècies, gèneres, famílies, etc.) aporta les bases legals per la conservació [O'Brien 1994]. En més d'una ocasió s'han descobert errors greus en la gestió d'espècies en perill d'extinció deguts a la descripció de més (*over-splitting*) o menys (*over-lumping*) espècies de les que realment hi havia en determinats grups mitjançant filogènies fetes amb caràcters moleculars [Avise i Nelson 1989; Daugherty i al. 1990; Geist 1992]. D'altra banda, la manca de recursos econòmics per subvencionar programes de conservació per totes les espècies que estan en perill d'extinció fa necessari establir prioritats en funció, per exemple, de la distinció taxonòmica o de la profunditat de la divergència filogenètica d'una espècie amenaçada en relació amb d'altres [May 1990]. Els taxons més divergents presenten una marcada distinció filogenètica i característiques que poden ser úniques o molt escasses, trets que es tenen en compte a l'hora de valorar les seves potencials utilitats econòmiques i/o ecològiques [Crozier 1997]. Segons el criteri de divergència filogenètica, dins dels mamífers per exemple s'hauria de prioritzar la conservació d'espècies com el panda vermell, *Ailurus fulgens*, el qual no té espècies emparentades en l'actualitat i el seu llinatge va divergir dels prociònids fa uns 30 milions d'anys (Ma), en detriment d'altres com la pantera de les neus, *Panthera uncia*, que forma part d'un gènere polifilètic que va divergir fa uns dos milions d'anys [O'Brien 1994]. La realitat, però, no és tant simple ja que hi ha autors que creuen que els grups que han especiat més recentment i de forma ràpida haurien de tenir una major prioritat de cara a la conservació respecte als taxons filogenèticament aïllats, doncs en el primer cas la biodiversitat es pot recuperar més ràpidament després d'un episodi d'extinció [Erwin 1991].

També és necessari disposar de filogènies ben resoltes en grups que contenen nombroses espècies en perill d'extinció per saber la quantitat d'història evolutiva o de diversitat filogenètica que es pot perdre com a conseqüència de la desaparició de totes o d'una part de les espècies amenaçades que hi estan incloses (vegeu Figura 1.1). S'han proposat diferents maneres de quantificar-ho; mitjançant arbres, comptant el nombre de

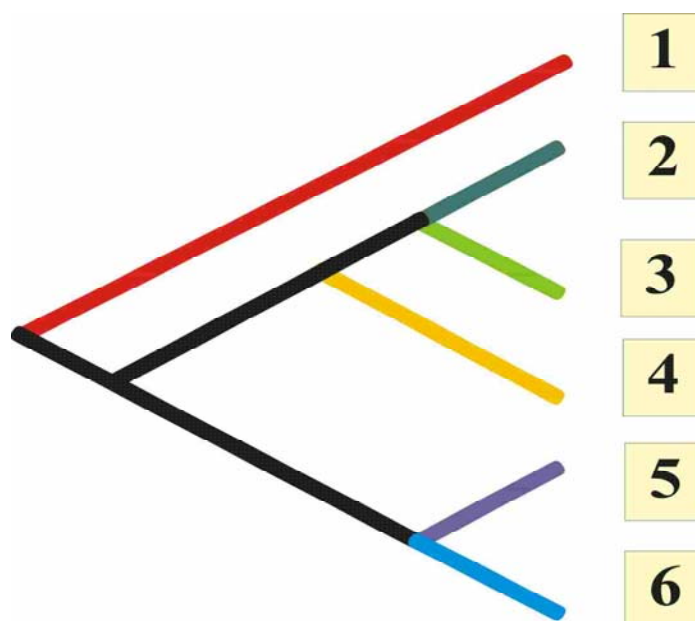


Figura 1.1: La quantitat d'història evolutiva que es pot perdre en un grup taxonòmic depèn de quina o quines espècies s'extingeixen. En l'exemple, si desapareix l'espècie 1, única representant del seu llinatge, es perdrà molta més història evolutiva que si desapareix qualsevol de les altres. L'extinció de les espècies 5 i 6 també suposaria una major pèrdua que si desapareguessin dues de les espècies que formen el grup 2, 3, 4. Dins d'aquest darrer grup seria prioritària la conservació de l'espècie 4 juntament amb la 2 o la 3.

nodes entre les espècies amenaçades i les que no ho estan o sumant la longitud de les branques que les representen; o mitjançant distàncies genètiques o número de diferències nucleotídiques [Crozer 1997]. En el cas de grups altament divergents s'aconsella utilitzar les longituds de les branques ja que estan estimades més robustament. Dins dels mamífers s'ha proposat que la pèrdua de diversitat filogenètica lligada a la desaparició de totes les espècies que actualment estan amenaçades equivaldria a la d'un filum monotípic [Purvis i al. 2000]. Això és així perquè hi ha ordres (p.e. Proboscidea, Sirenia), famílies (p.e. Rhinocerotidae, Daubentoniidae) o gèneres (p.e. *Pan*, *Pongo*, *Gorilla*, *Pteronura*, *Trichechus*, i un llarg etcètera) que l'única o les poques espècies que contenen estan greument amenaçades d'extinció. La diversitat filogenètica és un factor que també es comença a tenir en compte a l'hora de dissenyar reserves naturals [Pérez-Losada i Crandall 2003]. Mitjançant la informació obtinguda a partir de la filogenia es poden identificar àrees que tinguin un futur potencial evolutiu o que continguin un nombre important de taxons antics i monofilètics. D'altra banda, també s'ha demostrat el gran potencial que tenen les filogenies moleculars a l'hora de detectar comerç il·legal de derivats d'espècies en perill d'extinció, els quals en molts casos no es poden identificar mitjançant caràcters morfològics. Uns exemples clàssics d'això són els treballs realitzats per Baker i Palumbi

[1994] i Baker i al. [2000] en els que es va detectar comerç il·legal d'espècies de cetacis protegides en els mercats del Japó i de Corea del Sud.

L'espècie és el nivell taxonòmic bàsic en l'estudi de la diversitat biològica, de l'evolució i en la planificació de molts programes de conservació, per tant, és molt important definir-ne els límits. Malauradament, aquest objectiu a vegades és difícil de portar a la pràctica per la manca d'una definició universal per aquesta categoria taxonòmica. Les espècies s'han definit a partir de diferents conceptes (vegeu Taula 1.1) i cadascun d'ells ha rebut una multitud de crítiques a favor i en contra. Afortunadament els diferents conceptes comparteixen criteris comuns que permeten delimitar les espècies en molts casos: aïllament genètic, o absència de cohesió (barreres intrínseques que limitin l'intercanvi de gens); manca d'intercanvi a nivell demogràfic (aïllament ecològic); presència de caràcters diferencials fixats; exclusivitat; identitat i tendències evolutives independents; agrupaments genotípics diferenciables [De Queiroz 1998]. Segons Harrison [1998] la història natural de les espècies depèn dels esdeveniments geològics i geogràfics ocorreguts durant l'especiació, dels esdeveniments demogràfics ocorreguts durant i després de les divisions poblacionals, de l'impacte de la selecció natural, de l'ecologia i de la força dels mecanismes de cohesió. Així, al llarg de la història natural d'una espècie, determinats conceptes i criteris seran aplicables en funció de l'estadi del procés d'especiació en què es trobi (vegeu Figura 1.2) [De Queiroz 1998; Harrison 1998]. Mitjançant les eines proporcionades per la filogenia molecular i les filogeografies es pot determinar la quantitat de flux genètic que hi ha entre diferents grups d'individus i el seu parentesc evolutiu; característiques que formen part de quatre conceptes d'espècie diferents, el biològic, l'evolutiu, el filogenètic i el cohesiu. Aquestes dades són necessàries per complementar i comprovar la informació obtinguda a partir de la morfologia i poden ser molt útils per estudiar els processos d'especiació, dos punts importants per millorar la taxonomia en aquesta categoria.

Freqüentment les espècies també es divideixen en segments, la divergència dels quals es pot mesurar o avaluar. En aquest punt la filogeografia és aplicable a la conservació, doncs es poden identificar poblacions evolutivament diferenciades com a conseqüència de l'aïllament genètic persistent durant un període de temps relativament llarg. El concepte d'Unitats Evolutivament Significatives (ESUs) ha estat desenvolupat per proporcionar un mètode objectiu per prioritzar la conservació d'unitats sota el nivell taxonòmic d'espècie [Ryder 1986]. Aquest terme és present a l'Acta d'Espècies

Taula 1.1: Diferents conceptes i definicions d'espècie.

CONCEPTE	AUTORS	DEFINICIÓ
Evolutiu	Simpson [1961]; Wiley [1978]	Entitat d'organismes que manté la seva identitat respecte altres llinatges i que té la seva pròpia història i tendències evolutives.
Filogenètic	Cracraft [1983]	Mínim grup d'organismes, dins del qual hi ha un model d'ancestre i descendent, que és diagnosticablement diferent d'altres grups semblants.
Cohesiú	Templeton [1989]	Major grup possible d'organismes que tenen potencial per intercanviar gens i individus.
Biològic	Mayr i Ashlock [1991]	Grup de poblacions naturals que s'encreuen i que estan reproductivament aïllades d'altres grups de poblacions.
Genealògic	Baum i Shaw [1995]	Grup d'organismes exclusiu on tots els seus membres estan més properament relacionats entre ells que amb qualsevol organisme de fora del grup.
Llinatge general	De Queiroz [1998]	Llinatges evolutius que mantenen la seva integritat respecte altres llinatges en l'espai i en el temps.

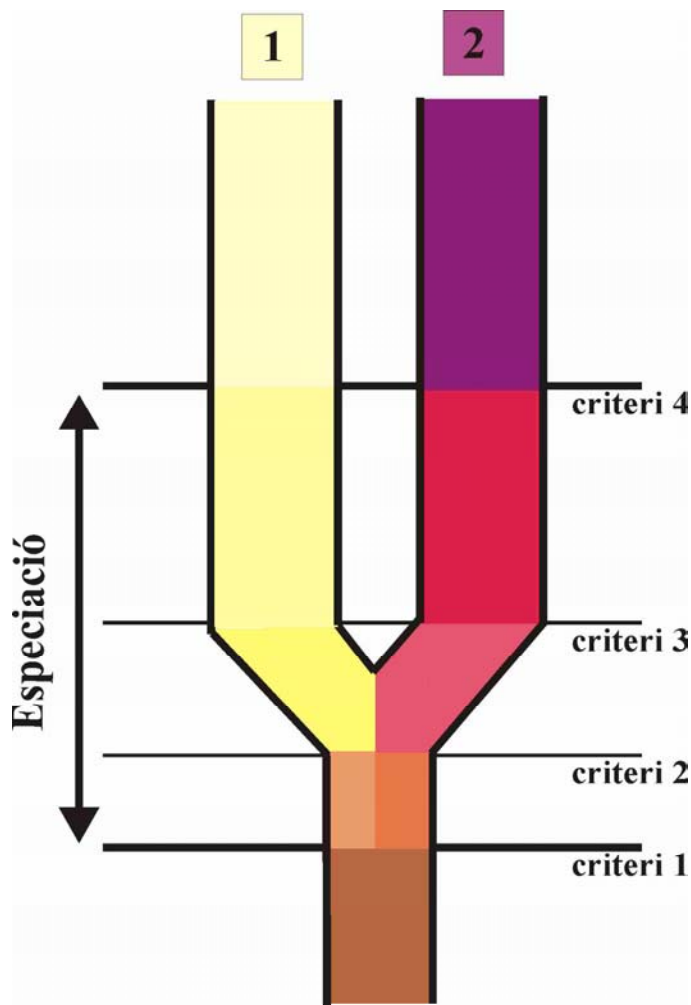


Figura 1.2: Els diferents criteris a partir dels quals es defineixen les espècies poden ser vàlids en funció del punt on es trobin dos llinatges divergents al llarg del seu procés d'especiació. En funció del criteri escollit es pot arribar a conclusions diferents sobre el nombre d'espècies.

Amenaçades dels Estats Units [Waples 1995], l'Acta de Protecció d'Espècies Amenaçades d'Austràlia [Moritz 1994] i en legislacions d'altres països, encara que no hi ha un consens a l'hora de definir-lo (vegeu Taula 1.2) [Fraser i Bernatchez 2001]. Hi ha discrepàncies, per exemple, sobre el paper que han de jugar els marcadors genètics neutres respecte a altres criteris (com per exemple l'ecològic) en el moment de realitzar un programa de conservació [Moritz 1994; Crandall i al. 2000]. A Fraser i Bernatchez [2001] es revisen totes les definicions d'Unitats Evolutivament Significatives i es proposa la Conservació d'Adaptacions Evolutives (AEC), que seria una visió integrativa de les diferents definicions d'Unitats Evolutivament Significatives on les unitats a conservar es seleccionarien d'acord amb les característiques de cada cas particular amb l'objectiu de preservar la variabilitat genètica i el potencial evolutiu d'una espècie concreta. En aquest cas es tracta d'identificar llinatges que presentin un flux genètic altament restringit respecte als altres llinatges dins d'una mateixa espècie. També puntualitzen que a la pràctica els criteris per definir les Unitats Evolutivament Significatives s'haurien de basar en la combinació de dades ecològiques i moleculars.

Taula 1.2: Diferents definicions d' "Unitats Evolutivament Significatives (ESUs)" des de Ryder [1986].

<i>AUTOR</i>	<i>DEFINICIÓ</i>
Ryder [1986]	Subgrups dins d'una espècie que a nivell genètic tenen atributs importants pel present i futur de tota l'espècie.
Waples [1991]	Una població o un grup de poblacions que estan substancialment aïllades reproductivament d'altres grups conespecífics i que representen un component important de l'herència evolutiva de l'espècie.
Dizon i al. [1992]	Poblacions o grups de poblacions que mostren una divergència significativa en les freqüències al·lèliques.
Awise [1994]	Grups de poblacions derivades de filogènies de gens consistentment congruents.
Moritz [1994]	Poblacions que són recíprocament monofilètiques segons els marcadors mitocondrials i que mostren una divergència significativa de freqüències al·lèliques en els loci nuclears.
Vogler i DeSalle [1994]	Grups formats a partir de caràcters que agrupen individus o poblacions i que els separen d'altres grups.
Crandall i al. [2000]	Poblacions amb nivells variables de flux genètic que evolucionen mitjançant deriva i selecció.
Fraser i Bernatchez [2001]	Un llinatge que presenta un flux genètic molt restringit amb els altres llinatges que formen part de la mateixa espècie.

2. ELS MARCADORS GENÈTICS

2.1 Genoma mitocondrial i genoma nuclear

El genoma mitocondrial de la majoria de vertebrats és una molècula d'ADN circular d'entre 16.000 i 18.000 parells de bases [Cantatore i Saccone 1987]. Malgrat la seva minúscula mida en comparació amb el genoma nuclear, ha estat i és encara ara un marcador genètic àmpliament utilitzat en treballs de filogènia molecular interespecífica i en filogeografia [Awise 1994; Hewitt 2001]. La taxa de divergència d'algunes regions de l'ADN mitocondrial és suficientment ràpida com per mostrar diferències entre les poblacions d'una mateixa espècie, mentre que en d'altres és suficientment lenta com per no saturar-se de mutacions recurrents en espècies que van divergir fa unes quantes desenes de milions d'anys [Hewitt 2001]. L'herència monoparental (materna), l'haploidia, l'absència de recombinació, l'ordre dels seus gens relativament conservat i la presència de poques insercions, delecions i duplicacions són característiques que fan el seu ús molt pràctic [Pasbøll i Arctander 1998]. D'altra banda, degut a la seva herència monoparental, el genoma mitocondrial té una mida poblacional efectiva menor que el genoma nuclear, cosa que es tradueix en un temps de coalescència esperat més curt en els gens mitocondrials respecte els nuclears. Així, el genoma mitocondrial pot representar millor que el nuclear la filogènia real d'espècies filogenèticament properes [Moore 1995]. Aquest autor també opina que per arribar al mateix poder de resolució d'un sol gen mitocondrial caldria seqüenciar varis gens nuclears, degut a que aquests tenen taxes de mutació més baixes que els mitocondrials, sobretot entre taxons filogenèticament molt propers. Però malgrat aquestes interessants característiques, l'ús dels marcadors mitocondrials ha estat criticat perquè tan sols representa una petita fracció dels centenars de milers de loci que formen el genoma d'un organisme i per tant podria no ser representatiu de la filogènia real d'un grup d'organismes [Hey 2000].

Les seqüències de regions del genoma nuclear han estat molt menys explotades fins fa poc a causa de les complicacions tècniques i biològiques (p.e. diploidia, recombinació) que són conseqüència de la seva herència biparental [Awise 1998]. La presència de recombinació suposa que els haplotips tenen més d'un ancestre immediat, la qual cosa significa que els diferents segments que formen part d'un mateix haplotip tindran històries independents. En aquests casos es poden obtenir reconstruccions filogenètiques errònies a causa de la introducció d'homoplàsia [Schierup i Hein 2000]. Com que les taxes de substitució dins del genoma nuclear poden variar entre diferents loci o regions a causa de processos local-depenents [Matassi i al. 1999], treballar amb

34- INTRODUCCIÓ

un sol locus nuclear pot introduir biaixos, que han de ser corregits mitjançant la seqüenciació de múltiples loci [Cummings i al. 1995]. D'altra banda, per reconèixer la fase (acoblament o repulsió) de les variants que hi ha en les múltiples posicions heterozigotes que poden aparèixer a la seqüència d'una regió nuclear és necessari que els haplotips siguin netament separats. Només així podran ser utilitzades correctament en estudis filogenètics. No obstant, des de l'última dècada les seqüències de gens nuclears s'estan incorporant amb un notable èxit en els estudis sistemàtics, sobretot les d'introns ja que en principi no presenten constriccions funcionals i, per tant, presenten taxes de substitució majors que les d'exons [p.e. Slade i al. 1994; DeBry i Seshadri 2001]. En alguns casos s'han trobat exons que presenten un major poder de resolució que els gens mitocondrials quan s'han comparat els clades basals dins dels mamífers [p.e. Springer i al. 2001].

L'ús de marcadors nuclears en filogeografia presenta encara un obstacle addicional; fins ara s'han trobat poques seqüències nuclears que donin una bona resolució a nivell intraespecífic. Els microsatèl·lits són les regions nuclears que han estat més utilitzades en aquest nivell, però sovint els seus patrons mutacionals no es coneixen prou bé i això es tradueix en la manca d'una bona metodologia per la seva anàlisi [Jarne i Lagoda 1996; Schötterer 2000]. No obstant, algunes regions nuclears com el marcador nuclear anònim no-codificant del saltamartí, *Chorthippus parallelus* [Cooper i al. 1995]; la regió 3' codificant del gen homeòtic *Antennipedia-class* de la llagosta, *Schistocerca gregaria* [Hewitt 1998]; o el gen de la transferrina en truita comuna, *Salmo trutta*, i altres vertebrats [Antunes i al. 2002] han demostrat ser fins i tot tant divergents com la regió control de l'ADN mitocondrial. Els marcadors nuclears poden tenir un paper molt important en filogeografia ja que poden completar la informació proporcionada pel genoma mitocondrial, sobretot en aquells casos que presenten biaixos importants a nivell de gènere deguts a diferències d'eficàcia biològica o de patrons de dispersió, tal com s'explica més endavant a l'apartat 5.3. Segons Hare [2001], la filogeografia basada en marcadors nuclears ofereix l'oportunitat d'entendre d'una manera més complerta el mosaic de patrons genealògics que evolucionen en els genomes com a resposta a les històries i ambients que les poblacions han patit.

Dins del genoma nuclear la regió no-recombinant del cromosoma Y presenta unes característiques molt semblants a les del genoma mitocondrial, encara que en aquest cas la transmissió és per via paterna. Malgrat que aquest marcador s'utilitza freqüentment en estudis de genètica de poblacions humanes, encara no ha esdevingut

molt popular entre els qui estudien altres espècies de mamífers. Els estudis realitzats en humans han mostrat que presenta unes característiques força interessants aplicables a nivell intraespecífic: absència d'heteroplàsmia i de recombinació i presència d'una gran quantitat de polimorfismes informatius [Petit i al. 2002]. Possiblement en molts casos la mida poblacional efectiva del cromosoma Y és menor que la dels marcadors mitocondrials, ja que la selecció sexual és més forta en mascles que en femelles. Això pot fer el cromosoma Y més sensible que el genoma mitocondrial a l'hora de detectar esdeveniments demogràfics en el passat recent com, per exemple, colls d'ampolla, efectes fundadors o expansions poblacionals [Fay i Wu 1999]. Les dades obtingudes a partir del cromosoma Y comparades amb les obtingudes a partir de marcadors autosòmics i mitocondrials poden donar una visió més completa dels processos que hi ha darrera la història de les poblacions d'una espècie i també poden ajudar a descriure el sistema d'aparellament i a estudiar els patrons de dispersió de cada sexe.

En aquesta tesi s'han utilitzat un marcador del genoma mitocondrial, el gen citocrom *b*, i un altre del genoma nuclear, la regió flanquejant d'una regió repetitiva complexa, per estudiar les relacions filogenètiques a nivell interespecífic en els mustèlids. En els treballs de filogeografia, realitzats en el teixó i el macac japonès, s'ha utilitzat la regió control de l'ADN mitocondrial.

2.2 El gen citocrom *b*

El gen mitocondrial citocrom *b* codifica per una proteïna transmembranal que es localitza a la membrana interna de la mitocondria. El citocrom *b* és una de les proteïnes més ben conegudes de les 9 o 10 que formen el complex III del sistema de fosforilació oxidativa i és l'única d'aquestes que està codificada pel genoma mitocondrial [Hatefi 1985; Irwin i al. 1991]. El complex III transfereix electrons de la dihidroubiquinona al citocrom *c*, cosa que permet el pas de protons a través de la membrana mitocondrial interna [Hatefi 1985]. El citocrom *b* conté centres redox, Q_0 i Q_1 , relacionats amb la transferència dels electrons [Howell i Gilbert 1988]. La major part de la variació en aquesta proteïna està localitzada als segments transmembrana i als extrems amino i carboxil, mentre que la part situada a l'espai intermembrana, on hi ha el centre redox Q_0 , i la part situada a la matriu i propera al primer segment transmembrana, on hi ha Q_1 , són les parts més conservades [Irwin i al. 1991]. Aquest és el motiu que fa que la distribució de les posicions nucleotídiques variables al llarg del gen no sigui a l'atzar. A més a més, els canvis nucleotídics també depenen del canvi aminoacídic que puguin

36- INTRODUCCIÓ

provocar (sinònim o no sinònim). D'aquesta manera, les terceres posicions dels codons són les més variables, seguides de les primeres i de les segones posicions [Irwin i al. 1991].

El citocrom *b* presenta un bon poder de resolució quan es comparen espècies moderadament divergents [Pasnøll i Arctander 1998], encara que també pot ser informatiu a nivell intraespecífic [Kurose i al. 2001; Fleming i Cook 2002; Jaarola i Searle 2002; Stone i al. 2002]. D'altra banda, les transversions a les terceres posicions dels codons s'acumulen linealment al llarg del temps, la qual cosa permet estimar fàcilment els temps de divergència entre els diferents llinatges [Irwin i al. 1991].

2.3 Les regions flanquejants de regions repetitives nuclears

A meitats de la dècada dels 90 alguns treballs van demostrar que alguns loci microsatèl·lit homòlegs poden persistir durant uns 300 Ma en el cas de les tortugues [FitzSimmons i al. 1995] o fins i tot 470 Ma en el cas dels peixos [Rico i al. 1996], la qual cosa suggeria que les seves regions flanquejants estaven bastant conservades. L'aplicació de les regions flanquejants de microsatèl·lits en estudis filogenètics va ser explorada per primera vegada per estudiar les relacions filogenètiques dels principals llinatges de peixos de la família "Cichlidae" juntament amb altres famílies dins del subordre Labroidei [Zardoya i al. 1996]. Els resultats obtinguts van ser consistents amb altres treballs realitzats amb dades morfològiques i altres marcadors genètics mitocondrials i nuclears. Encara que des d'aleshores aquests marcadors genètics han estat poc utilitzats en estudis filogenètics, també s'han obtingut bons resultats en taurons [Martin i al. 2002] i rosegadors [Garza i Desmarais 2000; Makova i al. 2000]. Tots aquests treballs han reafirmat que les regions nuclears que flanquegen seqüències repetitives tenen un gran potencial que es pot explotar a l'hora de realitzar estudis filogenètics. A la filogènia de la família "Mustelidae" (vegeu el Capítol I de Resultats) s'han utilitzat les seqüències flanquejants d'una regió repetitiva nuclear complexa, el locus *Mel08*. Aquesta regió ha estat aïllada originalment en el teixó euroasiàtic i descrita per primera vegada pel nostre grup [Domingo-Roura 2002]. Malgrat que hem obtingut seqüències curtes, de tan sols 154 parells de bases, aquest marcador ha demostrat ser filogenèticament força informatiu (vegeu Figura 2.1). La part repetitiva d'aquest locus es caracteritza per la presència de diferents motius que poden ser simples, compostos, perfectes o imperfectes.

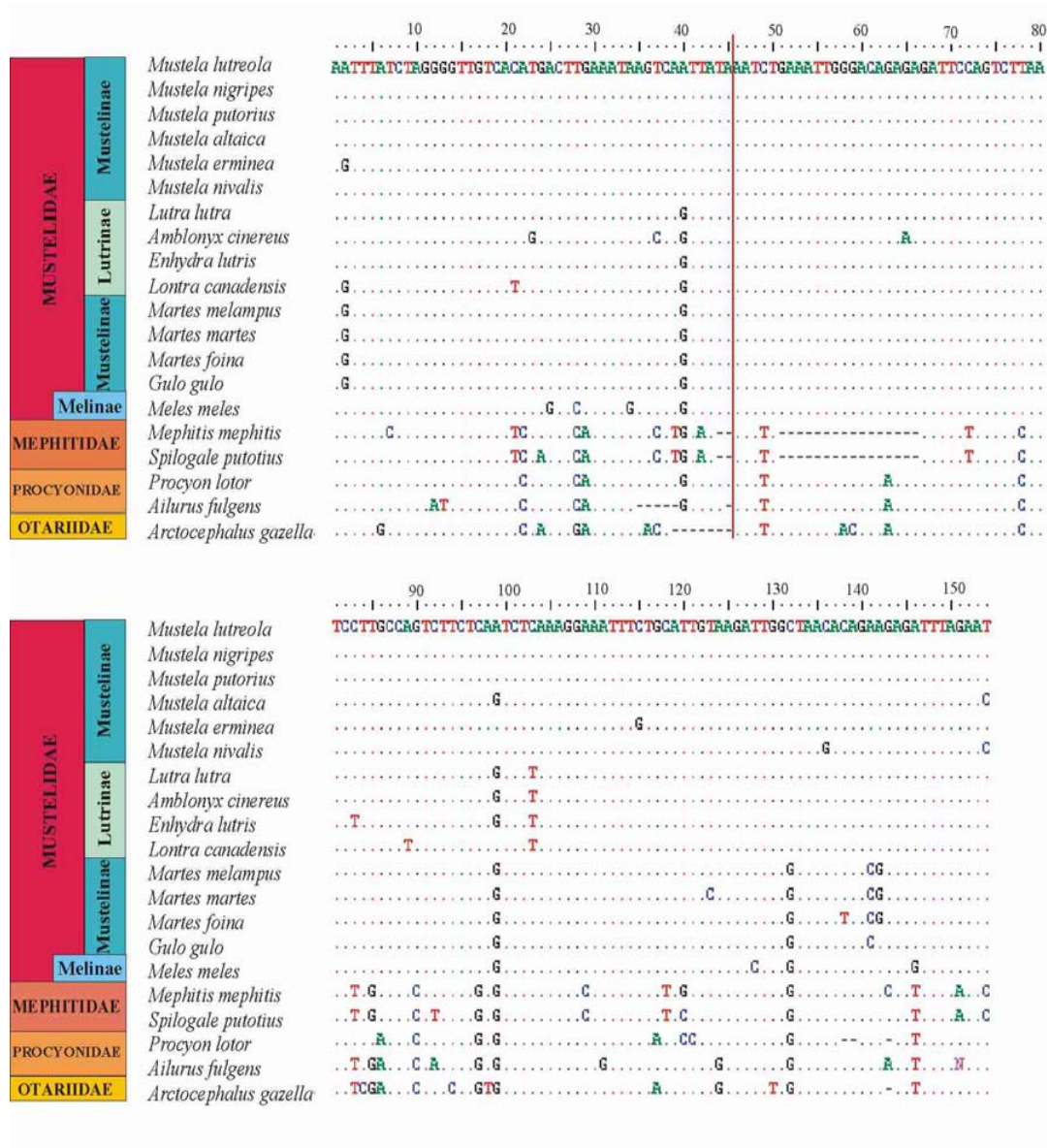


Figura 2.1: Alineament de les seqüències flanquejants de la regió repetitiva complexa *Mel08*. Hi estan representades diferents espècies de mustèlids, mefítids, prociònids i una d'otàrid. Els noms vulgars apareixen a la Taula 3.1. La línia vermella vertical indica la localització de les seqüències repetitives.

38- INTRODUCCIÓ

2.4 La regió control de l'ADN mitocondrial

La regió control és una part de l'ADN mitocondrial d'entre 880 i 1400 parells de bases (en mamífers) que està localitzada entre els gens que codifiquen pels ARNs de transferència de prolina (tRNA_{Pro}) i fenilalanina (tRNA_{Phe}) [Sbisà i al. 1997]. Conté els principals elements reguladors per la replicació i expressió del genoma mitocondrial i, malgrat la seva important funció, és la part d'aquest genoma que evoluciona més ràpidament [Saccone i al. 1993]. L'estructura de la regió control està força conservada dins dels mamífers, on es divideix en tres dominis ben diferenciats: el domini ETAS "seqüències exteses associades a terminació"; el domini central conservat; i el domini CSB "blocs de seqüències conservades" [Sbisà i al. 1997]. La major part dels polimorfismes es concentren als dominis ETAS i CSB, mentre que el domini central és menys variable.

El domini ETAS té entre 209 i 412 parells de bases en mamífers i està localitzat a la regió 5' adjacent al gen tRNA_{Pro}. Aquest domini conté dos blocs conservats d'uns 60 parells de bases que són les ETAS i algunes seqüències conservades de menor longitud (uns 15 pb) anomenades "seqüències associades a terminació (TAS)" [Doda i al. 1981; Sbisà i al. 1997]. Aquestes seqüències possiblement estan implicades en la regulació de la replicació i la transcripció [Sbisà i al. 1997]. L'espai entre ETAS1 i l'extrem 5' de la regió control i entre els dos blocs ETAS és variable depenent de l'organisme, la qual cosa suggereix que aquest domini és propens a patir insercions i delecions nucleotídiques. El domini central medeix entre 304 i 328 parells de bases en mamífers i és altament conservat, encara que la seva funció és desconeguda. El domini CSB conté entre 221 i 763 nucleòtids en mamífers i està localitzat a la regió 3' adjacent al gen tRNA_{Phe}. En aquest domini s'hi localitzen els principals elements reguladors del genoma mitocondrial com per exemple els promotors de transcripció de les cadenes pesada i lleugera, HSP i LSP respectivament, i l'origen de replicació de la cadena pesada. També hi apareixen freqüentment seqüències repetitives que sovint provoquen heteroplàsmia [Sbisà i al. 1997].

La regió control és un marcador genètic molt adequat en estudis de variació genètica intraespecífica i filogeografia gràcies a la seva elevada taxa de mutació [Pasbøll i Arctander 1998]. La Figura 2.2 mostra la localització dels fragments de la regió control que s'han analitzat en els treballs de variació intraespecífica realitzats en aquesta tesi i les Figures 2.3 i 2.4 mostren els alineaments de les seqüències de les espècies que han estat estudiades; el teixó, i els macacs japonès i rhesus.

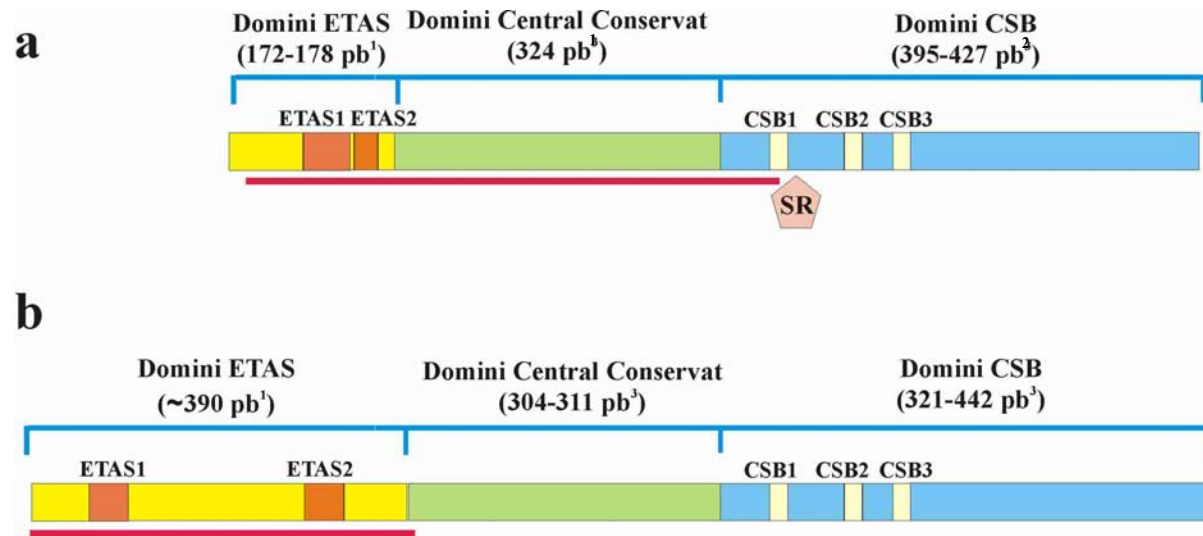


Figura 2.2: Representació esquemàtica i aproximada del mapa de la regió control de l'ADN mitocondrial del teixó, *Meles meles*, (a) i dels macacs japonès, *Macaca fuscata*, i rhesus, *Macaca mulatta* (b). La línia vermella sota l'esquema representa el fragment que s'ha seqüenciat en les filogeografies realitzades en aquestes espècies, en els Capítols II i IV de Resultats respectivament. Les longituds, en parells de bases (pb), de les diferents parts de la regió control han estat obtingudes a partir del mapatge dels fragments seqüenciats (¹), o estan basades en regions control d'altres espècies de carnívors (²), o de primats (³) d'acord amb Sbisà i al. [1997]. El símbol SR representa la localització d'una regió minisatèl·lit.

Figura 2.3 (pàgina següent): Localització de les posicions nucleotídiques polimòrfiques de la regió control del teixó a partir de l'alineament de seqüències d'individus procedents de diferents orígens geogràfics (T28, Catalunya; T1, Gran Bretanya; T43, Irlanda; T4, Alemanya; T165, Noruega; T2, Creta; T48, Israel; T231, Rússia (Urals); T188, Rússia central; T200, Rússia oriental; T44, Mongòlia; T31, Japó). Els rectangles de color que apareixen sobre l'alineament representen les diferents parts que divideixen la regió control tal com està esquematitzat a la Figura 2.2. Els asteriscs representen la localització de la regió minisatèl·lit la qual no ha estat seqüenciada en la seva totalitat. La part proximal al gen que codifica per l'ARN de fenilalanina va ser seqüenciada en 7 individus però en veure que contenia molt poques posicions informatives es va decidir no incloure-la en l'estudi de la filogeografia del teixó que es presenta en el Capítol II de Resultats. Les mostres d'Àsia continental estan dividides en dos grups geogràfics: quadrant sud-oest i Creta (1) i la resta d'Àsia continental (2) d'acord amb el Capítol II. La posició número 1 representa el primer nucleòtid de la regió control del teixó.

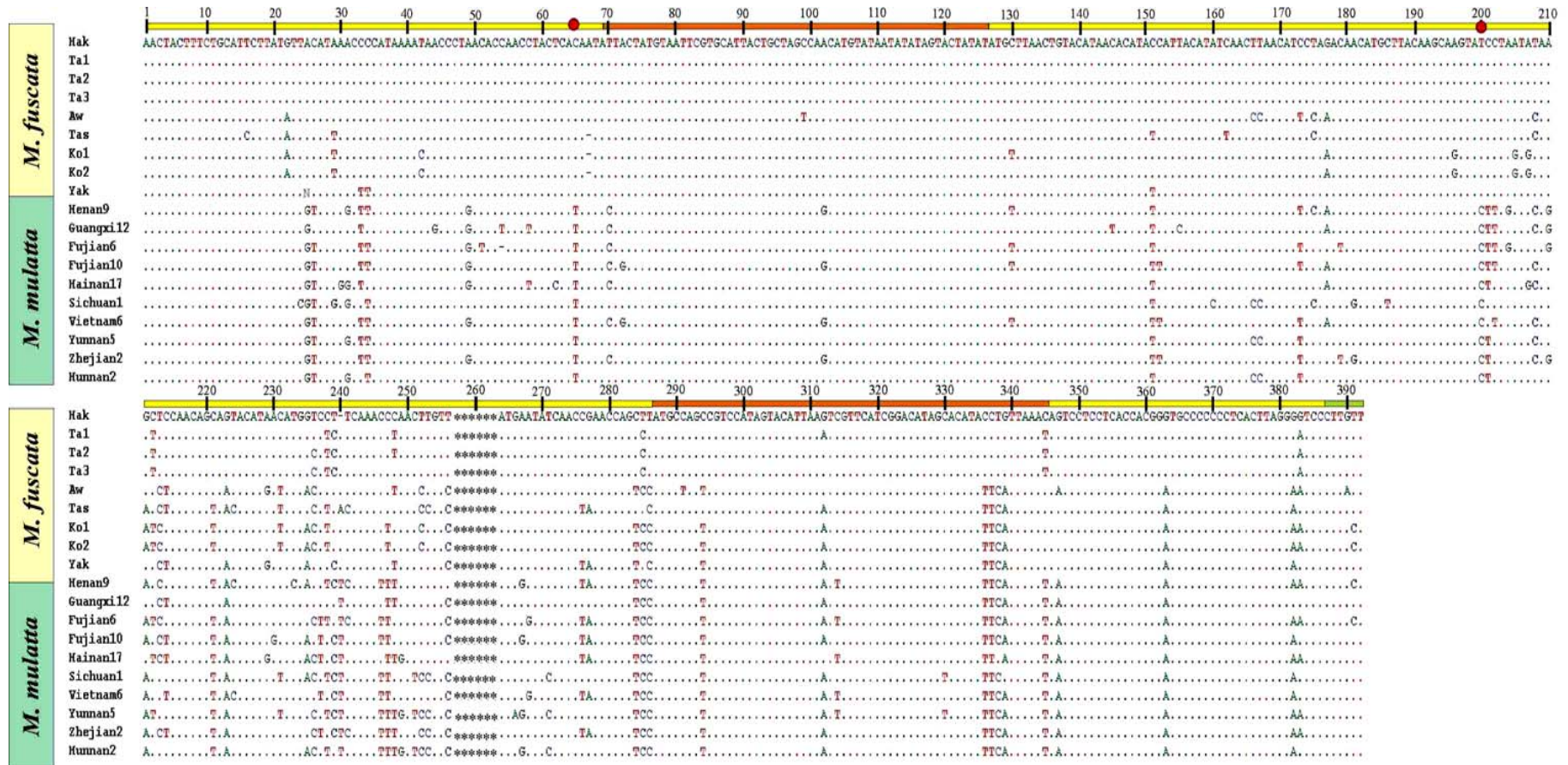


Figura 2.4: Localització de les posicions variables del domini ETAS de la regió control dels macacs japonès i rhesus. En aquest cas les seqüències s’han codificat a partir de la nomenclatura dels haplotips d’acord amb el Capítol IV, en el cas del macac japonès, i GenBank, en el cas del macac rhesus. Els asteriscs representen una regió poliC imperfecta que s’ha eliminat per la dificultat que presentava el seu alineament. Els cercles vermells marquen dues posicions nucleotídiques amb polimorfismes que són específics d’espècie. La posició número 1 representa en aquest cas el primer nucleòtid que s’ha seqüenciat.

3. ELS MUSTÈLIDS

3.1 Distribució, descripció i història evolutiva

Els mustèlids (família “Mustelidae”) són un exemple d’èxit adaptatiu dins dels carnívors. Les aproximadament 57 espècies descrites dins d’aquesta família es distribueixen de forma natural arreu de cinc continents (vegeu Figura 3.1) excepte a les Índies occidentals, la major part de Groenlàndia i del Sàhara, Islàndia, Madagascar, Sulawesi i illes orientals, la major part de les Filipines, Nova Guinea, Austràlia, Nova Zelanda, l’Antàrtida i la majoria d’illes oceàniques menors [Nowak 1991; Macdonald 2001]. Al llarg d’aquesta extensa àrea de distribució les diferents espècies s’han adaptat a una àmplia varietat d’hàbitats. Per exemple, les mosteles habiten boscos, muntanyes, àrees rurals, semi-deserts, estepes, la tundra; les martes habiten boscos de coníferes i en alguns casos de fulla caduca, també zones muntanyoses als tròpics i, fins i tot, ocasionalment àrees urbanes; el golut habita la tundra i la taigà a les zones àrtiques i subàrtiques; les llúdrigues estan lligades a hàbitats amb presència d’aigua; els teixons habiten boscos i en alguns casos muntanyes, estepes, sabanes, parcs urbans i jardins [Macdonald 2001]. Els mustèlids són carnívors de mida petita a mitjana – 15–123 cm de longitud (excepte la cua); 30–45.000 g de pes – i la majoria d’espècies presenten un cos allargat i prim, extremitats curtes amb cinc dits a cada peu i ungles no-retràctils [Macdonald i Barrett 1993].

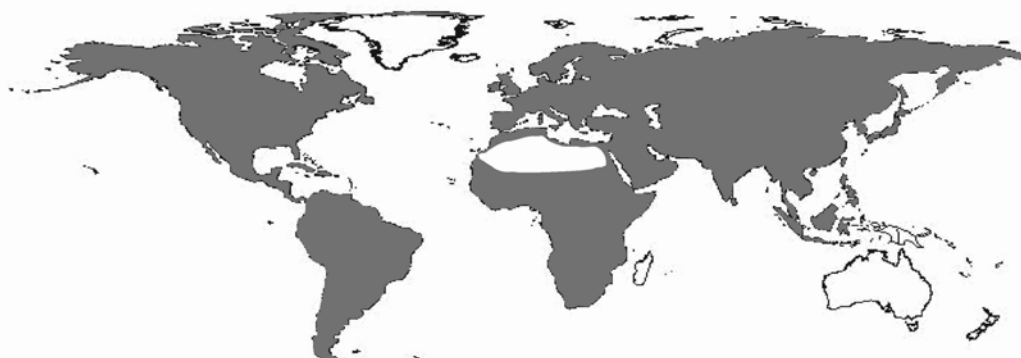


Figura 3.1: Distribució mundial, en gris, dels mustèlids. A més a més, la mostela comuna, *Mustela nivalis*; l’ermine, *Mustela erminea*, i el turó europeu, *Mustela putorius*, han estat introduïts per l’home a Nova Zelanda.

Segons una de les classificacions més recents, recollida a Macdonald [2001], la família “Mustelidae” està dividida en cinc subfamílies: “Mustelinae”, “Lutrinae”, “Melinae”, “Taxidiinae” i “Mellivorinae” (vegeu detalls a la Taula 3.1). Dins de la subfamília “Mustelinae” hi ha dos subgrups: les mosteles i espècies afins i les martes juntament amb el golut. Les mosteles són les espècies de menor mida dins dels mustèlids i fins i tot dins dels carnívors – la mostela comuna, *Mustela nivalis*, és el carnívor més petit del món. Es caracteritzen per tenir el cos molt prim i allargat, el cap triangular amb la part superior aplanada i la cara punxeguda. Les martes són de major mida, tenen el nas més llarg i punxegut, les orelles més grans, la cua més ampla i peluda i són excel·lents trepadores. Les mosteles i les martes són les espècies més estrictament carnívores de la família. Dins de la subfamília “Lutrinae” hi ha les llúdrigues, que estan perfectament adaptades a la vida aquàtica ja que tenen les potes palmades, la cua és afilada i gruixuda a la base (en algunes espècies està aplanada horitzontalment) i les orelles són petites i rodones i es poden tancar, com els orificis nasals, quan es submergeixen dins l’aigua. Les llúdrigues s’alimenten principalment de peix, però també poden consumir amfibis, crancs i a vegades ocells i petits mamífers. Els teixons no formen un grup natural i estan repartits en tres subfamílies: “Melinae”, “Taxidiinae” i “Mellivorinae”. Són animals pesants, plantígrads o semiplantígrads amb les extremitats i la cua curtes i presenten unes fortes ungles que utilitzen per cavar. Viuen en caus que excaven a terra i són omnívors ja que s’alimenten d’invertebrats, petits vertebrats, cereals i tubercles. Dins de la subfamília “Melinae” hi trobem el major nombre d’espècies de teixons (vegeu Taula 3.1) malgrat que només dues d’elles estan filogenèticament relacionades, el teixó euroasiàtic i el teixó porcí, *Arctonyx collaris* [Bryant i al. 1993]. Les dues subfamílies restants, “Taxidiinae” i “Mellivorinae”, són monotípiques. La primera està representada pel teixó americà, *Taxidea taxus*, i la segona pel ratel, *Mellivora capensis*.

El registre fòssil de la família “Mustelidae” no és tan complet com el d’altres grups de mamífers ja que els mustèlids són animals de mida petita i ossos fràgils, la qual cosa dificulta la seva fossilització. Malgrat tot, el material descobert i estudiat ha permès fer un esborrany de la història evolutiva d’aquesta família, el qual s’està millorant notablement a partir de la informació proporcionada pels nombrosos estudis de filogènia molecular realitzats en els darrers anys (vegeu el Capítol I de Resultats). Durant el Paleogen, fa entre 65 i 24 Ma, els carnívors estaven representats majoritàriament per petits mamífers viverriformes inclosos dins de les famílies

Taula 3.1: Classificació i distribució geogràfica de totes les espècies de mustèlids descrites segons Macdonald [2001]. La categoria d'amença està codificada d'acord amb la llista vermella d'espècies amenaçades publicada per la Unió Internacional per la Conservació de la Natura (UICN) el 2003. El significat dels codis el trobareu a l'Annex 2. Les espècies que no tenen cap codi no estan amenaçades, almenys a nivell de la seva població mundial.

^aSegons Dragoo i Honeycutt [1997] el teledu i el teixó de Palawan (gènere *Mydaus*) estarien emparentats amb les mofetes dins la família *Mephitidae*.

SUBFAMÍLIA	NOM CIENTÍFIC	NOM VULGAR	CATEGORIA D'AMENÇA	DISTRIBUCIÓ GEOGRÀFICA
<i>Mustelinae</i>				
	<i>Mustela nivalis</i>	Mostela comuna		Euràsia, des de la península Ibèrica fins al Japó (excepte Irlanda); Nord d'Àfrica; Amèrica del Nord, des de l'Àrtic fins a uns 40°N
	<i>Mustela erminea</i>	Ermini		Semblant a la mostela comuna però inclou Irlanda i no és present a la regió mediterrània ni al nord d'Àfrica.
	<i>Mustela frenata</i>	Mostela cua-llarga		Amèrica, des dels 50° N, fins a Bolívia a través dels Andes
	<i>Mustela africana</i>	Mostela tropical	DD	Est del Perú, Brasil
	<i>Mustela felipei</i>	Mostela colombiana	EN B1+2ce	Colòmbia
	<i>Mustela putorius</i>	Turó europeu		Europa fins als Urals (excepte Irlanda i la major part d'Escandinàvia)
	<i>Mustela eversmannii</i>	Turó d'estepa		Estepes i semi-deserts de Rússia, Kazakhstan, Mongòlia i la Xina
	<i>Mustela nigripes</i>	Turó de peus negres	EW	Oest d'Amèrica del Nord
	<i>Mustela altaica</i>	Mostela de muntanya		Àrees muntanyoses d'Àsia des d'Altai fins a Corea
	<i>Mustela sibirica</i>	Mostela siberiana		Des de l'est d'Europa fins l'est de Sibèria, Xina, Corea, Japó i Taiwan
	<i>Mustela kathiah</i>	Mostela de ventre groc		Himàlaia, oest i sud de la Xina, nord de Birmània
	<i>Mustela strigidorsa</i>	Mostela de dors llistat	VU C2a	Nepal, Birmània fins a Indoxina
	<i>Mustela nudipes</i>	Mostela de peus nus		Sud-est d'Àsia, Sumatra i Borneo
	<i>Mustela itatsi</i>	Mostela japonesa		Japó (excepte Hokkaido)
	<i>Mustela lutreolina</i>	Mostela d'Indonèsia	EN B1+2c	Java i Sumatra, a grans alçades
	<i>Mustela vison</i>	Visó americà		Originari d'Amèrica del Nord; naturalitzat a Europa, centre i est d'Àsia i Amèrica del Sud meridional
	<i>Mustela lutreola</i>	Visó europeu	EN A1ace	Europa de l'Est, costa atlàntica de França, Nord d'Espanya (País Basc, Navarra, La Rioja)
	<i>Vormela peregusna</i>	Turó jaspíat		Estepes i semi-deserts des del sud-est d'Europa fins a la Xina, Palestina i Baluxistan
	<i>Ictonyx striatus</i>	Turó africà		Regions semi-àrides d'Àfrica al sud del Sàhara
	<i>Poecilictis libyca</i>	Mostela llistada nord africana		Límits semi-desèrtics del Sàhara des del Marroc i Egipte fins al nord de Nigèria i Sudan
	<i>Poecilogale albinucha</i>	Mostela llistada africana		Àfrica sud-sahariana
	<i>Galictis vittata</i>	Grison		Amèrica Central i del Sud, des de Mèxic fins al Brasil
	<i>Galictis cuja</i>	Grison nan		Amèrica Central i del Sud però a major altitud que el grison
	<i>Lyncodon patagonicus</i>	Mostela de la Patagònia		Pampes d'Argentina i de Xile
	<i>Martes martes</i>	Marta comuna		Centre i Nord d'Europa i oest d'Àsia
	<i>Martes zibellina</i>	Marta gibel·lina		Nord d'Àsia i nord del Japó
	<i>Martes melampus</i>	Marta japonesa		Japó i Corea
	<i>Martes flavigula</i>	Marta de gola groga		Sud-est d'Àsia fins a Corea, Java, Sumatra i Borneo
	<i>Martes americana</i>	Marta americana		Amèrica del Nord septentrional fins a Califòrnia

Lutrinae	<i>Martes foina</i>	Fagina		Sud i centre d'Europa fins a Dinamarca i el centre d'Àsia
	<i>Martes pennanti</i>	Marta pescadora		Amèrica del Nord septentrional fins a Califòrnia i oest de Virgínia
	<i>Martes gwatkinsi</i>	Marta de Nilgiri	VU B1+2bc	Sud de l'Índia
	<i>Eira barbara</i>	Taira		Amèrica Central i del Sud, Trinidad
	<i>Gulo gulo</i>	Golut	VU A2c	Circumpolar a Amèrica del Nord i Euràsia
	<i>Lutra lutra</i>	Llúdriga comuna	VU A2cde	Major part d'Euràsia (latituds centrals), nord d'Àfrica
	<i>Lutra maculicollis</i>	Llúdriga de coll tacat	VU A1c	Àfrica al sud del Sàhara excepte zones desèrtiques
	<i>Lutra sumatrana</i>	Llúdriga de nas pelut	DD	Sumatra, Java, Borneo, Tailàndia, Vietnam, Malàisia
	<i>Aonyx capensis</i>	Llúdriga de galtes blanques		Des del Senegal a Etiòpia per sota dels 15°N i fins a l'extrem sud d'Àfrica
	<i>Aonyx congicus</i>	Llúdriga del Congo	DD	Regions boscoses de la conca del riu Congo
Mellivorinae	<i>Amblonyx cinereus</i>	Llúdriga cendrosa	LR/nt	Índia, Sri Lanka, Sud-est d'Àsia, Indonèsia, Borneo, illes Palawan, Sud de la Xina
	<i>Lutrogale perspicillata</i>	Llúdriga de pèl suau	VU A1acd	Iraq, baix Indus, Índia, sud-est d'Àsia, Birmània, sud-oest de la Xina, Malàisia peninsular, Sumatra, Borneo
	<i>Enhydra lutris</i>	Llúdriga de mar	EN A1ace	Illes Kurils i Aleutianes, costa i golf d'Alaska, introduïda en alguns punts de la costa pacífica d'Amèrica del Nord i Rússia
	<i>Lontra canadensis</i>	Llúdriga de riu nord americana		Canadà i Estats Units
	<i>Lontra felina</i>	Llúdriga marina	EN A1acd	Costes de Xile i del Perú
	<i>Lontra provocax</i>	Llúdriga de riu del sud	EN A1acd	Argentina i Xile
	<i>Lontra longicaudis</i>	Llúdriga de riu neotropical	DD	Amèrica Central i del Sud, des de Mèxic fins a Argentina
	<i>Pteronura brasiliensis</i>	Llúdriga gegant	EN A1acde	Amèrica del Sud, excepte Xile, Argentina i Uruguai
	<i>Mellivora capensis</i>	Ratel		Des de Sudàfrica fins al Marroc a l'oest i Etiòpia, Sudan i Somàlia a l'est; des d'Aràbia fins al Turkmenistan, el Nepal i l'Índia
	Taxidiinae			
<i>Taxidea taxus</i>	Teixó americà		Sud-oest del Canadà, nord i centre dels Estats Units fins a Mèxic	
Melinae				
<i>Meles meles</i>	Teixó comú		Euràsia, des de la península Ibèrica fins al Japó i des d'Escandinàvia fins a Palestina, Tibet i la Xina	
<i>Arctonyx collaris</i>	Teixó porcí		Sud de la Xina i Indoxina fins a Tailàndia i Sumatra	
<i>Melogale personata</i>	Teixó turó de l'Índia		Índia, Nepal, Birmània	
<i>Melogale orientalis</i>	Teixó turó oriental	LR/nt	Java, Bali, sud-est d'Àsia	
<i>Melogale moschata</i>	Teixó turó xinès		Xina, Taiwan, Assam, Birmània i sud-est d'Àsia	
<i>Melogale everetti</i>	Teixó turó d'Everett	VU B1+2c	Borneo	
<i>Mydaus javanensis</i>	Teledu ^a		Muntanyes de Borneo, Sumatra, Java i nord de les illes Natuna	
<i>Mydaus marchei</i>	Teixó pudent de Palawan ^a	VU B1+2c	Palawan i Busuanga, nord-est de Borneo	

46- INTRODUCCIÓ

“Viverravidae” i “Miacidae” [Martin 1989]. Entre l’Eocè i l’Oligocè, fa entre 54 i 26 Ma, aquest ordre es va diversificar i a principis del Neogen la majoria de famílies modernes ja havien aparegut [Macdonald 2001]. Alguns autors consideren que els gèneres *Mustelavus*, *Mustelictis* i *Amphicticeps*, que pertanyen a l’Eocè Superior i a l’Oligocè Inferior, són els mustèlids més antics coneguts [McKenna i Bell 1997; Baskin 1998]. No obstant, cap d’aquests tres gèneres presenta una fossa suprameatal, que és un caràcter sinapomòrfic en els mustèlids, la qual cosa qüestiona que siguin els representants més primitius d’aquesta família [Wolsan 1993; 1999]. D’acord amb això, les restes fòssils més antigues de mustèlids pertanyen a l’espècie *Plesictis plesictis* de l’Oligocè Superior de Cournon, França [Kurtén 1968; Wolsan 1999]. La diversificació dels mustèlids, i de la majoria dels mamífers moderns, va estar marcada per tot un seguit de canvis ambientals ocorreguts a nivell mundial possiblement derivats de l’aïllament de l’Antàrtida fa uns 36 Ma [Redfern 2000]. Des d’aleshores el clima es va anar tornant menys càlid i més sec i entre l’Oligocè Superior i el Miocè Inferior, fa entre 28 i 15 Ma, moltes àrees continentals, dominades prèviament per boscos densos i humits, ja s’havien convertit en boscos oberts, prats i sabanes [Pough i al. 1985; Latorre i al. 1997]. Diferents grups de mamífers van diversificar-se en aquests nous hàbitats desenvolupant hàbits cavadors per protegir-se de les inclemències del temps i dels depredadors, i els mustèlids no en van ser una excepció doncs van aparèixer formes semi-cavadores especialitzades en entrar dins dels caus de les seves preses, principalment rosegadors, per caçar-les (l’ecomorf de les mosteles i formes semblants) i especialitzades en cavar els seus propis caus per viure-hi (l’ecomorf dels teixons) [Martin 1989].

Els representants més antics coneguts de les subfamílies de mustèlids pertanyen al Miocè Inferior (fa entre 24 i 15 Ma) d’Europa. *Plesiogale angustifrons* i *Paragale huerzeleri* són els fòssils més antics de la subfamília “Mustelinae” [Wolsan 1993]; *Paralutra sp.* de la subfamília “Lutrinae” [Savage i Russell 1983; McKenna i Bell 1997]; i *Dehmictis vorax* i *Trochictis artenensis* de la subfamília “Melinae” [Ginsburg i Morales 2000]. El registre fòssil de la subfamília “Mellivorinae” és força complet a l’Àfrica des del Miocè Superior (fa entre 11 i 5 Ma) [Anderson 1989] i el de la subfamília “Taxidiinae” es coneix des del Miocè Superior d’Amèrica del Nord [Wagner 1976]. Es creu que els estadis més primerencs de la radiació dels mustèlids van esdevenir en el Vell Món i que després aquests animals es van expandir ràpidament fins Amèrica del Nord, ja que també s’han trobat restes fòssils de mosteles, possibles

llúdrigues i representants de la subfamília extingida “Leptarctinae” (també existent a Europa) en jaciments americans, d’una edat semblant als europeus [Bryant i al. 1993]. L’arribada dels mustèlids a Amèrica del Nord va ser possible perquè aquest subcontinent i Àsia estaven units per l’istme de Bering. Aquest istme va ser una ruta d’intercanvi de fauna molt important entre el Vell i el Nou Món des de meitats del Cretaci, fa uns 105 Ma, fins que es va obrir entre finals del Miocè Superior i principis del Pliocè Inferior, fa entre 7.4 i 4.8 Ma [Marincovich i Gladenkov 1999]. Una mica més tard, durant el Miocè Superior, fa entre 11 i 5 Ma, els mustèlids van arribar a l’Àfrica encara que al Miocè Inferior, fa entre 20 i 18 Ma, ja s’havia format un pont de terra entre Afro-Aràbia i Euràsia [Martin 1989; Rögl 1998]. Amèrica del Sud va estar aïllada fins fa entre 3.1 i 2.8 Ma quan es va formar l’istme de Panamà amb Amèrica del Nord [Coates i Obando 1996]. No obstant, sembla ser que els mustèlids no van arribar a Amèrica de Sud fins el Plistocè.

3.2 *Taxonomia confusa*

Dins de l’ordre “Carnivora”, els mustèlids són el grup germà dels procionids (família “Procyonidae”, vegeu Figura 3.2) d’acord amb les seqüències del gen mitocondrial citocrom *b* [Ledje i Arnason 1996]; l’intró I del gen nuclear que codifica per la transtiretina [Flynn i Nedbal 1998]; i amb la combinació de dades morfològiques i moleculars [Bininda-Emonds i al. 1999]. Dins de la família “Mustelidae”, però, la taxonomia és força confusa i hi ha importants discrepàncies entre els especialistes - per exemple en relació a la possible inclusió o no de les mofetes (gèneres *Mephitis*, *Spilogale* i *Conepatus*) dins de la família “Mustelidae”; les relacions filogenètiques entre les diferents subfamílies; la classificació de determinades espècies dins de noves subfamílies monotípiques o en una subfamília diferent; o la classificació dels diferents gèneres i espècies que hi ha dins d’una mateixa subfamília.

Alguns autors consideren que els mustèlids i les mofetes formen un grup monofilètic d’acord amb la morfologia del quart molar superior, la pèrdua del segon molar superior i l’augment de mida de les glàndules odoríferes anals [Martin 1989; Bryant i al. 1993]. Simpson [1945], va classificar les mofetes dins d’una de les cinc subfamílies, “Mephitinae”, que va descriure dins dels mustèlids. No obstant, l’anàlisi de les seqüències dels gens citocrom *b*, 12S i 16S rRNAs ha revelat que els mustèlids i les mofetes pertanyen a llinatges diferents i, per tant, les mofetes s’haurien de classificar en una família a part, “Mephitidae” [Ledje i Arnason 1996; Dragoo i Honeycutt 1997].

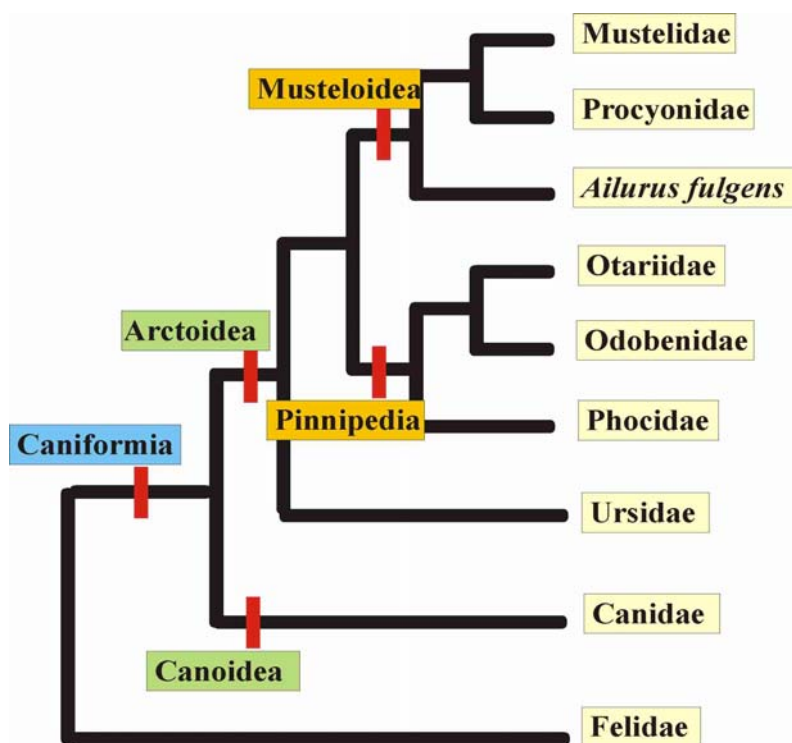


Figura 3.2: Filogènia dels caniformes segons Flynn i Nedbal [1998] i Bininda-Emonds i al. [1999], on es pot observar que els mustèlids són un grup germà dels prociònids.

Un altre punt de controvèrsia és la relació de les llúdrigues amb els altres mustèlids. Willemsen [1992] va suggerir que “Melinae” i “Lutrinae” són grups germans, en canvi, als treballs basats en marcadors genètics els teixons apareixen com el grup basal de la família i les llúdrigues com a grup germà de “Mustelinae” [Dragoo i Honeycutt 1997; Koepfli i Wayne 1998]. El teixó americà, *Taxidea taxus*, clàssicament s’havia classificat dins de la subfamília “Melinae” [Simpson 1945] però cada vegada està més acceptat que les semblances morfològiques entre *Taxidea taxus* i els teixons inclosos dins de la subfamília “Melinae” són degudes a convergències etològiques i ecològiques i, per tant, no deriven d’un mateix ancestre comú [Petter 1971]. A principis dels anys 90 aquesta espècie es va començar a classificar dins de la subfamília monotípica “Taxidiinae” [Wozencraft 1993]. També hi ha discrepàncies respecte a la classificació dels gèneres *Eira*, *Galictis* i *Lyncodon*. Alguns autors consideren que formen part de la subfamília “Mustelinae” [Macdonald 2001] mentre que d’altres els inclouen dins de la seva pròpia subfamília, “Galictinae” [Anderson 1989]. El teledu, *Mydaus javanensis*, i el teixó pudent de Palawan, *Mydaus marchei*, morfològicament s’han classificat dins de la subfamília “Melinae” [Simpson 1945; Wozencraft 1993],

però l'anàlisi de les seqüències dels gens 12S i 16S rRNAs ha revelat que són filogenèticament molt semblants a les mofetes i que s'haurien de reclassificar dins la família "Mephitidae" [Dragoo i Honeycutt 1997]. En una classificació morfològica realitzada per Anderson [1989], el golut, *Gulo gulo*, apareix dins de la subfamília "Mellivorinae"; no obstant, altres estudis basats en morfologia i marcadors moleculars suggereixen que està filogenèticament emparentat amb les martes [Bininda-Emonds i al. 1999].

Respecte a la taxonomia dins d'una mateixa subfamília la controvèrsea és deguda, per exemple, a la classificació de determinades espècies a nivell de gènere o a l'estatus específic de determinats taxons filogenèticament molt propers. Per il·lustrar el primer cas, Abramov [2000], basant-se en caràcters morfològics, suggereix que el visó americà, *Mustela vison*, pertany a un gènere diferent, *Neovison*. D'altra banda, hi ha espècies que han divergit molt recentment i se sap que poden hibridar, com és el cas dels turons europeu, *Mustela putorius*, d'estepa, *Mustela eversmannii*, i el visó europeu, *Mustela lutreola* [Heptner i al. 1967; Ternovsky 1977]; o el cas de les martes comuna, *Martes martes*, i gibel·lina, *Martes zibellina* [Grakov 1994], la qual cosa posa en dubte la seva classificació com a espècies diferents.

3.3 Estatus i conservació a nivell mundial

La UICN ha classificat 22 espècies i 7 subespècies de mustèlids com a amenaçades. Dins de "Mustelinae", el turó de peus negres, *Mustela nigripes*, està extingit de la natura i tan sols sobreviu en captivitat. A més a més, hi ha tres espècies més en perill d'extinció i tres més de classificades com a vulnerables. Dins de "Melinae" n'hi ha dues de vulnerables i una en baix risc d'extinció. La subfamília "Lutrinae" és la que té més espècies amenaçades; quatre espècies de llúdrigues estan en perill d'extinció, tres són espècies vulnerables i una està en baix risc d'extinció (vegeu Taula 3.1). Moltes de les espècies restants d'aquesta família estan protegides o en perill d'extinció en determinats països dins de la seva àrea de distribució. En general, les principals amenaces per aquestes espècies són la destrucció del seu hàbitat, la desaparició de les seves preses principals i la sobreexplotació (p.e. per proveir la indústria de pelleteria).

L'elevat nombre d'espècies amenaçades que representen els mustèlids fa necessari tenir una filogènia i una taxonomia ben resoltes en aquesta família. Aquesta

50- INTRODUCCIÓ

informació, juntament amb l'aportada per altres disciplines com per exemple l'ecologia, pot ser molt útil i necessària per prioritzar i guiar plans de conservació en els mustèlids en el futur.

4. EL TEIXÓ EUROASIÀTIC

4.1 Distribució, descripció i història evolutiva

El teixó euroasiàtic és una de les espècies de mustèlids que té una àrea de distribució més extensa. Habita boscos i estepes de la regió Paleàrtica excepte el nord-est de Sibèria, el nord d'Àfrica i Aràbia. El límit nord de la seva àrea de distribució es troba a Escandinàvia a uns 65° N, mentre que el límit sud es troba al llarg de Palestina, Iran, el Tibet i el sud de la Xina (vegeu Figura 4.1) [Lynch i al. 1997]. Diferents poblacions insulars existeixen a Irlanda, Gran Bretanya, Sicília, Creta, Rodes i Japó [Corbet 1978]. Al llarg de tota aquesta àrea, el teixó té una distribució subalpina, per sota dels 1.600-1.700 metres [Henry i al. 1988], encara que a Iran ha estat observat a altituds de fins a 2.200 metres [Neal i Cheeseman 1996].

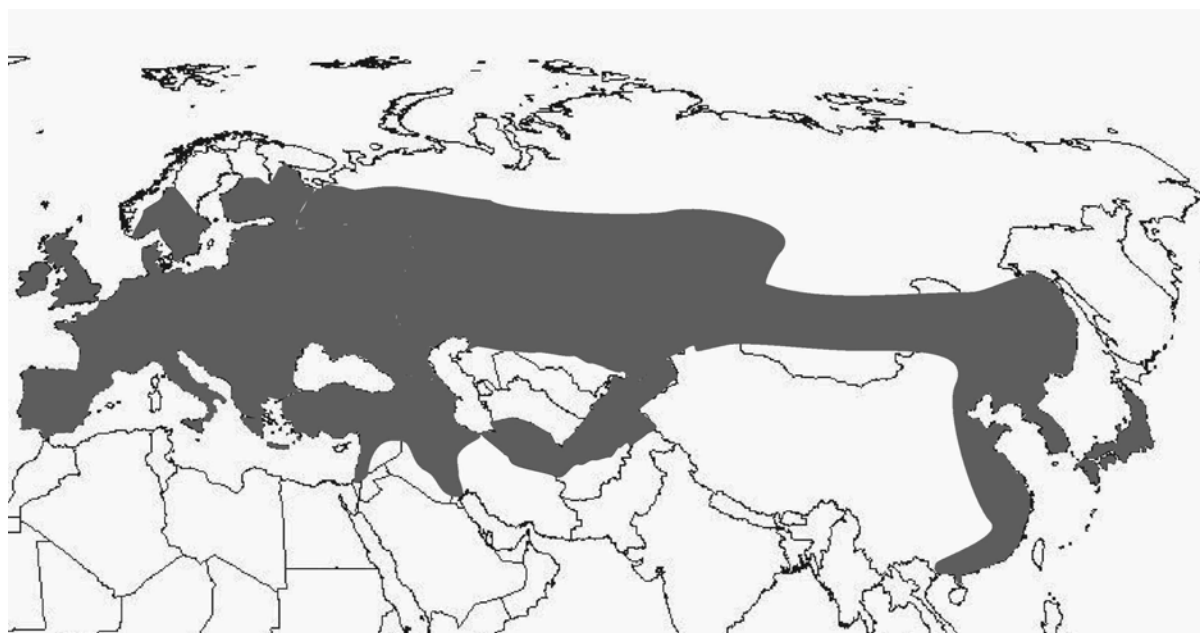


Figura 4.1: Distribució geogràfica, en gris, del teixó euroasiàtic.

El teixó euroasiàtic és un mustèlid de mida mitjana a gran, medeix de 67 a 81 cm de longitud (excepte la cua) i pesa de 10 a 12 kg [Macdonald 2001]. És un animal robust i camacurt amb pelatge llarg i fort que presenta una coloració molt característica: el cap és de color blanc amb dues bandes negres laterals marcades des del morro fins a les orelles; el cos és grisós excepte el pit, el ventre i les extremitats, que són negres. Les potes són semiplantígrades i molt potents. Té les ungles molt fortes – sobretot les

anteriors – que utilitza per excavar els caus, els quals poden ser des d’una simple galeria fins a extensos i complexos laberints subterranis [Neal i Cheeseman 1996]. El teixó és un animal generalment nocturn, durant el dia roman dins del cau i després de la posta del sol surt a l’exterior fins a l’alba. En regions fredes o seques caracteritzades per l’escassetat d’aliment (com per exemple el sud d’Espanya i el nord d’Escandinàvia) acostuma viure sol o en parelles, mentre que en regions temperades i plujoses (com per exemple les illes Britàniques) viu en grups socials de 3 a 7 individus adults més les cries i poden arribar a ser fins a 27 individus per grup [Neal i Cheeseman 1996; Macdonald 2001]. La sociabilitat del teixó, malgrat ser força rudimentària, és un cas molt poc freqüent en els mustèlids i encara no està aclarit el perquè aquesta espècie l’ha desenvolupat.

El llinatge del gènere *Meles* va evolucionar a partir del gènere *Melodon* durant el Pliocè (fa entre 5 i 1.7 Ma) en els boscos temperats d’Àsia [Kurtén 1968; Neal i Cheeseman 1996]. *Melodon* possiblement tenia costums molt semblants als dels teixons moderns ja que estava ben equipat per excavar, doncs presentava un cos fort i unes ungles llargues i robustes [Kurtén 1968]. Des d’Àsia els descendents de *Melodon* van dispersar-se cap a l’oest fins arribar a Europa. Els primers representants del gènere *Meles* coneguts, que són *Meles polaki* i *Meles maraghaus*, pertanyen al Pliocè Inferior (fa entre 5 i 3.6 Ma) d’Iraq [Osborn 1910] i no és fins a finals del Pliocè (fa uns 2 Ma) que n’apareixen els primers fòssils a Europa [Kurtén 1968]. Entre el Plistocè Inferior i Mitjà (fa entre 1.7 i 0.2 Ma) diferents formes molt semblants al teixó euroasiàtic actual habitaven Europa: *Meles thoralis*, *Meles atavus*, *Meles hollitzeri*, *Meles dimitrius* [Wolsan 2001]. A la mateixa època, a Àsia, s’ha descrit *Meles cf leucurus* que també és molt semblant a l’espècie actual [Petter 1971]. Malgrat que la variació que presenten aquestes espècies està inclosa en el rang del teixó euroasiàtic, no se’n consideren subespècies perquè encara no està clar, com es veurà en el següent apartat, si l’espècie actual està realment dividida en més d’una espècie al llarg d’Euràsia. *Meles meles* apareix en el registre fòssil des del Plistocè Mitjà [Kurtén 1968].

4.2 Importants diferències morfològiques

El teixó euroasiàtic presenta una notable variabilitat morfològica que complica la seva taxonomia a nivell intraespecífic. Els teixons europeus són generalment grans i representatius del patró descrit a l’apartat anterior. Els que estan distribuïts pel quadrant sud-oest d’Àsia i les illes de Creta i Rodes són de menor mida i, malgrat presentar la

52- INTRODUCCIÓ

màscara típica dels individus europeus, tenen el pelatge de color més pàl·lid. Els que estan distribuïts per la resta d'Àsia continental (excepte la part més oriental) són de mida intermitja, la màscara envolta els ulls, s'extén fins a les orelles i és marró fosc. La varietat que habita l'extrem oriental d'Àsia és de mida més petita, presenta un pelatge molt fosc i les franges de la màscara del cap quasi no es poden distingir. Finalment, la que habita al Japó, de mida semblant a l'anterior, és de color tirant a terrós amb les bandes de la màscara de color marró xocolata que en alguns casos poden quedar reduïdes a simples anells al voltant dels ulls [Alexei Abramov, comunicació personal]. També s'han trobat importants diferències en la dentició i en caràcters morfomètrics del crani i de l'os del penis [Baryshnikov i Potapova 1990; Lynch 1994; Lynch i al. 1997; Abramov 2002].

Tota aquesta variació morfològica ha complicat extraordinàriament la taxonomia del teixó euroasiàtic a nivell intraespecífic. Alguns especialistes han descrit entre 2 i 24 subespècies dins de *Meles meles* [Ellerman i Morrison-Scott 1951; Petrov 1953; Heptner i al. 1967; Corbet 1978; Wozencraft 1993] mentre que d'altres fins i tot proposen dues o tres espècies diferents – *Meles meles* a Europa, *Meles leucurus* a Àsia continental i *Meles anakuma* al Japó – (vegeu Figura 4.2 i Annex 1) [Satunin 1914; Ognev 1931; Neal 1948; Baryshnikov i Potapova 1990; Abramov 2001; 2002].

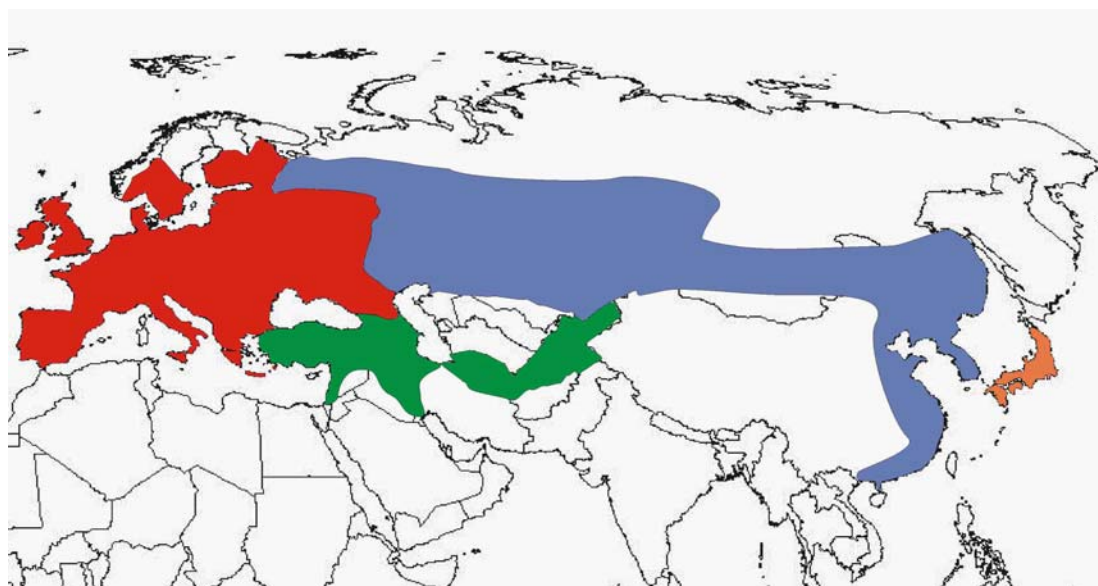


Figura 4.2: Alguns autors suggereixen que *Meles meles* està dividit en una subespècie europea, *Meles meles meles* (en vermell) i una altra que habita diferents parts del sud-oest d'Àsia, *Meles meles canescens* (en verd), mentre que els teixons que habiten la resta d'Àsia continental (en blau) i el Japó (en taronja) serien espècies diferents, *Meles leucurus* i *Meles anakuma* respectivament. No obstant, altres autors també han dividit aquests grups en múltiples subespècies (vegeu l'Annex 1).

Encara no s'ha realitzat un estudi extensiu de la variabilitat genètica del teixó a nivell mundial, excepte un primer intent de Kurose i al. [2001] on es van comparar seqüències del gen citocrom *b* de 17 teixons japonesos amb les d'un individu de Sibèria i dos d'Europa oriental. Aquests autors van trobar moderats nivells de divergència en comparacions realitzades entre regions, mentre que els teixons japonesos eren genèticament molt semblants entre ells. En el Capítol II de Resultats es presenta un estudi pioner en aquesta espècie fet amb mostres d'individus que cobreixen quasi tota l'àrea de distribució del teixó amb l'objectiu d'ajudar a clarificar la seva taxonomia a nivell intraespecífic, a més a més de descriure la història de les seves poblacions i delimitar les principals barreres geogràfiques que poden haver afectat aquesta i d'altres espècies de la fauna euroasiàtica durant els darrers centenars de milers d'anys.

4.3 Estatus i conservació

A Europa, malgrat que el nombre d'individus de moltes poblacions roman estable o en augment, hi ha alguns països – com per exemple els Països Baixos, Albània, l'antiga Iugoslàvia i Grècia, concretament les illes de Creta i Rodes – on els teixons cada vegada són més rars o estan amenaçats d'extinció [Neal i Cheeseman 1996; Griffith i Thomas 1997]. A la majoria de països mediterranis, de l'Europa de l'Est i sobretot d'Àsia es tenen poques dades de la seva abundància. Sembla ser que en països com Espanya, Albània i Estònia i les illes de Creta i Rodes hi ha densitats baixes mentre que en altres llocs com per exemple algunes parts d'Escandinàvia i de les illes Britàniques, és un animal força abundant. El teixó està inclòs a l'Apèndix III del Conveni de Berna i està protegit per lleis nacionals a: Portugal, Espanya, Itàlia, Irlanda, Gran Bretanya, Luxemburg, Bèlgica, Països Baixos, Albània, Grècia, Hongria i Estònia [Griffith i Thomas 1997]. En àrees rurals, principalment de l'Europa de l'Est, els teixons són caçats per aprofitar-ne la carn, el greix (utilitzat pel tractament del dolor muscular), el pelatge i la pell. A partir dels seus pèls també s'elaboren brotxes d'afaitar de luxe. Als països on no està protegit, el teixó està considerat com una espècie de caça menor o fins i tot com un animal nociu [Neal i Cheeseman 1996]. Malgrat tot, un dels majors problemes que té aquest animal a Europa és que ha estat identificat – a països com Irlanda i la Gran Bretanya – com el principal hoste en estat salvatge de *Mycobacterium bovis*, l'agent causant de la tuberculosi bovina [Gallagher i Clifton-Hadley 2000]. Aquesta malaltia, que és endèmica d'Europa, causa importants pèrdues econòmiques en les explotacions de bestiar boví. Per controlar la malaltia, entre el 1975

54- INTRODUCCIÓ

i 1982 una gran quantitat de teixons van ser exterminats a Anglaterra mitjançant cianur, però aquestes campanyes es van aturar perquè es consideraven inhumanes i no permetien una anàlisi *post-mortem* dels animals, ja que morien dins dels seus caus. La següent estratègia que ha seguit el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació d'Anglaterra (MAFF) és capturar els animals mitjançant trapes i matar-los a trets [Neal i Cheeseman 1996]. Aquest pla pel control de la tuberculosi bovina, que també suposa l'eliminació d'un gran nombre d'animals, en molts casos ha demostrat ser molt poc efectiu per controlar aquesta malaltia [Tuytens i al. 2000].

5. ELS MACACS

5.1 Distribució, descripció, taxonomia i història evolutiva

Els macacs (gènere *Macaca*) són uns dels primats amb major èxit adaptatiu que existeixen. L'àrea de distribució d'aquest gènere, estimada en 5.000.000 de km², és la més gran de tots el primats no humans [Fa 1989]. Actualment habiten el nord d'Àfrica (Marroc i Algèria), Gibraltar, centre i sud-est d'Àsia continental, Sri Lanka, Indonèsia (excepte Nova Guinea), Taiwan, les Filipines i el Japó (vegeu Figura 5.1) [Nowak 1991]. El fet de ser animals típicament oportunistes i que s'adapten a hàbitats molt diferents els ha permès tenir una àrea de distribució tan extensa. Poden viure des del nivell del mar fins a alçades de 2.500 metres, des de regions fredes fins a regions tropicals o des de regions àrides fins a regions dominades per boscos densos [Lindburg 1971]. Els macacs es caracteritzen per ser uns micos de mida mitjana, de cos robust i extremitats fortes i per tenir el morro una mica allargat. Totes les espècies són diürnes i estan adaptades a la vida arbòria. No obstant, a la major part d'elles, els individus poden baixar a terra ferma, encara que sigui ocasionalment, per buscar aliment o fins i tot per desplaçar-se al llarg de grans distàncies [Nowak 1991].

Els macacs estan classificats dins de la família "Cercopithecidae" a la qual pertanyen els anomenats "micós del vell món". Dins d'aquesta família formen part de la subfamília "Cercopithecinae", on s'han descrit unes 45 espècies que estan incloses en 11 gèneres. Els deu gèneres restants inclosos en aquesta subfamília són: *Papio*, el papió; *Mandrillus*, els mandrils; *Theropithecus*, el gelada; *Cercocebus* i *Lophocebus*, els mangabeis; *Cercopithecus*, els guenons; *Chlorocebus*, el vervet; *Allenopithecus*, el mico d'Allen; *Erythrocebus*, el patas, i *Miopithecus*, el talapoí [Macdonald 2001]. Els macacs, juntament amb el papió, els mandrils i els mangabeis, constitueixen la tribu "Papionini" [Strasser i Delson 1987].

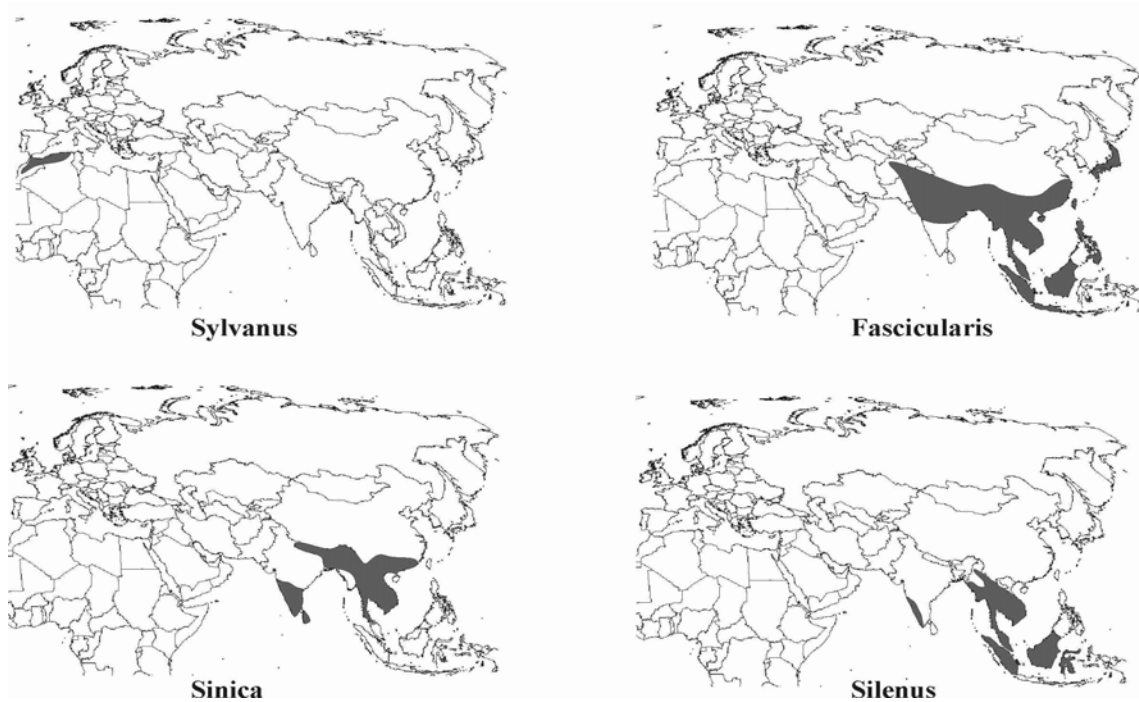


Figura 5.1: Distribució mundial dels diferents grups de macacs que apareixen a la Taula 5.1 i que han estat descrits d'acord amb dades morfològiques [Delson 1980] i moleculars [Tosi i al. 2000; 2003]. Els macacs japonès i rhesus formen part del grup “Fascicularis” que és el més extès geogràficament.

El bressol del gènere *Macaca* va ser el nord d'Àfrica i el seu llinatge va ser el primer que es va separar dins de la tribu “Papionini” fa entre set i vuit milions d'anys, durant el Miocè Superior, d'acord amb dades fòssils [Delson 1980] i moleculars [Cronin i al. 1980; Harris 2000; Tosi i al. 2003]. La separació d'aquests llinatges possiblement va estar relacionada amb un període d'aridesa que va començar a principis del Miocè Superior al sud d'Europa i al nord d'Àfrica i que va derivar en la formació d'una barrera semi-desèrtica al llarg del Sàhara. Els ancestres dels macacs van quedar aïllats al nord del desert que s'estava formant [Delson 1975]. Les restes fòssils més antigues d'aquest gènere s'han trobat a les localitats de Wadi Natrun (nord d'Egipte), Menacer (Algèria) i Sahabi (Líbia) [Delson 1980; Thomas i Petter 1986; Geraads 1987].

Des del nord d'Àfrica els macacs es van expandir ràpidament cap a Euràsia. Els primers representants van arribar a Europa possiblement aprofitant un pont de terra que va connectar el nord d'Àfrica amb la península Ibèrica fa uns 6.1 Ma [Benammi i al. 1996; Garcés i al. 1998; Köhler i al. 2000]. Uns 140.000 anys després, la mar Mediterrània es va assecar – fenomen conegut com la crisi del Messinià – la qual cosa possiblement va permetre nous intercanvis d'individus entre ambdós continents [Köhler i al. 2000]. Des d'aleshores i fins el Plistocè Mitjà van ocupar una part important del continent europeu arribant a latituds força septentrionals – s'han trobat fòssils a

56- INTRODUCCIÓ

Anglaterra, Països Baixos i Alemanya – però malgrat l'èxit de la seva colonització els últims macacs europeus es van extingir fa uns 125.000 anys [Delson 1980]. La majoria de macacs fòssils trobats a Europa s'han classificat com a subespècies de l'actual mona de Berberia, *Macaca sylvanus*, excepte una forma nana trobada a Sardenya anomenada *Macaca majori* [Azzaroli 1946].

Els macacs van colonitzar Àsia fa entre 6 i 5.5 Ma possiblement pel Pròxim Orient i ràpidament van arribar a les regions més orientals del continent [Delson 1980; 1996]. Des d'allà van colonitzar la majoria d'illes i arxipèlags (Sri Lanka, Sumatra, Borneo, Java, Tímor, les Filipines, Taiwan i el Japó) aprofitant els ponts de terra que emergiren durant els diferents períodes glacials del Plistocè [Delson 1980]. A diferència d'Europa i d'Àfrica, els macacs asiàtics van experimentar una important radiació evolutiva. Actualment hi ha 17 espècies descrites en aquest continent que han estat agrupades en tres grups (vegeu Figura 5.1 i Taula 5.1) d'acord amb dades morfològiques [Delson 1980] i moleculars [Tosi i al. 2000; 2003].

5.2 Història evolutiva del grup “Fascicularis”

El grup “Fascicularis” està format per quatre espècies: el macac menjador de crancs, *Macaca fascicularis*; el macac rhesus; el macac de Taiwan, *Macaca cyclopis*; i el macac Japonès (vegeu la distribució del grup a la Figura 5.1 i a la Taula 5.1). L'ancestre comú d'aquest grup va existir en el Pliocè Superior, fa entre 2.5 i 2.2 Ma, d'acord amb els càlculs fets a partir de la seqüència del gen TSPY [Tosi i al. 2003]. El genoma mitocondrial suggereix que el macac menjador de crancs va ser el primer que va divergir dins d'aquest grup, fa entre 2.0 i 1.8 Ma [Hayasaka i al. 1996]. No obstant, la posició ancestral d'aquesta espècie ha estat qüestionada mitjançant el gen nuclear *NRAMP1*, que suggereix que el macac rhesus seria el primer que va divergir [Deinard i Smith 2001].

Segons Delson [1980] i d'acord amb el registre fòssil, la baixada del nivell del mar durant el Plistocè Inferior va permetre que els macacs arribessin a Indonèsia on posteriorment un grup d'ells va quedar aïllat a les illes de Java i Sumatra. Aquests macacs esdevindrien els ancestres del grup “Fascicularis”. A principis del Plistocè Mitjà van arribar a l'illa de Borneo i a la península de Malaca (Malàsia i Tailàndia); a meitats del Plistocè Mitjà ja havien colonitzat la major part del sud-est asiàtic fins el nord de l'Índia, l'illa de Taiwan i l'arxipèlag de les Filipines; i a finals del Plistocè Mitjà van colonitzar el Japó.

Taula 5.1: Classificació de les 18 espècies de macac descrites actualment en quatre grups [segons Delson 1980 i Tosi i al. 2000; 2003]. La categoria d'amenaça està codificada d'acord amb la llista vermella d'espècies amenaçades publicada per la Unió Internacional per la Conservació de la Natura (UICN) el 2003. El significat dels codis el trobareu a l'Annex 2.

GRUP	NOM CIENTÍFIC	NOM VULGAR	CATEGORIA D'AMENAÇA	DISTRIBUCIÓ GEOGRÀFICA
Sylvanus	<i>Macaca sylvanus</i>	Mona de Berberia	VU A1c+2c C1	Nord d'Algèria i Marroc; Gibraltar.
Fascicularis	<i>Macaca fascicularis</i>	Macac menjador de crancs	LR/nt	Indonèsia i Filipines fins al sud de Birmània
	<i>Macaca mulatta</i>	Macac rhesus	LR/nt	Afganistan, Pakistan i Índia fins a la Xina i Vietnam
	<i>Macaca cyclopis</i>	Macac de Taiwan	VU A1cd	Taiwan
	<i>Macaca fuscata</i>	Macac japonès	DD	Japó
Sinica	<i>Macaca sinica</i>	Macac de còfia	VU A1c	Sri Lanka
	<i>Macaca radiata</i>	Macac coronat		Sud de l'Índia
	<i>Macaca assamensis</i>	Macac d'Assam	VU A1cd	Nord de l'Índia fins a Tailàndia i Vietnam
	<i>Macaca thibetana</i>	Macac del Tibet	LR/cd	Tibet fins a la Xina
	<i>Macaca arctoides</i>	Macac escuat	VU A1cd	Est de l'Índia fins al Sud de la Xina i Vietnam
Silenus	<i>Macaca silenus</i>	Macac de cua de lleó	EN B1+2c C2a	Sud-oest de l'Índia
	<i>Macaca nemestrina</i>	Macac de cua de porc	VU A1cd	Est de l'Índia fins a Indonèsia
	<i>Macaca ochreata</i>	Macac calçat	DD	Sulawesi
	<i>Macaca maura</i>	Macac moro	EN A1cd B1+2cde	Sulawesi
	<i>Macaca hecki</i>	Macac de Heck	LR/nt	Sulawesi
	<i>Macaca nigrescens</i>	Macac fosc	LR/cd	Sulawesi
	<i>Macaca nigra</i>	Macac de les Celebes	EN A1acd	Sulawesi
	<i>Macaca tonkeana</i>	Macac de Togian	LR/nt	Sulawesi

Diferents estudis basats en morfologia [Delson 1980] i en seqüències del genoma mitocondrial [Hayasaka 1996] i del genoma nuclear [Deinard i Smith 2001] han demostrat que aquestes espècies, i sobretot les tres últimes, són filogenèticament molt semblants. S'ha observat que dins del gènere *Macaca* individus de diferents espècies es poden encreuar i produir descendència fèrtil tant en captivitat [Bernstein i Gordon 1980] com en estat salvatge [Evans i al. 2001]. Dins del grup “Fascicularis” diferents autors han detectat hibridació entre el macac menjador de crancs i el rhesus [Fooden 1964; 1997; Tosi i al. 2000]. Zhang i Shi [1993], basant-se en la digestió de tot el genoma mitocondrial amb enzims de restricció, van trobar que les distàncies genètiques entre els macacs rhesus, Taiwanès i Japonès eren molt semblants a les trobades entre les poblacions de rhesus de l'illa de Hainan i de la Xina continental. Aquests fets suggereixen que els macacs del grup “Fascicularis” encara no han finalitzat el seu procés d'especiació i que aquest fenomen sembla ser força comú dins del gènere *Macaca*.

5.3 Els genomes mitocondrial i nuclear discrepen sobre l'evolució de les espècies de macacs

Les anàlisis de la variabilitat genètica intra i interespecífiques en macacs filogenèticament propers, com és el cas dels que formen part del grup “Fascicularis”, ens poden donar una valuosa informació sobre la història biològica de les espècies estudiades i ens poden ajudar a entendre els processos d'especiació en els primats. Dues de les espècies incloses dins del grup “Fascicularis”, el macac japonès i el rhesus, han estat estudiades mitjançant l'anàlisi de diferents marcadors genètics que han revelat resultats força interessants. Melnick i al. [1993] van estudiar la variabilitat genètica del macac rhesus analitzant mostres de 18 individus procedents del Pakistan, l'Índia, Birmània i la Xina mitjançant la digestió de tot el genoma mitocondrial amb enzims de restricció. També van comparar les seves dades amb les obtingudes dels macacs japonès i de Taiwan per Hayasaka i al. [1988]. El resultat més rellevant del treball de Melnick i col·laboradors va ser que, segons l'ADN mitocondrial, els rhesus presentaven dos llinatges mitocondrials diferenciats i que els individus de Birmània i la Xina eren genèticament més semblants als macacs japonès i de Taiwan que no pas als rhesus del Pakistan i l'Índia (vegeu Figura 5.2). Aquest resultat ha estat confirmat a partir de l'anàlisi de la seqüència dels gens mitocondrials que codifiquen per les subunitats 4 i 5 de la NADH deshidrogenasa i pels ARNs de transferència d'histidina, serina i leucina

[Hayasaka i al. 1996]. No obstant, no s'obtenen els mateixos resultats quan s'analitza la variació del genoma nuclear. Els polimorfismes de proteïnes [Melnick i al. 1986] i les seqüències de dos introns del gen *NRAMP1* [Deinard i Smith 2001] mostren que el macac rhesus és una espècie genèticament homogènia encara que molt semblant a les altres espècies del seu grup [Deinard i Smith 2001]. En el macac japonès el genoma mitocondrial mostra majors diferències entre poblacions que el genoma nuclear [Hayasaka i al. 1986; Nozawa i al. 1991].

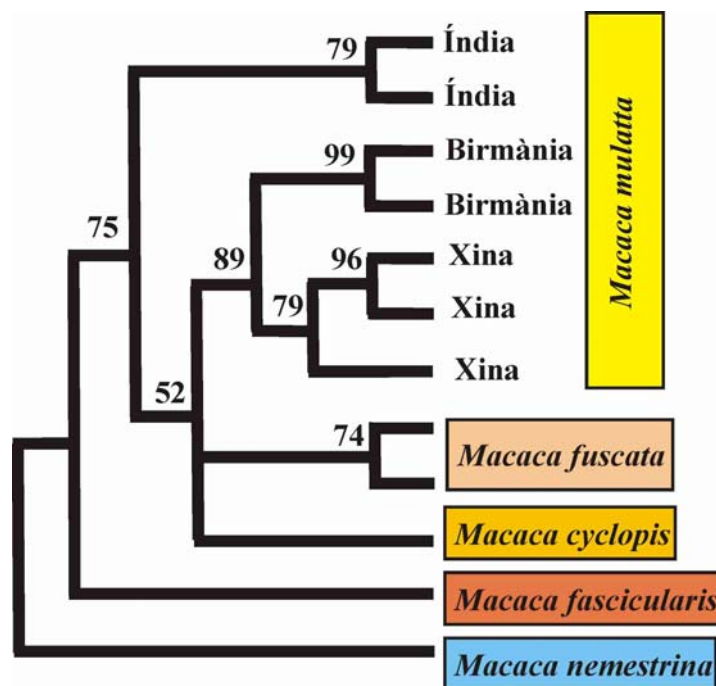


Figura 5.2: Relacions filogenètiques entre les diferents espècies de macacs del grup “Fascicularis” a partir de la digestió del genoma mitocondrial amb enzims de restricció realitzada per Melnick i al. [1993]. Segons aquests resultats els macacs rhesus xinesos i birmanesos estarien filogenèticament més emparentats amb els macacs japonès i de Taiwan que amb els rhesus de l’Índia.

L’explicació a les discrepàncies entre els resultats obtinguts a partir dels dos genomes es troba en els diferents patrons de dispersió que presenten els mascles i les femelles. A la majoria d’espècies de macacs, els mascles abandonen el seu grup natal abans d’arribar a la maduresa sexual mentre que les femelles presenten un comportament filopàtric molt accentuat [Pusey i Packer 1987]. A causa de la dispersió dels mascles la variació en el genoma nuclear s’homogenitza al llarg del territori. D’altra banda, les diferents variants del genoma mitocondrial queden restringides localment ja que s’hereten per via materna. Gràcies a això, el genoma mitocondrial es

pot utilitzar per estudiar esdeveniments biogeogràfics ancestrals així com la història biològica de grups d'espècies de macacs evolutivament semblants, malgrat que no és una representació real de la distribució de tota la variabilitat genètica d'una espècie [Melnick i al. 1993].

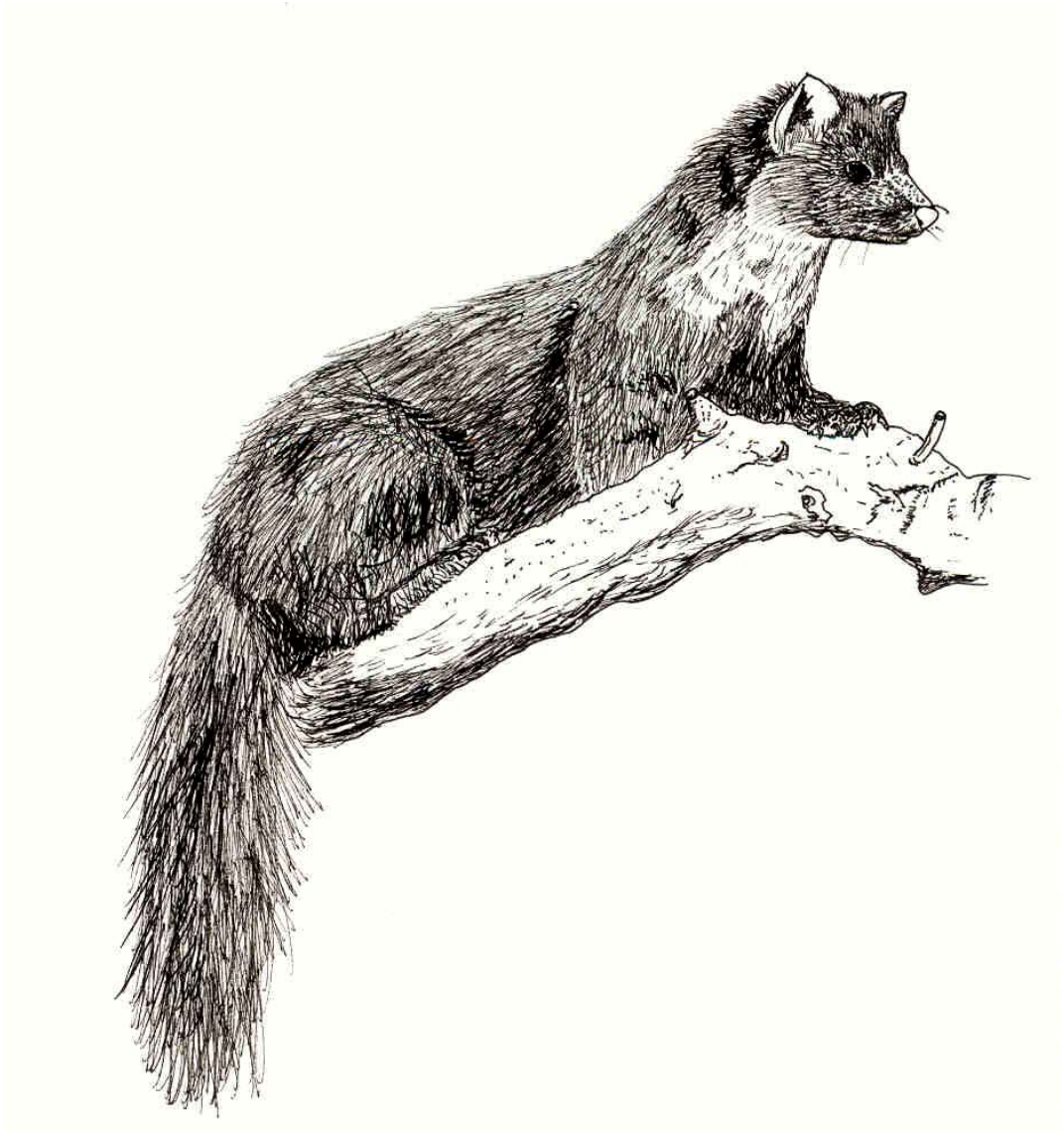
Complementant la informació aportada pels dos genomes amb l'aportada per la paleogeografia s'ha reconstruït la història biològica dels macacs rhesus en els últims centenars de milers d'anys [Melnick i al. 1993]. Durant el Plistocè es va formar una capa de gel a la vall del riu Brahmaputra, que travessa la província índia d'Assam i Bangladesh i que va separar les poblacions de rhesus que es trobaven a l'est i a l'oest d'aquesta vall. Aquests dos grups van quedar aïllats durant milers d'anys i això ha quedat marcat en el genoma mitocondrial d'aquesta espècie, molt de temps després que desaparegués el gel de la vall, com a conseqüència del comportament sedentari de les femelles. En canvi, una vegada que el gel es va retirar els mascles van dispersar-se, homogenitzant generació rera generació la variació del genoma nuclear entre tots dos costats de la vall. El genoma mitocondrial també ha revelat que el macac de Taiwan i el japonès van divergir de poblacions xineses de macac rhesus durant el Plistocè Mitjà, fa entre 700.000 i 600.000 anys, després de la separació dels dos llinatges de rhesus esmentats abans [Delson 1980; Melnick i al. 1993; Hayasaka i al. 1996].

5.4 Els macacs rhesus i japonès

Actualment el macac rhesus habita parcialment o totalment els següents països del sud d'Àsia: Afganistan, Pakistan, Índia, Nepal, Butan, Xina, Bangladesh, Birmània, Tailàndia, Laos i Vietnam [Fooden 2000]. El límit nord de la seva distribució està determinat per factors fisiogràfics o climàtics (l'Himàlaia, l'altiplà del Tibet, la transició de clima mesotèrmic a microtèrmic a la Xina) i el seu límit sud per la competència amb el macac coronat, *Macaca radiata*, a l'Índia i el macac menjador de crancs a Indoxina [Fooden 2000]. El rhesus és una espècie molt adaptable ja que habita llocs dominats per diferents condicions climàtiques (des de tropicals a temperades, però també se'l pot trobar en regions àrides i subalpines); diferents tipus de boscos (de coníferes, planifolis, mixtes); diferents altituds (normalment entre els 0 i 500 metres, en alguns casos fins als 2.500 metres i excepcionalment fins als 4.500 metres); àrees humanitzades (prop de camps de conreu, temples, pobles i fins i tot ciutats) [Lindburg 1971; Fooden 2000]. La coloració del seu pelatge és força característica ja que esdevé vermellosa a la part posterior del seu dors mentre que a la resta del cos varia entre gris groguenc i marró or.

Al llarg de la seva àrea de distribució el rhesus mostra una moderada variació en diferents caràcters morfològics com per exemple la mida, la longitud de la cua o el color del pelatge. D'acord amb aquesta variació, diferents autors han proposat la divisió de l'espècie en diferents subespècies. Wang i Jiang [1995] en proposen set: *mulatta* al Nepal; *lasiotus*, *tcheliensis*, *vestitus*, *littoralis* i *brevicaudus* a la Xina; i *siamica* a Tailàndia. El macac rhesus està catalogat dins de la categoria de baix risc d'extinció però en un futur proper pot passar a considerar-se espècie amenaçada [Macdonald 2001]. A les darreres dècades els seus efectius han disminuït notablement en països com l'Índia o la Xina a causa de la destrucció de l'hàbitat, del comerç i dels canvis culturals. Per exemple, en moltes regions de l'Índia, i com a conseqüència de l'escassetat d'aliments, ha passat de ser un animal sagrat a considerar-se una amenaça per les collites i una plaga que cal eliminar [Nowak 1991].

El macac japonès és el primat no humà que habita latituds més septentrionals. És una espècie restringida dins de l'arxipèlag del Japó a les illes de Honshu, Shikoku i Kyushu, a més a més d'illes petites properes a aquestes illes principals com per exemple Awajishima i Yakushima, on habita els boscos temperats i plujosos [Nowak 1991]. Malgrat tenir una àrea de distribució notablement més reduïda que la del macac rhesus, el macac japonès s'ha adaptat a una àmplia varietat de condicions climàtiques. El nord i el centre de la seva àrea de distribució estan dominats per un clima temperat amb temperatures que poden variar des dels -15°C a l'hivern fins als 23°C a l'estiu [Wada 1980] mentre que la part més meridional (l'illa de Yakushima) està dominada per un clima subtropical temperat [Azuma 1985]. El macac japonès es caracteritza per tenir barba, patilles llargues i el pelatge dens i llarg [Nowak 1991]. Actualment hi ha dues subespècies descrites, *Macaca fuscata yakui* que habita l'illa de Yakushima, i *Macaca fuscata fuscata* que habita la resta d'illes. El macac japonès està catalogat com a espècie amenaçada dins de l'Acta d'Espècies Amenacades dels Estats Units (US ESA) i la subespècie de l'illa de Yakushima està en perill d'extinció segons la Unió Internacional per la Conservació de la Natura (UICN). Diferents estudis de variabilitat genètica intraespecífica, però, posen en dubte la classificació del macac de Yakushima com una subespècie diferent [Hayasaka i al. 1986; Nozawa i al. 1991]. A les últimes dècades s'ha observat que el nombre d'individus d'aquesta espècie, sobretot a Yakushima, ha disminuït apreciablement a causa de la desforestació, captura i persecució per part dels agricultors pels danys que causen a les seves collites [Sprague i Maruhashi 1994].



OBJECTIUS

64- OBJECTIUS

A grans trets aquesta tesi tracta sobre el paper que tenen la sistemàtica molecular i la filogeografia en la clarificació de la taxonomia, la reconstrucció de la història evolutiva i la conservació de la biodiversitat. Per il·lustrar-ho el treball experimental ha estat centrat en dos grups de mamífers de gran interès conservacionista com són els mustèlids i els macacs. Tot seguit estan enumerats els principals objectius d'aquest treball.

1. *Reconstruir filogènies i clarificar taxonomies a nivell interespecífic.*

Mitjançant la utilització de múltiples seqüències completes del gen citocrom *b* per espècie, sempre que ha estat possible, s'ha proposat resoldre les relacions filogenètiques entre els llinatges més recents i moderadament més antics de la família "Mustelidae". Amb les seqüències nuclears que flanquegen el locus *Mel08* - les quals presenten una baixa saturació de mutacions - soles o combinades amb seqüències parcials del gen citocrom *b*, s'ha intentat resoldre les relacions filogenètiques entre els llinatges més antics ja que en aquest nivell el gen citocrom *b* sovint està saturat de mutacions recurrents. A partir dels resultats obtinguts s'han proposat canvis en la taxonomia consistents en les relacions filogenètiques dels diferents llinatges i la formació de grups monofilètics.

2. *Clarificar taxonomies a nivell intraespecífic*

Mitjançant els estudis filogeogràfics s'ha proposat clarificar la confusa taxonomia d'una espècie d'àmplia distribució euroasiàtica com és el teixó, així com de l'amenaçada població de macac japonès de l'illa de Yakushima.

3. *Estudiar processos de divergència i diferenciació genètica ocorreguts en mamífers de distribució euroasiàtica durant el Plistocè*

Per una banda s'ha estudiat la divergència recent d'espècies incloses dins dels gèneres *Mustela* i *Martes*, la diferenciació genètica intraespecífica en el teixó i finalment el procés d'especiació al·lopàtrica del macac japonès. En aquestes dues últimes espècies les femelles són altament filopàtriques, per tant l'ús de la regió control de l'ADN mitocondrial com a marcador genètic pot aportar interessants dades sobre la seva història evolutiva. A partir d'aquí s'ha estudiat el paper que han tingut les diferents

barreres geogràfiques (serralades, deserts, mar) existents en aquests dos continents així com les oscil·lacions climàtiques ocorregudes durant el Plistocè i les seves conseqüències (glaceres, pujades i baixades del nivell del mar) en la diferenciació d'aquestes espècies.

4. Explorar l'aplicació dels resultats obtinguts a la gestió d'espècies i poblacions d'elevat interès conservacionista o que estiguin en perill d'extinció.

Mitjançant els estudis filogenètics i filogeogràfics hem identificat llinatges antics, grups monotípics, grups que es troben en procés de divergència i clades diferenciats a nivell intraespecífic. També s'ha explorat l'aplicació de dos dels marcadors genètics utilitzats, la regió control i un fragment del gen citocrom *b* en el seguiment del comerç de brotxes d'afaitar de luxe presumiblement fetes amb pèl de teixó.



RESULTATS

Capítol I

Phylogeny, Evolutionary History and Taxonomy of the Mustelidae Based on Sequences of the *cyt b* Gene and a Complex Repetitive-flanking Region

**Josep Marmi, Juan Francisco López-Giráldez i Xavier
Domingo-Roura**

Zoologica Scripta (acceptat)

PHYLOGENY, EVOLUTIONARY HISTORY AND TAXONOMY OF THE MUSTELIDAE BASED ON SEQUENCES OF THE *CYT B* GENE AND A COMPLEX REPETITIVE-FLANKING REGION

J. Marmi, J.F. López-Giráldez, and X. Domingo-Roura

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

Running title: Phylogeny, evolution and taxonomy of the Mustelidae

Key words: Mustelidae, phylogeny, cytochrome *b*, flanking region

Corresponding author: Xavier Domingo-Roura, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 5422843, Fax: +34 93 5422802, xavier.domingo@upf.edu

Abstract

The Mustelidae is a diverse family of carnivores that includes weasels, polecats, mink, tayra, martens, otters, badgers and, according to some authors, skunks. Evolutionary relationships within the family are under debate at a number of different taxonomic levels, and incongruencies between molecular and morphological results are important. We analysed a total of 241 cytochrome *b* (*cyt b*) gene sequences and 33 sequences of a complex repetitive-flanking region from 33 different species to compile an extensive molecular phylogeny for the Mustelidae. We analysed these sequences and constructed phylogenetic trees using Bayesian and neighbor-joining methods that are evaluated to propose changes to the taxonomy of the family. The peripheral position of skunks in phylogenetic trees based on both loci suggests that they should be considered a separate family, Mephitidae. The subfamily Melinae is the basal group within the Mustelidae and trees based on the *cyt b* gene suggest that the American badger, *Taxidea taxus*, should be considered a separate monotypic subfamily, Taxidiinae. Otters classified within the genera *Lutra*, *Amblonyx* and *Aonyx* are grouped within the same clade in *cyt b* and combined partial *cyt b* and flanking region trees and show reduced levels of interspecific divergence, suggesting that they could be classified together under a single genus, *Lutra*. The Bayesian tree based on combined data from both loci supports the idea that subfamily Mustelinae is paraphyletic, since otters (subfamily Lutrinae) are included in this subfamily. Low levels of genetic divergence among European polecat, *Mustela putorius*, steppe polecat, *Mu. eversmannii*, and European mink, *Mu. lutreola*, suggest that these species could be considered subspecies within a single species, *Mu. putorius*. Our results are consistent with a rapid diversification of mustelid lineages in six different radiation episodes identified since the Early Eocene, the oldest events being the separation of subfamilies and the split of marten (*Martes*, *Gulo*) and weasel (*Mustela*) lineages in the Early-Middle Miocene. The separation of New World from Old World lineages and the split of the remaining genera are estimated to have occurred in Late Miocene. The most recent events have been the differentiation of species within genera and this probably occurred in four radiation episodes at the end of Late Miocene, Early Pliocene, Late Pliocene and Pleistocene epochs.

Introduction

The Mustelidae is a diverse and widespread family of carnivores consisting of approximately 65 species which are distributed across the majority of the New and Old Worlds (Nowak 1991). Extant members of the family Mustelidae are considered to be a monophyletic group on the basis of the loss of the carnassial notch on the upper fourth molar, the loss of the upper second molar and the enlargement of scent glands (Martin 1989; Bryant *et al.* 1993). However, there remains much debate regarding the phylogenetic relationships within and among subfamilies within this family. In the past, reports by Simpson (1945) and Stains (1984) were widely cited in textbooks on this subject (e.g. Nowak 1991). Stains (1984) assigned the 23 extant genera of mustelids to the five subfamilies defined previously by Simpson (1945): i) Mustelinae (weasels, mink, martens and wolverine): *Eira*, *Galictis*, *Ictonyx*, *Lyncodon*, *Mustela*, *Poecilictis*, *Poecilogale*, *Vormela*, *Martes* and *Gulo*; ii) Lutrinae (otters): *Aonyx*, *Enhydra*, *Lutra* and *Pteronura*; iii) Mellivorinae (honey-badger): *Mellivora*; iv) Melinae (true badgers): *Arctonyx*, *Meles*, *Melogale*, *Mydaus* and *Taxidea*; and v) Mephitinae (skunks): *Conepatus*, *Mephitis* and *Spilogale*.

The phylogenetic relationship between the skunks and other mustelids is the most controversial issue arising from this classification. Based on morphological characteristics, skunks have been described as a sister group to the badgers (Simpson 1945) and otters (Hunt 1974; Wozencraft 1989). However, these relationships may have been described on the basis of plesiomorphic character states, such as the unexpanded auditory bulla shared between skunks and otters (Dragoo & Honeycutt 1997).

Chromosomal data (Wurster & Benirschke 1968) and serum protein analyses (Ledoux & Kenyon 1975) have however indicated a remarkable difference between the skunks and the other species of the Mustelidae family. Differences were confirmed with the arrival of molecular data when analyses of the cytochrome *b* (*cyt b*) gene indicated that the skunks diverged before the rest of the mustelids (Ledge & Arnason 1996).

It is becoming accepted that the Mustelidae, as defined by Simpson, represents a paraphyletic group, with the skunks and the oriental stink badger (*Mydaus* spp.) forming a monophyletic clade. This clade has been referred as the Mephitidae family, separated from the rest of the Mustelidae and the monophyletic Procyonidae (Dragoo & Honeycutt 1997). Relationships involving the remaining subfamilies have also been debated. Willemsen (1992) concluded from fossil evidence that badgers and otters share a common ancestor, the genus *Mionictis*, an otter-like animal from the Miocene. However, more recent molecular evidence suggests that otters may be closer to mustelines than to badgers (Masuda & Yoshida 1994; Koepfli & Wayne 1998; Hosoda *et al.* 2000).

The monophyly of the subfamilies is also a matter of debate. Based on analyses of two mitochondrial genes (12S and 16S ribosomal RNAs) only the Lutrinae represent a monophyletic group (Dragoo & Honeycutt 1997). At the opposite extreme, Bininda-Emonds *et al.* (1999) combined phylogenetic information from morphological and molecular data to demonstrate that only badgers were polyphyletic. The monophyly of the Mustelinae is not supported by several other studies (e.g. Koepfli & Wayne 1998; Hosoda *et al.* 2000). The

Melinae clearly seem to be a polyphyletic group, the badger ecomorph having evolved at least three times within the Mustelidae (Bryant *et al.* 1993).

Most of the disagreements concerning phylogenetic positions and taxonomic status within the Mustelidae may be a consequence of a basal diversification at the origin of this family in which the major lineages split rapidly from one another. This argument was used to explain the lack of resolution among clades found in the subfamilies Lutrinae and Mustelinae (Koepfli & Wayne 1998). Fast radiation events occurring during the Miocene have also been reported in other mammalian families making it difficult to resolve the phylogenetic relationships and the taxonomy of taxa involved (e.g. Ursidae, Waits *et al.* 1999; Bovidae, Gatesy *et al.* 1997; Muridae, Martin *et al.* 2000).

The evolution of the *cyt b* gene is well characterised (Irwin *et al.* 1991) and this gene provides relevant phylogenetic information in moderately diverged species. Public databases contain a large number of mustelid *cyt b* sequences published in a number of reports. Our aim in this study was to resolve the main disagreements about phylogenetic relationships and taxonomy among the Mustelidae. In order to do this, we pooled all mustelid *cyt b* sequences published before December 2002 and complemented them with sequences, produced in our own laboratory, from the same region of relevant species to obtain an extensive molecular phylogeny for the mustelids. We included several individuals for certain species to increase the resolution and reliability of the dataset (e.g. Gagneux *et al.* 1999).

We explored phylogenetic relationships with neighbor-joining and Bayesian methods (Huelsenbeck & Ronquist 2001), and proposed

taxonomic changes accordingly. Many authors have warned that it may be desirable to use a combination of different genomes to guarantee the accuracy of phylogenetic inference (e.g. Kluge 1989). We combined *cyt b* mitochondrial and nuclear data from a highly variable and informative complex repetitive-flanking region in 17 relevant mustelid species to clarify the deepest evolutionary roots of the mustelid group.

Materials and methods

Sequence acquisition

We collected a total of 122 entire (1140 base pairs (bp)) and 105 partial (337 bp) sequences of the *cyt b* gene from GenBank/EMBL. These samples originated from 31 and 33 species respectively, these representing four different mustelid subfamilies (Mustelinae, Lutrinae, Melinae and Taxidiinae) and the skunk family (Mephitidae). Three species of procyonids (raccoon, *Procyon lotor*; olingo, *Bassaricyon gabbii*; and red panda, *Ailurus fulgens*), and one otarid (Antarctic fur seal, *Arctocephalus gazella*) were used as outgroups. In addition to data obtained from public databases, we sequenced 14 partial *cyt b* sequences and 33 *Mel08* flanking regions (*Mel08fr*). *Mel08* is a complex repetitive region which includes up to four different repetitive motives showing size variability in mustelids, skunks, procyonids, otarids and phocids (Domingo-Roura *et al.* unpublished data). This region was first described in the Eurasian badger, *Meles meles*, where it shows a GTG₂T₂C₂TG(CA)₆C₄AC₅AC(CA)₂G₂ repetitive motive (Domingo-Roura 2002). The species analysed are given in Appendices 1 and 2.

A fragment of 402 bp of the *cyt b* gene was amplified using primers L14724 (5' GATATGAAAACCATCGTTG 3') and H15149 (5' CTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3') (Masuda & Yoshida 1994). Twenty-five μ l PCR reactions consisted of 100 ng of target DNA, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 67.0 mM Tris – HCl (pH = 8,8), 0.01% Tween-20, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM of each nucleotide, 1.7 pmol of each primer and 0.85 units of *Taq* DNA polymerase (Ecogen, Madrid, Spain). The program used for thermal cycling was: an initial cycle of denaturation at 94°C for 5 minutes, 30 cycles divided in three steps of one minute each at 94°C (denaturing), 49°C (annealing) and 72°C (extension), and a final extension at 72°C for 5 minutes.

Mel08 complex repetitive region was amplified using primers *Mel08* F (5' CTGCCCTTAACTGTAGTC 3') and *Mel08* R (5' CCTTACCATCCATCAGCTTC 3') (Domingo-Roura 2002). PCR reaction conditions were as described for *cyt b* gene amplification and the program used for thermal cycling was: an initial cycle of denaturation at 94°C for 3 minutes, 32 cycles divided in three steps of 45 seconds each at 94 °C (denaturing), 52 °C (annealing) and 72 °C (extension), and a final extension at 72°C for 5 minutes.

The amplification products were purified with GeneClean (Qbiogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced using dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Each reaction tube contained 4 μ l of PCR product, 1.9 μ l of H₂O, 1.6 pmol of primer and 2.5 μ l of Sequencing Kit in a total volume of 10 μ l. Sequencing reactions were precipitated and run in an ABI Prism 377TM automated DNA

sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Data analyses

Sequences were aligned using CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994) and double-checked visually. Sequences from both sides of the *Mel08* complex repetitive region were combined to obtain a total of 154 bp of nuclear sequence. *Mel08fr* sequences contained nucleotide deletions ranging from one to 16 bp in the skunks as well as in the outgroups, and these deletions were treated as a fifth mutational state. We computed the number of polymorphic sites and the number of synonymous and non-synonymous sites for the entire *cyt b* gene data set using DNASP v.3.51 (Rozas & Rozas 1999). We estimated the shape parameter (α) of the gamma distribution to correct for substitution rate heterogeneity across the sequence using MRBAYES v.2.01 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). The average number of substitutions, transitions and transversions between each pair of species, as well as the average number of substitutions within each species, were computed for each locus assuming the gamma corrected Tamura-Nei model and using MEGA v.2.1 (Kumar *et al.* 2001). This model, as with the other substitution models used in this work, assumes substitution rate differences between nucleotides and inequality of nucleotide frequencies (Tamura & Nei 1993). A recent report based on tree distances (also known as 'patristic distances') of complete *cyt b* sequences, suggested a reference mean value of 0.2 substitutions per site (or 0.1 substitutions per site per lineage) separating different genus (Castresana 2001). Even if the solely use of molecular data for taxonomic classification has

74- RESULTATS: CAPÍTOL I

been debated (Seberg *et al.* 2003) we also obtained a matrix of patristic distances, between pairs of species, from complete sequences of *cyt b* with the aim to discuss the application of this measure at the taxonomy of genera within the Mustelidae. In this case we assumed the HKY model (Hasegawa *et al.* 1985), using a discrete gamma distribution with six rate categories, and a neighbor-joining tree with branch lengths further optimised by maximum likelihood. See Castresana (2001) for further details. The number of transitions was plotted against the number of transversions, to see the level of transitional saturation of sequences for both loci. In addition, a Mantel's test was performed between matrices of transitions and transversions using ARLEQUIN ver.2.000 (Schneider *et al.* 2000). We included and excluded skunks to obtain a correlation coefficient.

Phylogenetic analyses were performed for the entire *cyt b* data set. A neighbor-joining tree was constructed using the DNADIST – assuming the F84 model (Felsenstein & Churchill 1996), gamma-distributed rates across sites, and a transition/transversion ratio equal to 7.8 as estimated in Koepfli & Wayne 1998)– and NEIGHBOR programs. Bootstrap values were obtained from 1,000 replications using SEQBOOT, and the consensus tree was obtained with CONSENSE. All these programs are included in PHYLIP v.3.6a3 (Felsenstein 2002). A Bayesian tree was constructed with MRBAYES using the following parameters: “lset nst = 6” (the general time reversible (GTR) model); “sitepartition = bycodon” (partition is defined for each base position within codons); “rates = ssgamma” (specific gamma-distributed rate variation for each partition); and “basefreq = estimate” (estimated proportion of base types from the data). In the Monte Carlo process four

chains ran simultaneously for 1,200,000 generations. Trees were sampled every 100 generations for a total of 12,000 trees in the initial sample. The “stationarity” was determined to have occurred by the 2,000th tree and therefore “burnin” was completed by this stage (i.e. the first 2,000 trees were discarded). The whole procedure was repeated three times and the tree topologies obtained were the same.

To support the deepest evolutionary roots of the mustelids we estimated a Bayesian tree for *Mel08fr* sequences, assuming the same parameters as used for the *cyt b* gene, but without partition and using “rates = gamma” (gamma-distributed rate variation). In addition, we repeated the analysis using combined data from these two independent loci. We obtained partial consensus *cyt b* sequences with BIOEDIT Sequence Alignment Editor v.5.0.9 (Hall 1999). We tested these *cyt b* sequences and the *Mel08fr* sequences for congruence using the partition homogeneity test (Farris *et al.* 1995) in PAUP v.4.0b10 (Swofford 2002). This involved 1,000 replicates and the heuristic search option with a simple addition sequence. The phylogenetic relationships of taxa included in the analysis of combined loci were also estimated by Bayesian inference as in the *cyt b* analysis, except that in this case “sitepartition = bygene” (partition is defined by locus).

In the *cyt b* gene, third-position transversions accumulate approximately linearly with time for up to 80 million years or more (Irwin *et al.* 1991). Therefore, we used the mean pairwise divergence of third-position transversions among mustelid taxa, and calibrated the rate of substitution with the divergence time between mustelids and procyonids. We estimated divergence time among mustelid lineages following Koepfli &

Wayne (1998) except that we did not calibrate the molecular clock with genus *Mustelavus* since it has been lately proposed that this genus is neither a mustelid nor member of the mustelid-procyonid clade (Wolsan 1999). Instead we based divergence times on the oldest mustelid and procyonid fossils known, *Plesictis*, dated at 24.3 Million Years Ago (MYA) and *Pseudobassaris* dated at 28.5 MYA respectively (Wolsan 1999), and suggests a rate of 0.67% third position transversions per million years.

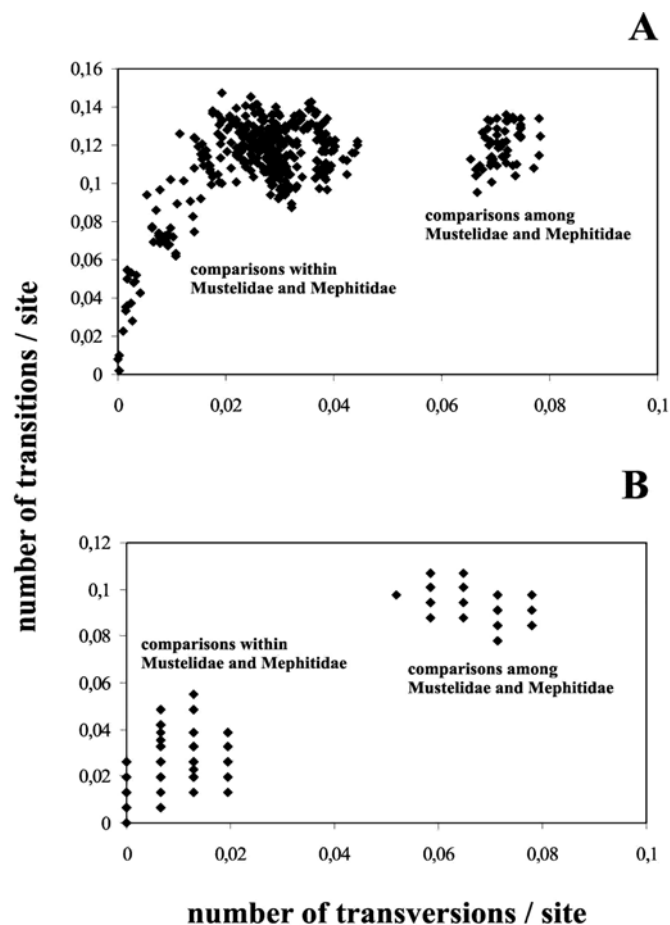
Results

Sequence variability

The entire *cyt b* gene (1140 bp) had 552

(48.4%) variable sites, of which 495 (43.4%) were maximum parsimony informative within the Mustelidae including skunks. If skunks were removed, the number of variable sites decreased to 534 (46.8%). The mean ratio of synonymous and non-synonymous substitutions for pairwise comparisons was 7.9. Plots of the number of transitions against the number of transversions showed that transitions reached saturation quickly in pairwise comparisons among mustelid species (Fig. 1A). The plateau of transitional saturation was around 0.12 transitions per site. The upper limit of transversions among mustelids was near 0.05, whereas in comparisons among mustelids and skunks the number of transversions ranged between 0.06 and 0.08. Mantel's test gave a higher correlation

Figure 1. Plots of the number of transitions per site against the number of transversions per site to detect transitional saturation for: (A) the complete *cyt b* gene; and (B) the *Me108fr*.



76- RESULTATS: CAPÍTOL I

coefficient between transitions and transversions excluding skunks ($r = 0.63$) rather than including them ($r = 0.41$), although in both cases this correlation was highly significant ($P < 0.001$). The shape parameter (α) was equal to 0.23.

Mel08fr (154 bp) showed 43 (27.9%) variable sites when skunks were included and 23 (14.9%) when they were not. Of the 43 variable sites, 33 (21.4%) were maximum parsimony informative. Numbers of transitional and transversional differences in comparisons among mustelids and skunks were higher than in comparisons within mustelids (Fig. 1B). This locus did not show transitional saturation. The correlation coefficient between transitions and transversions when skunks were excluded was equal to 0.4 ($P < 0.001$), whereas when skunks were included it rose to 0.92 ($P < 0.001$). The shape parameter for this locus was equal to 2.03. The combined *cyt b-Mel08fr* alignment consisted of 491 bp with 132 maximum parsimony informative polymorphic sites within the

Mustelidae including skunks. The partial *cyt b* gene and the *Mel08fr* region had 29% and 21% maximum parsimony informative polymorphic sites respectively. The shape parameter for the combined loci was equal to 0.32.

Ranges and values of sequence divergence were obtained for the two loci for comparisons at different taxonomic levels (Table 1) and for comparisons between pairs of species (Tables 2 and 3). The range of intraspecific sequence divergence was very large. Yellow-throated marten, *Martes flavigula*, showed the highest level of intraspecific divergence due to the high number of polymorphic sites found between sequences obtained by Kurose *et al.* (1999) and Hosoda *et al.* (2000). For *Mel08fr*, only the Eurasian badger, *Meles meles*, and the eastern spotted skunk, *Spilogale putorius*, showed intraspecific variation (0.7% of sequence divergence), but few individuals were analysed per species.

Table 1 Percentage of sequence divergence based on pair-wise comparisons within the Mustelidae. Comparisons were made at different taxonomic levels using gamma corrected Tamura-Nei distances for the complete *cyt b* gene and for *Mel08fr*. Since we found that *Ma. pennanti*, *G. gulo*, *Am. cinereus*, *Ao. capensis*, *Me. meles* and *Arctonyx collaris* each had an unclear taxonomic status, these species were excluded from intergeneric and intrageneric comparisons within subfamilies. Abbreviations: NA, not available.

Taxonomic level	<i>cyt b</i>		<i>Mel08fr</i>	
	Mean	Range	Mean	Range
Overall Mustelidae	35.6	0.2-63.8	3.7	0.0-7.5
Between subfamilies	44.4	34.0-53.0	5.2	4.0-6.0
Between genera	41.9	25.6-59.0	4.3	0.7-7.5
Between genera within Mustelinae	27.7	NA	4.9	NA
Between genera within Lutrinae	40.8	25.6-55.8	2.3	0.7-3.4
Between species within genus <i>Mustela</i>	15.2	0.2-37.0	1.2	0.0-2.7
Between species within genus <i>Martes</i>	12.3	2.8-25.0	0.9	0.7-1.4
Between species within genus <i>Lutra</i>	27.0	NA	NA	NA
Between species within genus <i>Lontra</i>	14.7	7.7-19	NA	NA

Table 2 Percentage of mean *cyt b* gene sequence divergence, based on gamma corrected Tamura-Nei distances for 1140 bp, among species (below diagonal) and within species (diagonal). Species marked with an asterisk (*) and values within parentheses are based on 337 bp. *Cyt b* patristic distances based on one sequence of 1140 bp per species are above the diagonal. Abbreviations: see Appendix 1 for full species names; NA, not available.

	<i>Mama</i>	<i>Mazi</i>	<i>Mame</i>	<i>Maam</i>	<i>Mafo</i>	<i>Mafl</i>	<i>Mape</i>	<i>Gugu</i>	<i>Muev</i>	<i>Mulu</i>	<i>Mupu</i>	<i>Mung*</i>	<i>Musi</i>	<i>Muit</i>	<i>Mual</i>	<i>Muni</i>	<i>Muer</i>	<i>Muvi</i>	<i>Mufr*</i>	<i>Lulu</i>	<i>Luma</i>	<i>Anci</i>	<i>Aoca</i>	<i>Enlu</i>
<i>Mama</i>	1.1(0.7)	2.9	3.0	5.7	9.2	10.5	19.4	17.8	22.3	22.1	22.7	NA	22.4	22.3	22.7	23.1	21.4	24.7	NA	23.0	23.5	25.3	23.9	22.9
<i>Mazi</i>	2.8	0.7(1.1)	4.3	7.0	10.5	11.9	20.7	19.1	23.6	23.4	24.0	NA	23.7	23.6	24.0	24.4	22.7	26.0	NA	24.3	24.8	26.6	25.2	24.3
<i>Mame</i>	3.6	4.9	0.7(0.3)	5.1	8.7	10.0	18.8	17.2	21.8	21.6	22.1	NA	21.8	21.8	22.2	22.5	20.8	24.1	NA	22.4	23.0	24.7	23.3	22.4
<i>Maam</i>	6.9	7.8	6.1	1.8(1.2)	10.9	12.2	21.1	19.5	24.0	23.8	24.3	NA	24.0	24.0	24.4	24.7	23.0	26.3	NA	24.6	25.2	26.9	25.5	24.6
<i>Mafo</i>	12.0	13.8	11.9	14.1	2.2(1.4)	13.8	22.7	21.1	25.6	25.4	26.0	NA	25.7	25.6	26.0	26.4	24.7	28.0	NA	26.3	26.8	28.6	27.2	26.2
<i>Mafl</i>	18.1	20.2	15.9	21.4	25.0	5.6(22.6)	19.1	17.5	22.1	21.9	22.4	NA	22.1	22.1	22.5	22.8	21.1	24.4	NA	22.7	23.3	25.0	23.6	22.7
<i>Mape</i>	29.7	32.6	27.9	32.2	31.1	36.0	0.06(0.0)	20.9	24.9	24.7	25.3	NA	25.0	24.9	25.3	25.7	24.0	27.3	NA	25.6	26.1	27.9	26.5	25.5
<i>Gugu</i>	28.8	29.9	28.3	32.3	31.0	28.3	34.7	0.8(2.2)	23.8	23.6	24.2	NA	23.9	23.8	24.2	24.6	22.9	26.2	NA	24.5	25.0	26.8	25.4	24.4
<i>Muev</i>	26.7	27.7	24.7	29.2	36.7	33.7	34.0	37.9	NA(0.7)	0.8	0.3	NA	4.0	6.3	11.9	12.2	10.5	18.6	NA	22.1	22.6	24.4	23.0	22.0
<i>Mulu</i>	28.5	29.4	26.3	31.2	36.7	34.5	36.4	37.5	0.8	NA(0.3)	1.1	NA	3.8	6.1	11.6	12.0	10.3	18.4	NA	21.9	22.4	24.2	22.8	21.8
<i>Mupu</i>	26.4	27.3	24.4	29.0	36.4	33.7	33.7	37.5	0.2	1.1	0.4(0.7)	NA	4.3	6.7	12.2	12.6	10.8	19.0	NA	22.4	23.0	24.7	23.3	22.4
<i>Mung*</i>	22.8	24.2	17.2	26.1	19.8	27.6	27.8	27.7	2.7	2.7	3.2	NA(0.0)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Musi</i>	30.0	32.2	27.0	30.9	35.7	37.5	35.0	42.1	4.5	4.3	4.7	4.5	0.6(1.1)	6.4	11.9	12.3	10.6	18.7	NA	22.1	22.7	24.5	23.0	22.1
<i>Muit</i>	31.4	32.5	30.8	36.9	35.7	35.8	31.0	35.0	8.3	7.3	8.2	6.2	7.3	NA(0.8)	11.9	12.2	10.5	18.6	NA	22.1	22.6	24.4	23.0	22.0
<i>Mual</i>	26.1	26.6	23.7	27.2	27.2	33.6	41.8	34.3	12.4	13.9	12.5	12.2	13.7	20.9	0.7(0.0)	8.5	9.5	19.0	NA	22.5	23.0	24.8	23.4	22.4
<i>Muni</i>	30.1	29.5	24.8	31.3	30.3	39.1	36.2	34.1	12.9	12.7	12.9	7.4	13.2	13.9	11.0	0.6(0.7)	9.9	19.4	NA	22.8	23.4	25.1	23.7	22.8
<i>Muer</i>	25.2	26.1	23.0	26.9	29.5	29.1	27.9	30.3	14.1	13.9	14.2	10.2	13.5	13.3	12.0	13.2	2.4(2.1)	17.7	NA	21.1	21.7	23.4	22.0	21.1
<i>Muvi</i>	47.6	44.2	45.0	43.4	44.9	52.4	41.1	46.9	30.6	31.3	30.9	31.3	31.3	30.5	33.0	37.0	32.2	0.6(0.4)	NA	24.4	25.0	26.7	25.3	24.4
<i>Mufr*</i>	35.9	39.2	30.2	32.0	30.6	48.1	34.3	45.6	27.2	29.7	25.8	28.0	32.8	27.8	21.4	25.6	20.0	19.2	NA(NA)	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Lulu</i>	31.5	32.6	29.2	34.3	34.6	28.8	36.8	34.7	32.8	31.1	33.0	29.7	33.3	32.6	32.2	41.2	29.2	46.8	58.8	0.09(0.1)	18.3	16.2	14.8	18.4
<i>Luma</i>	35.1	37.4	32.6	39.5	31.4	40.7	40.5	42.5	35.7	35.1	35.9	23.8	36.8	33.3	30.9	30.5	29.3	48.8	45.8	27.0	NA(NA)	20.6	19.2	19.0
<i>Anci</i>	42.4	47.1	37.2	41.8	47.0	38.6	49.6	38.9	38.5	36.2	38.6	30.3	35.8	37.5	38.4	44.8	35.1	46.6	26.9	23.3	33.9	NA(0.3)	13.4	20.7
<i>Aoca</i>	34.6	32.2	33.4	35.1	38.3	38.6	36.7	28.5	33.5	32.9	33.8	25.2	30.6	30.4	40.5	39.2	29.5	46.0	41.8	22.9	34.6	20.2	NA(NA)	19.3
<i>Enlu</i>	36.9	39.6	32.8	38.3	32.2	40.8	31.9	36.6	30.0	29.1	29.9	19.1	33.4	29.8	34.8	32.2	24.5	37.6	37.9	25.6	30.0	32.1	25.3	0.06(0.1)
<i>Lofe</i>	44.2	46.5	41.3	42.0	45.9	43.1	44.4	49.6	40.9	41.4	40.9	30.1	38.6	41.3	46.1	44.7	34.4	49.3	35.9	31.6	44.4	35.8	37.1	42.9
<i>Lolo</i>	30.6	33.5	29.5	34.4	33.3	37.5	41.8	42.5	38.2	37.0	37.9	24.7	34.9	36.0	36.0	39.4	31.1	46.1	32.1	33.0	41.7	34.9	38.9	41.0
<i>Loca</i>	37.0	41.4	35.6	40.0	37.3	43.7	42.4	42.0	38.0	37.2	38.0	32.9	36.8	32.9	39.9	43.6	33.5	42.2	37.9	34.8	44.1	40.9	43.0	40.8
<i>Ptbr</i>	48.1	50.8	47.5	54.5	48.0	50.7	56.3	54.0	39.9	37.1	40.1	64.6	43.6	41.8	52.4	50.2	46.0	51.3	70.8	49.8	61.7	58.1	49.4	39.3
<i>Meme</i>	47.6	48.2	48.1	46.2	48.9	54.9	47.9	55.1	42.7	45.6	42.9	51.0	44.2	39.8	49.6	47.0	42.0	52.3	36.9	54.0	56.7	53.9	47.4	51.2
<i>Arco</i>	45.2	45.1	45.6	49.7	36.1	58.5	52.7	52.7	52.2	50.1	52.1	46.4	50.2	47.7	45.6	46.9	44.2	57.6	35.1	54.4	58.0	63.8	48.8	47.4
<i>Tata</i>	31.8	35.1	28.5	33.2	34.8	37.9	47.2	33.8	34.0	36.6	33.8	34.8	36.3	35.8	36.1	36.7	33.5	50.9	33.5	36.3	38.9	44.6	35.4	43.6
<i>Mppp</i>	74.0	77.6	73.9	69.6	72.5	71.0	79.1	59.9	60.4	58.7	60.3	55.0	61.9	48.8	56.7	69.3	72.8	63.8	41.7	66.2	81.1	65.9	77.8	65.0
<i>Sppu</i>	50.9	54.0	45.6	51.3	47.0	51.6	59.8	62.1	50.6	47.6	50.4	46.8	46.2	42.3	52.8	53.2	58.9	68.8	64.7	49.4	53.2	50.5	56.1	45.3

	<i>Lofe</i>	<i>Lolo</i>	<i>Loca</i>	<i>Ptbr</i>	<i>Meme</i>	<i>Arco</i>	<i>Tata</i>	<i>Mpmp</i>	<i>Sppu</i>
<i>Mama</i>	26.3	25.1	25.2	26.9	28.3	28.6	23.3	42.7	39.5
<i>Mazi</i>	27.6	26.4	26.6	28.2	29.6	29.9	24.6	44.0	40.8
<i>Mame</i>	25.7	24.5	24.7	26.4	27.7	28.1	22.7	42.2	38.9
<i>Maam</i>	27.9	26.7	26.9	28.6	29.9	30.3	24.9	44.4	41.1
<i>Mafo</i>	29.6	28.4	28.6	30.2	31.6	31.9	26.6	46.0	42.8
<i>Mafl</i>	26.0	24.8	25.0	26.7	28.0	28.4	23.0	42.5	39.2
<i>Mape</i>	28.9	27.7	27.9	29.5	30.9	31.2	25.9	45.3	42.1
<i>Gugu</i>	27.7	26.6	26.7	28.4	29.7	30.1	24.8	44.2	41.0
<i>Muev</i>	25.4	24.2	24.3	26.0	30.1	30.5	25.2	44.6	41.4
<i>Mulu</i>	25.1	24.0	24.1	25.8	29.9	30.3	24.9	44.4	41.1
<i>Mupu</i>	25.7	24.5	24.7	26.4	30.5	30.9	25.5	45.0	41.7
<i>Mung*</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Musi</i>	25.4	24.3	24.4	26.1	30.2	30.6	25.2	44.7	41.4
<i>Muit</i>	25.3	24.2	24.3	26.0	30.1	30.5	25.2	44.6	41.4
<i>Mual</i>	25.7	24.6	24.7	26.4	30.5	30.9	25.6	45.0	41.7
<i>Muni</i>	26.1	24.9	25.1	26.8	30.9	31.3	25.9	45.3	42.1
<i>Muer</i>	24.4	23.2	23.4	25.1	29.2	29.6	24.2	43.6	40.4
<i>Muvi</i>	27.7	26.5	26.7	28.4	32.5	32.9	27.5	46.9	43.7
<i>Mufr*</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Lulu</i>	24.3	23.1	23.3	26.7	30.8	31.1	25.8	45.2	42.0
<i>Luma</i>	24.8	23.7	23.8	27.2	31.3	31.7	26.4	45.8	42.6
<i>Amci</i>	26.6	25.4	25.6	29.0	33.1	33.5	28.1	47.6	44.3
<i>Aoca</i>	25.2	24.0	24.2	27.6	31.7	32.1	26.7	46.1	42.9
<i>Enlu</i>	24.2	23.1	23.2	26.6	30.7	31.1	25.8	45.2	42.0
<i>Lofe</i>	NA(NA)	6.1	12.4	29.9	34.1	34.4	29.1	48.5	45.3
<i>Lolo</i>	7.7	NA(NA)	11.2	28.8	32.9	33.3	27.9	47.4	44.1
<i>Loca</i>	19.0	17.5	NA(NA)	28.9	33.1	33.4	28.1	47.5	44.3
<i>Ptbr</i>	60.0	52.4	55.0	NA(NA)	34.7	35.1	29.7	49.2	45.9
<i>Meme</i>	48.7	51.1	56.9	59.0	4.4(4.4)	14.7	28.3	44.4	41.2
<i>Arco</i>	51.1	48.5	49.6	57.4	16.1	NA(NA)	28.7	44.8	41.6
<i>Tata</i>	45.9	46.9	47.8	46.4	53.0	53.4	NA(0.6)	42.8	39.5
<i>Mpmp</i>	77.3	78.5	71.7	78.6	85.8	86.4	66.1	NA(0.0)	20.2
<i>Sppu</i>	70.1	67.4	71.1	73.4	72.2	62.2	56.0	36.6	NA(0.3)

Table 3 Percentage of mean *Me/08fr* sequence divergence based on gamma corrected Tamura-Nei distances for 154 bp among species (below diagonal) and within species (diagonal).

Abbreviations: see Appendix 1 for full species names; NA, not available.

	<i>Mama</i>	<i>Mame</i>	<i>Mafo</i>	<i>Gugu</i>	<i>Mulu</i>	<i>Mupu</i>	<i>Mung</i>	<i>Mual</i>	<i>Muni</i>	<i>Muer</i>	<i>Lulu</i>	<i>Amci</i>	<i>Enlu</i>	<i>Loca</i>	<i>Meme</i>	<i>Mpmp</i>	<i>Sppu</i>
<i>Mama</i>	0.0																
<i>Mame</i>	0.7	NA															
<i>Mafo</i>	1.4	0.7	0.0														
<i>Gugu</i>	1.3	0.7	1.3	NA													
<i>Mulu</i>	4.9	4.2	4.9	3.4	NA												
<i>Mupu</i>	4.9	4.2	4.9	3.4	0.0	0.0											
<i>Mung</i>	4.9	4.2	4.9	3.4	0.0	0.0	NA										
<i>Mual</i>	4.8	4.1	4.8	3.4	1.3	1.3	1.3	NA									
<i>Muni</i>	6.3	5.6	6.3	4.8	1.3	1.3	1.3	1.3	NA								
<i>Muer</i>	4.8	4.1	4.8	3.4	1.3	1.3	1.3	2.7	2.7	0.0							
<i>Lulu</i>	4.1	3.4	4.1	2.7	2.0	2.0	2.0	2.0	3.4	3.4	0.0						
<i>Amci</i>	6.3	5.5	6.3	4.8	4.1	4.1	4.1	4.1	5.6	5.6	2.0	NA					
<i>Enlu</i>	4.8	4.1	4.8	3.4	2.7	2.7	2.7	2.8	4.1	4.1	0.7	2.7	NA				
<i>Loca</i>	5.5	4.8	5.6	4.1	3.4	3.4	3.4	4.9	4.8	3.4	2.7	4.8	3.4	NA			
<i>Meme</i>	6.0	5.3	6.0	4.5	5.3	5.3	5.3	5.2	6.7	6.8	4.5	6.7	5.3	7.5	0.7		
<i>Mpmp</i>	22.4	21.0	22.5	20.2	21.1	21.1	21.1	18.9	20.7	23.0	20.8	21.2	19.4	22.1	19.5	NA	
<i>Sppu</i>	22.2	20.8	22.3	19.9	20.8	20.8	20.8	19.9	21.8	22.8	20.6	20.9	19.2	21.9	19.2	3.8	0.7

80- RESULTATS: CAPÍTOL I

We evaluated the values of the patristic distances shown in Table 2 and how far these values were from the mean value of 0.2 substitutions per site (20% of sequence divergence), that is 0.1 substitutions per site per

lineage, obtained for different genera to explore the consistency of these distances with the current mustelid generic taxonomy and tree topologies obtained in this study. In general, patristic distances agree with current

Table 4 Estimates of divergence times in Million Years Ago (MYA) of radiations and lineage splits within the Mustelidae. These were based on third codon tranversions from complete *cyt b* gene sequences. Taxonomic changes proposed in this work were assumed to have defined divergence events, although in this table we use current nomenclature for taxa.

Divergence event	MYA
Late Eocene – Late Oligocene: Origin of Mustelidae	
Mustelidae + (Procyonidae, Mephitidae)	37-23
Early - Middle Miocene: Split of Mustelidae subfamilies, differentiation of first genera	
(Melinae, Taxidiinae) + (Lutrinae, Mustelinae)	20-12
Lutrinae + Mustelinae	15-8
Taxidiinae + Melinae	17-16
(<i>Gulo</i> , <i>Martes</i>) + <i>Mustela</i>	14-11
Late Miocene: Split of Old and New World lineages, differentiation of genera and most divergent species within genera	
<i>Lontra</i> + (other otter species)	10.6-7.5
<i>Pteronura</i> + (other otter species)	10.6-7.0
<i>E. lutris</i> + (<i>Lutra</i> , <i>Aonyx</i> , <i>Amblonyx</i>)	10.1-7.5
<i>Mu. vison</i> + (other <i>Mustela</i> species)	9.5-6.6
<i>Gulo</i> + <i>Martes</i>	8.6-5.8
<i>Ma. pennanti</i> + (remaining <i>Martes</i> species)	7.6-6.6
Late Miocene - Early Pliocene: Differentiation within genera	
<i>Lu. maculicollis</i> + (<i>Lu. lutra</i> , <i>Aonyx</i> , <i>Amblonyx</i>)	6.6-5.2
<i>Lu. lutra</i> + (<i>Aonyx</i> , <i>Amblonyx</i>)	5.7-4.5
<i>Ma. flavigula</i> + (remaining <i>Martes</i> species)	6.1-4.6
Early Pliocene: Differentiation within genera	
<i>Mu. erminea</i> + (remaining <i>Mustela</i> species)	4.8-3.0
(<i>Mu. nivalis</i> , <i>Mu. altaica</i>) + (remaining <i>Mustela</i> species)	4.0-3.4
<i>Aonyx</i> + <i>Amblonyx</i>	3.6
Late Pliocene: Differentiation within genera	
<i>Meles</i> + <i>Arctonyx</i>	3.3
<i>Ma. foina</i> + (<i>Ma. americana</i> , <i>Ma. zibellina</i> , <i>Ma. martes</i> , <i>Ma. melampus</i>)	3.1-2.2
<i>Lontra canadensis</i> + (<i>Lontra felina</i> , <i>Lontra longicaudis</i>)	2.4-1.9
Pleistocene: Differentiation within genera	
<i>Ma. americana</i> + (<i>Ma. zibellina</i> , <i>Ma. martes</i> , <i>Ma. melampus</i>)	1.8-0.9
<i>Lo. felina</i> + <i>Lo. longicaudis</i>	1.2
<i>Ma. melampus</i> + (<i>Ma. martes</i> , <i>Ma. zibellina</i>)	1.0
(<i>Mu. itatsi</i> , <i>Mu. sibirica</i>) + (<i>Mu. lutreola</i> , <i>Mu. eversmannii</i> , <i>Mu. putorius</i>)	0.7-0.4
<i>Mu. lutreola</i> + (<i>Mu. eversmannii</i> , <i>Mu. putorius</i>)	0.15

classification of genera within Mustelidae with most mustelid species classified within the same genus showing patristic divergences below 20% (Table 2). However, among the values that deviated more from this 20%, the wolverine, *Gulo gulo*, had an average sequence divergence of 18.7% in relation to marten species. Within the Lutrinae, the short-clawed otter, *Amblonyx cinereus*, and the Cape clawless otter, *Aonyx capensis*, showed average sequence divergences from species belonging to the genus *Lutra*, which ranged between 14.8 and 20.6%, and sequence divergence between the genera *Amblonyx* and *Aonyx* was 13.4%. Within the Melinae, sequence divergence between the genera *Meles* and *Arctonyx* was 14.7%.

We estimated divergence times of mustelid lineages based on *cyt b* third codon transversions and described six radiation episodes after the separation of the Mustelidae from the Procyonidae and Mephitidae (Table 4). We suggest that in a first episode, between the Early and the Middle Miocene, subfamilies and the oldest genera may have separated. The second radiation episode might have occurred during the Late Miocene when we estimate that Old and New World lineages, all genera, and the oldest lineages leading to the present species separated. In the remaining four episodes proposed to have occurred between the Late Miocene and the Pleistocene, the remaining lineages, which lead to the present species, may have separated.

Phylogenetic relationships

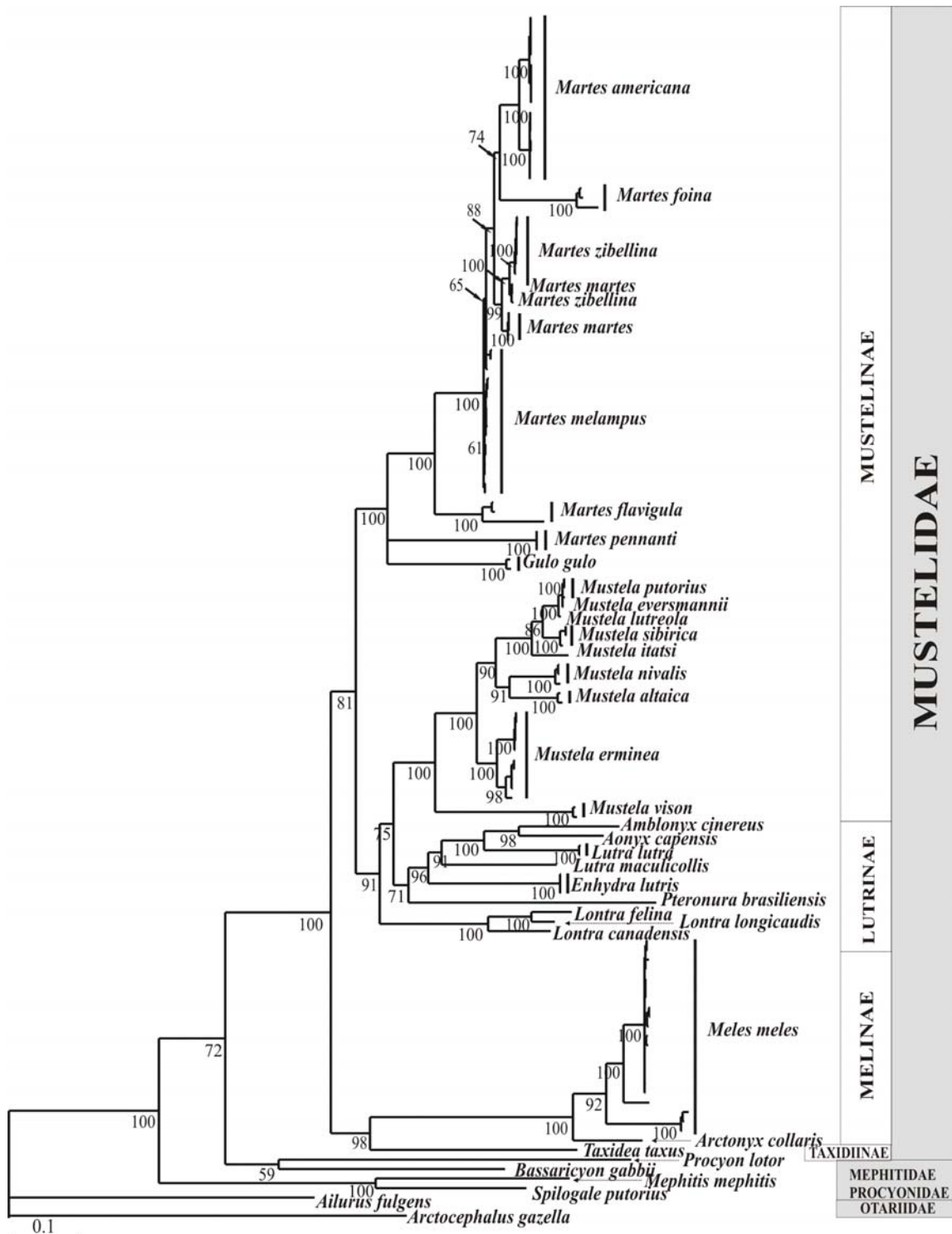
Entire cyt b gene data set. Terminal branches were longer than internal branches in both trees, although the resolution of internal branches was better in the Bayesian (Fig. 2) than

in the neighbor-joining tree (Fig. 3). The Bayesian tree also had deeper internodes supported by high clade credibility values. The two methods recovered the same clades within the Mustelidae, and skunks appeared either as sister group to the remaining clades including the Procyon-Bassaricyon clade (Fig. 2) or within the paraphyletic Procyonidae (Fig. 3). The monophyly of the Mustelidae, excluding skunks, was strongly supported by Bayesian inference (clade credibility value, CCV = 100%) and moderately supported by the neighbor-joining tree method (bootstrap value, B = 75%). The clade comprising Melinae and Taxidiinae subfamilies is the sister group of the rest of mustelid subfamilies. Both trees suggested that the Mustelinae was paraphyletic since it included subfamily Lutrinae, although statistical support for this grouping was low (CCV = 81%, B < 50%). In the Bayesian tree, the Lutrinae formed a clade with the genus *Mustela* (CCV = 91%), but this did not include the genera *Martes* or *Gulo* (Fig. 2). Within the Lutrinae, both methods clearly supported the monophyly of the genus *Lontra* (CCV = 100%, B = 100%) and the clade formed by *Lutra lutra*, *Am. cinereus* and *Ao. capensis*, as well as the separation of these three species from other otters (CCV = 100%, B = 86%). The nodes of the spot-necked otter, *Lutra maculicollis*, and the sea otter, *Enhydra lutris*, were more strongly supported by Bayesian inference, in which they were grouped together with *Lu. lutra*, *Am. cinereus* and *Ao. capensis* (CCV = 96%, Fig. 2).

Two clades were recognised within the Mustelinae, one for the genus *Mustela* and another for the genera *Martes* and *Gulo* together. The Bayesian tree showed that each one of these

82- RESULTATS: CAPÍTOL I

Figure 2. Bayesian tree obtained from complete *cyt b* sequences (1140 bp). Numbers indicate clade credibility values that exceeded 50%, as observed in 10,000 trees, and the ln likelihood was of -14,055.33.



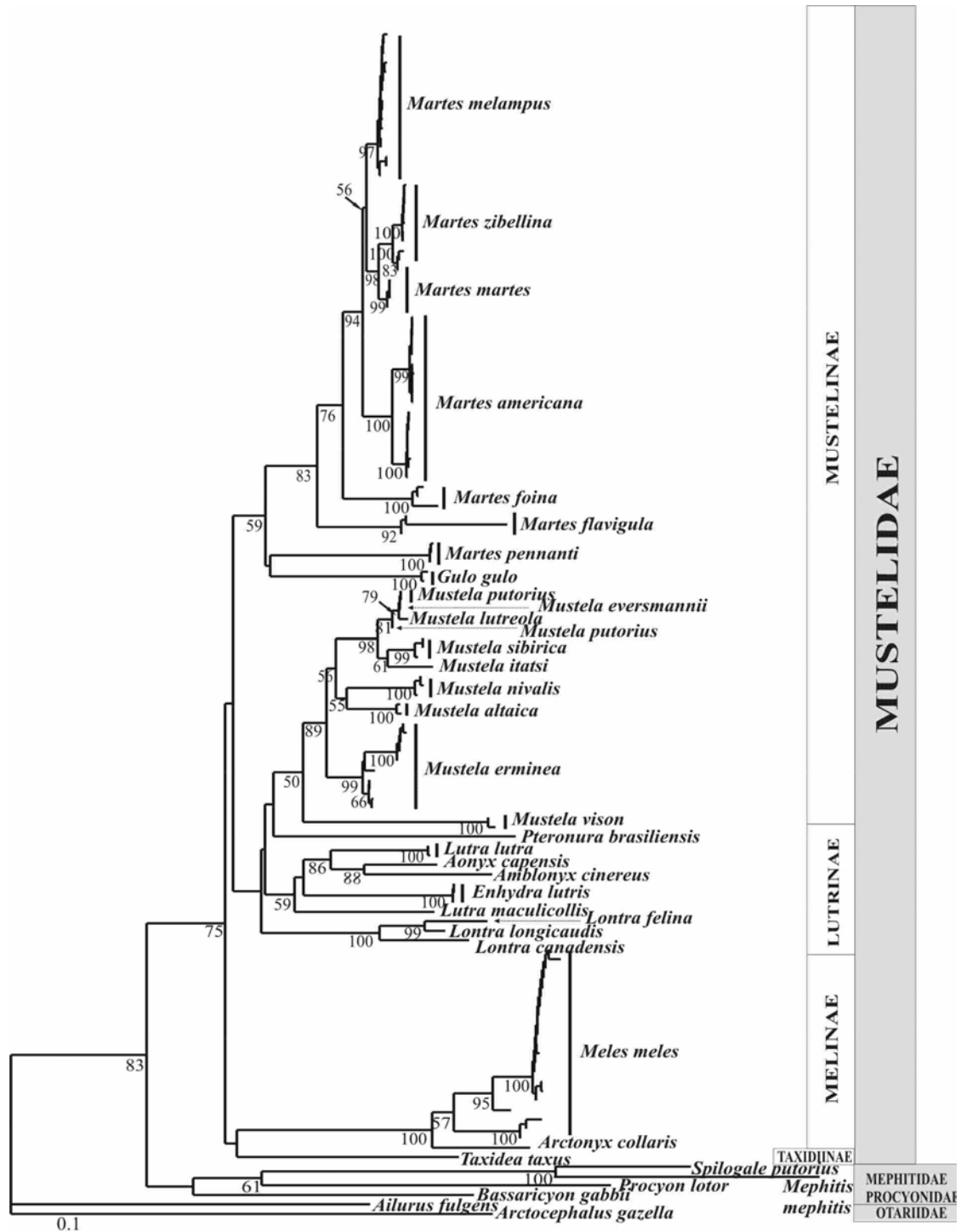
two clades was monophyletic (CCV = 100% in both cases). The nodes within the genus *Mustela* were more strongly supported by the Bayesian than by the neighbor-joining tree. The American

mink, *Mustela vison*, was the first species to diverge from the other members of this genus, followed by the ermine, *Mustela erminea*. The least weasel, *Mustela nivalis*, and the mountain

weasel, *Mustela altaica*, were identified as sister taxa (CCV = 91%, B = 55%), while the Japanese weasel, *Mustela itatsi* and the kolinsky, *Mustela sibirica* appeared as sister groups of the European mink, *Mustela lutreola*, the steppe polecat, *Mustela eversmannii*, and the European

polecat, *Mustela putorius* clade (CCV = 100%, B = 98%). These last three species were particularly closely related. Within the martens, four groups were distinguished: i) *G. gulo*; ii) the fisher, *Ma. pennanti*; iii) *Ma. flavigula* and iv) the beech marten, *Martes foina*, the American

Figure 3. Neighbor-joining tree obtained from complete *cyt b* sequences (1140 bp). Numbers indicate bootstrap values that exceeded 50%, as obtained from 1,000 iterations.



84- RESULTATS: CAPÍTOL I

marten, *Martes americana*, the pine marten, *Martes martes*, the sable, *Martes zibellina*; and the Japanese marten, *Martes melampus*. Bayesian analysis was not able to resolve the phylogenetic relationships within this last group of marten species.

Mel08fr and combined partial cyt b gene and Mel08fr data sets. The *P*-value resulting from the partition homogeneity test conducted with PAUP was 0.41, *P* = 0.05, indicating congruence between *cyt b* and *Mel08fr* data sets (Farris *et al.* 1995). Combined (Fig. 4A) and *Mel08fr* (Fig. 4B) trees were consistent with the exclusion of skunks from the mustelid clade, and in the monophyly of the remaining taxa included within the Mustelidae (CCV = 100% in both cases). The *Mel08fr* tree supported the monophyly of martens and the wolverine (genera *Martes* and *Gulo*, CCV = 100%) but was not able to resolve the remaining phylogenetic relationships within the Mustelidae. However, the combined data also provided strong support for a sister group relationship between the Lutrinae and the genus *Mustela*, and for the monophyly of the Lutrinae, martens including the wolverine and the genus *Mustela* (CCV = 100% in all cases).

Discussion

Usefulness of the cyt b gene and the Mel08fr region for clarifying phylogenetic relationships of the Mustelidae

The analysis of the *cyt b* gene is a commonly used tool for phylogenetic inference within carnivore families (e.g. Ursidae, Waits *et al.* 1999; Otariidae, Wynen *et al.* 2001). Within the Mustelidae, excluding skunks, the *cyt b* gene

strongly supports the monophyly of the basal and terminal clades (Fig. 2 and 3). However, the relationships among subfamilies or among some genera are not clearly resolved, possibly due to the effects of transitional saturation and/or fast radiation. In addition, *cyt b* sequence divergences including patristic distances should be used with caution in genera diagnosis because it is known that the *cyt b* gene evolves at different rates even within mammals and taxonomic changes proposed according to these distances should be effective only if agree with tree topologies and morphological synapomorphies.

In this study, the levels of sequence divergence show wide variations across the mustelid species (Tables 1 and 2). This could be due to some lineages leading to modern species being much older than others. However, other factors such as, differences in evolutionary rates, generation time, and selection could also result in wide variations in sequence divergence. In addition the family includes from highly endangered to widely distributed species and differences in effective population sizes are likely to be involved.

Repetitive flanking region sequences might show an adequate degree of conservation for PCR primers to amplify across species which diverged millions of years ago, and yet still be sufficiently variable to contain relevant phylogenetic information (e.g. Zardoya *et al.* 1996). In spite of its short length, *Mel08fr* has a high mutation rate. Alone, and when combined with *cyt b* data, *Mel08fr* shows good resolution at the basal level of the phylogeny. It supports the monophyly of the Mustelidae (Melinae, Lutrinae and Mustelinae) and the exclusion of skunks (Mephitidae) from the rest of the mustelids, but it fails to resolve some phylogenetic relationships within Mustelidae (Fig. 4).

Phylogenetic relationships and taxonomy among Simpsonian subfamilies

The classical division of the family Mustelidae into five subfamilies, as proposed by Simpson (1945), has not been supported by molecular data, especially regarding the skunks. Our results, based on *cyt b* transversional and *Mel08fr* transitional and transversional differences (Fig. 1), and on phylogenetic trees (Figs. 2, 3 and 4), support the assignment of skunks to the Mephitidae family, as has been proposed by other authors (e.g. Ledge & Arnason 1996; Dragoo & Honeycutt 1997). Once skunks are excluded, badgers remain external to the other two remaining subfamilies analysed in this study, the Lutrinae and the Mustelinae, which are sister groups. Phylogenetic trees suggest that the genus *Mustela* and the Lutrinae subfamily might share an ancestor, which is not common to the martens (Figs. 2 and 4), but further research combining different markers will be needed to confirm this.

Phylogenetic relationships and taxonomy within the Melinae.

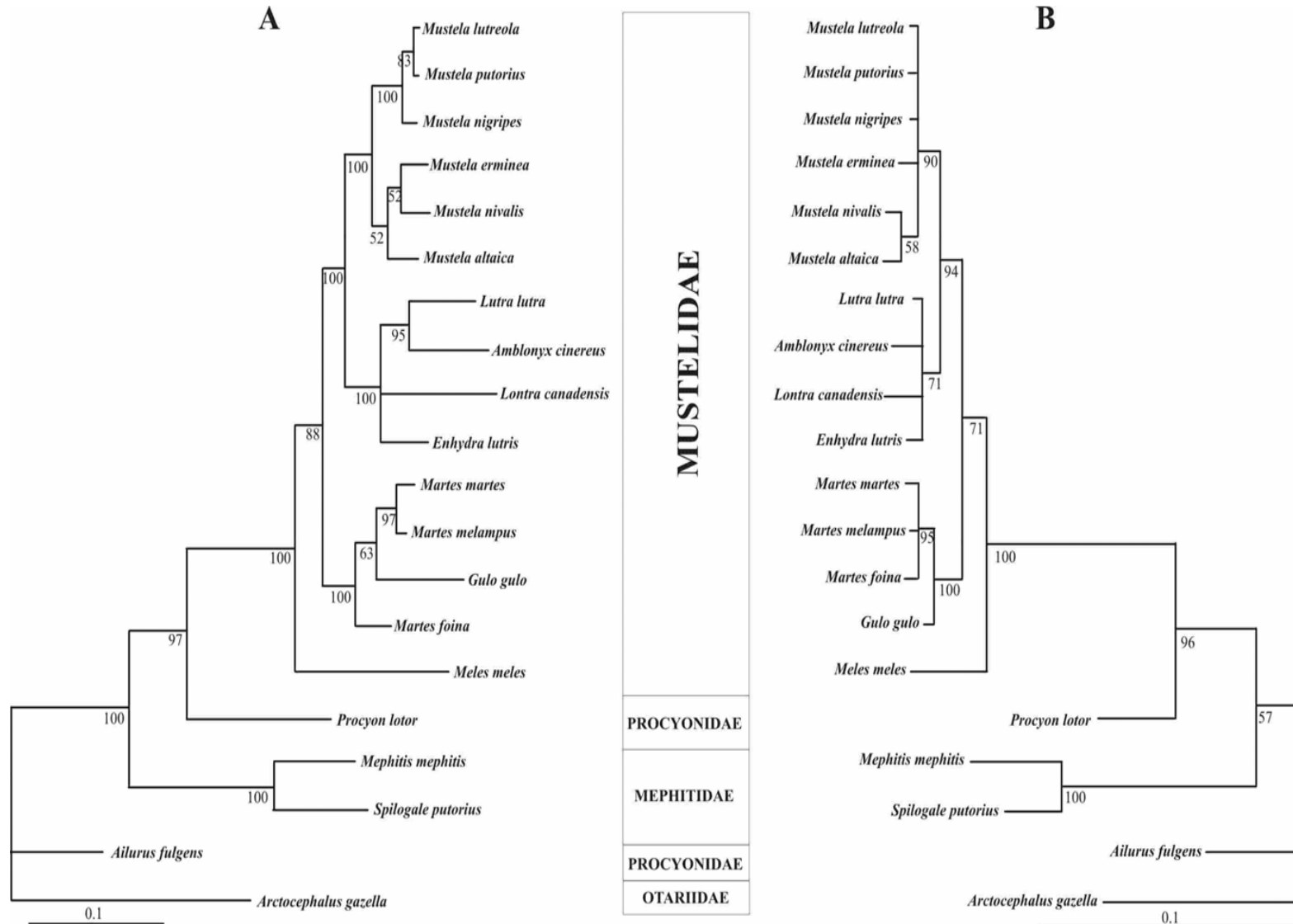
The monophyly of the Melinae has been supported by neither morphological (Bryant *et al.* 1993), nor molecular techniques (Dragoo & Honeycutt 1997), nor has it been upheld by combining these two sources of data (Bininda-Emonds *et al.* 1999). Classically, the American badger, *Taxidea taxus*, was classified within the subfamily Melinae. We found that *Taxidea* was not closely related to *Meles* or *Arctonyx* (Fig. 2 and 3), an observation which is consistent with the findings of authors that proposed the separation of *Taxidea* into a monotypic

subfamily, Taxidiinae (see Wozencraft 1993; Macdonald 2001). On the other hand, because genera *Meles* and *Arctonyx* formed a monophyletic group in the phylogenetic trees (Fig. 2 and 3) and both *cyt b* gene sequence divergence and patristic distances were low (Table 2), we suggest that these two genera may be classified within the same genus, *Meles*. We found significant levels of intraspecific sequence divergence in the *cyt b* gene within the Eurasian badger, *Me. meles*, (Table 2). These sequences belonged to individuals from different geographic origins (see Appendix 1) and formed three clusters which were strongly supported by high bootstrap values: (Europe)+(Central Russia)+(Japan) (Fig. 2 and 3). Based on *cyt b* sequences, Kurose *et al.* (2001) suggested that the Japanese badger (*Me. me. anakuma*) is a different subspecies from the continental badgers (*Me. me. meles*). Our study predicts the existence of three different subspecies, whereas several reports based on morphology propose the existence of two or three species of *Meles* (Baryshnikov & Potapova 1990; Abramov 2002).

Phylogenetic relationships within the Lutrinae.

Phylogenetic relationships within the Lutrinae were explored by Koepfli and Wayne (1998). They distinguished three monophyletic groups of otters containing the following genera: (*Lontra*)+(Lutra, *Aonyx*, *Amblonyx* and *Enhydra*)+(Pteronura). Our work includes sequences already analysed by these authors and nine additional otter *cyt b* sequences that confirm these three groups. These authors also suggested that the genus *Lutra* was paraphyletic, because the Eurasian otter, *Lu. lutra*, was more phylogenetically related with the genera *Amblonyx* and *Aonyx* than with its congeneric

Figure 4. Bayesian trees for combined loci: (A) partial *cyt b* gene (337 bp) and *Mel08fr* (154 bp); and (B) *Mel08fr* alone . Numbers indicate those clade credibility values that exceeded 50%, as observed in 10,000 trees. Values of ln likelihood were of -2,951.99 and -624.56 respectively.



species, the spot-necked otter, *Lu. maculicollis*. Our results based on *cyt b* gene trees (Fig. 2 and 3) and distances (Table 2) agree with the inclusion of *Lutra*, *Amblonyx* and *Aonyx*, and even *Enhydra*, within a single genus, *Lutra*.

Phylogenetic relationships and taxonomy within the Mustelinae.

Two clades were found within the subfamily Mustelinae, one containing the genera *Martes* and *Gulo*, and the other containing the genus *Mustela*. Genus *Martes* is divided into three subgenera (Anderson 1970). Phylogenetic trees based on *cyt b* sequences (Fig. 2 and 3) were consistent with subdivision of the genus *Martes* into subgenera *Charronia* (*Ma. flavigula*) and *Martes* (*Ma. foina*, *Ma. martes*, *Ma. zibellina*, *Ma. melampus* and *Ma. americana*). Neither of the trees based on *cyt b* sequences (Fig. 2, 3 and 4A) or values of sequence divergences or patristic distances (Table 2) justify the placement of *G. gulo* as a separate genus. Within the *Martes* subgenus, all members are closely related, with the possible exception of *Ma. foina*. Stone & Cook (2002) found polytomies within the subgenus *Martes* and were not able to resolve the phylogenetic relationships of their members. Similar results are reported in our present work (Fig. 2 and 3). These species maintain allopatric and parapatric distributions, and it has been suggested that they form a superspecies (Anderson 1970). However, none of the marten species are paraphyletic except *Ma. martes* and *Ma. zibellina*. These two species are not reproductively isolated and successful hybridization between them is possible (Grakov 1994).

Recently, the genus *Mustela* has been divided into nine subgenera according to skull structure, dentition, bacular structure and external characteristics (Abramov 2000). As a result, *Mu. erminea* and the long-tailed weasel, *Mustela frenata* were included within the subgenus *Mustela*. However, we propose that *Mu. frenata* should be excluded from this subgenus since this species and *Mu. erminea* are highly divergent compared with other pairs of *Mustela* species (Table 2). Abramov (2000) placed *Mu. sibirica* and *Mu. itatsi* in the subgenus *Kolonokus*. However, our phylogenetic trees based on the *cyt b* gene (Fig. 2 and 3) suggest that these two species, together with species in the subgenera *Putorius* (*Mu. putorius*, *Mu. evermannii* and the black-footed ferret, *Mustela nigripes*) and *Lutreola* (*Mu. lutreola*), should be included in the same subgenus. Our results are consistent with Abramov's (2000) assignment of *Mu. nivalis* and *Mu. altaica* to the subgenus *Gale*.

The genetic divergence among *Mu. putorius*, *Mu. evermannii* and *Mu. lutreola* is similar to, or less than, that found within other *Mustela* species (Table 2). Moreover, hybridization between pairs of these three species has been reported (Heptner *et al.* 1967; Ternovsky 1977; Davison *et al.* 2000). Thus, we think that these three species could be considered as subspecies of a single species, *Mu. putorius*. On the other hand, in our study *Mu. vison* was the most divergent species within *Mustela* but we found no support for classifying this species as a separate genus named *Neovison* as suggested by Abramov (2000).

Temporal mode of diversification of mustelid lineages

The fossil record suggests that between the Eocene and Early Oligocene epochs, diversification among the Mustelids resulted in the production of modern carnivore families (Anderson 1970). *Plesictis plesictis*, from the Late Oligocene of Cournon (France), is the oldest mustelid fossil known (Wolsan 1999). The first stage of Mustelid radiation occurred in the Old World, and at some point between the Early and Middle Miocene epochs all of the Mustelidae subfamilies that are known today became recognisable (Anderson 1970; Bryant *et al.* 1993). Our estimates of divergence times (Table 4) are either consistent with, or older than, predictions based on fossil evidence. This might be explained by the fact that, in general, gene evolution predates species evolution (Graur & Li 2000), and, moreover, the fossil record for the Mustelidae is incomplete for most lineages (Anderson 1989). We suggest at least six radiation episodes within the Mustelidae (Table 4), adding a further radiation (during the Pliocene) to those proposed by Hosoda *et al.* (2000).

We suggest that the mustelid subfamilies differentiated and that martens and weasels separated within the Mustelinae in the first radiation that we estimate that took place between the Early and the Middle Miocene. On the basis of fossil evidence, the first member of the Lutrinae may have been *Paralutra*, from the Early Miocene of Europe (Savage & Russell 1983). *Plesiogale* and *Paragale*, which have been placed in the same epoch and continent, have been considered early members of the Mustelinae (Wolsan 1993), whereas the earliest known marten, *Martes laevidens*, was found in the Early Miocene of Germany (Anderson 1994). *Dehmictis vorax* and *Trochictis artensis* from

the Early Miocene have been considered the earliest melines (Ginsburg & Morales 2000).

We propose that most New World lineages differentiated from Old World lines during the second radiation, which may have occurred in the Late Miocene epoch. This was also the time at which we estimate that martens divided into the *Martes* and *Gulo* lineages. Fossil data agree with our estimates of the separation age of *Enhydra* and *Gulo* (Willemsen 1992; Anderson 1989). *Martes palaeosinensis* is the earliest known ancestor of *Ma. pennanti*, and this was discovered in Early Pliocene deposits in China (Anderson 1994). In the United States, fossil records exist for *Mu. vison* from as far back as the Early Pleistocene (Anderson 1989). However, our molecular estimates for the appearance of both *Martes palaeosinensis* and *Mu. vison* are earlier than fossil records suggest.

In the third radiation, which we suggest that took place between the end of Late Miocene and the beginning of Early Pliocene, differentiation within genera increased. Again, however, our estimates of the dates involved are earlier than those suggested by the fossil record. The genus *Lutra* was first identified in deposits of the Late Pliocene in Asia (Savage & Russell 1983). *Martes lydekkeri*, the oldest species within *Charronia*, was found in deposits from the Early Pliocene (Anderson 1994), also in Asia. We propose that lineages which resulted in the present-day otter genera *Amblonyx* and *Aonyx*, musteline subgenus *Gale*, and *Mu. erminea* separated in the fourth radiation, which may have occurred during the Early Pliocene epoch. Our estimates of the time at which *Mu. erminea* lineage appeared agree with the fossil record (Anderson 1989). However the fossil record suggests older origin for *Aonyx* and *Amblonyx* genera, in the Late Miocene (Radinsky

1968). Finally, we propose that lineages leading to genera *Meles* and *Arctonyx* and our present-day species, differentiated in the most recent two radiations, which we estimate that took place between the Late Pliocene and the Pleistocene epochs. The fossil record suggests that genus *Arctonyx* separated from *Meles* line during the Plaisancien age within the Late Pliocene (Petter 1971). *Martes vetus* is considered to be the common ancestor of *Ma. foina* and *Ma. Martes*, and this species has been found in deposits from the beginning of the Middle Pleistocene of Germany (Anderson 1994). *Ma. americana* and *Ma. melampus* have also occurred in the fossil record since the Middle Pleistocene. *Mu. lutreola* is however only known in the Holocene (Anderson 1989), supporting its unclear specific status proposed in this research.

Acknowledgements

Researchers and institutions mentioned in the appendices kindly provided samples for this study. We thank A. Ferrando, O. Andrés, A. Pérez-Lezaun and M. Vallès for their help and advice in the laboratory. J. Castresana (Centre de Regulació Genòmica) and A. Susanna (Institut Botànic de Barcelona, C.S.I.C.) assisted with data analyses. Sandra Baker provided editorial assistance. The project was financed by the Ministerio de Educación y Cultura, Spain (Ref. PB98-1064) and the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació, Generalitat de Catalunya (Ref. 2001SGR 00285). J.M. and J.F. L-G. were supported by scholarships from this latter institution (Ref. 2000FI-00698 and 2001FI-00625 respectively).

Bibliography

- Abramov, A.V. (2000). A taxonomic review of the genus *Mustela* (Mammalia, Carnivora). *Zoosystematica Rossica*, 8, 357-364.
- Abramov, A.V. (2002). Variation of the baculum structure of the Palearctic badger (Carnivora, Mustelidae, *Meles*). *Russian Journal of Theriology*, 1, 57-60.
- Anderson, E. (1970). Quaternary evolution of the genus *Martes* (Carnivora, Mustelidae). *Acta Zoologica Fennica*, 130, 1-132.
- Anderson, E. (1989). The phylogeny of mustelids and the systematics of ferrets. In U.S. Seal, E.T. Thorne, M.A. Bogan & S.H. Anderson (Eds). *Conservation biology and the black-footed ferret* (pp. 10-20). Connecticut: Yale University Press.
- Anderson, E. (1994). Evolution, prehistoric distribution and systematics of *Martes*. In S.W. Buskirk, A.S. Harestad, M.G. Raphael & R.A. Powell (Eds). *Martens, sables and fishers: biology and conservation* (pp.13-25). Ithaca: Cornell University Press.
- Baryshnikov, G.F. & Potapova, O.R. (1990). Variability of the dental system in badgers (*Meles*, Carnivora) of the USSR fauna. *Zoologicheskii Zhurnal*, 69, 84-97.
- Bininda-Emonds, O.R.P., Gittleman, J.L. & Purvis, A. (1999). Building large trees by combining phylogenetic information: a complete phylogeny of the extant Carnivora (Mammalia). *Biological Reviews*, 74, 143-175.
- Bryant, H.N., Russell FLS, A.P. & Fitch, W.B. (1993). Phylogenetic relationships within the extant Mustelidae (Carnivora): appraisal of the cladistic status of the Simpsonian subfamilies. *Zoological Journal of the Linnaean Society*, 108, 301-334.

90- RESULTATS: CAPÍTOL I

- Castresana, J. (2001). Cytochrome *b* phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution*, *18*, 465-471.
- Davison, A., Griffiths, H.I., Brookes, R.C., Maran, T., Macdonald, D.W., Sidorovich, V.E., Kitchener, A.C., Irizar, I., Villate, I., González-Esteban, J., Ceña, J.C., Ceña, A., Moya, I. & Palazón, S. (2000). Mitochondrial DNA and palaeontological evidence for the origins of endangered European mink, *Mustela lutreola*. *Animal Conservation*, *4*, 345-355.
- Domingo-Roura, X. (2002). Genetic distinction of marten species by fixation of a microsatellite region. *Journal of Mammalogy*, *83*, 907-912.
- Dragoo, J.W. & Honeycutt, R.L. (1997). Systematics of mustelid-like carnivores. *Journal of Mammalogy*, *78*, 426-443.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics*, *10*, 315-319.
- Felsenstein, J. (2002). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6a3. Seattle: Department of Genetics, University of Washington.
- Felsenstein, J. & Churchill, G.A. (1996). A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution. *Molecular Biology and Evolution*, *13*, 93-104.
- Gagneux, P., Wills, C., Gerloff, U., Tautz, D., Morin, P.A., Boesch, C., Fruth, B., Hohmann, G., Ryder, O.A. & Woodruff, D.S. (1999). Mitochondrial sequences show diverse evolutionary histories of African hominoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *96*, 5077-5082.
- Gatesy, J., Amato, G., Vrba, E., Schaller, G. & DeSalle, R. (1997). A cladistic analysis of mitochondrial ribosomal DNA from the Bovidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *7*, 303-319.
- Ginsburg, L. & Morales, J. (2000) Origine et évolution des Melinae (Mustelidae, Carnivora, Mammalia). *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris (2A)*, *330*, 221-225.
- Grakov, N.N. (1994). Kidus-a hybrid of the sable and the pine marten. *Lutreola*, *3*, 1-4.
- Graur, D., Li, W-H. (2000). *Fundamentals of molecular evolution*, 2nd ed. Sunderland, Massachussets: Sinauer Associates.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit version 5.0.9. Available via <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, *22*, 160-174.
- Heptner, V.G., Naumov, N.P., Yurgenson, P.B., Sludskiy, A.A., Chirkova, A.F. & Bannikov, A.G. (1967). *Mammals of the Soviet Union, Vol. 2. Sea cows and carnivora*. Moskow: Vyshaya Shkola (in Russian).
- Hosoda, T., Suzuki, H., Harada, M., Tsuchiya, K., Han, S-H., Zhang, Y., Kryukov, A.P. & Lin, L-K. (2000). Evolutionary trends of the mitochondrial lineage differentiation in species of genera *Martes* and *Mustela*. *Genes Genetics and Systematics*, *75*, 259-267.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics Application Notes*, *17*, 754-755.
- Hunt, R.M.Jr. (1974). The auditory bulla in *Carnivora*: an anatomical basis for reappraisal of carnivore evolution. *Journal of Morphology*, *143*, 21-76.

- Irwin, D.M., Kocher, T.D. & Wilson, A.C. (1991). Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 128-144.
- Kluge, A.G. (1989). A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among Epicrates (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology*, 38, 7-25.
- Koepfli, K.P. & Wayne, R.K. (1998). Phylogenetic relationships of otters (Carnivora: Mustelidae) based on mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Journal of Zoology, London*, 246, 401-416.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, 17, 1244-1245.
- Kurose, N., Masuda, R., Siritroonrat, B. & Yoshida, M.C. (1999). Intraspecific variation of mitochondrial cytochrome *b* gene sequences of the Japanese marten *Martes melampus* and the sable *Martes zibellina* (Mustelidae, Carnivora, Mammalia) in Japan. *Zoological Science*, 16, 693-700.
- Kurose, N., Kaneko, Y., Abramov, A.V., Siritroonrat, B. & Masuda, R. (2001). Low genetic diversity in Japanese populations of the Eurasian badger *Meles meles* (Mustelidae, Carnivora) revealed by mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Zoological Science*, 18, 1145-1151.
- Ledge, C. & Arnason, U. (1996). Phylogenetic analyses of complete cytochrome *b* genes of the order Carnivora with particular emphasis on the Caniformia. *Journal of Molecular Evolution*, 42, 135-144.
- Ledoux, R.G. & Kenyon, A.J. (1975). Protides of the Mustelidae-II. Immunologic relatedness. *Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Physiology*, 51, 213-217.
- Macdonald, D.W. (2001). *The new encyclopaedia of mammals*. Oxford: Oxford University Press.
- Martin, L.D. (1989). Fossil history of the terrestrial Carnivora. In J.L.Gittleman (Ed) *Carnivore behaviour, ecology and evolution* (pp. 536-568). New York: Comstock Publishing Associates.
- Martin, Y., Gerlach, G., Schlotterer, C. & Meyer, A. (2000). Molecular phylogeny of European muroid rodents based on complete cytochrome *b* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16, 37-47.
- Masuda, R. & Yoshida, M.C. (1994). A molecular phylogeny of the family Mustelidae (Mammalia, Carnivora), based on comparison of mitochondrial cytochrome *b* nucleotide sequences. *Zoological Science*, 11, 605-612.
- Nowak, R.M. (1991). *Walker's mammals of the world 5th ed.* Baltimore: John Hopkins University Press.
- Petter, G. (1971). Origine, phylogenie et systematique des blaireaux. *Mammalia*, 35, 567-597.
- Radinsky, L.B. (1968). Evolution of somatic sensory specialization in otter brains. *Journal of Comparative Neurobiology*, 134, 495-506.
- Rozas, J. & Rozas, R. (1999). DnaSP version 3: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15, 174-175.
- Savage, D.E. & Russell, D.E. (1983). *Mammalian paleofaunas of the world*. London: Addison-Wesley Publishing Co-Ltd.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2000). "Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis". Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

92- RESULTATS: CAPÍTOL I

- Seberg, O., Humphries, C.J., Knapp, S., Stevenson, D.W., Petersen, G., Scharff, N. & Andersen, N.M. (2003). Shortcuts in Systematics? A commentary on DNA-based Taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 63-65.
- Simpson, G.G. (1945). The principles of classification and a classification of mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 85, 1-350.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP*, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4.0b10, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Stains, H.J. (1984). Carnivores. In S. Anderson & J.K. Jones Jr. (Eds) *Orders and families of recent mammals of the world* (pp. 491-522). New York: John Wiley and Sons.
- Stone, K.D. & Cook, J.A. (2002). Molecular Evolution of Holarctic martens (genus *Martes*, Mammalia: Carnivora: Mustelidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24, 169-179.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- Ternovsky, D.V. (1977). *Biology of Mustelidae*. Nauka, Novosibirsk (in Russian).
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Waits, L.P., Sullivan, J., O'Brien, S.J. & Ward, R.H. (1999). Rapid radiation events in the family Ursidae indicated by likelihood phylogenetic estimation from multiple fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13, 82-92.
- Willemsen, G.F. (1992). A revision of the Pliocene and Quaternary Lutrinae from Europe. *Scripta Geologica*, 101, 1-115.
- Wolsan, M. (1993). Phylogeny and classification of early European *Mustelida* (Mammalia: Carnivora). *Acta Theriologica*, 38, 345-384.
- Wolsan M (1999) Oldest mephitine cranium and its implications for the origin of skunks. *Acta Palaeontologica Polonica*, 44, 223-230.
- Wozencraft, W.C. (1989). The phylogeny of the recent Carnivora. In J.L. Gittleman (Ed) *Carnivore behaviour, ecology and evolution* (pp. 495-453). New York: Cornell University Press.
- Wozencraft, W.C. (1993). Carnivora. In D.E. Wilson & D.M. Reeder (Eds) *Mammal species of the world: a taxonomic geographic reference* (pp. 279-348). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Wurster, D.H. & Benirschke, K. (1968). Comparative cytogenetics studies in the order Carnivora. *Chromosoma (Berlin)*, 24, 336-382.
- Wynen, L.P., Goldsworthy, S.D., Insley, S.J., Adams, M., Bickham, J.W., Francis, J., Gallo, J.P., Hoelzel, A.R., Majluf, P., White, R.W.G. & Slade, R. (2001). Phylogenetic relationships within the eared seals (Otariidae: Carnivora): Implications for the historical biogeography of the family. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21, 270-284.
- Zardoya, R., Vollmer, D.M., Craddock, C., Streelman, J.T., Karl, S. & Meyer, A. (1996). Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceedings of the Royal*

Society of London B Biological Sciences,
263, 1589-1598.

94- RESULTATS: CAPÍTOL I

Appendix 1 List of samples used in *cyt b* analyses. Samples sequenced in our laboratory are marked with an asterisk (*).

Abbreviations: n, number of sequences.

Species	Origin	n	Accession numbers
MUSTELIDAE			
Mustelinae			
Martes			
<i>martes, Mama</i>	Spain	1	AJ536007*
	Germany	4	AB051251-52, AF154975, AF448239
	Sweden	2	AF448240-41
	Belarus	1	AJ536008*
	Finland	1	AJ536009*
	Russia	2	AB051237, AB051253
	unknown	4	L39275, L77958, AF336974-75
<i>zibellina, Mazi</i>	Russia	5	AB029420-21, AF448242-44
	Japan	8	D26519, AB012356-61, AB029423
	unknown	2	L39276, L77957
<i>melampus, Mame</i>	Japan	20	D26518, AB012341-55, AB029424-26, AB051238
<i>americana, Maam</i>	North America	25	L39270-74, L77952-53, AB051234, AF057130 AF154964-74, AF268272-74, AF448237-38
<i>foina, Mafo</i>	Spain	1	AJ536005*
	Germany	6	AB051247-50, AF448245-46
	Belarus	1	AJ536006*
	China	1	AB051236
	unknown	1	AF336976
<i>flavigula, Mafl</i>	Thailand	2	AB012362-63
	Russia	1	AB051235
	China	1	AB051246
<i>pennanti, Mape</i>	USA	1	AF057131
	Canada	2	AF448247-48
	unknown	1	L77959
Gulo			
<i>gulo, Gugu</i>	Sweden	1	X94921
	Russia	1	AB051245
	unknown	1	L77960
Mustela			
<i>eversmannii, Muev</i>	Serbia	1	AF068540
	Russia	2	AB026102, AB051261
	Mongolia	2	AF068541-42
<i>lutreola, Mulu</i>	Eastern Europe	3	AF207712-14
	Russia	3	AB026105, AB051263, AF068544
<i>putorius, Mupu</i>	Spain	1	AF207716

	United Kingdom	1	AF068538
	Slovenia	4	AF068534-37
	Germany	3	AB051273-75
	Eastern Europe	1	AF207715
	Russia	2	AB026107, AB051276
	unknown	3	U12845, X94925, AF057128
<i>nigripes, Mung</i>	USA	1	AF068543
	captive	1	AJ489325*
<i>sibirica, Musi</i>	Russia	5	AB029428, AB051277-80
	Korea	3	AB051281-83
	Japan	8	D26132, AB026108, AB051242, AB051284-88
	Taiwan	2	AB051243, AB051289
<i>itatsi, Mui</i>	Japan	5	D26130-31, AB026104, AB029427, AB051262
<i>altaica, Mual</i>	Russia	3	AB051239, AB051254-55
	Mongolia	1	AB026100
<i>nivalis, Muni</i>	Slovenia	1	AF068545
	Germany	3	AB051264-66
	Russia	3	AB051267-69
	Korea	1	AB051270
	Japan	6	D26133, D26516, AB026106, AB051241, AB051271-72
	Taiwan	1	AB046612
<i>erminea, Muer</i>	United Kingdom	1	AF068546
	Germany	1	AB051256
	Russia	2	AB051257-58
	Japan	5	D26515, AB026101, AB051240, AB051259-60
	North America	8	AF057127, AF271060-66
<i>vison, Muvi</i>	Spain	1	AJ536003*
	United Kingdom	1	AJ536004*
	USA / UK	1	AF068548
	Japan	1	D26517
	unknown	3	L39278, AB026109, AF057129
<i>frenata, Mufr</i>	Colombia	1	AF068547
Lutrinae			
Lutra			
<i>lutra, Lulu</i>	Spain	1	AJ536012*
	United Kingdom	1	AJ536010*
	Norway	1	AF057124
	Belarus	1	AJ536011*
	Russia	1	D26521
	unknown	1	X94923
<i>maculicollis, Luma</i>	captive	1	AF057125
Amblonyx			
<i>cinereus, Amci</i>	Thailand	1	AJ536013*

96- RESULTATS: CAPÍTOL I

	unknown	1	AF057119
<i>Aonyx</i>			
<i>capensis, Aoca</i>	South Africa	1	AF057118
<i>Enhydra</i>			
<i>lutris, Enlu</i>	USA	2	AB051244, AF057120
	North Pacific	1	D26522
	unknown	2	U12835, X94924
<i>Lontra</i>			
<i>felina, Lofe</i>	Chile	1	AF057122
<i>longicaudis, Lolo</i>	South America	1	AF057123
<i>canadensis, Loca</i>	USA	1	AF057121
<i>Pteronura</i>			
<i>brasiliensis, Ptbr</i>	unknown	1	AF057126
Melinae			
<i>Meles</i>			
<i>meles, Meme</i>	United Kingdom	1	AF068549
	Sweden	1	X94922
	Russia	3	AB049807-09
	Japan	18	D26520, AB049790-806
<i>Arctonyx</i>			
<i>collaris, Arco</i>	Thailand	1	AB049810
Taxidiinae			
<i>Taxidea</i>			
<i>taxus, Tata</i>	USA	1	AF057132
	unknown	2	L39277, L77961
MEPHITIDAE			
<i>Mephitis</i>			
<i>mephitis, Mmpm</i>	USA	2	X94927, AJ536014*
<i>Spilogale</i>			
<i>putorius, Sppu</i>	USA	2	X94928, AJ536015*
PROCYONIDAE			
<i>Bassaricyon</i>			
<i>gabbii</i>	unknown	1	X94931
<i>Procyon</i>			
<i>lotor</i>	unknown	1	X94930
<i>Ailurus</i>			
<i>fulgens</i>	unknown	1	X94919

OTARIIDAE*Arctocephalus*

<i>gazella</i>	unknown	1	X82292
----------------	---------	---	--------

98- RESULTATS: CAPÍTOL I

Appendix 2 List of samples sequenced for the *Me/08* complex repetitive-flanking region. Abbreviations: *n*, number of samples; Acc. number, Accession number.

Species	Origin	<i>n</i>	Acc. number	Supplier and institution
MUSTELIDAE				
Mustelinae				
<i>Martes</i>				
<i>martes</i>	Spain	1	AJ489568	S. Lavín, Univ. Autònoma de Barcelona
	France	1		X. Domingo-Roura, Univ. Pompeu Fabra
	Finland	1		K. Kauhala, Finnish Game and Fisheries Research Inst.
	Belarus	1		V. Sidorovich, Nat. Academy of Sciences of Belarus
<i>melampus</i>	Japan	1	AJ489567	Y. Fukue, Tokio Univ. of Agriculture and Technology
<i>foina</i>	Spain	1	AJ489569	S. Lavín, Univ. Autònoma de Barcelona
	Belarus	1	AJ489570	V. Sidorovich, Nat. Academy of Sciences of Belarus
<i>Gulo</i>				
<i>gulo</i>	Canada	1	AJ489571	M.A. Ramsay, Univ. of Saskatchewan C.M. Pond, The Open Univ.
<i>Mustela</i>				
<i>lutreola</i>	Belarus	1	AJ489560	V. Sidorovich, Nat. Academy of Sciences of Belarus
<i>putorius</i>	Spain	1	AJ489562	C. Rosell, Minuartia, Sant Celoni
	United Kingdom	1		A. Grogan, WildCRU, Univ. of Oxford
<i>nigripes</i>	captive	1	AJ489561	A. Kitchener, Nat. Museums of Scotland
<i>altaica</i>	Russia	1	AJ489563	E. Zholnerovskaya, Siberian Zoological Museum
<i>nivalis</i>	Belarus	1	AJ489566	V. Sidorovich, Nat. Academy of Sciences of Belarus
<i>erminea</i>	United Kingdom	2	AJ489564-65	R.A. Macdonald, Univ. of Bristol
Lutrinae				
<i>Lutra</i>				
<i>lutra</i>	United Kingdom	1	AJ489574	A. Bradshaw, Univ. of Cardiff
	Belarus	1		V. Sidorovich, Nat. Academy of Sciences of Belarus
<i>Amblonyx</i>				
<i>cinereus</i>	Thailand	1	AJ489575	S. O'Brien, Lab. Genomic Diversity, Nat. Cancer Inst.
<i>Enhydra</i>				
<i>lutris</i>	USA	1	AJ489576	S. O'Brien, Lab. Genomic Diversity, Nat. Cancer Inst.
<i>Lontra</i>				
<i>canadensis</i>	USA	1	AJ489573	S. O'Brien, Lab. Genomic Diversity, Nat. Cancer Inst.
Melinae				
<i>Meles</i>				
<i>meles</i>	Spain	1	AJ309847	M. Miralles, Rectoria Vella, Sant Celoni
	United Kingdom	1		D.W. Macdonald and C. Newman, WildCRU, Univ. of Oxford J. Brabec, Univ of Innsbruck
	Austria	1		D.W. Macdonald and R. Woodroffe, WildCRU, Univ. of

	Greece	1		Oxford
	Japan	2	AJ489572	Y. Fukue, Tokio Univ. of Agriculture and Technology M. Saeki, WildCRU, Univ. of Oxford
MEPHITIDAE				
<i>Mephitis</i>				
	USA	1	AJ489577	S. O'Brien, Lab. Genomic Diversity, Nat. Cancer Inst.
<i>Spilogale</i>				
	USA	2	AJ489578-79	S. O'Brien, Lab. Genomic Diversity, Nat. Cancer Inst.
PROCYONIDAE				
<i>Procyon</i>				
	USA	1	AJ489580	J.F. López-Giráldez, Univ. Pompeu Fabra
<i>Ailurus</i>				
	captive	1	AJ489583	J. Fernández, Parc Zoològic de Barcelona S.A.
OTARIIDAE				
<i>Arctocephalus</i>				
	South Georgia	1	AJ489584	J.P. Arnould, Macquarie Univ. C.M. Pond, The Open Univ.

Capítol II

Badgers are divided into four clearly separated taxonomic units across Eurasia

Josep Marmi, Juan Francisco López-Giráldez, David White Macdonald, Francesc Calafell, Elena Zholnerovskaya i Xavier Domingo-Roura

Molecular Ecology (en preparació)

BADGERS ARE DIVIDED INTO FOUR CLEARLY SEPARATED TAXONOMIC UNITS ACROSS EURASIA

**J. Marmi,* J.F. López-Giráldez,* D.W. Macdonald,‡ F. Calafell,* E.
Zholnerovskaya, ¶ and X. Domingo-Roura,***

**Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain, ‡ Wildlife Conservation Research Unit, Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, UK, ¶ Siberian Zoological Museum, Institute of Animal Systematics and Ecology, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences, Frunze Street 11, 630091, Novosibirsk, Russia.*

Keywords: Eurasia, *Meles*, mitochondrial DNA, control region, phylogeography, postglacial colonisation, taxonomy

Corresponding author: Xavier Domingo-Roura, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, 08003, Barcelona, Spain. Tel: +34 935422843, Fax: +34 93 5422802, xavier.domingo@upf.edu

Running title: Phylogeography of Eurasian badgers

Abstract

The badger, *Meles meles*, is a widely distributed mustelid in Eurasia and showing large geographic variability in morphological characters that complicates its taxonomy at the intraspecific level. The combination of widespread sampling and the female philopatry typical of this species offers the possibility to explore evolutionary structuring and the relevance of geographic barriers across Eurasia. We sequenced 512 bp of the mtDNA control region in 115 Eurasian badgers from 21 countries in order to clarify the taxonomy of this species, to describe the genetic relationships among their populations across its widespread geographic range, and to infer demographic and biogeographical processes. We found that the Eurasian badger is divided into four genetically divergent regional groups that could be considered as different subspecies: *M. meles meles* from Europe; *M. m. canescens* from Asia Minor, Near East and Caucasus to Pamir and Tien Shan Mountains in Tajikistan and Kirghizia; *M. m. leucurus* from Siberia, Kazakhstan, Mongolia, China, and Korea; and *M. m. anakuma* from Japan. This supports the relevance of the extreme climate in the region between the Volga River and Ural Mountains during the Pleistocene and of geographic barriers, such as Kopet Dagh, Hindu Kush, Pamiro-Alai and the Tien Shan Mountains and Kara-Kum and Kizil-Kum deserts leading to the separation of taxonomic units. Genetic variation within regions based on Tamura-Nei distances (d_{T-N} range: 3.6-5.1) was much lower than among regions (d_{T-N} range: 15.9-50.2), and 90% of the variation could be attributed to differences among regions. Analysis of molecular variance (AMOVA), median joining network, and Mantel's test did not detect genetic

structuring within any of the regional taxonomic units or subspecies. We calculated that the first three subspecies evolved separately since the Middle Pleistocene (0.52-0.86 Mya) whereas the Japanese badger separated from Continental Asian badgers between the Middle and the Late Pleistocene (0.22-0.31 Mya). Badgers from Crete Island were closely related to badgers from Southwest Asia contradicting their designation as subspecies *M. m. arcalus*. We also detected sudden demographic growth in European and Southwest Asian badgers that occurred during the Late Pleistocene (0.012-0.134 Mya).

Introduction

The Eurasian badger, *Meles meles*, is classified within the mustelid subfamily Melinae (Wozencraft 1993; Macdonald 2001) where it is closely related with the hog badger, *Arctonyx collaris* (Bryant *et al.* 1993). During the Pliocene, the *Meles* line evolved in the temperate forests of Asia spreading West into Europe between the Late Pliocene and the Early Pleistocene (Neal & Cheeseman 1996). Badger forms very similar to the modern Eurasian badger are found in the fossil record of Eurasia since the Middle Pleistocene (Kurten 1968; Petter 1971).

At the present time, the Eurasian badger is one of the most widely distributed mustelids. Its geographic range includes forested and steppe areas in the Palearctic region from the Iberian peninsula in the West to the Japanese archipelago in the East; and from Scandinavia and West Siberia in the north to Palestine, Iran, South China and Tibet in the South (Heptner *et al.* 1967; Corbet 1978). Insular populations exist in Ireland, Britain, Sicily, Crete, Rhodes, and Japan (Corbet 1978). Considerable differences in size, coloration, and morphological characters are reported across its geographic range. However, this variation is not easily interpreted, which complicates the intraspecific taxonomy (Neal & Cheeseman 1996; Kurose *et al.* 2001). Main morphological differences are found in dentition (e.g. the frequency of loss of first premolars, shape and proportions of first upper molar) and bones (e.g. skull and bacular structure) (Baryshnikov & Potapova 1990; Lynch *et al.* 1997; Abramov 2002).

Based on morphology, many authors consider the Eurasian badger as a single species with up to 24 subspecies (Ellerman & Morrison-Scott 1951; Petrov 1953; Heptner *et al.* 1967;

Corbet 1978; Wozencraft 1993). Others indicate important differences between European and Asian populations to the East of the Volga River and suggest that they belong to two species, *M. meles* in Europe and *M. leucurus* in Asia (Neal 1948; Baryshnikov & Potapova 1990; Abramov 2001). The taxonomic status of the Japanese badger is also confusing. Some authors suggested that it should be classified as a subspecies (Petrov 1953; Heptner *et al.* 1967) while others think that there are arguments to classify it as a different species, *M. anakuma* (Neal 1948; Abramov 2001). Molecular data are scarce, but high levels of genetic differentiation were found comparing complete cytochrome *b* sequences from 17 Japanese, one Siberian and two European badgers across regions (Kurose *et al.* 2001).

Locally badger populations can show moderate levels of genetic variability (Bijlsma *et al.* 2000 using microsatellites in The Netherlands and Denmark; P. Fakler and A. Schreiber unpublished data, using allozymes and RAPDs in Switzerland and Germany) or even further reductions (Pertoldi *et al.* 2000 in Denmark using allozymes; Domingo-Roura *et al.* 2003 in the United Kingdom using microsatellite markers; P. Fakler and A. Schreiber unpublished data in the British Islands and Norway using allozymes and random amplified polymorphic DNAs, RAPDs). The species has been killed for meat, fur, hair, and because of its role as a wild host of *Mycobacterium bovis*, which causes bovine tuberculosis (Neal & Cheeseman 1996; Gallagher & Clifton-Hadley 2000). Nevertheless, at least where they are monitored, badger populations appear to be either stable or increasing in Europe, although there are threats of local extinction in The Netherlands and Albania (Neal & Cheeseman 1996; Griffiths &

Thomas 1997). Populations from the islands of Crete and Rhodes, which have been classified as different subspecies (*M. m. arcalus* and *M. m. rhodius*, respectively), are seriously threatened, and there is little information about the status of the species in most parts of Continental Asia.

The quantification and distribution of genetic variability, and the understanding of population history and structure are crucial to establish taxonomic or evolutionary units for improved management and conservation (Avice 1989). Genetic data from many localities across its geographic range are necessary to elucidate the causes of the reduced genetic variability often found in badgers, and to determine whether this is a widespread phenomenon or it is restricted to populations that have been subject to demographic bottlenecks or founder effects as suggested in the United Kingdom (Domingo-Roura *et al.* 2003). Since the species is protected in some countries but not in others, and it has commercial and public health importance (Griffiths & Thomas 1997), the determination of the provenance of badger samples may have legal relevance. In addition, the species shows variability in ecological adaptations, behaviour and social systems (Kruuk 1989) and the clarification of evolutionary relationships among badgers worldwide can offer insight into the link between phenotypic similarity and evolutionary relationships, as well as into the coevolution of the species and its parasites (e.g. *Mycobacterium bovis*; biting louse, *Trichodectes melis*, or fleas such as *Paraceas melis*) (Neal & Cheeseman 1996). Finally, since the species is extensively distributed across Eurasia, shows low dispersion rates, and as maternal philopatry has been repeatedly reported (Neal & Cheeseman 1996; Revilla & Palomares 2002), the two latter characteristics promoting allele fixation and

genetic drift (Melnick & Hoelzer 1992), the regional structuring of its populations can offer insights into colonization routes, barriers to dispersal and glacial refuges in a continent that has been little explored.

The objectives of this report are: i) to describe and quantify the genetic variation in badgers across their distribution; ii) to define taxonomic units and to clarify the taxonomy of the species; iii) to explore geographic barriers to dispersal in Eurasia; and iv) to draw inferences on past demographic and biogeographical processes of this philopatric and widely distributed carnivore.

Materials and Methods

Sample collection and sequence acquisition

One-hundred and fifteen badger samples from 21 countries (considered here as populations) throughout Eurasia were kindly provided by collaborators listed in Appendix 1. Animals came mainly from road kills and were often museum specimens. No badger was killed for the sake of this project. DNA was extracted from muscle, skin, ear, heart and blood tissues using standard phenol/chloroform protocols. Bone and teeth samples were powdered in a coffee grinder, which was washed with lye between each sample, and DNA was extracted using Dneasy Tissue Extraction kit (Qiagen) according to modifications suggested by Iudica *et al.* (2001).

We amplified the complete mtDNA control region in 16 samples using primers L15926 and H00651 (Kocher *et al.* 1989) and L-Pro and H-Phe (Mucci *et al.* 1999). We amplified seven more complete control regions with the pair L-ProMel (5'

106- RESULTATS: CAPÍTOL II

AATAGCCCCACCATCAGCACCCAAAGC 3'; modified from L-Pro) and H-Phe. Using these 23 sequences we designed a new pair of primers specific for Eurasian badger to amplify a fragment of 594 bp from the 5' end of control region which were named *MelCR1* (5' AGCACCCAAAGCTGATATTCT 3') and *MelCR6* (5' CCATTGACTGAATTGCACCT 3'). Three primer combinations were used to divide this fragment into smaller ones (221-252 bp) to amplify bone and teeth samples: *MelCR1* and *MelCR2* (5' CAAGGATTGATGGTTTCTCG 3'), *MelCR3* (5' TGCATTTCACTTAGATCACGAG 3') and *MelCR4* (5' TACCAAATGCATGACACCAC 3') and *MelCR5* (5' TCTTCAAATGGACATCTCG 3') and *MelCR6*. PCR reactions contained between 100 and 400 ng of genomic DNA, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 67.0 mM Tris-HCl (pH = 8.8), 0.01% Tween-20, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM of each nucleotide, 4.25 pmol of each primer and 0.85 units of *Taq* DNA polymerase (Ecogen). PCR programs to amplify the complete control region started with a cycle of denaturing at 94°C for 5 minutes, followed by 30 cycles divided in three steps of one minute each (denaturing at 94°C; annealing at 61°C for L15926-H00651 and L-Pro-H-Phe, and at 68°C for L-Pro*Mel*-H-Phe; extension at 72°C), and a final extension at 72°C for 5 minutes. We used steps of 45 seconds and an annealing temperature of 59°C for *MelCR1*-*MelCR6*. We also used steps of 45 seconds and an annealing temperature of 55°C, through 35-40 cycles to amplify the three short fragments in bone and teeth samples. PCR products were purified with GeneClean (Qbiogene), sequenced with Big Dye Terminator Cycle sequencing Kits (ver II and III Applied Biosystems) and precipitated following the instructions of the

manufacturer. Precipitates were run on an ABI3100™ automated DNA sequencer (Applied Biosystems).

Data analyses

Sequences were visualised with BIOEDIT Sequence Alignment Editor ver.5.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) aligned with the CLUSTALW option included in this software and double-checked by eye. A median-joining network was performed to obtain a picture of the geographic distribution of control region haplotypes with NETWORK ver.3.1.1.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>). Shape parameter (α) of the gamma distribution was estimated with MRBAYES ver.2.01 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Number of polymorphic sites, transitions and transversions, and haplotype (h) and nucleotide (π) diversities were obtained with ARLEQUIN ver.2.000 (Schneider *et al.* 2000). Mean numbers of nucleotide distances assuming the gamma corrected Tamura-Nei model within and between main regional groups inferred from the data were computed with MEGA ver.2.1 programme (Kumar *et al.* 2001). To better visualise differences among regional groups, we performed a two-dimensional scaling analysis (Kruskal & Wish 1977) with STATISTICA ver.6.0 (StatSoft Inc.). This analysis is based on similarity, dissimilarity and correlation matrices extracted from the average generic distance matrix between populations.

Phylogenetic trees of haplotypes were constructed using neighbor-joining and Bayesian methods. Neighbor-joining trees were obtained assuming the gamma corrected Tamura-Nei model, pairwise deletion, and 1,000 bootstrap iterations using MEGA programme. Bayesian

trees were obtained with MRBAYES assuming the following parameters: “lset nst = 6” (the general time reversible, GTR, model), “rates = gamma” (gamma-distributed rate variation) and “basefreq = estimate” (estimated proportion of base types from the data). In the Monte Carlo process four chains ran simultaneously for 700,000 generations with trees being sampled every 100 generations for a total of 7,000 trees in the initial sample. The first 1,000 trees were discarded after reaching stationarity.

Mismatch distributions of the whole Eurasian sample and three of the regional groups detected - Europe; Southwest Asia (Crete, Israel, Georgia and Tajikistan) and North and East Asia (Russia, Kazakhstan and Mongolia) - were computed with ARLEQUIN using distances based on Tamura-Nei model of substitution to detect past demographic expansions. The number of samples available precluded this analysis with Japanese badgers. We performed 1,000 bootstrap replications to calculate standard errors. Fu's F_s statistic (Fu 1997) was computed to test for neutrality and demographic expansions with DNASP ver.3.99.1 (Rozas & Rozas 1999). Significances for F_s statistics were obtained by means of coalescent simulations of a panmictic population of constant size conditioning on the number of segregating sites. For each case, 1,000 simulations were run in DNASP and the number of trees with values of interest statistic equal or more extreme than the observed value were recorded. The tau (τ) parameter, obtained from the mismatch distribution is an estimate of time after expansion in mutational units. If the divergence rate per nucleotide and year ($m = 2\mu$ where μ is the substitution rate per lineage) and the number of nucleotides of the fragment analysed (l) are known, it is possible to calculate the age when the expansion occurred using the

expression, $\tau = mlt$, modified from Harpending *et al.* (1993).

To estimate the effective maternal population size (N_e) we can assume a divergence rate per nucleotide and year (m) and apply the expression $\theta = N_e m$ modified from Nei (1987). Parameter θ was estimated using programme FLUCTUATE ver.1.4 (Kuhner *et al.* 1998) by Coalescent Metropolis-Hastings Markov Chain (MHMC) method using genealogical relationships among haplotypes and assuming historically fluctuating population sizes (Kuhner *et al.* 1998). A generation time of one year was assumed (Neal & Cheeseman 1996).

We estimated a divergence rate from the weasel, *Mustela nivalis*, and ermine, *Mustela erminea*, split. The first extant members of lineages leading to these two species (*Mustela pliocaenica* and *Mustela plioerminea*, respectively) appeared in the Pliocene (about 4 Mya) (Anderson 1989). The divergence rate estimated was based on the mean number of substitutions, according to gamma corrected Tamura-Nei model, obtained from published weasel (GenBank accession numbers: AB006717-28, AB049764-76) and ermine (AB006729-33, AB049777-78, 80, 82-88) control regions and its value was of 1.39×10^{-7} substitutions per nucleotide per year (m_1). In addition, we used the divergence rate of 1.0×10^{-7} substitutions per nucleotide per year (m_2) estimated by Vilà *et al.* (1999) from the split between coyotes, *Canis latrans*, and grey wolves, *C. lupus*. We also used these divergence rates to calculate divergence times among Eurasian badger phylogeographic groups.

We tested the significance of phylogeographic groups using the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) included in ARLEQUIN. Groups were defined by the same

numbers that appears in Table 4 according to: 1) separations in four groups inferred from our data; 2) inclusion of Japanese badgers in the North and East Asia group; 3) inclusion of samples from Crete within Europe; 4) inclusion of samples from Crete within the Southwest Asia group; 5) exclusion of samples from Crete from both the European and the Southwest Asian groups.

In addition we also performed the analysis to find any phylogeographic structure within Europe. In number 6 we tested the effect of geographic barriers: Pyrenees or Alps isolating Iberian and Italian badgers; the isolation of Irish and British from continental badgers by sea; and the isolation of Western Scandinavian (Norway and Sweden) from Eastern Scandinavian (Finland) badgers following their current geographic distribution. In number 7 we tested the effect of geographic proximity based on the location of the countries where samples were obtained. Finally we tested three possible postglacial colonisation routes followed by European badgers: 8) postglacial recolonisation of most of Europe from the Iberian Peninsula and Finland colonised from an Eastern refuge as in the brown bear, *Ursus arctos* (Taberlet & Bouvet 1994); 9) recolonisation of most of Europe from the Iberian and Italian Peninsulas and another undetermined Eastern refuge as in the hedgehog, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor* (Santucci *et al.* 1998); and 10) recolonisation only from an Eastern refuge alone as in the grasshopper, *Chorthippus parallelus* (Cooper *et al.* 1995). The correlation between geographic distances and mean genetic distances for each pair of populations was computed using Mantel's test, included in ARLEQUIN and performing 1,000 permutations. Geographic distances were determined in kilometres from the latitudinal and longitudinal co-ordinates using Haversine

geodesic distances (Sinnott 1984). Gene flow among regions, expressed as the number of migrant females per generation (N_m), was calculated by the expression $N_m = (1-F_{ST})/2F_{ST}$ using ARLEQUIN and assuming that the mutation rate is negligible as compared to the migration rate.

Results

Genetic variability, phylogenetic relationships and divergence time

The haplotype distribution (Fig. 1) and median-joining network (Fig. 2) clearly differentiated sequences from three geographic regions: i) Europe; ii) Southwest Asia (Crete, Israel, Georgia and Tajikistan), iii) North and East Asia (Russia, Kazakhstan, Mongolia) and Japan. Within the last group, Japanese sequences were also clearly, although not as deeply, separated from those of North and East Asia, suggesting a fourth phylogeographic region. The same structuring was also evident with the multidimensional scaling analysis (Fig. 3), which showed a tiny stress (4.2×10^{-6}), and also with the phylogenetic trees of haplotypes (data not shown). Some haplotypes were distributed across a wide geographic range within a single geographic region but none of them was shared across regions (Fig. 1). Twenty-two out of the 43 haplotypes encountered were restricted to a single individual. Haplotype diversity was high within and across regions, whereas nucleotide diversity within regions was one order of magnitude lower than in the whole Eurasia (Table 1). Gamma corrected Tamura-Nei genetic distances among regions (range: 15.9-50.2) were one order of magnitude higher than distances among samples within one region (range: 3.6-

Figure 1 (previous page) Polymorphic sites, geographic distribution and frequency of the 43 mtDNA control region haplotypes found in the 115 Eurasian badgers. Dots (·) indicate nucleotide identity with the first sequence and hyphens (-) nucleotide deletions. Sequences are deposited in EMBL/GenBank database with accession numbers AJ563661-AJ563703. Geographic regional groups are indicated: Europe, Southwest Asia (Crete, Israel, Georgia, Tajikistan), North and East Asia (Russia, Kazakhstan and Mongolia), and Japan. Abbreviations: Es = Spain, It = Italy, Ch = Switzerland, Lu = Luxembourg, Uk = United Kingdom, Nl = The Netherlands, De = Germany, At = Austria, Pl = Poland, Se = Sweden, No = Norway, Fi = Finland, Cre = Crete, Il = Israel, Ge = Georgia, Tj = Tajikistan, Kz = Kazakhstan, Ru = Russia, Mn = Mongolia, Jp = Japan.

Figure 2 Median-joining network showing the distribution of Eurasian badger control regions in geographic regional groups. Circles represent haplotypes and their size is proportional to the frequency observed. Lines connecting circles are proportional to the number of mutations, indicated by black points.

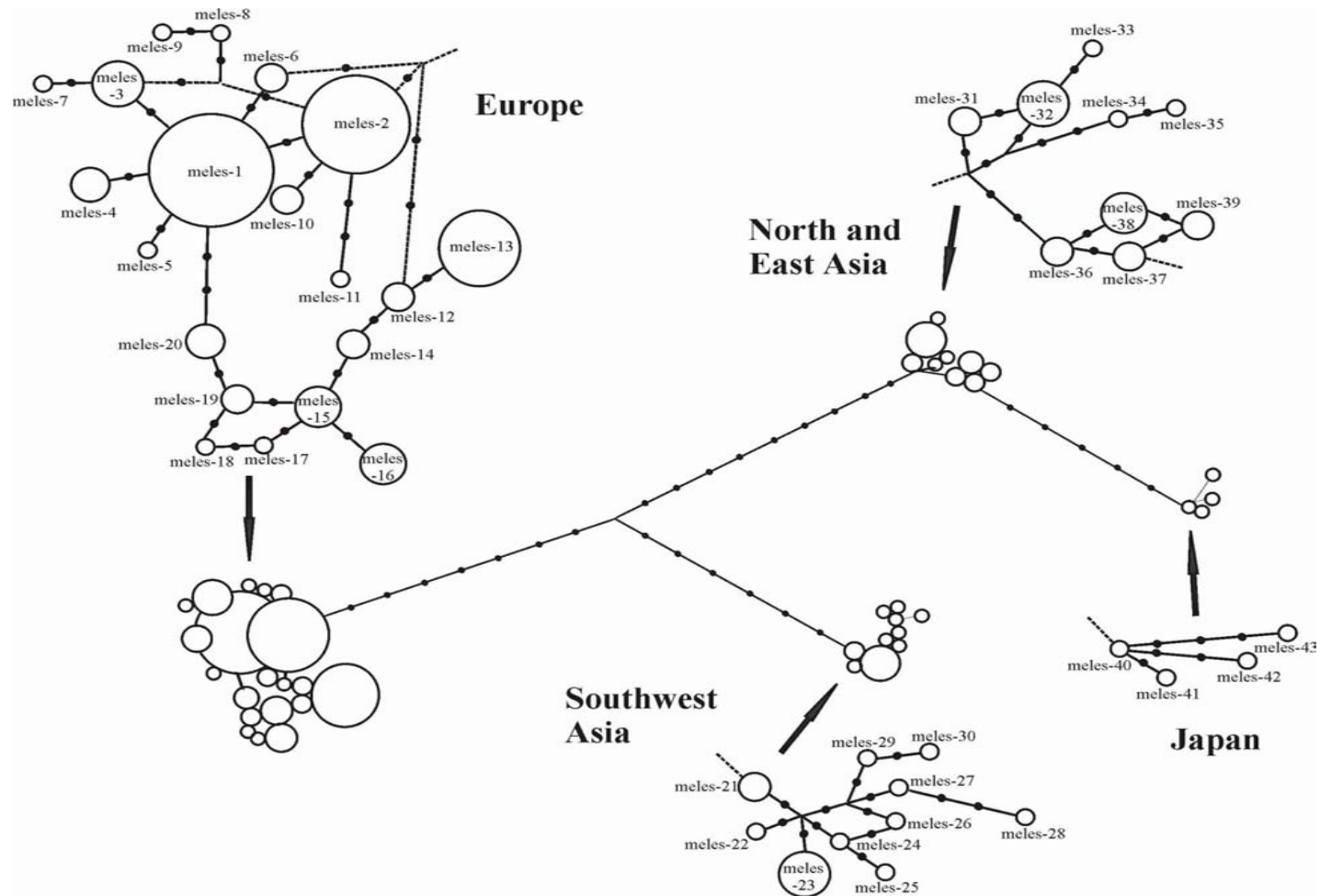
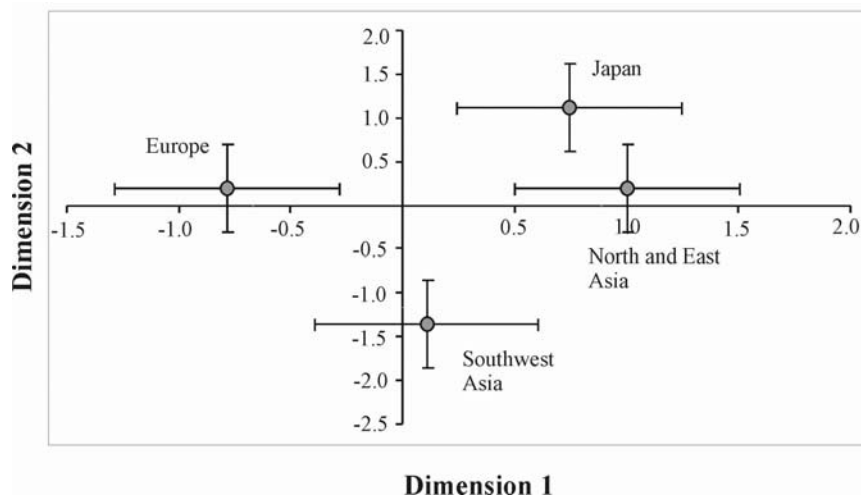


Figure 3 Multidimensional scaling analysis based on Tamura-Nei average genetic distances between Eurasian badger populations. Error bars are shown for both co-ordinate axes.



5.1, Table 2). We calculated that badgers from Europe and Southwest Asia diverged from those from North and East Asia and Japan between 0.62 and 0.86 million years ago (Mya), based on $m_1 = 1.39 \times 10^{-7}$ and $m_2 = 1.0 \times 10^{-7}$ substitutions

per nucleotide per year respectively. Badgers from Southwest Asia diverged from European badgers between 0.52 and 0.73 Mya and Japanese and North and East Asian badgers diverged between 0.22 and 0.31 Mya.

Table 1 Molecular diversity indices based on the gamma corrected Tamura-Nei method for the 512 bp control region fragment for all Eurasia and for subsets belonging to regional divisions inferred from the data (standard deviations are in parentheses).

	<i>n</i>	Number of haplotypes	Haplotype diversity (<i>h</i>)	Number of polymorphic sites	Nucleotide diversity (π)
Eurasia	115	43	0.952 (0.09)	47	0.046 (0.023)
Europe	76	20	0.900 (0.02)	14	0.008 (0.004)
Southwest Asia	15	10	0.895 (0.07)	11	0.005 (0.003)
North and East Asia	20	9	0.905 (0.03)	9	0.007 (0.004)
Japan	4	4	1.000 (0.17)	6	0.006 (0.005)

Table 2 Matrix of gamma corrected Tamura-Nei distances between the four phylogeographic groups inferred from the data (below diagonal) and their standard errors (above diagonal). Values within regions and their standard errors, in parenthesis, are shown in the diagonal. All values have been multiplied by sequence length (*l*).

	Europe	Southwest Asia	North and East Asia	Japan
Europe	3.6 (2.0)	25.6	33.8	34.8
Southwest Asia	37.4	3.6 (2.0)	30.2	84.5
North and East Asia	44.5	42.0	5.1 (4.1)	10.7
Japan	50.2	73.7	15.9	4.1 (2.6)

112- RESULTATS- CAPÍTOL II

Mismatch distributions and population fluctuations

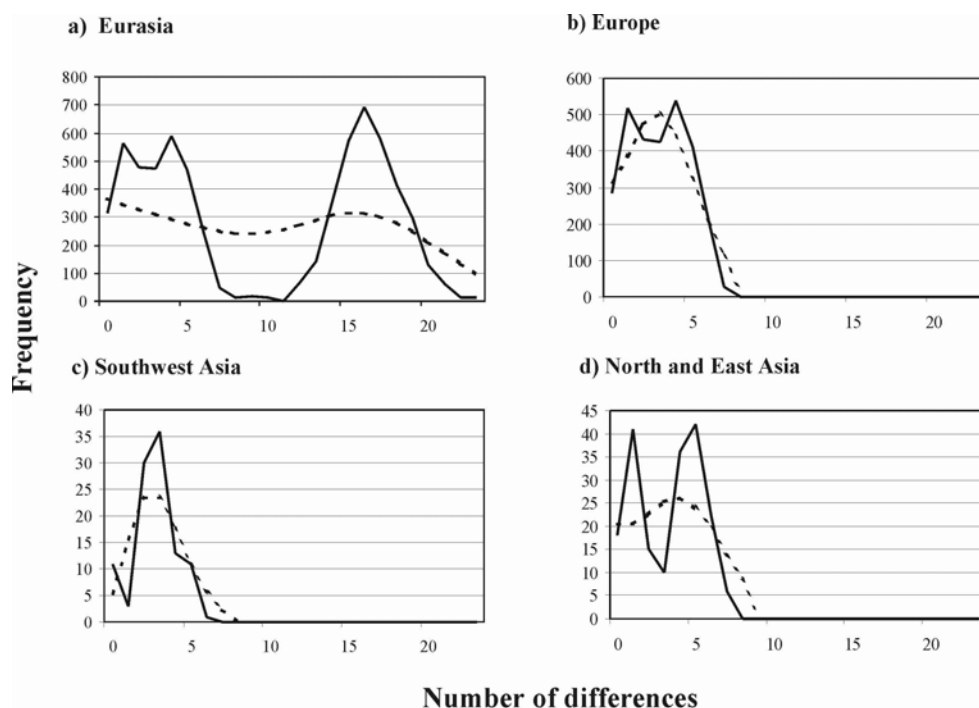
When the mismatch distribution was estimated with all samples (Fig. 4a) two frequency waves were detected. Mismatch distributions within the European (Fig. 4b) and within the Southwest Asian (Fig. 4c) regional groups were bell-shaped suggesting that a population expansion occurred in the past. These

expansions were supported by the negative and statistically significant values of Fu's statistic (Table 3). However, it is important to notice that an episode of positive selection could lead to similar results. Using the 95% confidence interval around τ , we estimated that the population expansion occurred in Europe between 0.022 and 0.096 Mya for m_1 and between 0.030 and 0.134 Mya for m_2 . In the Southwest Asia group, the expansion occurred

Table 3 Tau (τ) parameter obtained from mismatch distributions, Fu's (F_S) tests, and estimates of theta (θ) parameter based on Coalescent Metropolis–Hastings Markov Chain method, using genealogical relationships among haplotypes and assuming historically variable population sizes (θ_F). The current effective number of females (N_e) estimated from θ_F for all samples and each regional group is also indicated. Due to the low sample number, estimates for the Japanese population have not been obtained.

	n	Tau (τ)		Fu's F_S		θ_F	N_e	
		estimate	95% confidence interval	F_S	P		1.39×10^{-7}	1.0×10^{-7}
Eurasia	115	17.5	9.1-27.4	-10.24	0.02	0.063	4.5×10^5	6.3×10^5
Europe	76	3.9	1.5-6.8	-7.17	0.01	0.039	2.8×10^5	3.9×10^5
Southwest Asia	15	3.0	0.9-4.4	-4.62	0.02	0.058	4.1×10^5	5.8×10^5
North and East Asia	20	5.2	1.8-9.1	-1.68	0.20	0.010	7.0×10^4	1.0×10^5

Figure 4 Mismatch distributions based on Tamura-Nei genetic distances for badgers of the whole Eurasia (a); Europe (b); Southwest Asia, (c); and North and East Asia (d). Solid lines represent the observed distribution and dashed lines represent the expected distribution according to the sudden expansion model.



between 0.012 and 0.062 Mya for m_1 and between 0.017 and 0.086 Mya for m_2 . The North and East Asia group showed a bimodal mismatch distribution (Fig. 4d) that could indicate the admixture of two expanding populations, or that populations could be stationary in the past as also suggested the non-significant result of Fu's test (Table 3). Reduced sample numbers could also be responsible for not detecting a population expansion; thus, a larger number of samples is needed to clarify the demographic history of this group. Estimates based on parameter θ showed that the current world-wide population of Eurasian badgers (MHMC $\theta_F = 0.063$) is 30 times more diverse than the initial population represented by $\theta_o = 0.002$, in the mismatch distribution. In addition, these estimates show that European and Southwest Asian badgers are more diverse and have effective numbers of females six times greater than North and East Asian badgers (Table 3).

Population structure and gene flow

The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was consistent with the regional subdivision of samples in four groups (Europe, Southwest Asia, North and East Asia, and Japan) as suggested by the median-joining network, the multidimensional scaling and the phylogenetic trees. Most probable phylogeographic structures were those with maximum and statistically significant percentages of variation explained by differences among groups (Table 4). This value was maximum when sequences from Europe, Southwest Asia, North and East Asia, and Japan were separated in four different groups (89.66% in test number 1 of Table 4). In this case and in tests numbers 2-5, percentages of variation explained by differences among populations

within regional groups and among individuals within populations were very low, although statistically significant. Within Europe we detected lower statistically significant population structuring among groups when we tested by isolation due to geographic barriers (47.92%, $P < 0.01$ in test number 6 of Table 4), or distance (35.85%, $P < 0.05$ in test number 7 of Table 4). No model of postglacial recolonisation tested within Europe was statistically significant (see methods and Table 4 for details). In all of these cases (tests numbers 6-10) we obtained moderately high and statistically significant percentages of variation among populations within groups and among individuals within populations.

Mantel's test revealed a significant positive correlation between genetic and geographic distances when all populations were considered ($r = 0.71$, $P < 0.0001$). However, values of correlation coefficient decreased to non-significance when the analysis was executed among populations within regions: Europe ($r = 0.27$, $P = 0.06$); Southwest Asia ($r = -0.03$, $P = 0.60$); North and East Asia ($r = -0.14$, $P = 0.69$), indicating a lack of structuring within regions. No gene flow was detected among regions. The highest value of N_m was found between Japanese and North and East Asian badgers, excluding Southwest Asia ($N_m = 0.2$) whereas in the other cases values were equal or lower than 0.05.

Table 4 Possible geographic structures tested by Analysis of Molecular Variance (AMOVA). Percentages of variation explained by the groupings are indicated. Statistical significance is indicated with asterisks (** = $P < 0.01$, * = $P < 0.05$). Values of most probable population structures are indicated in bold. Groupings are based on inferences from the data (1, 2, 4); geographical proximity (3, 7) geographical isolation (5, 6). Within Europe recolonisation routes from potential glacial refuges are also tested – Iberia (8), Iberia, Italy and another undetermined eastern refuge (9), and an eastern refuge alone (10) – following brown bear (Taberlet & Bouvet 1994), hedgehog (Santucci *et al.* 1998) and grasshopper (Cooper *et al.* 1995) models respectively. See methods for further details.

Test	Among groups	Among populations within groups	Within populations
1. [Europe][Crete, Israel, Georgia, Tajikistan][Russia, Kazakhstan, Mongolia][Japan]	89.66**	3.11**	7.22**
2. [Europe][Crete, Israel, Georgia, Tajikistan][Russia, Kazakhstan, Mongolia, Japan]	87.73**	5.10**	7.18**
3. [Europe, Crete][Israel, Georgia, Tajikistan]	68.38*	23.92**	7.71**
4. [Europe][Crete, Israel, Georgia, Tajikistan]	88.94**	3.77**	7.29**
5. [Europe][Crete][Israel, Georgia, Tajikistan]	88.61**	3.80**	7.59**
6. [Spain][Ireland][Great Britain][Italy][Switzerland, Austria, Luxembourg, The Netherlands, Germany, Poland][Sweden, Norway][Finland]	47.92**	11.51**	40.57**
7. [Spain][Ireland, Great Britain][Italy, Switzerland, Austria][Luxembourg, The Netherlands, Germany, Poland][Sweden, Norway][Finland]	35.85*	20.87**	43.29**
8. [Spain, Ireland, Great Britain, Luxembourg, The Netherlands, Switzerland, Austria, Germany, Sweden, Norway, Poland][Italy][Finland]	4.41	52.04**	43.56**
9. [Spain, Ireland, Great Britain, Luxembourg, The Netherlands][Italy, Switzerland, Austria, Sweden, Norway][Germany, Poland, Finland]	0.61	54.21**	45.18**
10. [Spain][Italy][Ireland, Great Britain, Luxembourg, The Netherlands, Switzerland, Austria, Germany, Sweden, Norway, Poland, Finland]	6.35	50.25**	43.39**

Discussion

Genetic variation in the mtDNA control region of the Eurasian badger

The statement that Eurasian badgers are genetically depauperated as has been shown at a reduced scale (Burke *et al.* 1996; Pertoldi *et al.* 2000; Domingo-Roura *et al.* 2003) does not stand when considering the species as a whole as we have done in this study. The nucleotide diversity found in the Eurasian badger ($\pi = 4.6\%$, Table 1) is within the range observed in other carnivores: Steller sea lion, *Eumetopias jubatus*, $\pi = 1.7\%$ (Bickham *et al.* 1996); pine marten, *Martes martes*, $\pi = 2.1\%$ (Davison *et al.* 2001); grey wolf, *Canis lupus*, $\pi = 2.6\%$ and coyote, *C. latrans*, $\pi = 4.6\%$ (Vilà *et al.* 1999); and ocelot, *Felis pardalis*, $\pi = 6.8\%$ (Eizirik *et al.* 1998). However, values within geographic regions were much lower ($\pi = 0.5 - 0.8\%$) and comparable to those reported in species that have been classified as endangered, such as the jaguar, *Panthera onca*, (0.8%, Eizirik *et al.* 2001); the European polecat, *Mustela putorius*, (0.9%, Davison *et al.* 2001); but still higher than those of the Eurasian otter, *Lutra lutra*, $\pi = 0.06\%$ (Ferrando *et al.* unpublished data); and the sea otter, *Enhydra lutris*, $\pi = 0.09\%$ (Larson *et al.* 2002). The disparity between species-wide and regional nucleotide diversities is a consequence of the extreme geographical structure of genetic variation in the badger, as discussed below. Eurasian and regional haplotype diversities found in our study were high, around $h = 0.9$ (Table 1) and comparable to values reported in species with no known bottlenecks. Lower values of haplotype diversity ($h = 0.4 - 0.5$) are documented in species such as the sea otter and the Northern elephant seal, *Mirounga*

angustirostris, that have suffered bottlenecks (Larson *et al.* 2002).

How many species or subspecies of Meles exist?

Median-joining network (Fig. 2), multidimensional scaling analysis (Fig. 3) and the highest percentage of genetic variation explained by differences among groups in test number 1 of AMOVA (Table 4) clearly confirm the existence of four taxonomic units in agreement with morphological data. These units were previously considered as two different subspecies, in Europe (*M. m. meles*, Linnaeus 1758) and in badgers from Asia Minor, Near East and Caucasus to Pamir and Tien Shan Mountains in Tajikistan and Kirghizia (*M. m. canescens*, Blanford 1875) respectively. However, a similar grouping for the remaining taxonomic units was done based on the morphology of animals from Siberia, Kazakhstan, Mongolia, China, and Korea and from Japan, and these two groups were considered two additional *Meles* species, *M. leucurus*, Hodgson 1847 and *M. anakuma*, Temminck 1844, respectively (Abramov 2002). In our study genetic distances between regions were similar (d_{T-N} range: 37.4-73.7) and showed large standard errors (Table 2). Thus, we suggest that *M. leucurus* should be classified as a subspecies, *M. m. leucurus*. The only exception was the distance between Japanese and North and East Asian badgers that showed the smallest genetic distance ($d_{T-N} = 16$), strongly suggesting that Japanese badgers should be also considered a subspecies, *M. m. anakuma*, instead of a species. Moreover, the divergence time calculated for these four taxa (0.22-0.86 Mya) is also consistent with their subspecific status when compared to the estimates of 1.2-3.2 Mya

proposed for the speciation of mammals during the Pliocene-Pleistocene (Avice *et al.* 1998). Several nucleotide combinations are subspecies-specific and the assignment of badger samples to each one of these subspecies for research or forensic purposes is possible using any molecular technique of single nucleotide polymorphisms (SNPs) detection.

We found little or no evidence of substructuring within each one of these units, although several subspecies have been proposed in the past based on morphological evidence (see Marmi *et al.* in press for a review). This is especially relevant for the badgers from Crete that have been classically classified as *M. m. arcalus*, Miller 1907, and recommended special protection (Griffiths & Thomas 1997). We found that Cretan badgers are closely related to other populations of *M. m. canescens* (Fig. 2, 3 and test number 4 in Table 4). Because Crete was not connected with the continent by land bridges during the Pleistocene, this supports the possible relationship between the presence of badgers in Crete and human migrations from Asia Minor. It appears that Crete was first colonised by humans 50,000 years ago although until 11,000 years ago no wide-ranging sailing has been reported in the Eastern Mediterranean (Bednarik 1999) and the presence of badgers in this island would be very recent.

Eurasian badgers might define main geographic barriers in Eurasia

Eurasian badgers seem to have evolved as three separated geographic continental groups in Europe, Southwest Asia, and North and East Asia since the Middle Pleistocene, between 0.52 and 0.86 Mya. The Volga River and the Ural Mountains have been proposed as the geographic

boundaries between European badgers and Continental Asian badgers from Siberia, Kazakhstan, Mongolia, China and Korea on the basis of morphological relationships (Ognev 1931; Heptner *et al.* 1967). Extremely cold and arid conditions were dominant in the Ural region during glacial ages (Dawson 1992) which likely contributed to the isolation of these groups during thousands of years. Badgers distributed in Southwest Asia were presumably isolated from badgers of the other two regions by the Mediterranean, Black and Caspian Seas, as well as the Caucasus Mountains in the West. In Turkmenistan and Uzbekistan, Kopet Dagh and Hindu Kush Mountains, together with Kara-Kum and Kizil-Kum large sandy deserts, could determine the geographical border, whereas in Central Asia the Pamiro-Alai and Tien Shan Mountains would promote the separation. This is supported by the fact that since the end of the Early Pleistocene the formation of deserts had started in the Tarim Basin and by the Middle Pleistocene Tien Shan Mountains were covered with glacial sheets (Wen 1994). A boundary between Western and Eastern mitochondrial DNA lineages has also been recently reported in the red deer, *Cervus elaphus*, in this Central Asian region (Mahmut *et al.* 2002). However, in the badger, our results should be taken with caution since they are based on few individuals from this area. In addition, in the foothills of Western and central Tien Shan, *M. m. canescens* and *M. m. leucurus* nowadays are sympatric (Alexey Abramov, personal communication), prompting the need of further research to define this boundary with more accuracy. The female philopatry and restricted movement shown by badgers likely related to the value of the sett (Neal & Cheeseman 1996) leads to the presence of residuals of past colonisation routes and

geographical separation in their genomes. In contrast, other larger carnivores such as the grey wolf do not show geographic differentiation across Eurasia. Possibly this is a result of multiple expansions and contractions experienced by wolf populations during glacial ages, together with the change in distribution of suitable habitats and the high mobility of this species (Vila *et al.* 1999).

We estimated that Japanese badgers diverged from Continental Asian badgers between 0.22 and 0.31 Mya during the Riss glacial stage. Sea levels decreased during glacial stages and land bridges connecting Japanese Islands with the continent were formed (Emery *et al.* 1971). One of these land bridges connected the Korean Peninsula and Japan and was used, for instance, for the Japanese macaque, *Macaca fuscata*, ancestors to colonise the Japanese archipelago (Kamei 1969). The facts that nowadays no Eurasian badger occurs in the Northern island of Hokkaido and that fossils of Japanese badgers of about 0.20 Mya have been excavated in Southern Japan (Kawamura *et al.* 1989) may indicate that Japanese badger and the Japanese macaque had a similar colonisation pattern. On the contrary, another mustelid, the sable, *Martes zibellina*, colonised Japan through the Kuril Islands from Kamchatka and Sakhalin before spreading from Hokkaido to the Southern islands of Honshu, Shikoku and Kyushu and giving rise to the Japanese marten, *Martes melampus*. Nowadays the Japanese marten and the sable are separated by the Tsugaru Strait (Anderson 1994).

Glacial refuges, post-glacial colonisation routes and demographic history within regions

Three main glacial refuges have been proposed in Europe, in the Iberian Peninsula, Italy, and the Balkans, together with an additional refuge located easternmost between the Black and Caspian Seas (Taberlet *et al.* 1998; Hewitt 1999). Tests of population structuring based on the postglacial recolonisation routes described by the brown bear (number 8), hedgehogs (number 9) and the grasshopper (number 10) showed extremely low percentages of variation among groups (Table 4). This suggests that none of these routes explain the observed genetical homogeneity of European badgers. The scarce genetic differentiation within Europe and the mismatch distribution consistent with a Late Pleistocene population expansion (Table 3 and Fig. 4b) suggest that the Eurasian badger recolonised this continent from a single refuge following a recent glaciation. A similar pattern has been described in two other mustelid species, the pine marten, *Martes martes* (Davison *et al.* 2001) and the European polecat, *Mustela putorius* (Davison *et al.* 1999, 2000). In contrast, larger carnivores such as the brown bear recolonised Europe from more than one refuge (Taberlet & Bouvet 1994). However the little population structuring we found within Europe when we tested for geographic isolation due to geographic barriers or distance by AMOVA (see methods and numbers 6 and 7 in Table 4) could be also a consequence of a postglacial recolonisation from more than one refuge with posterior intermixing. The geographic distribution of some haplotypes agrees with this last possibility. For instance haplotype “meles-1” was widely distributed from Italy to Central and Eastern Europe and Great Britain; “meles-2” was found in Spain, Switzerland, Great Britain and Poland; “meles-15” was found in Spain and

Luxembourg; and no haplotype from Finland was found in the rest of Europe (Fig. 1).

We found one main lineage and we also detected a Late Pleistocene population expansion in badgers from Southwest Asia (Table 3 and Fig. 4c). For many small mammals, such as the field vole, *Microtus agrestis*, showing widely ranging phylogeographic groups it has been proposed that huge areas of Eurasia might have been recolonised by derivatives of a single lineage (Jaarola & Searle 2002). Our results are in agreement with this extensive colonisation of Southwest Asia by a single lineage and provide preliminary evidence to extend this pattern of colonisation of Eurasia to median sized mammals. The bimodal mismatch distribution suggested that no demographic fluctuation occurred in the North and East Asia group since the recent past (Fig. 4d), although the admixture of two expanding populations could also lead to a similar result. Population expansions are characterised by low and negative values of F_S test and even if our data followed this tendency ($F_S = -1.68$) they were not statistically significantly different from zero ($P = 0.2$) and larger sample size would be required to confirm one of these two possibilities.

Nowadays, the demographic status of the badger within Europe is relatively well documented, and in general populations are stable or increasing (Neal & Cheeseman 1996; Griffiths & Thomas 1997). However, the status of Asian populations is widely unknown. The North and East Asia group showed a female effective population size (N_e) remarkably lower than the value estimated for Europe and Southwest Asia (Table 3). This could be a first indication of declining badger populations in this region, or, at least, given the large number of

assumptions included in this estimate, a reason to focus conservation interest in the subject.

We did not detect gene flow among the four regional groups, which may be due to a combination of the ancestral isolation of these groups and the low dispersal pattern characteristic of the Eurasian badger. Mantel's test was consistent with these results showing a strong positive correlation between genetic and geographic distances when all populations were considered. However, it fell to very low and not significant values when the analysis was performed within regions, again supporting the lack of population structuring within regions.

Acknowledgements

We thank researchers and institutions listed in Appendix 1 for providing samples used in this study. We also thank A. Ferrando, A. Martínez, O. Andrés, M. Vallés and A. Pérez-Lezaun for their help in the laboratory. N. Yamaguchi provided invaluable help in sample collection and A. Navarro and O. Lao in data analyses. We are very grateful to A. Abramov (Zoological Institute, Russian Academy of Sciences) and P. Chashchin (Ilmsky State Reserve, Russian Academy of Sciences) for providing information about morphology and taxonomic status of Eurasian badgers. This work was financed by the Generalitat de Catalunya, Spain (2001SGR00285); People's Trust for Endangered Species, United Kingdom; and INPRIMAT (European Commission, QLR1-CT-2002-01325). J. Marmi and J.F. López-Giráldez are supported by scholarships from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Refs. 2000FI-00698 and 2001FI-00625 respectively).

References

- Abramov AV (2001) Notes on the taxonomy of the Siberian badgers (Mustelidae: *Meles*). *Proceedings of the Zoological Institute of Russian Academy of Sciences*, **288**, 221-233.
- Abramov AV (2002) Variation of the baculum structure of the Palaearctic badger (Carnivora, Mustelidae, *Meles*). *Russian Journal of Theriology*, **1**, 57-60.
- Anderson E (1989) The phylogeny of Mustelids and the systematics of ferrets. In: *Conservation biology and the black-footed ferret* (eds. Seal US, Thorne ET, Bogan MA, Anderson SH), pp. 10-20. Yale University Press, Connecticut.
- Anderson E (1994) Evolution, prehistoric distribution and systematics of *Martes*. In *Martens, sables and fishers: biology and conservation* (eds. Buskirk SW, Harestad AS, Raphael MG, Powell RA), pp.13-25. Cornell University Press, Ithaca.
- Avise JC (1989) Role of molecular genetics in recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution*, **4**, 279-281.
- Avise JC, Walker D, Johns GC (1998) Speciation duration and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **265**, 1707-1712.
- Baryshnikov GF & Potapova OR (1990) Variability of the dental system in badgers (*Meles*, Carnivora) of the USSR fauna. *Zoologicheskii Zhurnal*, **69**, 84-97.
- Bednarik RG (1999) Maritime navigation in the Lower and Middle Palaeolithic. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris*, **328**, 559-563.
- Bickham JW, Patton JC, Loughlin TR (1996) High variability for control-region sequences in a marine mammal: implications for conservation and biogeography of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Journal of Mammalogy*, **77**, 95-108.
- Bijlsma R, van de Vliet M, Pertoldi C, van Apeldoorn RC, van de Zande L (2000) Microsatellite primers from the Eurasian badger, *Meles meles*. *Molecular Ecology*, **9**, 2155-2234.
- Burke T, Hanotte O, van Pijlen I (1996) Minisatellite analysis in conservation genetics. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation* (eds Smith TB, Wayne RK), pp. 251-277. Oxford University Press, New York.
- Bryant HN, Russell AP, Fitch WD (1993) Phylogenetic relationships within the extant Mustelidae (Carnivora): appraisal of the cladistic status of the Simpsonian subfamilies. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **108**, 301-334.
- Cooper SJB, Ibrahim KM, Hewitt GM (1995) Post-Glacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology*, **4**, 49-60.
- Corbet GB (1978) The Mammals of the Palearctic Region: a Taxonomic Review. *Publications of the British Museum of Natural History*, **788**, 1-314.
- Davison A, Birks JDS, Griffiths HI, Kitchener AC, Biggins D, Butlin RK (1999) Hybridization and the phylogenetic relationship between polecats and domestic ferrets in Britain. *Biological Conservation*, **87**, 155-161.
- Davison A, Griffiths HI, Brookes RC, Maran T, Macdonald DW, Sidorovich VE, Kitchener AC, Irizar I, Villate I, González-Esteban J, Ceña JC, Ceña A, Moya I, Palazón S (2000)

120- RESULTATS: CAPÍTOL II

- Mitochondrial DNA and palaeontological evidence for the origins of endangered European mink, *Mustela lutreola*. *Animal Conservation*, **4**, 345-355.
- Davison A, Birks JDS, Brookes RC, Messenger JE, Griffiths HI (2001) Mitochondrial phylogeography and population history of pine martens *Martes martes* compared with polecats *Mustela putorius*. *Molecular Ecology*, **10**, 2479-2488.
- Dawson AG (1992) *Ice Age Earth; Late Quaternary Geology and Climate*. Routledge, London.
- Domingo-Roura X, Macdonald DW, Roy MS, Marmi J, Terradas J, Woodroffe R, Burke T, Wayne RK (2003) Confirmation of low genetic diversity and multiple breeding females in a social group of Eurasian badgers from microsatellite and field data. *Molecular Ecology*, **12**, 533-539.
- Eizirik E, Bonatto SL, Johnson WE *et al.* (1998) Phylogeographic patterns and mitochondrial DNA control region evolution in two Neotropical cats (Mammalia, Felidae). *Journal of Molecular Evolution*, **47**, 613-624.
- Eizirik E, Jae-Heup K, Menotti-Raymond M, Crawshaw PG, O'Brien SJ, Johnson WE (2001) Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, **10**, 65-79.
- Emery KO, Niino H, Sullivan B (1971) Post-Pleistocene levels of the East China Sea. In: *Late Cenozoic Glacial Ages* (ed. Turekian KK), pp. 381-390. Yale University Press, New Haven.
- Ellerman JR, Morrison-Scott TCS (1951) *Checklist of Palaearctic and Indian Mammals (1758 to 1946)*. Trustees of British Museum (Natural History), London.
- Fu Y-X (1997) Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Gallagher J, Clifton-Hadley RS (2000) Tuberculosis in badgers; a review of disease and its significance for other animals. *Research in Veterinary Science*, **69**, 203-217.
- Griffiths HI, Thomas DH (1997) *The Conservation and Management of the European Badger (Meles meles)*. Nature and Environment, No. 90. Council of Europe, Strasbourg.
- Harpending HC, Sherry ST, Rogers AR, Stoneking M (1993) The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology*, **34**, 483-496.
- Heptner VG, Naumov NP, Yutgenon PB, Sludsky AA, Chirkova AF, Bannikov AG (1967) *Mammals of Soviet Union. Vol.2 Part 1. Sea Cows and Carnivora*. Vysshaya Shkola, Moscow. [In Russian]
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87-112.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics Application Notes*, **17**, 754-755.
- Iudica CA, Whitten WM, Williams NH (2001) Small bones from dried mammal museum specimens as a reliable source of DNA. *BioTechniques*, **30**, 732-736.
- Jaarola M, Searle JB (2002) Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, **11**, 2613-2621.
- Kamei T (1969) Mammals of the glacial age in Japan – especially on Japanese monkey. *Monkey*, **106**, 5-12 [in Japanese].

- Kawamura Y, Kamei T, Taruno H (1989) Middle and late Pleistocene mammalian faunas in Japan. *Quaternary Research*, **28**, 317-326 [in Japanese with English summary].
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **86**, 6196-6200.
- Kruskal JB, Wish M (1977) *Multidimensional Scaling*. Sage Publications, Beverly Hills, CA.
- Kruuk H (1989) *The Social Badger*. Oxford University Press, Oxford.
- Kuhner MK, Yamato J, Felsenstein J (1998) Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. *Genetics*, **140**, 1421-1430.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Temple, Arizona, U.S.A.
- Kurose N, Kaneko Y, Abramov AV, Siriaroonrat B, Masuda R (2001) Low genetic diversity in Japanese populations of the Eurasian badger *Meles meles* (Mustelidae, Carnivora) revealed by mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Zoological Science*, **18**, 1145-1151.
- Kurten B (1968) *The Pleistocene Mammals of Europe*. Weidenfeld & Nicolson, London.
- Larson S, Jameson R, Bodkin J, Staedler M, Bentzen P (2002) Microsatellite DNA and mitochondrial DNA variation in remnant and translocated sea otter (*Enhydra lutris*) populations. *Journal of Mammalogy*, **83**, 893-906.
- Lynch JM, Whelan R, Il Frituri AI, Hayden TJ (1997) Craniometric variation in the Eurasian badger, *Meles meles*. *Journal of Zoology, London*, **242**, 31-44.
- Macdonald DW (2001) *The New Encyclopaedia of Mammals*. Oxford University Press, Oxford.
- Mahmut H, Masuda R, Onuma M, Takahashi M, Nagata J, Suzuki M, Ohtaishi N (2002) Molecular phylogeography of the red deer (*Cervus elaphus*) populations in Xinjiang of China: comparison with other Asian, European, and North American populations. *Zoological Science*, **19**, 485-495.
- Marmi J, Abramov AV, Chashchin PV, Domingo-Roura X (in press) Phylogeny, subspeciation and genetic structure of the Eurasian badger (*Meles meles*) in the Iberian Peninsula and the World. In: *Ecology and Conservation of Badger in Mediterranean Ecosystems* (eds. Virgós E, Mangas JG, Revilla E, Domingo-Roura X), pp. Sociedad Española para la Conservación y Estudio de los Mamíferos, Málaga.
- Melnick DJ, Hoelzer GA (1992) Differences in male and female macaque dispersal lead to contrasting distributions of nuclear and mitochondrial DNA variation. *International Journal of Primatology*, **13**, 379-393.
- Mucci N, Pertoldi C, Madsen AB, Loeschcke V, Randi E (1999) Extremely low mitochondrial DNA control-region sequence variation in the otter *Lutra lutra* population of Denmark. *Hereditas*, **130**, 331-336.
- Neal E (1948) *The Badger*. Collins, London.
- Neal E, Cheeseman C (1996) *Badgers*. T & AD Poyser Ltd, London.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

122- RESULTATS: CAPÍTOL II

- Ognev SI (1931) *The Mammals of the Eastern Europe and Northern Asia. Vol. 2.* Gosizdat, Moskow-Leningrad. [In Russian]
- Pertoldi C, Loeschcke V, Madsen AB, Randi E (2000) Allozyme variation in the Eurasian badger *Meles meles* in Denmark. *Journal of Zoology*, **252**, 544-547.
- Petrov VV (1953) The data on the intraspecific variability of badgers (genus *Meles*). *Uchenye Zapiski Leningradskogo Pedagogicheskogo Instituta*, **7**, 149-205. [In Russian]
- Petter G (1971) Origine, phylogenie et systematique des blaireaux. *Mammalia*, **35**, 567-597.
- Revilla E, Palomares F (2002) Spatial organization, group living and ecological correlates in low-density populations of Eurasian badgers, *Meles meles*. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 497-512.
- Rozas J, Rozas R (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, **15**, 174-175.
- Santucci F, Emerson BC, Hewitt GM (1998) Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. *Molecular Ecology*, **7**, 1163-1172.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) "Arlequin ver.2.000: A software for population genetics data analysis". Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sinnott RW (1984) Virtues of the Haversine. *Sky and Telescope*, **68**, 159.
- Taberlet P, Bouvet J (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, **255**, 195-200.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.
- Vilà C, Amorim IR, Leonard JA, Posada D, Castroviejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall KA, Ellegren H, Wayne RK (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, **8**, 2089-2103.
- Wen Q (1994) *Quaternary Geology and Environment of Xinjiang Region, China.* Agriculture Publishing Company of China, Beijing. (In Chinese with English abstract)
- Wozencraft WC (1993) Carnivora. In: *Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference* (eds. Wilson DE, Reeder DM), pp. 279-348. Smithsonian Institution Press, Washington.

Appendix List of origins and collectors of Eurasian badger samples used in this study.

Country	Origin	<i>n</i>	Institution and/or Collector
<i>Europe</i>			
Spain	Barcelona	4	Santiago Lavín, Universitat Autònoma de Barcelona; Marta Miralles, Rectoria Vella; Antoni Arrizabalaga, Museu de Granollers
	Girona	4	Xavier Domingo-Roura, Universitat Pompeu Fabra; Salvador Pérez, Taxidermia El Ciervo; Miquel Ponce; Ivan Ponce
	Jaén	1	Jesús López Valladolid
	Huelva, Sevilla	3	Eloy Revilla, Estación Biológica de Doñana
Ireland	Ulster	2	Paddy Sleeman, University College Cork
Great Britain	Brackleyshire	1	Xavier Domingo-Roura, Universitat Pompeu Fabra
	Market Harboroughshire	1	Xavier Domingo-Roura, Universitat Pompeu Fabra
	Oxford-Northamptonshire	1	Xavier Domingo-Roura, Universitat Pompeu Fabra
	Oxfordshire	4	Chris Newman, Wildlife Conservation Research Unit
	Gloucestershire	3	Frank Tuytens, Wildlife Conservation Research Unit
Italy	Marche	2	Ettore Randi, Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica
Switzerland	Zurich	8	Karin Hindelang, Institut Fédéral de Recherche WSL
Luxembourg	Indeterminate	10	Laurent Schley, Service de la Conservation de la Nature, Ministère de l'Environnement
Austria	Indeterminate	3	Jan Brabec, University of Innsbruck
The Netherlands	Indeterminate	7	Hugh Jansman, ALTErrA, Green World Research
Germany	Indeterminate	3	Petter Fakler, Universität Heidelberg
Sweden	Göteborg	1	Xavier Domingo-Roura, Universitat Pompeu Fabra
Norway	Trondheim	5	Henrik Brøseth, Norwegian Institute for Nature Research; Petter Fakler, Universität Heidelberg
	Ostfold	4	Henrik Brøseth, Norwegian Institute for Nature Research
Finland	Indeterminate	3	Kaarina Kauhala, Finnish Game and Fisheries Research Institute
Poland	Lower Silesia	5	Monika Nadolska, Akademii Rolniczej we Wrocławiu
	Bialowieza Forest	1	Rafal Kowalczyk, Polish Academy of Sciences
Greece	Crete Island	8	Wildlife Conservation Research Unit; Petros Lymberakis, Natural History Museum of Crete, University of Crete
<i>Asia</i>			
Israel	North Israel	5	Eli Geffen, University of Tel Aviv
Georgia	Eastern Georgia	1	Iamze Khutsishvili, Noah's Ark Center for the Recovery of Endangered Species
Tajikistan	Vakhsh River	1	Elena Zholnerovskaya, Siberian Zoological Museum
Kazakhstan	Akmolinskaya Region	3	Elena Zholnerovskaya, Siberian Zoological Museum
Russia	South and Transural Region	4	Pavel Chashchin, Russian Academy of Sciences
	Novosibirskaya Region	2	Elena Zholnerovskaya, Siberian Zoological Museum
	Tomskaya Region	1	Elena Zholnerovskaya, Siberian Zoological Museum
	Altai Territory	2	Elena Zholnerovskaya, Siberian Zoological Museum
	Khakasia Region	2	Elena Zholnerovskaya, Siberian Zoological Museum
	Chitinskaya Region	1	Elena Zholnerovskaya, Siberian Zoological Museum
	Primorsky territory	3	Elena Zholnerovskaya, Siberian Zoological Museum
Mongolia	Indeterminate	2	Andrew Laurie, Eastern Steppes Biodiversity Project
Japan	Honshu	4	Midori Saeki, Wildlife Conservation Research Unit; Yuko Fukue, Tokyo University of Agriculture and Technology

Capítol III

Inquiring into the Origin of Badger Hair Used in the Manufacturing of Shaving Brushes

**Xavier Domingo-Roura, Josep Marmi, Ainhoa Ferrando,
Juan Francisco López-Giráldez i Hugh Jansman**

Conservation Biology (en preparació)

INQUIRING INTO THE ORIGIN OF BADGER HAIR USED IN THE MANUFACTURING OF SHAVING BRUSHES

**X. Domingo-Roura¹, J. Marmi¹, A. Ferrando^{1,2}, J.F. López-Giráldez¹, and H.
Jansman³**

¹Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain; ²Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; ³ALTERRA, Research Instituut voor de Groene Ruimte, P.O. Box 47, 6700 AA Wageningen, The Netherlands.

Running head: Origin of badger hair

Key words: *Meles*, *Arctonyx*, hair, shaving brushes, DNA, phylogeny

Corresponding author: Xavier Domingo-Roura, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 5422843, Fax: +34 93 5422802, xavier.domingo@upf.edu

Abstract

The Eurasian badger, *Meles meles*, is included in the Appendix III of the Bern Convention (Council of Europe 1979) and protected by national laws in many European countries. In addition, populations of The Netherlands, Albania and Crete Island are endangered. Badger hair is used in the manufacturing of luxury shaving brushes and it is frequently argued that the origin of the hair used is the hog badger, *Arctonyx collaris*, which is distributed in Southeast Asia, is an exotic species in Europe and, thus is not protected. We have applied an extraction protocol specific for unrooted hair to successfully obtain DNA from hair cut from shaving brushes obtained from commercial companies in The Netherlands and Spain. The brushes tested originated from The Netherlands, Spain, France, Italy and the United Kingdom where the Eurasian badger is a protected species. We have sequenced 191 bp of the mitochondrial DNA control region and 170 bp of the cytochrome *b* gene and compared the sequences obtained with Eurasian badger and hog badger reference sequences of the same mitochondrial DNA regions obtained in our laboratory and from GenBank. Sequences obtained from four shaving brushes were highly similar to hog badger sequences, whereas four sequences were alike others of Eurasian badgers of both European and Asian origins, likely indicating the illegal commerce of badger hair for the manufacturing of brushes that are sold in Europe.

Introduction

Nowadays Eurasia is inhabited by eight species of badgers classically included in the Melinae, a subfamily within Mustelidae that includes the Eurasian badger, *Meles meles*; the hog badger, *Arctonyx collaris*; the Indian ferret badger, *Melogale personata*; the Oriental ferret badger, *Melogale orientalis*; the Chinese ferret badger, *Melogale moschata*; the Everett's ferret badger, *Melogale everetti*; the Indonesian stink badger, *Mydaus javanensis*; and the Palawan stink badger, *Mydaus marchei* (Macdonald 2001). However only the Eurasian and hog badgers are closely related (Bryant et al. 1993; Koepfli and Wayne 2003) whereas the phylogenetic relationships of the remaining genera are unclear. Morphological and molecular data suggests that stink badgers, genus *Mydaus*, and skunks, family Mephitidae, are sister taxa (Bryant et al. 1993; Dragoo and Honeycutt 1997), whereas ferret badgers, genus *Melogale*, are not included in the Melinae (Bryant et al. 1993; Koepfli and Wayne 2003). Other badger forms seem to have evolved independently in other parts of the world. The American badger, *Taxidea taxus*, and the honey badger, *Mellivora capensis*, are currently classified in two monotypic subfamilies, the Taxidiinae and the Mellivorinae respectively (Macdonald 2001).

The Eurasian badger is widely distributed from the Iberian Peninsula to Japan and has been divided into different taxonomic units. Based on morphology, some authors consider that they belong to a single species including between 2 and 24 subspecies, whereas others divide the genus *Meles* into two or three species (see Marmi et al. in press for a review). However, main morphological differences and mitochondrial DNA control region sequences

suggest that Eurasian badgers may be separated into four geographic groups (Europe, Southwest Asia, North and East Asia, and Japan) which could be considered subspecies *M. m. meles*, *M. m. canescens*, *M. m. leucurus* and *M. m. anakuma* respectively (Marmi et al. unpublished data). The hog badger is distributed in Southeast Continental Asia and Sumatra and is divided into six subspecies: *A. c. collaris* in Southeastern foothills of the Himalayas in Sikkim, Buthan and Assam; *A. c. leucolaemus* in Northern China; *A. c. albogularis* throughout most of China; *A. c. consul* in Southern Assam and Myanmar; *A. c. dictator* throughout Thailand, Vietnam and Northern Myanmar; and *A. c. hoeveni* in Sumatra (Neal and Cheeseman 1996).

The status of the hog badger is widely unknown, whereas the Eurasian badger is well studied in Europe, where it ranges from highly abundant in countries, such as the United Kingdom and Sweden, to low density endangered populations in The Netherlands, Albania and the island of Crete (Griffiths and Thomas 1997). Neither of these two species is included in CITES nor classified as endangered by the International Union for the Conservation of Nature (IUCN), but the Eurasian badger is included in the Appendix III of the Bern Convention (Council of Europe 1979). In addition the Eurasian badger is protected by national laws in countries, such as Spain, Portugal, Italy, Belgium, The Netherlands, Albania, Greece, Estonia, Luxembourg, Hungary, the United Kingdom and the Irish Republic (Griffiths and Thomas 1997). The species is also eliminated for being the main wild host of *Mycobacterium bovis*, which causes bovine tuberculosis, in some countries such as Switzerland, Great Britain and Ireland (Gallagher

and Clifton-Hadley 2000) although the success of this control is controversial (Donnelly et al. 2003). In rural areas, particularly from Eastern Europe, badgers are still hunted mainly for their meat, fat, fur and leather (Neal and Cheeseman 1996). Moreover, the hair of Eurasian badger is used for the manufacturing of luxury shaving brushes in Europe, and it is often argued that badger hair comes from the exotic and unprotected hog badger.

Mitochondrial DNA (mtDNA) has certain characteristics that make it suitable for forensic applications. Because its high copy number (there can be between 2,000 and 10,000 copies of mtDNA per somatic cell), it is extremely useful for typing samples with low quality and quantity DNA, such as old bones, teeth, and shafts (Budowle et al. 2003). Moreover mtDNA is highly variable, mitochondrial genes evolving faster than single copy nuclear genes (Brown et al. 1979). The mtDNA control region evolves between four and five times faster than mtDNA coding regions (Aquadro and Greenburg 1983). In addition, the haploid and monoclonal nature of mtDNA simplifies the interpretation of DNA sequencing results (Monnat and Reay 1986) although the existence of nuclear insertions of mtDNA sequences, that could be erroneously amplified as mtDNA, are of concern (Bensasson et al. 2001). Beyond human forensics, mtDNA technology is also applicable to the monitoring of the trade of products derived from protected or endangered animal populations and species. The mtDNA control region is enough variable to be applied to within species forensic identification (Bender et al. 2000), and cytochrome *b* gene sequences have been successfully used for interspecific comparison of products derived from endangered species, such as whales (Baker

and Palumbi 1994), tigers (Wan and Fang 2003), and rhinoceroses (Hsieh et al. 2003).

In this work we have compared partial sequences of the mtDNA control region and cytochrome *b* gene obtained from the hair of commercial shaving brushes, bought in The Netherlands and Spain, with sequences from the same regions from hog and Eurasian badgers available in GenBank or obtained in our laboratory. Our objective was to trace the species and subspecies origin of the animals used in the manufacturing of shaving brushes to monitor the legality of the trade of Eurasian badger derivatives in countries where the species is protected.

Materials and methods

Sampling and DNA extraction

A total of thirteen shaving brushes advertised as made of natural badger hair were obtained from commercial companies in The Netherlands and Spain. Seven of the shaving brushes (Sb1-7) were made and obtained in The Netherlands from a single company and the remaining six brushes (Sb8-13) were bought in Catalonia, Spain. In Catalan brushes the brands appearing on the products were from Spain (Sb8 and 9), Italy (Sb10 and 11), France (Sb12) and the United Kingdom (Sb13).

Pieces of 5-10 mm of the brushes' shaft were cut and stored overnight in a 2 ml Eppendorff tube with 0.75 ml of H₂O to dissolve possible PCR inhibitors. One day later, the supernatant was removed and the washing step was repeated. DNA extraction was performed on the third day following the instructions of Dneasy Tissue Extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) with some modifications. After

adding buffer ATL and Proteinase K, we incubated samples during 24 hours at 55°C adding Proteinase K each 12 hours. Moreover, in the last step we eluted the DNA with 60 μ l of buffer AE two times obtaining a final volume of 120 μ l. We included negative controls in all extractions and the whole protocol was repeated twice, one at the Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra (code “upf” in the samples), where we often isolate and amplify mustelid DNA, and one either at ALTERRA, Green World Research, The Netherlands (code “alt”); or at the Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d’Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona (code “uab”); or at the Centre Mediterrani d’Investigacions Marines i Ambientals, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona (code “cmima”). Badger DNA is never amplified at these two last institutions.

PCR amplification and sequencing

Four μ l of extraction product were used to amplify a fragment of mtDNA containing 39 bp of Pro-tRNA gene and 201 bp of control region using the PCR primers *MelCR1* (5’ AGCACCCAAAGCTGATATTCT 3’) and *MelCR2* (5’ CAAGGATTGATGGTTTCTCG 3’) (Marmi et al. unpublished data). This fragment includes the complete Hypervariable Segment I (HVS-I) of the Eurasian badger (177 bp). PCR reactions contained about 100 ng of genomic DNA, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 67.0 mM Tris-HCl (pH = 8.8), 0.01% Tween-20, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM of each nucleotide, 4.25 pmol of each primer and 0.85 units of *Taq* DNA polymerase (Ecogen, Madrid, Spain). PCR programs started with a cycle of denaturing at

94°C for five minutes, followed by 40 cycles divided into three steps of 45 seconds each (denaturing at 94°C; annealing at 55°C; and extending at 72°C), and a final extension at 72°C for 5 minutes. We also included a negative control for each PCR reaction performed. PCR products were purified with GeneClean (Qbiogene), sequenced with Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) and precipitated following the instructions of the manufacturer. Precipitates were run on an ABI3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). The readable part of the sequence extended for 191 bp. No sequence from extractions performed in the Universitat Pompeu Fabra was incorporated in the database until obtaining the same sequence from at least another independent extraction performed in a different institution. Sequences obtained were compared to sequences obtained in our laboratory from a hog badger (GenBank accession number AJ563704) and from the following Eurasian badger subspecies belonging to clearly separated and geographically isolated taxonomic units (Marmi et al. unpublished data): Europe, *M. m. meles* AJ563662-3, AJ563672-4, AJ563680 obtained from a total of n = 36 individuals; Southwest Asia, *M. m. canescens* AJ563681, AJ563683, AJ563685 (n = 8); North and East Asia, *M. m. leucurus* AJ563691-2, AJ563694, AJ563696, AJ563698 (n = 14); and Japan, *M. m. anakuma* AJ563702 (n = 1).

Since we had only one sample tissue of hog badger as control and we were not able to know the geographic variation of hog badger control region, we also amplified a fragment of 250 bp of cytochrome *b* gene in samples of brushes that were suspected to belong to hog badgers according to control region sequences. This fragment was amplified using primers

130- RESULTATS: CAPÍTOL III

MelCB1 (5' GCACCATCCAATATCTCAGC 3') and *MelCB2* (5' ATCCGTAATATAGGCCTCGTC 3') designed in our laboratory from the alignment of hog and Eurasian badger cytochrome *b* sequences, obtained from GenBank (accession numbers AB049810, AF068548, and AB049807, AB049809). The PCR conditions were the same that were used for the control region with the exception of the annealing temperature that was of 56°C and steps of the 40 PCR cycles were one minute each. The readable part of the sequence extended for 170 bp between positions 125 and 295 of the complete Eurasian and hog badger cytochrome *b* genes. Three partial cytochrome *b* sequences belonging to Eurasian badger subspecies – *M. m. meles* (corresponding to complete cytochrome *b* sequences AF068548 and AB049809); *M. m. leucurus* (corresponding to AB049807) – and hog badger (corresponding to AB049810) were used as controls.

Data analysis

Sequences were edited with BIOEDIT Sequence Alignment Editor ver.5.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) aligned with the CLUSTALW option included in this software and checked by eye. We constructed a phylogenetic tree based on the neighbor-joining method using DNADIST - assuming maximum likelihood distances and a transition/transversion ratio of 2.4 obtained from the data - and NEIGHBOR programs. Bootstrap values were obtained from 1,000 replicates generated using SEQBOOT which were analysed again with DNADIST and NEIGHBOR assuming the same conditions as described

above. Finally, a consensus tree was obtained with CONSENSE. All these programs are included in PHYLIP ver.3.5c package (Felsenstein 1993). An Eurasian otter (*Lutra lutra*) control region sequence (AJ006174) was used as outgroup.

Results

We were able to amplify and sequence eight of the thirteen shaving brushes samples tested (Sb2, Sb3, Sb4, Sb5, Sb6, Sb9, Sb10 and Sb12). The remaining samples could not be amplified (Sb1, Sb8 and Sb11) or the sequence of the PCR product produced a weak signal within extensive background (Sb7 and Sb13). The two extractions in two independent institutions resulted in the same sequence in all cases (Figure 1A).

The alignment of the sequences from both loci obtained from GenBank or in our laboratory revealed several nucleotide positions that were either species-specific or relevant to identify the geographical and the subspecies origin of Eurasian badgers (Figure 1). For control region HVS-I (Figure 1A) base positions 7, 33, 63 and 137 were relevant for assigning samples to *M. m. meles*; base positions 16 and 62 to *M. m. canescens*; base positions 14 and 16 to *M. m. leucurus*; and base positions 5, 9-14, 50-51, 67, 136 and 158 to *Arctonyx collaris*. In addition to several base positions with informative nucleotide substitutions and/or nucleotide deletions, we also found two repetitive tracts, between base positions 18-23 and 69-83 in the control region HVS-I, easy to detect in the chromatograms, which allowed a rapid identification of the species and/or

Figure 1: Hypervariable Segment I of the control region (A) and partial cytochrome *b* (B) polymorphic sites for control sequences belonging to Eurasian badger subspecies and the hog badger and for sequences obtained from shaving brushes (in bold and named as Sb followed by a number). Abbreviations of countries where brushes were manufactured are: NE, The Netherlands; FR, France; SP, Spain; IT, Italy. Abbreviations of institutions where the extractions were performed are also indicated: upf, Universitat Pompeu Fabra; uab, Universitat Autònoma de Barcelona; cmima, Centre Mediterrani d'Investigacions Marines i Ambientals; alt, ALTERRA. Dots (·) indicate nucleotide identity in relation to the top sequence, hyphens (-) indicate nucleotide deletions and question mark (?) indicate unresolved nucleotide positions.

A

<i>M. m. meles</i>	AJ563662	135791111111122344556666677777777891111111111
	AJ563663	0123467835335012367903456789010334455666
	AJ563672	26705378026
	AJ563673	CTTTACCTAACAT- ACTCAGGTGCCTCTTCCCTCGCAGGTAGCTTT
	AJ563674-.....A.G.....
	AJ563680-.....C.....
	Sb2NE (upf, cmima)-.....C.....C..
	-.....C.....A.....
	-.....C.....
<i>M. m. canescens</i>	AJ563681	...C.....-...TC...AC..TT.....G--...A.....
	AJ563683	...C.....-...TC...AC..TT.....G--...AA.....?
	AJ563685	...C.....-...TC...AC..TT.....G--...AA.....
<i>M. m. leucurus</i>	AJ563691	AC.C.....TT..T.TCT...CA.TTT.--G-...A...C...C
	AJ563692	AC.C.....TT..T.TCT...CA.TTT.--G-...A...C...C
	AJ563694	AC.C.....TT..T.TCT...CA.TTT.--G-...A...C.C.C
	AJ563696	AC.C.....TT..T.TCT...CA.TTT.--G-...A...GC...C
	AJ563698	AC.C.....TT..T.TCT...CA.TTT.--G-...A.CGC...C
	Sb5NE (cmima)	AC.C.....TT..T.TCT...CA.TTT.--G-...A...C...C
	Sb6NE (upf, uab)	AC.C.....TT..T.TCT...CA.TTT.--G-...A...C...C
	Sb12FR (uab, cmima)	AC.C.....TT..T.TCT...CA.TTT.--G-?.A...?C...C
<i>M. m. anakuma</i>	AJ563702	AC.CCAT.C.---TTTCT...CA.TTT.--A-...A..GC..CC
<i>A. collaris</i>	AJ563704	A.CC.-----CT.T.TCA.C.T.TT-----AT.C...T...
	Sb3NE (cmima)	A.CC.-----CT.T.TCA.C.T.TT-----A..C...T...
	Sb4NE (uab, cmima)	A.CC.-----CT.T.TCA.C.T.TT-----GC...?T?..
	Sb9SP (upf, uab)	A.CC.-----CT.T.TCA.C.T.TT-----?C...T...
	Sb10IT (upf, cmima)	A.CC.-----CT.T.TCA.C.T.TT-----?.?C...T...

B

<i>M. m. meles</i>	AF068548	11111111111122222222222222222222
	AB049809	2334666777880001122233344567888
		9584259147361470925814736513025
		ATTTTCCACCTATTCCCTTGCTTATCTTGC
	A.....
<i>M. m. leucurus</i>	AB049807	.C..C.....TC.C.TT..CA..C.....CA.
<i>A. collaris</i>	AB049810	C.CC.TTGTTTCT.C.TTCCATC..CTCCAT
	Sb3NE	C.CC.TTGTT.CT.C.TTC?ATC..CTCCAT
	Sb4NE	C.CC.TTGTT.CT.C.TTCCATC..CTCCAT
	Sb9SP	C.CC.TTGTT.CT.C.TTCCATC..CTCCAT
	Sb10IT	C.CC.TTGTT.CT.C.TTCCATC..CTCCAT

subspecies of origin of a given sample. The first repetitive tract (reading from 5' to 3') was a T₅ for *M. m. meles* and *M. m. canescens*, T₆ for *M. m. leucurus* and *M. m. anakuma*, and CT₅ for *A. collaris*. The second repetitive tract was C₂T₂CT₂C₃TC₄ or CT₃CT₂C₃TC₄ for *M. m. meles*, T₄CT₂C₂GC₃ for *M. m. canescens*, T₇GC₄ for *M. m. leucurus*, T₇AC₄ for *M. m. anakuma*, and CT₄C₃TC₄ for *A. collaris*. Eighteen base positions in the cytochrome *b* fragment were informative to distinguish between Eurasian and hog badger samples (Figure 1B).

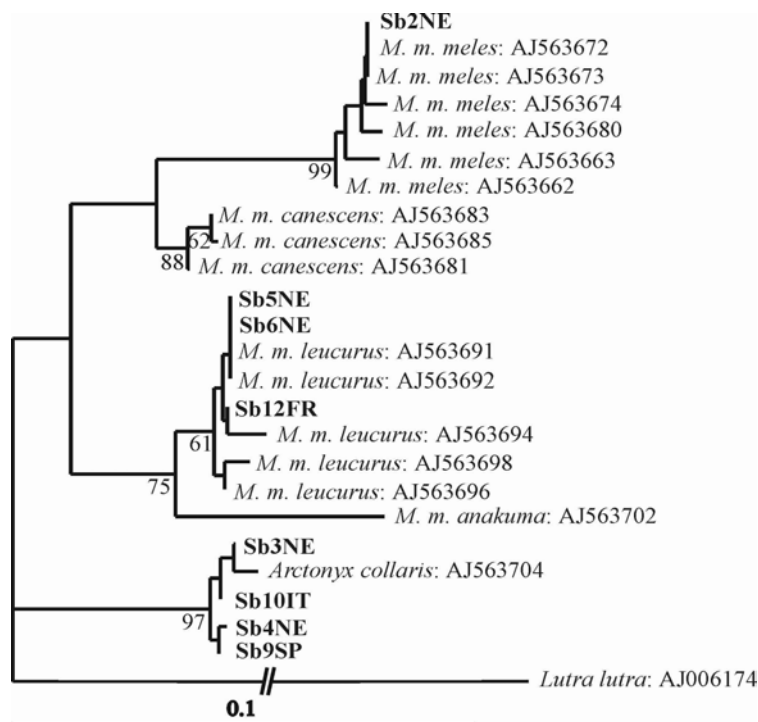
The neighbor-joining tree (Figure 2) based on control region HVS-I clearly supported the clustering of Sb2 sequence with those of Eurasian badger subspecies, *M. m. meles* with high bootstrap support (99% Figure 2). These results also supported the clustering of Sb5, Sb6 and Sb12 sequences with those of Eurasian badger subspecies *M. m. leucurus* although in

this case bootstrap support in the neighbor-joining tree was lower (61%). No sequence obtained from shaving brushes clustered with sequences belonging to *M. m. canescens* or *M. m. anakuma* subspecies. Sequences of Sb3, Sb4, Sb9 and Sb10 clearly clustered with that of hog badger in both analyses with a high bootstrap value (97%) in the control region neighbor-joining tree (Figure 2).

Discussion

Hair is a source of DNA (Higuchi et al. 1988), but since most of the DNA is located in the root, many genetic studies on wild mammals have used rooted hairs as a non-invasive source of DNA. Rooted hairs can be shed naturally (Vigilant 1999) or can be plucked, for instance by means of hair traps (Sloane et al. 2000). Mitochondrial DNA can be extracted from hair

Figure 2: Neighbor joining tree of sequences obtained from GenBank and from shaving brushes for the Hypervariable Segment I of the control region. Numbers indicate the bootstrap value obtained after performing 1,000 replicates.



shaft and amplified by PCR (Higuchi et al. 1988; Wilson et al. 1995). Moreover, since hair shaft contains very little if any nuclear DNA (Wilson et al. 1995), the accidental amplification of mtDNA nuclear insertions is unlikely.

The forensic identification of animal remnants frequently implies working with samples of suboptimal quality and resulting in diluted and degraded DNA. For highly degraded samples or those that have been processed during the manufacturing of a product, such as the hair of shaving brushes, the high copy number per cell of mtDNA will be the only source of nucleic acids for species identification (Bataille 1999). On the other hand, because in these cases DNA usually is also highly degraded, PCR amplification is only possible for short fragments. After the death of the animal oxidation and hydrolysis produce the decay of the DNA leaving not only fragmented and low traces of DNA, but also cross links and modified bases (Höss et al. 1996; Lindahl 1993). Physically isolated working areas, clean extractions, the inclusion of PCR controls, the amplification from different extracts, and the reproduction of the results in a second laboratory by an independent researcher have been established as authenticity criteria to determine post-mortem DNA sequence, such as in ancient DNA studies (Handt et al. 1996), and have been followed in this work.

Mitochondrial DNA have several characteristics that make it useful as a species-specific marker. Because mtDNA is haploid and maternally inherited, its effective population size is four times less than in nuclear genes (Birky et al. 1983) which can result in a relatively rapid loss or fixation of mtDNA genotypes (Avise et al. 1984). This makes mtDNA suitable for the identification of species-specific and population-

specific genotypes (Cronin et al. 1991). The high variability of the short mtDNA fragments analysed in this study have been highly effective to determine the specific or subspecific origin of badger hair used in the manufacturing of shaving brushes. This is supported by the identification of several diagnostic base positions in both loci (Figure 1) and the consistent clustering of sequences obtained from shaving brushes with their respective control Eurasian and hog badger sequences obtained from high-quality DNA (Figure 2).

The method described in this paper can be successfully applied to the monitoring of the trade of Eurasian badger derivatives and we have demonstrated that shaving brushes manufactured with Eurasian badger hair are sold in countries, such as Spain and The Netherlands, where the species is endangered and/or protected. We recommend the implementation of this protocol to determine the legal precedence of hair used by European companies in the manufacturing of badger products.

Acknowledgements

We thank M. Ponsà and R. Massana for allowing us to perform DNA extractions at the Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia (Universitat Autònoma de Barcelona) and at the Centre Mediterrani d'Investigacions Marines i Ambientals (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). A. Abramov from the Zoological Institute of St. Petersburg (Russian Academy of Sciences) provided a bone of hog badger which we used as control. We also thank O. Andrés, A. Martínez, A. Pérez-Lezaun and M. Vallès for their help in the laboratory. This work was supported by Parfumerie Douglas Netherland B.V.; Fundació Territori i Paisatge, Caixa de Catalunya,

134- RESULTATS: CAPÍTOL III

Barcelona; and the Generalitat de Catalunya, Spain (2001SGR00285). J. Marmi, A. Ferrando and J.F. López-Giráldez are supported by scholarships from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Refs. 2000FI-00698, 2002FI-00280 and 2001FI-00625 respectively).

Bibliography

- Aquadro CF, Greenburg BD (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* **103**: 287-312.
- Avise JC, Neigel JE, Arnold J (1984) Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution* **20**: 99-105.
- Baker CS, Palumbi SR (1994) Which wales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science* **265**: 1538-1539.
- Bataille M, Crainic K, Leterveux M, Durigon M, Mazancourt PD (1999) Multiplex amplification for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Science International* **99**: 165-170.
- Bender K, Schneider PM, Rittner C (2000) Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Science International* **113**: 103-107.
- Bensasson D, Zhang D-X, Harlt DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 314-321.
- Birky CW, Maruyama T, Fuerst P (1983) An approach to population genetic and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* **103**: 513-527.
- Brown WM, George M Jr, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **76**: 1967-1971.
- Bryant HN, Russell FLS AP, Fitch WB (1993) Phylogenetic relationships within the extant Mustelidae (Carnivora): appraisal of the cladistic status of the Simpsonian subfamilies. *Zoological Journal of the Linnaean Society* **108**: 301-334.
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R (2003) Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **4**: 119-141.
- Cronin MA, Palmisciano DA, Vyse ER, Cameron DG (1991) Mitochondrial DNA in wildlife forensic science: species identification of tissues. *Wildlife Society Bulletin* **19**: 94-105.
- Donnelly CA, Woodroffe R, Cox DR, Bourne J, Gettinby G, Le Fevre AM, McInerney JP, Morrison WI (2003) Impact of localized badger culling on tuberculosis incidence in British cattle. *Nature* **426**: 834-837.
- Dragoo JW, Honeycutt RL (1997) Systematics of mustelid-like carnivores. *Journal of Mammalogy* **78**: 426-443.
- Felsenstein J (1993) "Phylip 3.5c". Department of Genetics SK-50, University of Washington, Seattle.
- Gallagher J, Clifton-Hadley RS (2000) Tuberculosis in badgers; a review of disease and its significance for other animals. *Research in Veterinary Science*, **69**, 203-217.
- Griffiths HI, Thomas DH (1997) *The Conservation and Management of the European Badger (Meles meles)*. Nature and

- Environment, No. 90. Council of Europe, Strasbourg.
- Handt O, Krings M, Ward RH, Pääbo S (1996) The retrieval of ancient human DNA sequences. *American Journal of Human Genetics*. **59**: 368-376.
- Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, and Erlich HA (1988) DNA Typing from single hairs. *Nature* **332**: 543-546.
- Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S (1996) DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* **24**: 1304-1307
- Hsieh H-M, Huang L-H, Tsai L-C, Kuo Y-C, Meng H-H, Linacre A, Lee JC-I (2003) Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome *b* gene. *Forensic Science International* **136**: 1-11.
- Koepfli KP, Wayne RK (2003) Type I STS markers are more informative than cytochrome *b* in phylogenetic reconstruction of the Mustelidae (Mammalia: Carnivora). *Systematic Biology* **52**: 571-593.
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709-15.
- Macdonald DW (2001) *The New Encyclopaedia of Mammals*. Oxford University Press, Oxford.
- Marmi J, Abramov AV, Chashchin PV, Domingo-Roura X (in press) Phylogeny, subspeciation and genetic structure of the Eurasian badger (*Meles meles*) in the Iberian Peninsula and the World. In: *Ecology and Conservation of the Badger in Mediterranean Ecosystems* (eds. Virgós E, Mangas JG, Revilla E, Domingo-Roura X). Sociedad Española para la Conservación y el Estudio de los Mamíferos, Málaga.
- Monnat RJ, Reay DT (1986) Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues. *Gene* **43**: 205-211.
- Neal E, Cheeseman C (1996) *Badgers*. T and AD Poyser Ltd, London.
- Sloane MA, Sunnucks P, Alpers D, Beheregaray LB, and Taylor AC (2000). Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censusing method. *Molecular Ecology* **9**: 1233-1240.
- Vigilant L (1999) An evaluation of techniques for the extraction and amplification of DNA from naturally shed hairs. *Biological Chemistry*. **380**: 1329-1331
- Wan Q-H, Fang S-G (2003) Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *Forensic Science International* **131**: 75-78.
- Wilson MR, Polansky D, Butler J, DiZinno JA, Replogle J, and Budowle B. (1995) Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *BioTechniques* **18**: 662-669.

Capítol IV

Radiation and Phylogeography in the Japanese Macaque

Josep Marmi, Jaume Bertranpetit, Jaume Terradas, Osamu Takenaka i Xavier Domingo-Roura

Molecular Phylogenetics and Evolution; 2004: 30, 676-685



Radiation and phylogeography in the Japanese macaque, *Macaca fuscata*

Josep Marmi,^a Jaume Bertranpetit,^a Jaume Terradas,^b Osamu Takenaka,^c
and Xavier Domingo-Roura^{a,*}

^a *Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, Barcelona E-08003, Spain*

^b *Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra E-08193, Barcelona, Spain*

^c *Section of Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi 484, Japan*

Received 24 January 2003; revised 6 June 2003

Abstract

The Japanese macaque (*Macaca fuscata*) presumably differentiated from eastern rhesus macaque (*Macaca mulatta*) populations during the Pleistocene and the two species are closely related. In order to analyse speciation and subspeciation events in the Japanese macaque and to describe historical and current relationships among their populations, we sequenced and analysed a fragment of 392 bp of mitochondrial DNA (mtDNA) control region in 50 individuals belonging to six populations of Japanese macaque and compared these sequences with 89 eastern rhesus macaque control region sequences from GenBank/EMBL database. There were high genetic similarities between both species and only two positions were fixed within each species, which supports the inclusion of the Japanese macaque in a single species with eastern populations of rhesus macaques. Japanese macaque ancestors colonised Japan after the separation of the two species, estimated at between 0.31 and 0.88 million years ago (Mya). The star-like phylogeny, multimodal mismatch distribution, and lack of correlation between geographic and genetic distances are in accordance with a rapid dispersion of macaques throughout the archipelago after the arrival into Japan. The species shows low genetic variation within populations and high levels of genetic differentiation among populations with no mtDNA haplotype shared across populations. Genetic distances between Yakushima macaques (*Macaca fuscata yakui*) and any other population of *Macaca fuscata fuscata* subspecies are comparable to the distances between populations of Honshu, Awajishima, and Kyushu, not supporting the classification of Yakushima macaques as a different subspecies.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Macaca* includes up to 20 different species, which have been divided into four species groups according to morphological data (Fooden, 1976). The Japanese macaque, *Macaca fuscata*, is classified within the *fascicularis* group, the youngest among the species groups of macaques, and is closely related to the rhesus macaque, *Macaca mulatta* (Deinard and Smith, 2001; Eudey, 1980). Within this group, molecular data based on restriction enzyme analysis of the entire mitochondrial DNA (mtDNA) supports a closer relationship

between the Japanese macaque and the rhesus macaque than between the Japanese macaque and either Formosan, *Macaca cyclopis*, or crab-eating, *Macaca fascicularis*, macaques (Hayasaka et al., 1988). Whereas the rhesus and the crab-eating macaques are diverse and widespread, the Japanese and the Formosan macaques are restricted to the Japanese archipelago and Taiwan, respectively. Morales and Melnick (1998) provide figures of the range of distribution of macaque species.

The ancestors of the Japanese macaque presumably differentiated from eastern populations of the rhesus macaque (Melnick et al., 1993) and colonised Japan by the Middle Pleistocene (Delson, 1980; Morales and Melnick, 1998). During Pleistocene and Early Holocene epochs, there were several glaciations that caused the

* Corresponding author. Fax: +34-93-542-28-02.

E-mail address: xavier.domingo@upf.es (X. Domingo-Roura).

decline of the sea level and the formation of a land bridge between Korea and Japan, which was likely exposed and submerged several times (Emery et al., 1971). Fossil data support the existence of macaques in Japan at least since Late Pleistocene (Iwamoto, 1975; Iwamoto and Hasegawa, 1972). During the glacial periods the Japanese islands were connected by land bridges, which were used by the ancestors of the Japanese macaque to spread across the Japanese archipelago. At the present time, the Japanese macaque is distributed from Shimokita Peninsula, at the northern limit of Honshu (41°20'N), to Yakushima Island, at the southern limit of the archipelago (30°20'N; Hill, 1992).

The Japanese macaque has been traditionally classified into two subspecies, *Macaca fuscata yakui* inhabiting Yakushima Island and *Macaca fuscata fuscata* found in the rest of Japan (Izawa et al., 1996). However, this classification has been questioned on the basis of protein electrophoresis polymorphisms (Hayasaka et al., 1987; Nozawa et al., 1991).

The Japanese macaque lives in social groups structured around sets of matrilineal kingroups, which are closely related, and a small number of central adult males, usually unrelated (Fedigan, 1982). Males are the dispersing sex and leave their natal troop before reaching sexual maturity, whereas females have a marked philopatry (Itani, 1972; Pusey and Packer, 1987). Migrant males and geographic range continuity are expected to uniform nuclear genetic variation throughout the species range. In contrast, female philopatry is expected to maintain mtDNA differences across populations independently of habitat fragmentation (Melnick and Hoelzer, 1992). Even if variation in mtDNA not always reflects population genetic structuring, parapatry within a given species and ancient biogeographical events can be reflected in the mtDNA when the nuclear genome has already been homogenised (Melnick and Hoelzer, 1992). Thus, the analysis of variation in mtDNA can be a very useful tool to investigate the history of ancestral populations of the Japanese macaque after the colonisation of Japan.

There has been a notable effort for studying genetic variation in the Japanese macaque (Hayasaka et al., 1986, 1987, 1991; Nozawa et al., 1982, 1991). Blood protein polymorphisms and restriction patterns of the complete mtDNA of the Japanese macaque showed reduced levels of variation within local populations but relevant differences among populations (Hayasaka et al., 1986, 1987; Nozawa et al., 1982, 1991). Genetic variation is lower in southern latitudes (Nozawa et al., 1991) where density is high, home ranges are small, and troops overlap with each other (Azuma, 1985) than in northern latitudes.

In spite of the potential information contained in mtDNA sequences, such as population ancestry or female inheritance, few studies have included mtDNA

sequence data (Hayasaka et al., 1991, 1996). A reduced number of individuals have been included in these studies and few sequences currently appear in the GenBank/EMBL database. In this work we have sequenced 50 mtDNA control regions from a minimum of six individuals from six different populations covering most of the range of the species and compared these sequences with 89 sequences from seven populations of eastern rhesus macaque obtained from GenBank/EMBL with the following objectives: (i) to estimate the degree and age of separation of Japanese and rhesus macaque species, (ii) to describe mtDNA variation in most of the geographic distribution of the Japanese macaque, (iii) to describe the history of ancestral populations of Japanese macaque, and (iv) to clarify Japanese macaque subspeciation.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

DNA samples from 39 Japanese macaques belonging to five different *M. f. fuscata* populations of Honshu, Awajishima, and Kyushu (Hakusan ($n = 8$), Takahama ($n = 9$), Awajishima ($n = 8$), Takasakiyama ($n = 6$), and Koshima ($n = 8$)) were kindly provided by the Primate Research Institute (Kyoto University). DNA samples from 11 Yakushima macaques, *M. f. yakui*, were obtained from semen as previously described (Domingo-Roura, 1998).

2.2. PCR amplification and sequence acquisition

A fragment of 392 bp of the mtDNA control region hypervariable segment I was amplified using human primers L15996 (5' CTCCACCATTAGCACCCAAA GC 3') and H16401 (5' TGATTTCACGGAGGATGG TG 3') (Vigilant et al., 1989). Twenty-five microlitres of PCRs contained 150 ng of target DNA, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 67.0 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.01% Tween 20, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 mM of each nucleotide, 1.7 pmol of each primer, and 0.85 U *Taq* DNA polymerase (Ecogen, Madrid, Spain). The PCR programme used for thermal cycling included an initial cycle of denaturing at 94 °C for 5 min, 25 cycles divided in three steps of 1 min each at 94 °C (denaturing), 57 °C (annealing), and 72 °C (extension), and a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were purified with GeneClean (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA) and sequenced in both directions using dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the instructions of the manufacturer. Each reaction tube contained 4 µl of PCR product, 2.9 µl of H₂O, 1.6 pmol of primer L15996 or H16401, and 1.5 µl of Sequencing Kit in a total volume of 10 µl. Twenty-five PCR cycles

ing tree was constructed using DNADIST (assuming Kimura-2-parameter model) and NEIGHBOR programmes. Maximum-likelihood tree was estimated using DNAML programme performing global rearrangements. These programmes are included in PHYLIP v3.5c. package (Felsenstein, 1993). In both analyses a transition/transversion ratio obtained from ARLEQUIN using these 18 Japanese and rhesus macaque sequences was applied. PHYLIP v3.5c package was also used to perform 1000 replications of the trees to obtain bootstrap values using SEQBOOT programme, and to obtain the consensus tree using CONSENSE programme.

The relationship between genetic and geographic distances between Japanese macaque populations was estimated using Mantel-test of the ARLEQUIN package performing 1000 permutations. Geographic distances were estimated in kilometres from the latitudinal and longitudinal coordinates using Haversine geodesic distances (Sinnott, 1984).

3. Results

3.1. Levels of polymorphism

We detected a total of 136 substitutions and 7 insertion/deletion events in 387 bp among rhesus and Japanese macaque sequences. Among the substitutions, 126 were transitions, and 10 were transversions. Only two polymorphic sites, located at 65 and 200 bp from the origin, were fixed between species. The transition/transversion ratio is 12.6. Table 1 shows the mean number of nucleotide differences (d_A) between rhesus and Japanese macaque populations.

We found 123 polymorphic sites in 387 bp within the rhesus macaque. Within the Japanese macaque 61 sites in 392 bp were polymorphic, of which 57 were transitions, one was a transversion, and three were insertion/deletion events (Fig. 1). The transition/transversion ratio is 57. No haplotype was shared across populations. Within populations, only in Takahama and Koshima more than one haplotype was found. Two haplotypes from Koshima (Ko1 and Ko2) differed by only one

nucleotide position. The three haplotypes found in Takahama (Ta1, Ta2, and Ta3) differed by three nucleotide positions. Table 2 shows the mean number of nucleotide differences within and between Japanese macaque populations. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showed that 99.16% of variation was due to differences among populations and only 0.84% was associated with variation within populations.

3.2. Pairwise difference distribution and ages of expansion and separation

Fig. 2 shows the pairwise difference distribution within each species and the two species together (Harpending et al., 1993; Rogers and Harpending, 1992). Mismatch distribution within the Japanese macaque was multimodal with the highest observed frequencies at 0 and 24 differences. The value of τ was 28.26 and the mismatch distribution estimated from 1000 bootstrap iterations showed a 95% confidence interval from 21.62 to 32.50 ($\alpha = 0.05$). The sum of square deviations (SSD) between the observed and the expected mismatch was $SSD = 0.04$, $P < 0.001$. Tajima's D statistic was positive ($D = 2.37$, $SD = 0.93$, $P < 0.01$) and Fu's F_S statistic had a large positive value ($F_S = 20.34$, $P < 0.001$). Thus, the possibility of a sudden expansion in Japanese macaque populations in the past has to be discarded. Within the rhesus macaque the mismatch distribution was bell-shaped and the following values were obtained: $\tau = 30.58$ (95% confidence interval = 23.20–34.33); $SSD = 0.0042$, $P = 0.23$; $D = 0.33$, $SD = 0.91$, $P = 0.31$; $F_S = -5.25$, $P = 0.14$. The mismatch distribution suggests that a sudden expansion occurred in the past although Tajima's D and Fu's F_S were not significant. If we apply the 95% confidence interval around τ to Eq. (1), we can estimate the age of expansion of rhesus macaques to be between 0.52 and 0.77 Mya (for $m_1 = 1.15 \times 10^{-7}$, Vigilant et al., 1991) and 0.18–0.27 Mya (for $m_2 = 3.3 \times 10^{-7}$, Ward et al., 1991). By treating the two species as a single population we can infer about the history of the common ancestral population of Japanese and eastern rhesus macaques. In this case we obtained a bell-shaped mismatch distribution with the following values: $\tau = 26.51$ (95% confidence

Table 1

Mean number of nucleotide differences between Japanese and rhesus macaque populations in a fragment of 387 bp of mtDNA control region

		Japanese macaque					
		Hakusan	Takahama	Awajishima	Takasakiyama	Koshima	Yakushima
Rhesus macaque	Henan	51.6	47.9	44.1	39.5	42.6	29.9
	Zhejiang	47.1	45.3	40.1	36.4	39.9	27.1
	Fujian	48.5	43.3	45.3	39.2	38.1	29.0
	Guangxi	40.8	41.5	36.6	36.7	38.9	24.8
	Hainan	43.9	38.4	36.1	42.0	38.8	26.4
	Yunnan	44.3	40.0	34.7	37.4	34.8	32.0
	Vietnam	45.6	45.2	43.0	39.5	42.3	28.8

Table 2

Mean number of nucleotide differences among (below diagonal) and within (diagonal) Japanese macaque populations in a fragment of 392 bp of mtDNA control region

	Hakusan	Takahama	Awajishima	Takasakiyama	Koshima	Yakushima
Hakusan	0.0					
Takahama	7.1	0.7				
Awajishima	32.4	33.2	0.0			
Takasakiyama	28.2	32.1	26.8	0.0		
Koshima	30.3	27.4	26.0	24.1	0.7	
Yakushima	23.4	26.9	24.9	23.0	26.8	0.0

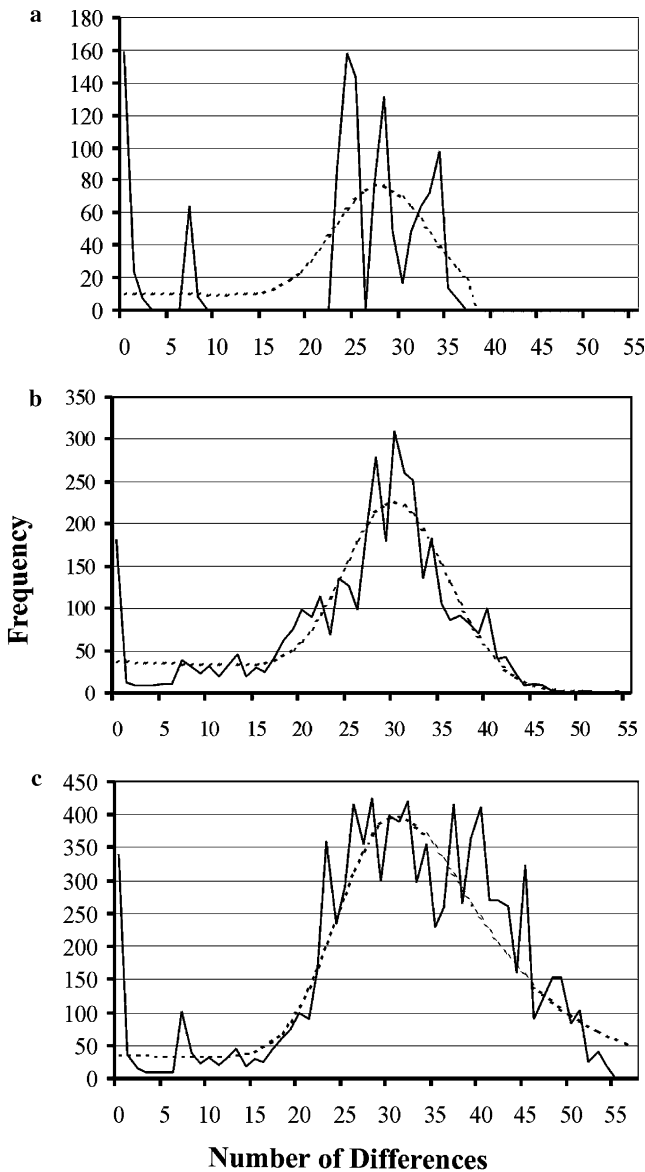


Fig. 2. Observed (solid line) and expected (discontinuous line) mismatch distributions showing the frequencies of pairwise differences: (a) within Japanese macaque; (b) within rhesus macaque; (c) considering Japanese and rhesus macaques together.

interval = 20.14–44.35); $SSD = 0.0031$, $P = 0.21$; $D = 0.92$, $SD = 0.90$, $P = 0.13$; $F_5 = -2.84$, $P = 0.35$. If we apply Eq. (1) we estimated a sudden expansion

occurring between 0.45 and 1.00 Mya (using m_1) or 0.16–0.35 Mya (using m_2). The estimate of the age of separation of the two species using m_1 was 0.88 Mya for a mean number of nucleotide differences of 39.2 (Table 1; range 0.56 Mya for $d_{A \text{ min}} = 24.8$ to 1.16 Mya for $d_{A \text{ max}} = 51.6$). Using m_2 the estimated age of separation decreased to 0.31 Mya (range 0.19–0.40 Mya).

3.3. Japanese macaque haplotype genealogy

Neighbor-joining and maximum-likelihood trees gave similar topologies—revealing low variation within groups and clear differences among them—and very low bootstrap values in the short central internodes connecting long external branches (Fig. 3). The main differences

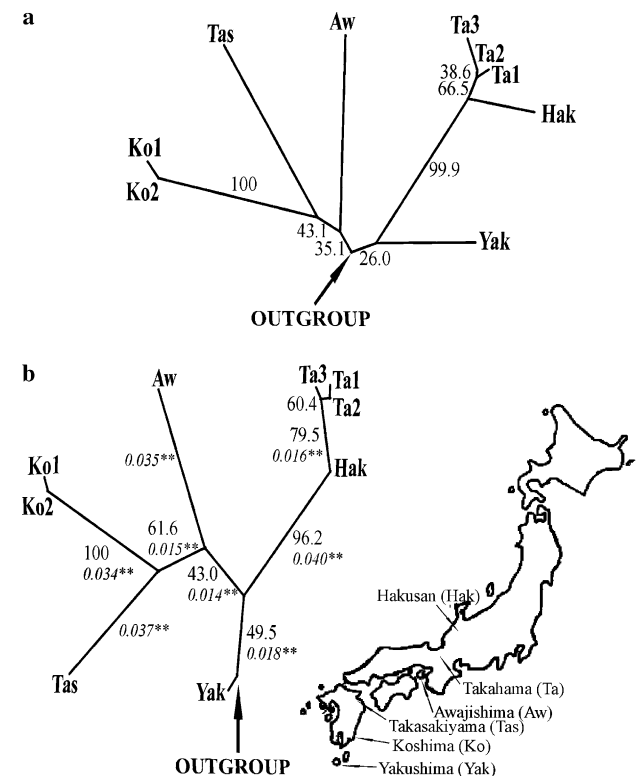


Fig. 3. Phylogenetic trees showing the relationships between Japanese macaque haplotypes using neighbor-joining (a) and maximum-likelihood (b) methods. Bootstrap values are included in both trees. Branch lengths (in italics) are shown in the maximum-likelihood tree (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

between the trees obtained with the two methods refer to the structure of internal branches, which, as expected, have low statistical support. Neighbor-joining method clustered the haplotype from Yakushima with the ones from Honshu (Hakusan and Takahama) in 26% of trees resampled. Maximum-likelihood method placed the haplotype from Yakushima near the rhesus sequences and outwardly of the cluster formed by the haplotypes from Kyushu populations (Takasakiyama and Koshima) and Honshu populations in 49.5% of trees resampled. The two topologies agreed with the clustering of haplotypes from Honshu and Kyushu separately. If Hakusan and Takahama are considered a single population, the shape of the tree is clearly star-like, as none of the internal nodes is robust. Using Mantel's test, we found a poor relationship between genetic and geographic distances ($r = 0.171$, $P = 0.31$), showing a lack of genetic stratification related to geographic distance.

4. Discussion

4.1. Genetic diversity

The mean number of nucleotide differences between eastern rhesus and Japanese macaques obtained in this study range between 25 and 52 for the 387 bp analysed giving a 6–13% sequence divergence. These divergence values question the separation of the Japanese and eastern rhesus macaques in two species since it is lower than the 16.5–19.2% described, also for mtDNA control region, between Borneo (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) and Sumatran (*Pongo pygmaeus abelli*) orang-utan subspecies (Warren et al., 2001) and similar to the differences between three gorilla subspecies: 13.2% between western lowland (*Gorilla gorilla gorilla*) and mountain (*Gorilla gorilla beringei*) gorillas; 13.6% between western and eastern (*Gorilla gorilla graueri*) lowland gorillas; and 6.3% between the eastern lowland and mountain gorillas (Garner and Ryder, 1996).

The analysis of 896 bp region of mtDNA showed that the intraspecific divergence within the rhesus macaque (6.2%) greatly exceeded the interspecific divergence among the eastern rhesus and the Japanese and Formosan macaques (3.6 and 3.2%, respectively) (Hayasaka et al., 1996). Similarly, a detailed geographical study using mtDNA haplotypes obtained with endonucleases, showed that eastern populations of rhesus macaque are more divergent from those of western populations than they are from the Japanese and Formosan macaques (Fooden, 2000; Zhang and Shi, 1993). The range of sequence divergence between pairs of other macaque species analysed was from 6.0% between the Assamese (*M. assamensis*) and the Tibetan (*M. thibetana*) macaques to 15% between the Bonnet (*M. radiata*) and the pig-tailed (*M. nemestrina*) macaques (Hayasaka et al.,

1996). Bornean and Sumatran orang-utans showed a sequence divergence of 4.6% in the same region (Brown et al., 1982; Horai et al., 1995). In addition, since we found that only two among 136 variable positions were fixed between species and the differences between eastern rhesus and Japanese macaques were often within the range obtained in comparisons between Japanese macaque populations, the separation between the two species is unclear. The separation is further confused by the fact that almost all alleles in blood protein polymorphism detected in the Japanese macaque can also be found in the rhesus macaque (Nozawa et al., 1982). Retention of ancestral polymorphisms or interspecific hybridisation could be possible explanations for these findings (Hayasaka et al., 1996; Melnick et al., 1993). We propose the need to reconsider the division of western and eastern rhesus macaques in two different species and reduce the number of species within the *fascicularis* group by the possible inclusion of Japanese and the Formosan macaques in a single species together with eastern populations of rhesus macaques. However, this proposal should be confirmed with additional nuclear sequences.

If we assume the estimated age of separation between rhesus and Japanese macaques from the date of the colonisation of Japan at 0.5 Mya, based on fossil evidence (Kamei, 1969), the nucleotide divergence rates range is 12–26% per Mya. This value falls within the range from 11.5 (Vigilant et al., 1991) to 33% (Ward et al., 1991) described for primate control regions.

4.2. Ancestry

The Japanese macaque originated from Chinese populations of rhesus macaque after the mtDNA of this latest species was divided into two isolated lineages—eastern and western populations—due to a glacial ice sheet in the Brahmaputra River valley formed during the Pleistocene (Melnick et al., 1993). The estimation of the age of separation between Japanese and rhesus macaques highly depends on the divergence rate used in the calculations. The two divergence rates used in this study are based on well dated events and have been extensively used to estimate ages of divergence and population expansions in primates (e.g., Goldberg and Ruvolo, 1997; Warren et al., 2001). For a mean value of $d_A = 39.2$, we obtained a range of ages of separation between 0.31 and 0.88 Mya. The maximum sequence difference can provide an estimate of the time since separation of the most divergent pair of sequences. This value equals 0.40 Mya for a divergence of 33% per Mya (Ward et al., 1991) and 1.16 Mya for a divergence of 11.5% per Mya (Vigilant et al., 1991). Our results are in agreement with, and support with stronger molecular evidence based on a large number of sequences, the age range of 0.65–0.73 Mya proposed by Hayasaka et al.

(1996) for the separation between rhesus and Japanese macaques based on only three mtDNA sequences, and with the estimation of the age of colonisation of Japan by macaques between 0.4 and 0.5 Mya based on fossil evidence (Kamei, 1969).

The mismatch distribution of the Japanese macaque was multimodal, suggesting that no sudden expansion occurred in the ancestral populations of this species (Rogers and Harpending, 1992). In addition, Tajima's D statistic is positive and Fu's F_S statistic has a large value whereas a sudden expansion leads to low and negative values. The bell-shaped mismatch distribution (characteristic of a sudden expansion) may be associated to gene genealogies with very short internodes and long external branches where the majority of mutations have accumulated (Harpending and Rogers, 2000) but in our case the topology of gene genealogies is better explained with a strong substructuring of ancestral populations and population radiation.

Our results based on the mismatch distribution suggest that there was a sudden expansion in the ancestral eastern rhesus macaque populations between 0.18 and 0.77 Mya. From the bell-shaped mismatch distribution obtained treating the two species as a single group we estimated the age of expansion of the common ancestors of Japanese and eastern rhesus macaque populations between 0.16 and 1.00 Mya. However, the slightly positive and not significant values of Tajima's D and their appreciable variance in the rhesus macaque and the two species together may be indicators of the effect of mutation rate heterogeneity in addition to a sudden expansion (Aris-Brosou and Excoffier, 1996). In this case, the ages of expansion could be underestimated.

Our data agree with the following scenario that occurred by the Middle Pleistocene. In a short period of time there was a sudden expansion of eastern macaques, linked to dispersal from south to north. A group of eastern macaques took advantage of this expansion-dispersal episode to colonise Japan from Korea. Then the Japanese macaque ancestors dispersed quickly throughout Japan (with the exception of Hokkaido) because there were land bridges connecting different Japanese islands. After this dispersion, land bridges were submerged by the rise of the sea level and Japanese macaque populations became isolated in different islands. If a small number of macaques colonised Japan and the dispersion throughout Japan was fast, an initially homogeneous set of mtDNA genotypes evolved independently in reduced and discrete local populations due to geographic isolation and female philopatry during the last thousands of years.

Like the Japanese macaque, other species, such as the sika deer, *Cervus nippon*, and the sable, *Martes zibellina*, are also believed to have colonised Japan during the Pleistocene (Anderson, 1970; Kawamura, 1991). The *Martes* genus was already present in actual East Russia

during the Pleistocene and colonised Japan from the north (Kurose et al., 1999). In addition, there is evidence of recent communication through ice age land bridges between Hokkaido and the continent for the sable and the red fox, *Vulpes vulpes*, (Hosoda et al., 1999; Tsuda et al., 1997). This communication was not possible for the Japanese macaque since non-human primates do not reach such northern latitudes.

4.3. Population differentiation and phenetic relationships

The present mitochondrial data support an early population isolation of the Japanese macaque. Short length and low bootstrap values of internal branches combined with long external branches also support the long-term separation among populations. We found most of the variation among populations (99%), whereas within population variability was very low (1%). Although this result agrees with other studies (e.g., Hayasaka et al., 1986, 1987; Nozawa et al., 1982, 1991) the low levels of genetic variation found within populations can also be biased because of the small sample size for each population. Hayasaka et al. (1986) also found population-specific restriction enzyme patterns of mtDNA. A similar pattern has been observed in other macaque species, such as the crab-eating macaque (*M. fascicularis*, Perwitasari-Farajallah et al., 1999) but not in all other macaques (e.g., toque macaques, *Macaca sinica*, Hoelzer et al., 1994) where female movements might be more relevant. The pattern is also different from the one obtained in humans and east African chimpanzees, also from the analyses of mtDNA (Goldberg and Ruvolo, 1997). In this latter species, 80–85% of genetic diversity is contained within populations and only 15–20% of genetic diversity is specific to particular isolated populations. These results are certainly linked to the ability of chimpanzees and humans of both sexes, in particular females, to maintain gene flow over important geographic distances. In east African chimpanzees, haplotypes were shared up to 583 km apart. Orang-utans show intermediate values with 71% of genetic diversity attributable to differences among populations between Borneo and Sumatra and 28% among populations of Borneo (Warren et al., 2001).

We found that 99% of the variation observed is due to variation among populations, whereas Nozawa et al. (1991) could only explain 32% of the total genetic variation found in blood proteins by interpopulation differences. The comparison suggests male-mediated gene flow as has been described for sika deer (Goodman et al., 2001) that would be interesting to check through Y chromosome analysis.

The mitochondrial genome is maternally inherited and free from recombination, and thus has a lower effective population size than nuclear autosomes. This reduced effective population size leads to higher levels of

genetic drift (Birky et al., 1989) and increased fixation rates (Brown et al., 1979).

The population separation we found is likely linked to both, the use of mitochondrial sequences and the strong female philopatry shown by the species. Selection, including cultural selection (Whitehead, 1998), where neutral mitochondrial alleles might hitchhike upon selected matrilineally transmitted cultural traits, could also favour the reduction in variability. Moreover, current populations of Japanese macaques are usually separated by insularism and human promoted habitat fragmentation. All these factors contribute to the poor relationship observed between genetic variability and geographic distance.

4.4. Subspeciation of the Yaku macaques

Yakushima macaques are classified as a different subspecies, *M. f. yakui*, and are considered as endangered by the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). Yakushima has the most viable population of macaques in Japan but is threatened by hunting, trapping, and the inadequacy of existing protected areas for the conservation of their habitat (Hill, 1992).

However, the subspeciation of *M. f. yakui* has been debated. In order to define evolutionary significant units and conservation strategies it is important to combine evidences from different origins such as nuclear and mitochondrial sequences or morphological and molecular data (Domingo-Roura et al., 2001). The genetic distances between the Yaku macaques and the other populations of Japanese macaque from Honshu, Awajishima, and Kyushu are not important enough to support the existence of a different subspecies in Yakushima, confirming with a relevant number of mitochondrial sequences previous results in the same line based on restriction patterns of the complete mtDNA (Hayasaka et al., 1986) and protein polymorphisms (e.g., Nozawa et al., 1991). Nozawa et al. (1991) found that all local populations of Japanese macaques from central and southern Honshu, Shikoku, and Kyushu had a closer genetic relationship with Yaku macaques than with the consubspecific Wakinozawa population of Shimokita Peninsula, in northern Honshu. Subspeciation of the sika deer has also been debated with molecular data (Nagata et al., 1999; Tamate and Tsuchiya, 1995). Neither deer (*Cervus nippon yakushimae*) nor macaque differentiation as a subspecies inhabiting Yakushima island are supported with mtDNA data.

Acknowledgments

We wish to thank Francesc Calafell, Oscar Lao, Sergi Castellano, Arcadi Navarro, and Julio Rozas for their

help in data analyses, José Antonio Pereira for graphical support, and Marta Pulido for editorial assistance. Anna Pérez-Lezaun, Joan Francesc López-Giráldez, Olga Andrés, and David Comas provided useful advise in the laboratory. Financial support was provided by the Ministerio de Educación y Cultura (Spain) (Ref. PB98-1064), the Institut d'Estudis Catalans, and the European Commission (Contract Ref. INPRIMAT QLRI-CT-2002-01325). The first author is supported by a scholarship from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Ref. 2000FI-00698).

References

- Anderson, E., 1970. Quaternary evolution of genus *Martes*. (Carnivora, Mustelidae). Acta Zool. Fennica 130, 1–133.
- Aris-Brosou, S., Excoffier, L., 1996. The impact of population expansion and the mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. Mol. Biol. Evol. 13, 494–504.
- Azuma, S., 1985. Ecological biogeography of Japanese monkeys (*Macaca fuscata* Blyth) in the warm- and cold-temperate forest. In: Kawamichi, T. (Ed.), Contemporary Mammalogy in China and Japan. Mammalogical Society of Japan, Osaka, pp. 1–5.
- Birky Jr., C.W., Fuerst, P., Maruyama, T., 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effect of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. Genetics 121, 613–627.
- Brown, W.M., George Jr., M., Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1967–1971.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. J. Mol. Evol. 18, 225–239.
- Deinard, A., Smith, D.G., 2001. Phylogenetic relationships among the macaques: evidence from the nuclear locus *NRAMP1*. J. Hum. Evol. 41, 45–59.
- Delson, E., 1980. Fossil macaques, phyletic relationships and a scenario of deployment. In: Lindburg, D. (Ed.), The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 10–30.
- Domingo-Roura, X., 1998. The analysis of hypervariable DNA regions for the study of the ecology and genetic structure of wild mammalian populations. Applications to conservation biology, Ph.D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (microfilm edition).
- Domingo-Roura, X., Marmi, J., López-Giráldez, J.F., Garcia-Franquesa, E., 2001. New molecular challenges in animal conservation. Anim. Biodivers. Conserv. 24, 19–29.
- Emery, K.O., Niino, H., Sullivan, B., 1971. Post-Pleistocene levels of the East China Sea. In: Turekian, K.K. (Ed.), Late Cenozoic Glacial Ages. Yale University Press, New Haven, pp. 381–390.
- Eudey, A., 1980. Pleistocene glacial phenomena and the evolution of Asian macaques. In: Lindburg, D. (Ed.), The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 52–83.
- Fedigan, L.M., 1982. Primate Paradigms Sex Roles and Social Bounds. Eden Press, Montreal, Canada.
- Felsenstein, J., 1993. Phylip 3.5c. Department of Genetics SK-50, University of Washington, Seattle.
- Fooden, J., 1976. Provisional classification and key to living species of macaques (Primates: *Macaca*). Folia Primatol. 25, 225–236.

- Fooden, J., 2000. Systematic review of the rhesus macaque, *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780). Field Museum of Natural History, Illinois, USA.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
- Garner, K.J., Ryder, O.A., 1996. Mitochondrial DNA diversity in gorillas. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, 39–48.
- Goldberg, T.L., Ruvolo, M., 1997. The geographic apportionment of mitochondrial genetic diversity in east African chimpanzees, *Pan troglodytes schweinfurthii*. *Mol. Biol. Evol.* 14, 976–984.
- Goodman, S.J., Tamate, H.B., Wilson, R., Nagata, J., Tatsuzawa, S., Swanson, G.M., Pemberton, J.M., McCullough, D.R., 2001. Bottlenecks, drift and differentiation: the population structure and demographic history of sika deer (*Cervus nippon*) in the Japanese archipelago. *Mol. Ecol.* 10, 1357–1370.
- Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R., Stoneking, M., 1993. The genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthropol.* 34, 483–496.
- Harpending, H.C., Rogers, A., 2000. Genetic perspectives on human origins and differentiation. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 1, 361–385.
- Hayasaka, K., Horai, S., Shotake, T., Nozawa, K., Matsunaga, E., 1986. Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese monkeys, *Macaca fuscata*. *Jpn. J. Genet.* 61, 345–359.
- Hayasaka, K., Kawamoto, Y., Shotake, T., Nozawa, K., 1987. Population genetic study of Japanese macaques, *Macaca fuscata*, in the Shimokita A1 troop, with special reference to genetic variability and relationships to Japanese macaques in others troops. *Primates* 28, 507–516.
- Hayasaka, K., Horai, S., Gojobori, T., Shotake, T., Nozawa, K., Matsunaga, E., 1988. Phylogenetic relationships among Japanese, rhesus, Formosan and crab-eating monkeys, inferred from restriction-enzyme analysis of mitochondrial DNAs. *Mol. Biol. Evol.* 5, 270–281.
- Hayasaka, K., Ishida, T., Horai, S., 1991. Heteroplasmy and polymorphism in the major noncoding region of mitochondrial DNA in Japanese monkeys: association with tandemly repeated sequences. *Mol. Biol. Evol.* 8, 399–415.
- Hayasaka, K., Fujii, K., Horai, S., 1996. Molecular phylogeny of macaques: implications of nucleotide sequences from an 896-bp region of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1044–1053.
- Hill, D.A., 1992. Conservation of the Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*) in Yakushima: the need for effective protected areas. In: Itoigawa, N., Sugiyama, Y., Sackett, G.P., Thompson, R.K.R. (Eds.), *Topics in Primatology*, vol. 2: Behavior, Ecology and Conservation. University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 395–401.
- Hoelzer, G.A., Dittus, W.P.J., Ashley, M.V., Melnick, D.J., 1994. The local distribution of highly divergent mitochondrial DNA haplotypes in toque macaques *Macaca sinica* at Polonnaruwa, Sri Lanka. *Mol. Ecol.* 3, 451–458.
- Horai, S., Hayasaka, K., Kondo, R., Tsugane, K., Takahata, N., 1995. Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 532–536.
- Hosoda, T., Suzuki, H., Iwasa, M.A., Hayashida, M., Watanabe, S., Tataru, M., Tsuchiya, K., 1999. Genetic relationships within and between the Japanese marten *Martes melampus* and the sable *Martes zibellina*, based on variation of mitochondrial DNA and nuclear ribosomal DNA. *Mammal Study* 24, 25–33.
- Itani, J., 1972. A preliminary essay on the relationship between incest avoidance in primates. In: Poirier, F.E. (Ed.), *Primate Socialization*. Random Press, New York, pp. 165–171.
- Iwamoto, M., 1975. On a skull of a fossil macaque from the Shikimizu limestone quarry in the Shikoku District, Japan. *Primates* 16, 83–94.
- Iwamoto, M., Hasegawa, Y., 1972. Two macaque fossil teeth from the Japanese Pleistocene. *Primates* 13, 77–81.
- Izawa, K., Kasuya, T., Kawamichi, T., 1996. The Encyclopaedia of Animals of Japan, vol. 2 Mammals II. Heibonsha, Tokyo (in Japanese).
- Kamei, T., 1969. Mammals of the glacial age in Japan—especially on Japanese monkey. *Monkey* 106, 5–12 (in Japanese).
- Kawamura, Y., 1991. Quaternary mammalian faunas in the Japanese islands. *Quaternary Res.* 30, 213–220.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, AZ, USA.
- Kurose, N., Masuda, R., Siritaroonrat, B., Yoshida, M.C., 1999. Intraspecific variation of mitochondrial cytochrome *b* gene sequences of the Japanese marten *Martes melampus* and the sable *Martes zibellina* (Mustelidae, Carnivora, Mammalia) in Japan. *Zool. Sci.* 16, 693–700.
- Melnick, D.J., Hoelzer, G.A., 1992. Differences in male and female macaque dispersal lead to contrasting distributions of nuclear and mitochondrial DNA variation. *Int. J. Primatol.* 13, 379–393.
- Melnick, D.J., Hoelzer, G.A., Absher, R., Ashley, M.V., 1993. mtDNA diversity in rhesus monkeys reveals overestimates of divergence time and paraphyly with neighboring species. *Mol. Biol. Evol.* 10, 282–295.
- Morales, J.C., Melnick, D.J., 1998. Phylogenetic relationships of the macaques (Cercopithecidae: *Macaca*), as revealed by high resolution restriction site mapping of mitochondrial ribosomal genes. *J. Hum. Evol.* 34, 1–23.
- Nagata, J., Masuda, R., Tamate, H.B., Hamasaki, S., Ochiai, K., Asada, M., Tatsuzawa, S., Suda, K., Tado, H., Yoshida, M.C., 1999. Two genetically distinct lineages of the sika deer, *Cervus nippon*, in the Japanese islands: comparison of mitochondrial D-loop region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13, 511–519.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nozawa, K., Shotake, T., Kawamoto, Y., Tanabe, Y., 1982. Population genetics of Japanese monkeys: II. Blood protein polymorphisms and population structure. *Primates* 23, 252–271.
- Nozawa, K., Shotake, T., Minezawa, M., Kawamoto, Y., Hayasaka, K., Kawamoto, S., Ito, S., 1991. Population genetics of Japanese monkeys: III. Ancestry and differentiation of local populations. *Primates* 32, 411–435.
- Perwitasari-Farajallah, D., Kawamoto, Y., Suryobroto, B., 1999. Variation in blood proteins and mitochondrial DNA within and between local populations of longtail macaques, *Macaca fascicularis* on the island of Java, Indonesia. *Primates* 40, 581–595.
- Pusey, A.E., Packer, C., 1987. Dispersal and philopatry. In: Smuts, B.B., Cheney, D.L., Seyfarth, R.M., Wrangham, R.W., Struhsaker, T.T. (Eds.), *Primate Societies*. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 250–266.
- Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552–569.
- Rozas, J., Rozas, R., 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15, 174–175.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000. Arlequin ver. 2.000: A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sinnott, R.W., 1984. *Virtues of the Haversine*. Sky Telescope Press, 159.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Tamate, H.B., Tsuchiya, T., 1995. Mitochondrial DNA polymorphism in subspecies of the Japanese sika deer, *Cervus nippon*. *J. Hered.* 86, 211–215.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Tsuda, K., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Tanabe, Y., 1997. Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. *Genes Genet. Syst.* 72, 229–238.
- Vigilant, L., Pennington, R., Harpending, H., Kocher, T.D., Wilson, A.C., 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from southern African populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9350–9354.
- Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K., Wilson, A.C., 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253, 1503–1507.
- Ward, R.H., Frazier, B.L., Dew-Jager, K., Pääbo, S., 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8720–8724.
- Warren, K.S., Verschoor, E.J., Langenhuijzen, S., Heriyanto, Swan, R.A., Vigilant, L., Heeney, J.L., 2001. Speciation and intrasub-specific variation of Bornean orangutans, *Pongo pygmaeus pygmaeus*. *Mol. Biol. Evol.* 18, 472–480.
- Whitehead, H., 1998. Cultural selection and genetic diversity in matrilineal whales. *Science* 282, 1708–1711.
- Zhang, Y., Shi, L., 1993. Phylogeny of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) as revealed by mitochondrial DNA restriction enzyme analysis. *Int. J. Primatol.* 14, 587–605.



DISCUSSIÓ GENERAL

150- DISCUSSIÓ GENERAL

En aquest apartat exposo tot un seguit de reflexions generals sobre diferents aspectes que he treballat en aquesta tesi. A cada capítol de la tesi hi ha la discussió corresponent i específica del treball que s'hi presenta. En aquesta discussió general, la meua intenció és donar la meua opinió sobre coses més generals – com són la taxonomia, l'estudi de la història evolutiva dels éssers vivents i la conservació de la biodiversitat – il·lustrada amb constants referències i exemples de la meua recerca.

1. COM HEM DE CLASSIFICAR ELS ESSERS VIVENTS?

Hi ha un consens força generalitzat a la comunitat científica que recolza que la taxonomia ha d'estar basada en la filogènia, és a dir, ha de reflexar la història evolutiva dels éssers vivents. Hi ha el risc però que la taxonomia basada en la filogènia no sigui consistent amb la tradicional, basada en molts casos en la semblança morfològica ja que aquesta no necessàriament és un reflex del parentesc evolutiu dels organismes. Sóc de l'opinió, com Wiley [1979] i Nixon i Carpenter [2000], que la filogènia i la metodologia cladista poden ser compatibles amb la taxonomia tradicional sempre que s'hi integrin d'una manera moderada. Modificar de cop i totalment tot el sistema tradicional només contribuiria a augmentar el caos actual degut a l'excessiva sinonímia, podent fins i tot arribar a dificultar la comunicació entre els mateixos taxònoms. Afortunadament, sovint les classificacions tradicional i cladista poden ser equivalents encara que es basin en principis diferents – la primera, en la semblança morfològica, i la segona, en la filogènia – ja que en molts casos la semblança morfològica és un reflex del parentesc evolutiu entre els organismes.

D'acord amb això, per tenir una bona taxonomia, hem d'inferir la filogènia dels organismes correctament. A la introducció, he parlat dels principals marcadors filogenètics utilitzats, els moleculars i els morfològics, i de les seves avantatges i inconvenients. Penso que els marcadors moleculars poden resoldre amb menys ambigüitats les relacions filogenètiques dels organismes i així aquestes relacions es poden testar amb una major facilitat, objectivitat i consistència. A més a més, cada vegada hi ha més regions dels genomes seqüenciades que poden ser utilitzades en estudis filogenètics. Per tant, el material genètic és un bon instrument per treballar en sistemàtica. L'ús dels caràcters morfològics ha tingut força detractors, sobretot des de que es van començar a utilitzar seqüències d'ADN en la reconstrucció de les filogènies.

L'argument més freqüentment utilitzat és que no sempre són representatius de l'evolució dels organismes, a causa de les convergències morfològiques o de l'aparició de determinades variants o caràcters en llinatges independents. Una cosa sí que és clara: no tots els caràcters morfològics són adequats per a la reconstrucció filogenètica, com tampoc ho són totes les regions del genoma. Crec que el que s'ha de discutir és si els caràcters morfològics s'utilitzen correctament, enlloc de si són pitjors que els moleculars. Per tant, identificar els caràcters que són filogenèticament informatius és un gran repte que tenen els sistemàtics.

Els caràcters morfològics estan codificats pels genomes i, per tant, també són heretats, però poden estar més o menys afectats per l'ambient i canviar al llarg del desenvolupament de l'individu. Segons comenta Bernard Wood, a Gura [2000], es comença a sospitar que els caràcters esquelètics, que s'utilitzen freqüentment en morfologia, són més plàstics del què ens pensàvem, a causa de l'ambient o de factors fisiològics com per exemple l'acció de l'hormona del creixement. Això no vol dir que estigui en contra del seu us, sempre i quan es seleccionin aquells que tinguin un reduït component ambiental – o que aquest sigui fàcil de discriminar –, i que siguin consistents amb les filogènies d'aquells gens que siguin bons marcadors filogenètics. En una filogènia d'homínids realitzada mitjançant caràcters derivats de teixits tous (principalment del sistema muscular), l'equip de Wood va observar que aquesta era molt consistent amb les filogènies moleculars, enlloc de ser-ho amb les filogènies de caràcters derivats de teixits durs (ossos i dents) [Gibbs i al. 2002]. Per tant, sembla factible inferir filogènies correctes mitjançant molècules i teixits tous, però això planteja un problema molt important. Com podem situar les espècies extingides dins l'arbre de la vida? En aquestes espècies no es conserven els teixits tous i molt menys el seu material genètic (excepte en aquells casos en que l'extinció s'ha produït molt recentment, o que les restes s'han preservat en condicions extremadament excepcionals com per exemple la congelació continuada). Crec que ens equivocaríem si penséssim que la posició filogenètica d'aquestes espècies no la podrem inferir mai correctament, generalitzant que els teixits durs són mals marcadors filogenètics. Identificar els mecanismes de control genètic dels caràcters morfològics pot ajudar a resoldre aquest problema i així conèixer el paper que desenvolupa el genotip en aquests caràcters [Wayne i Ostrander 1999]. Seria una llàstima que la classificació dels fòssils quedés reduïda a una taxonomia purament fenètica. En tot cas, primer hem de saber com el creixement de l'organisme i l'ambient afecten la morfologia dels teixits durs i trobar la

manera d'eliminar aquest soroll per poder detectar possibles senyals filogenètiques. Abans no es coneguin aquests mecanismes, els caràcters morfològics que siguin consistents amb filogènies moleculars seran la millor eina disponible per localitzar les posicions filogenètiques de les espècies fòssils.

Tot seguit utilitzo alguns exemples de la meua recerca per exemplificar el que he dit fins ara. Els mustèlids són un exemple il·lustratiu del potencial que té la sistemàtica molecular per reconstruir filogènies i resoldre taxonomies, quan la morfologia perd el seu poder de resolució, o per detectar errors deguts a la mala interpretació dels caràcters morfològics. Diferents filogènies moleculars fetes amb marcadors independents són consistents en que les mofetes (gèneres *Mephitis* i *Spilogale*) no estan incloses de manera natural dins de la família “Mustelidae” – vegeu Capítol I, Dragoo i Honeycutt [1997], Flynn i al. [2000] – la qual cosa també està recolzada amb dades cromosòmiques [Wurster i Benirschke 1968]. En canvi altres autors com Simpson [1945] i més recentment Wolsan [1999], les classifiquen dins dels mustèlids basant-se en la metodologia fenètica i dades morfològiques. Aquesta classificació no té en compte la filogènia, és a dir si els mustèlids i les mofetes estan o no evolutivament emparentats, i, a més a més, les dades morfològiques que relacionen les mofetes amb els mustèlids segurament són variants primitives de determinats caràcters i/o convergències. Wolsan [1999], creu que les mofetes s'han d'agrupar amb les llúdrigues ja que ambdós grups presenten una bulla timpànica molt poc desenvolupada però aquest caràcter és ancestral (plesiomòrfic) i no derivat i compartit (sinapomòrfic). L'extensió del forat epitimpànic en el mastoide i la part posterior de l'esquamós i l'abultament lateral de l'esquamós han estat considerats dos caràcters cranials sinapomòrfics, exclusius de les mofetes [Bryant i al. 1993]. Igualment la deleció de 15 parells de bases trobada a la regió flanquejant del locus *Mel08* en les mofetes estudiades (gèneres *Mephitis* i *Spilogale*, vegeu Figura 2.1a) podria tractar-se d'una altra sinapomorfia, encara que això s'ha de confirmar a partir de la seqüenciació de la resta d'espècies de mofetids d'aquests gèneres i dels altres dos restants, *Conepatus* i *Mydaus*. Aquests caràcters són dos bons candidats per definir les mofetes dins de la família que les pertoca, “Mephitidae”, i d'acord amb la filogènia.

Els resultats presentats en el Capítol I estan d'acord amb l'agrupament monofilètic de la resta d'espècies de mustèlids estudiades. La morfologia ha basat la monofília d'aquesta família en la pèrdua de l'osca del quart premolar superior, la pèrdua del segon molar superior i la presència de glàndules odoríferes anals desenvolupades [Martin 1989; Bryant i al. 1993]. No obstant, es dubta que aquests caràcters morfològics

siguin els adequats per descriure aquesta família doncs poden estar associats a un fort grau d'homoplàsia. Per exemple Wozencraft [1989] suggereix que la pèrdua de l'osca del quart premolar superior ha succeït diverses vegades en llinatges independents de carnívors. D'altra banda, tots els carnívors tenen glàndules odoríferes anals encara que els mustèlids les tenen més grans. Cal tenir en compte que en les mofetes encara estan més desenvolupades, aleshores la mida gran d'aquestes glàndules tampoc seria una sinapomorfia dels mustèlids. La fosa suprimeatal, localitzada a l'orella mitjana, és un caràcter morfològic que defineix millor els mustèlids [Schmidt-Kittler 1981, Wolsan 1993]. Aquest caràcter, per exemple, ha fet reconsiderar la classificació del gènere *Mustelavus*, de l'Eocè Superior-Oligocè Inferior, com el primer mustèlid fòssil doncs s'ha vist que aquest no la presenta. La fosa suprimeatal apareix per primera vegada en el gènere *Plesictis*, de l'Oligocè Superior-Eocè Inferior, el qual ara es considera el primer mustèlid [Wolsan 1999]. Aquest caràcter és absent en els mefitids.

Totes les filogènies moleculars de mustèlids realitzades fins a la data coincideixen en què les llúdrigues, classificades dins de la subfamília "Lutrinae", i les espècies del gènere *Mustela* són grups germans, la qual cosa converteix la subfamília "Mustelinae" en parafilètica. Això ha estat demostrat mitjançant marcadors del genoma mitocondrial – gen citocrom *b* [Capítol I; Koepfli i Wayne 1998] – i nuclear – regió flanquejant de *Mel08* (Capítol I); marcadors STS de tipus I [Koepfli i Wayne 2003] i un fragment de 1185 parells de bases del gen que codifica per la proteïna d'unió a l'interfotoreceptor retinoide [Sato i al. 2003]. De moment, però, no hi ha evidències morfològiques descrites que donin suport a aquest agrupament. Per tant seria molt interessant buscar si existeixen sinapomorfies morfològiques que el defineixin i, en cas de trobar-ne, seria més clar que cal reconsiderar la classificació d'aquestes dues subfamílies de mustèlids d'acord amb la metodologia cladista i les filogènies moleculars i incloure les llúdrigues dins de "Mustelinae".

La clarificació de les relacions filogenètiques entre els teixons es presenta com un interessant camp de recerca. Simpson [1945] va incloure els gèneres *Arctonyx*, *Meles*, *Melogale*, *Mydaus* i *Taxidea* dins de la subfamília "Melinae" basant-se en la semblança morfològica i només tenint en compte la metodologia fenètica. No obstant, a partir d'estudis moleculars posteriors s'ha vist que aquesta ordenació es basa en caràcters que presenten un alt grau d'homoplàsia, doncs les espècies que formen part d'aquests gèneres estan adaptades a ambients i estils de vida molt semblants la qual cosa ha desembocat en una forta convergència morfològica. Sembla ser que *Meles* i

154- DISCUSSIÓ GENERAL

Arctonyx són els únics gèneres de “Melinae” que estan filogenèticament emparentats (vegeu Capítol I). D’acord amb les dades moleculars, *Mydaus* estaria emparentat amb les mofetes [Dragoo i Honeycutt 1997], *Taxidea* seria l’únic gènere de la subfamília monotípica “Taxidiinae” [Capítol I; Koepfli i Wayne 2003] i *Melogale* sembla estar filogenèticament força allunyat de *Meles* i *Arctonyx* [Koepfli i Wayne 2003].

Com s’ha pogut observar, l’estudi del parentesc evolutiu dels diferents membres de la família “Mustelidae” mitjançant la morfologia presenta múltiples ambigüitats i és força confús. En canvi els marcadors moleculars tenen un poder resolutiu sensiblement superior. En aquesta tesi i en diferents treballs que he citat en aquest apartat s’han descrit tres regions mitocondrials i set loci nuclears que han demostrat ser informatius per resoldre les relacions filogenètiques dels mustèlids. En tots aquests treballs però han estat estudiades en total 34 espècies de les 55 descrites en aquesta família (excloïent les dues espècies del gènere *Mydaus*). Això significa que quasi un 40% de les espècies de la família encara no han estat estudiades filogenèticament amb dades moleculars. Per tant, seria molt interessant aconseguir mostres d’aquestes 21 espècies que queden per realitzar una filogènia molecular completa d’aquesta família i veure si els resultats obtinguts a partir dels treballs incomplets que s’han presentat i citat es mantenen. Una vegada s’aconsegueixi aquest objectiu s’haurà fet un gran pas per reconstruir la història evolutiva dels mustèlids i a partir d’aquí es podrà treballar per aconseguir una taxonomia més correcta per aquest grup de carnívors.

Hi ha diferents exemples d’anàlisis combinats de dades morfològiques i moleculars en els quals s’han obtingut arbres més robustos que els obtinguts amb cada base de dades per separat, la qual cosa suggereix que les dades morfològiques sovint presenten un patró semblant al de les molècules [Freudenstein i al. 2003]. L’ús de marcadors moleculars també presenta problemes, tal com s’ha dit a la introducció, i un d’aquests és la saturació de mutacions – sobretot quan parlem de seqüències d’ADN – la qual cosa fa que a vegades es perdi poder resolutiu en els nodes més interns de la filogènia. Una solució a aquest problema podria ser que en aquests casos s’incloguin a l’anàlisi diferents caràcters representatius de diferents nivells (des de la seqüència de l’ADN fins al caràcter morfològic que representa) per detectar el màxim d’homologies que ajudin a resoldre la filogènia [Freudenstein i al. 2003]. Aquests autors parteixen de la base de que no tota la variació del genoma es transmet al fenotip – sigui aquest una seqüència d’aminoàcids, o una estructura de l’esquelet – i així el fenotip pot retenir evidències d’homologies quan aquestes han quedat diluïdes en els caràcters genotípics a

causa de la saturació de mutacions. Aquests autors van més enllà i també aposten per tenir en compte la informació proporcionada per caràcters independents del genoma com poden ser, per exemple, la presència d'organismes simbiotes, patrons comportamentals, orgànuls cel·lulars com els centrosomes, o els prions.

Cada vegada som més conscients que per reconstruir l'arbre de la vida cal que considerem totes les homologies possibles entre els organismes. Per tant, els sistemàtics, ja siguin morfològics, ja siguin moleculars, s'han de concentrar en entendre com evolucionen cadascun dels possibles marcadors filogenètics, intercanviar informació i dialogar constructivament; enlloc de discutir-se sobre si uns marcadors són millor que els altres. Reconstruir l'arbre de la vida no és una feina gens fàcil i s'ha d'evitar de menysprear qualsevol tipus d'informació que ens pugui ajudar en aquesta aventura. Estem aprenent molt de les molècules, i aquestes ens haurien de servir per aprendre més dels teixits i sobretot dels fòssils, ja que aquests últims són les proves més directes de l'evolució dels éssers vivents. La biologia molecular ha suposat una autèntica revolució en el món de la sistemàtica, però això no ha d'implicar que els que treballem en aquest camp ens convertim en prepotents, ni que despreciem altres aspectes de la vida que no siguin la seqüència de l'ADN.

2. L'ETERN DEBAT SOBRE LA CLASSIFICACIÓ DE LES ESPÈCIES

Bona part del debat taxonòmic obert en aquesta tesi es relaciona directament amb la pròpia definició de què és una espècie. La paraula "espècie", en Zoologia pot tenir diferents significats entre els que trobem: (1) el nom d'un rang taxonòmic, (2) cadascun dels taxons que formen part d'aquest rang i (3) un grup d'organismes que evolucionen conjuntament. Un dels principals problemes que té l'aplicació del concepte d'espècie és la categorització d'entitats, és dir, coses reals que tenen una localització en l'espai i en el temps i que poden romandre invariables o canviar. L'evolució i l'especiació són processos biològics continus que els sistemàtics intenten reconèixer i a partir d'aquí establir parcel·les discretes que tinguin significat biològic. Les espècies són categories creades pels mateixos biòlegs que les estudien i també són entitats evolutivament i demogràficament dinàmiques, que existeixen independentment dels observadors humans i de les categories assignades per nosaltres. Davant de la dificultat, alguns autors, com Spurway [1955] i Haldane [1956], han suggerit que difícilment s'arribarà a trobar una definició universal d'espècie. De fet, cap dels conceptes

d'espècie existents (vegeu Taula 1.1) és completament objectiu [Helbig i al. 2002] i, d'entre els diferents mètodes que s'han descrit per intentar delimitar les espècies, com es pot veure a la revisió feta per Sites i Marshall [2003], cap és plenament satisfactori i sovint la decisió es pren a partir d'una mostra amb la incertesa de si és suficientment representativa de la realitat. Tot això no significa que tots els esforços realitzats pels biòlegs sistemàtics, en el passat i en el present, no serveixin per res – ni molt menys! – però sí que s'han tenir en compte les limitacions metodològiques existents, per fer un ús de la categoria d'espècie el màxim d'objectiu possible i aplicar-la més correctament a la classificació d'aquestes entitats canviant. Com diu Hey [2001], les espècies taxonòmiques es poden considerar una hipòtesis de que tots els organismes existents que hi estan inclosos constitueixen actualment una entitat biològica a la natura, és a dir que formen una unitat evolutiva i ecològica. Aquesta hipòtesi es pot testar i cada vegada tenim més mitjans tècnics per fer-ho millor gràcies a la gran quantitat d'informació genètica que s'està acumulant a les bases de dades moleculars (com per exemple GenBank), fruit de la multitud d'estudis de sistemàtica molecular i filogeografia que s'estan realitzant, juntament amb la informació derivada de la morfologia i de l'ecologia.

Idealment les espècies haurien de ser grups discrets de poblacions, reproductivament aïllats, formant grups monofilètics i clarament diferenciables genètica i, a efectes pràctics sobretot en el camp, fenotípicament. La realitat ens mostra sovint que no sempre es compleixen tots aquests requisits i en aquesta tesi apareixen uns quants exemples de les dificultats que poden tenir els sistemàtics per decidir si les entitats que estan estudiant són espècies i de les ambigüitats que es presenten sovint en aquesta categoria. Podem considerar les martes comuna i gibel·lina o el visó europeu, i els turons comú i d'estepa espècies diferents? Els macacs rhesus i el japonès s'haurien d'incloure dins d'una mateixa espècie? Les diferents unitats genèticament diferenciades trobades en el teixó euroasiàtic podrien tractar-se d'espècies diferents? Per respondre a aquestes preguntes les dades genètiques són de gran utilitat però s'han de comparar amb altres dades provinents d'altres fonts.

Els casos de les martes, dels turons i del visó, i dels macacs podrien exemplificar el que es coneix per *splitting* o classificació com a diferents espècies el que realment és una sola entitat evolutiva. Les martes comuna i gibel·lina són morfològicament molt semblants. A les topologies dels arbres de citocrom *b* que es presenten en el Capítol I s'observen agrupaments parafilètics d'haplotips i, també, s'han documentat casos

d'hibridació entre aquestes dues espècies de martes [Grakov 1994]. D'altra banda, i malgrat que havien coincidit al nord d'Europa en el passat, actualment aquestes martes tenen distribucions al·lopàtrides. També s'han trobat agrupaments parafilètics d'haplotips entre el turó europeu i el d'estepa. Les distàncies genètiques calculades a partir del gen citocrom *b* entre els turons europeu i d'estepa i el visó europeu són semblants o fins i tot menors a les trobades dins d'altres espècies del mateix gènere. També s'han documentat casos d'hibridació entre els dos turons i el visó europeu [Heptner i al. 1967; Ternovsky 1977; Davison i al. 2000]. El turó europeu habita preferentment àrees forestades mentre que el turó d'estepa prefereix àrees obertes i fins i tot semidesèrtiques i la distribució geogràfica d'ambdues espècies només coincideix a la part europea de Rússia [Macdonald 2001]. El visó europeu és simpàtric amb el turó europeu a la major part de la seva àrea de distribució i ambdues espècies prefereixen hàbitats forestals amb una densa cobertura vegetal i presència d'aigua. D'altra banda, aquestes dues espècies tenen diferents patrons característics de coloració del seu pelatge; el visó té el pelatge al voltant del nas i de la mandíbula de color blanc, el turó a més a més presenta una mitja lluna blanca entre cada orella i l'ull i una línia blanca i estreta en el contorn de les orelles. El visó també presenta membranes interdigitals incompletes en mans i peus mentre que aquestes són absents en el turó [Blanco 1998]. El cas dels macacs japonès i rhesus és diferent, malgrat que són dues espècies que també han divergit fa relativament molt poc temps, que genèticament són molt semblants (vegeu Capítol IV) i que possiblement també poden hibridar. Aquestes dues espècies viuen clarament separades per barreres físiques; el macac japonès està aïllat del continent a l'arxipèlag del Japó, per tant l'intercanvi genètic entre les dues espècies tan sols es podria produir si es tornés a formar un istme entre l'Àsia continental i el Japó o si s'introduïssin artificialment individus d'una espècie en el rang geogràfic de l'altra.

Les àrees de distribució d'aquestes espècies estan relativament ben delimitades geogràficament (a excepció dels visó europeu i el turó) i, a més a més, aquestes espècies són relativament fàcils de diferenciar morfològicament. Per tant, podem suposar que són entitats evolutivament independents. No obstant, genèticament són molt semblants i potencialment poden hibridar, el que suposa que en el cas de que desapareguessin aquestes barreres geogràfiques o ecològiques algunes d'aquestes espècies podrien formar part d'una mateixa entitat evolutiva. Cal aprofundir més en el seu coneixement i són necessaris estudis genètics, morfològics i ecològics detallats, sobretot en aquelles àrees on dues d'aquestes espècies coincideixen, per aclarir si pertanyen o no a la

158- DISCUSSIÓ GENERAL

mateixa entitat evolutiva ja que el seu estatus taxonòmic és força confús. Si volem ser puristes, i sobretot, d'acord amb la genètica, hem de considerar les martes comuna i gibel·lina com una sola espècie igualment com el visó europeu i els turons europeu i d'estepa o els macacs rhesus i japonès. No obstant, la biogeografia, l'ecologia i la morfologia ens suggereixen que aquestes entitats podrien estar més diferenciades que el que ens suggereixen els seus gens. Què cal fer, doncs, en casos com aquests?

Segons De Queiroz [1999], i d'acord amb el concepte de llinatge general, les espècies evolucionen i divergeixen esdevenint distingibles tant en el seu genotip com en el seu fenotip. D'altra banda, segons Helbig i al. [2002] la divergència molecular és proporcional al temps que ha passat des de que dues unitats taxonòmiques s'han separat del seu ancestre comú i, indirectament, ens està informant de la probabilitat de que aquestes unitats hagin o no desenvolupat mecanismes d'aïllament reproductiu. El contrari del que he exemplificat fins ara l'il·lustra el turó de peus negres. En aquest cas les dades moleculars recolzen una divergència que no es reflexa suficientment en el fenotip. Alguns autors basant-se en la semblança en caràcters morfològics com la mida, la coloració, les mesures craniomètriques i dentals han considerat que el turó de peus negres i el turó d'estepa són la mateixa espècie [Youngman 1982]. També s'han documentat casos d'hibridació en captivitat entre el turó de peus negres i els euroasiàtics [Davison i al. 1999] i, d'acord amb la distribució de restes momificades, aquestes espècies havien tingut distribucions simpàtrides durant el Plistocè [Youngman 1994]. Les distàncies genètiques obtingudes a partir de la comparació de dues seqüències parcials del gen citocrom *b* del turó de peus negres amb les dels dos turons euroasiàtics i del visó europeu són significativament majors que les obtingudes comparant aquestes tres últimes espècies entre elles (vegeu Taula 2 del Capítol I). Els nostres resultats s'aproximen més als obtinguts per O'Brien i al. [1989] els quals, basant-se l'anàlisi d'isoenzims, suggereixen, d'acord amb Helbig i al. [2002], que el turó de peus negres és una espècie diferent dels turons euroasiàtics. Segons tot això, la meua opinió és que una divergència genètica apreciable pot ser ja rellevant per categoritzar quelcom com a espècie, doncs les semblances fenotíques amb una altre entitat poden ser causades també per convergències morfològiques i ecològiques.

Penso que la decisió sobre si quelcom és una espècie ha d'estar recolzada amb caràcters morfològics (amb poc o nul component ambiental), moleculars i ecològics consistents amb filogènies de gens tant dels genomes mitocondrial com nuclear. En els casos que he presentat l'estatus específic de les diferents unitats està qüestionat per les

dades moleculars, tot i estar recolzat per les dades morfològiques i/o ecològiques, aleshores caldria buscar altres maneres de categoritzar aquestes espècies. Crec que una opció potser l'aplicació de la categoria de subespècie però amb diferents matisos; no com les va definir Mayr [1963] el qual considerava subespècies aquelles poblacions on el 75% dels individus són diagnosticablement diferents als de les altres poblacions de l'espècie a la qual pertanyen, sinó d'acord amb si hi ha consistència o no entre les dades obtingudes de diferents fonts. Tenint en compte això, les martes comuna i gibel·lina, el turó comú i el turó d'estepa, i els macacs rhesus i japonès es podrien considerar subespècies morfològiques i al·lopàtrides; i el visó europeu i el turó comú es podrien classificar com a subespècies morfològiques. Helbig i al. [2002] suggereixen que el diagnòstic de les espècies s'ha de definir també en funció del procés d'especiació que les ha – o les està – originant. Per tant, les situacions de simpatria, parapatria i al·lopatria requeririen diferents criteris: aïllament reproductiu per definir les espècies simpàtrides; facilitat de diagnosi sense connectivitat clinal en espècies parapàtrides; i diagnosi a partir de múltiples caràcters en espècies al·lopàtrides. En zones híbrides i en els casos de parapatria i al·lopatria – si les distribucions geogràfiques es tornen a fusionar – aquests autors consideren com a hipòtesi que la probabilitat de que els taxons siguin reproductivament compatibles ha de ser molt baixa per considerar-los espècies diferents. En els casos que la independència evolutiva no pugui ser determinada empíricament i amb una fiabilitat raonable, proposen incloure les diferents unitats dins d'una mateixa superespècie. Una superespècie és un grup monofilètic d'al·loespècies (unitats geogràficament separades) i/o semiespècies (connectades per una zona híbrida). D'acord amb això els turons i el visó europeu podrien formar part de la semiespècie *Mustela [putorius]* que inclouria *Mustela [p.] putorius*, *Mustela [p.] evermannii*, i *Mustela [p.] lutreola*. Les martes comuna, gibel·lina, juntament amb la japonesa i l'americana, tal com ja va proposar Anderson [1994] es podrien incloure dins de l'al·loespècie *Martes [martes]* convertint-se en *Martes [m.] martes*, *Martes [m.] zibellina*, *Martes [m.] melampus*, *Martes [m.] americana*. Els macacs rhesus i japonès es podrien incloure dins de l'al·loespècie *Macaca [mulatta]* convertint-se en *Macaca [m.] mulatta* i *Macaca [m.] fuscata*.

L'altra cara de la moneda de la problemàtica de la classificació de les espècies és el *lumping* o la classificació de diferents entitats evolutives com a una sola espècie. Aquest cas pot ser freqüent en aquelles espècies que estan distribuïdes al llarg d'una extensa àrea geogràfica, com és el cas del teixó euroasiàtic. La regió control de l'ADN

160- DISCUSSIÓ GENERAL

mitocondrial mostra que l'espècie està dividida en quatre clares unitats taxonòmiques les quals estan molt ben delimitades geogràficament (vegeu Capítol II). Un punt important que s'ha d'aclarir a partir d'estudis futurs és si aquestes quatre unitats taxonòmiques s'han de classificar com espècies o subespècies. De moment, crec que s'ha de ser prudent i classificar aquestes quatre unitats com a subespècies, malgrat que s'han trobat evidències que el flux gènic entre elles és molt restringit. Abramov [2002] va observar que la variació de la morfologia de l'os del penis entre teixons europeus, asiàtics i japonesos és major que la que van trobar Baryshnikov i Abramov [1997] entre el turó europeu, el d'estepa i el de peus negres o entre les martes comuna, gibel·lina, americana i japonesa. No obstant, la classificació d'algunes d'aquestes entitats com a espècies ja hem vist que era dubtosa. Per tant, és necessari realitzar més estudis amb altres marcadors genètics, especialment del genoma nuclear, i aclarir la confusió que hi ha en la seva morfologia buscant variants morfològiques de fàcil diagnosi, per decidir si aquestes quatre unitats s'han de considerar espècies o subespècies. A la regió localitzada entre el riu Volga i els Urals i a l'Àsia Central, on dues d'aquestes unitats són simpàtrides, s'haurien de realitzar estudis més detallats basats en marcadors microsatèl·lit els quals servirien per complementar la informació obtinguda de la morfologia i de l'ecologia per determinar el grau de flux gènic que hi pugui haver entre elles. A partir de l'obtenció de noves evidències es podrà decidir si aquests grups es poden elevar a les categories de semiespècies o d'al·loespècies (dins d'una superespècie) o fins i tot d'espècies.

Les noves tècniques disponibles en biologia molecular poden desenvolupar un paper important en la clarificació de l'estatus específic d'aquestes unitats. A partir de seqüències de regions del genoma es poden identificar polimorfismes de nucleotids simples (SNPs) els quals poden ser analitzats en estudis posteriors mitjançant altres tècniques com són la miniseqüenciació (SnapShot) [Raitio i al. 2001] i els "microarrays" [Chakravarti 1999]. La tècnica de miniseqüenciació consisteix en una reacció de PCR on la polimerasa afegeix un sol nucleòtid després de l'encebador el qual acaba just abans de la posició nucleotídica que es vol diagnosticar. Aleshores s'identifica quin nucleòtid s'ha incorporat en un seqüenciador automàtic. Els "microarrays" consisteixen en milers de filaments d'ADN desnaturalitzats units ordenadament sobre un suport sòlid. Aleshores es tracta de posar en contacte aquestes seqüències amb filaments d'ADN monocatenaris d'origen desconegut, esperar que hibridin i identificar la seqüència problema a partir de la seva complementària coneguda

(el cas contrari també és possible). Aquestes tècniques aporten una notable millora en rapidesa i permeten processar moderats o elevats nombres de mostres i així es pot treballar amb mides mostrals que siguin més representatives de la realitat. Així, l'aplicació d'aquestes tècniques augura un futur immediat molt prometedor pels estudis de processos d'especiació i de filogeografia. No obstant, s'ha de tenir en compte que, encara que tècnicament ja és possible genotipar elevats nombres de mostres, continua sent, en molts casos, força complicada l'obtenció d'aquestes en el camp. D'altra banda, el gran volum d'informació que es pot arribar a generar pot ser difícil d'interpretar sinó ve acompanyat d'eines estadístiques capaces d'interpretar grans quantitats de dades. A més a més, també s'ha de tenir en compte que, superats aquests problemes, tota aquesta informació es podrà entendre molt millor, i més correctament, si es combina amb dades fisiològiques, demogràfiques, ecològiques i comportamentals recollides al camp [Haig 1998].

3. ELS FACTORS QUE HAN INFLUÏT EN LA DIFERENCIACIÓ DELS MAMÍFERS EUROASIÀTICS

Les dades moleculars són un complement excel·lent de les evidències paleontològiques, paleoclimàtiques i paleogeogràfiques per desxifrar la història evolutiva dels éssers vivents. L'anàlisi de la variació genètica ens ajuda a detectar diferències intraespecífiques, que sovint no són prou evidents a nivell morfològic, les quals poden ser fruit de diversos factors ja siguin geogràfics, climàtics, ecològics o etològics. Diferents estudis filogeogràfics han permès descriure amb bastant detall les diferents rutes i patrons de colonització que han seguit les espècies de la fauna i la flora europees després de l'última glaciació [Taberlet i al. 1998; Hewitt 1999]. Aquests i altres estudis ens han ensenyat el paper rellevant que han tingut les penínsules Ibèrica, Itàlica i Balcànica i les diferents serralades i massissos (els Pirineus, els Alps, els Balcans, els Càrpats, el Caucas) en els processos de diferenciació genètica a nivell intraespecífic. Les primeres han actuat com els principals refugis glacials i les segones com les principals barreres de dispersió per determinades espècies. Aquest escenari s'està completant mitjançant el descobriment de nous refugis glacials críptics, com ara els trobats al centre i nord d'Europa [Stewart i Lister 2001], i al fet que hi ha un creixent interès en realitzar estudis filogeogràfics en espècies i poblacions asiàtiques. Els efectes genètics de les barreres geogràfiques i de les oscil·lacions climàtiques del Plistocè tot

just ara es comencen a estudiar al continent asiàtic i, entre els estudis més rellevants, cal destacar els realitzats en mamífers com el teixó (vegeu Capítol II) i el cérvol comú, *Cervus elaphus* [Mahmut i al. 2002; Ludt i al. en premsa]. Els genomes mitocondrials d'algunes espècies de mamífers euroasiàtiques – com el teixó (vegeu Capítol II) i el talpó muntanyenc, *Microtus agrestis*, [Jaarola i Searle 2002] – mostren clares diferències quan es comparen poblacions a occident i orient de la regió geogràfica que hi ha entre el riu Volga i els Urals. La separació d'aquests llinatges possiblement és una conseqüència de que durant el Plistocè aquesta zona era extremadament freda i seca, la qual cosa va provocar que les poblacions situades a l'est i a l'oest d'aquesta regió quedessin aïllades durant milers d'anys. D'acord amb els resultats d'aquesta tesi, el mateix passa quan es comparen poblacions del quadrant sud-occidental asiàtic amb les de la resta del continent. En aquest cas les barreres més rellevants són el mar Negre, les muntanyes del Caucas, el mar Caspi; les muntanyes de Kopet Dagh i Hindu Kush juntament amb els extensos deserts de Kara-Kum i Kizil-Kum (a Turkmenistan i Uzbekistan); i les muntanyes del Pamiro-Alai i Tien Shan (a l'Àsia Central).

Els diferents casos presentats en aquesta tesi ofereixen un exemple excel·lent per estudiar els processos de formació de les espècies mitjançant l'ús de tècniques moleculars. La combinació de les informacions proporcionades per la filogènia i la distribució geogràfica actual de les poblacions d'una espècie o d'espècies de divergència molt recent pot ajudar a inferir el tipus d'especiació pel qual estan passant [Lynch 1989; Losos i Glor 2003]. El registre fòssil suggereix que, entre el Plistocè Inferior i Mitjà, el teixó comú presentava una distribució geogràfica semblant a l'actual. Combinant els resultats obtinguts en el nostre treball (vegeu Capítol II) i la informació que es coneix de la paleoclimatologia i geografia d'Euràsia, suggereixo que el teixó euroasiàtic ha evolucionat en quatre grups genèticament independents i geogràficament ben definits durant milers d'anys i en àrees al·lopàtrides. Això convertiria el teixó en un model molt interessant per estudiar el desenvolupament de mecanismes d'aïllament reproductiu en espècies que han divergit en processos d'especiació al·lopàtrica i que posteriorment les seves àrees de distribució han tornat a coincidir.

Les àrees de distribució dels turons europeu i d'estepa se solapen tan sols en alguns punts de l'Europa de l'Est i altres àrees properes a la mar Negra, al nord del Caucas i de la mar Càspia. En aquest cas, possiblement, el factor principal que està aïllant aquestes dues espècies és l'adaptació a diferents hàbitats, com s'ha dit més amunt. És a dir que la barrera que les separa és de tipus ecològic i en aquest cas

succeeix un model d'especiació parapàtric. En canvi, el turó comú i el visó europeu haurien seguit un model d'especiació simpàtric ja que les seves respectives àrees de distribució tenen un alt grau de solapament.

Actualment les martes comuna, gibel·lina, i japonesa estan distribuïdes al·lopàtridament en boscos d'alta muntanya, de zones boreals i del taigà des del nord de la Península Ibèrica fins a l'estret de Bering i el Japó – cal dir, però, que les martes gibel·lina i japonesa són simpàtrides a l'illa de Hokkaido. La marta americana habita la meitat septentrional d'Amèrica del Nord. Sembla ser que aquest subgènere es va començar a diversificar a Europa durant el Plistocè Mitjà i després es va expandir a través de les zones temperades d'Àsia fins arribar a Amèrica del Nord, passant per Beringia – així s'anomena el subcontinent que unia Àsia amb Amèrica del Nord – on va divergir la marta americana [Anderson 1994]. Considerant la topologia dels arbres basats en el citocrom *b* presentats en el Capítol I s'observa que la marta japonesa i l'americana estan genèticament ben diferenciades contràriament al què passa en les martes comuna i gibel·lina. Això suggereix que el contacte entre les dues primeres espècies i les dues últimes es va perdre abans que entre les martes comuna i gibel·lina. Les martes americana i japonesa haurien quedat aïllades a Amèrica del Nord i el Japó respectivament mentre les poblacions ancestrals de marta comuna i gibel·lina encara s'encreuaven a Euràsia. Totes aquestes espècies possiblement s'han diversificat a partir de processos d'especiació al·lopàtrics o parapàtrics a excepció de la marta japonesa.

Un altre punt interessant a tractar és com les diferents espècies japoneses estudiades van colonitzar el Japó a partir de la formació de diferents ponts de terra amb l'Àsia continental degut a les successives baixades del nivell del mar ocorregudes durant el Plistocè. Per una banda els ancestres de la marta japonesa van colonitzar el Japó des de la península de Kamtchatka, molt a prop de l'estret de Bering passant per les illes Kurils fins arribar a Hokkaido i també a través de la gran illa de Sajalín localitzada entre Hokkaido i la costa siberiana [Anderson 1994]. Les martes són espècies tolerants al fred i de distribució força septentrional. Els ancestres del teixó i del macac japonesos ho van fer, en canvi, des de la península de Corea arribant pel sud a l'arxipèlag a l'alçada de Kyushu i el sud de Honshu [Kamei 1969]. Els teixons prefereixen climes més temperats i els macacs fins i tot més càlids que les martes i durant el Plistocè no es distribuïen en latituds tan septentrionals com les martes. En tots aquests casos, malgrat que el número de mostres de teixons japonesos és reduït, hem detectat poca variabilitat genètica en les poblacions japoneses (vegeu Capítols I i IV) la

qual cosa suggereix que aquest arxipèlag va ser colonitzat per pocs individus. Per tant, tots aquests darrers casos són exemples molt il·lustratius de processos d'especiació peripàtrica.

Finalment, cal dir que l'home també desenvolupa un paper important en els processos evolutius, doncs els efectes de les seves accions es noten en tots els nivells que s'organitza la vida, des dels gens fins els ecosistemes. L'home crea barreres artificials, fragmenta i destrueix els hàbitats, aïllant poblacions. Les activitats humanes sovint augmenten la deriva genètica i disminueixen el flux gènic entre les poblacions d'espècies salvatges, la qual cosa es tradueix en una disminució de la variabilitat genètica en les poblacions locals i dificulta l'expansió de les variants adaptatives fora de la seva població d'origen [Templeton i al. 2001]. Així l'home altera els processos adaptatius d'una espècie localment i globalment. Malgrat que s'ha argumentat que la fragmentació d'hàbitats pot produir noves espècies a partir d'efectes fundadors, la teoria de la genètica de poblacions i diferents evidències experimentals indiquen que realment el que facilita són les extincions locals [Templeton i al. 2001].

A causa de l'acció de l'home, la distribució geogràfica del visó europeu està dividida en dos nuclis principals separats per una gran distància, un de gran, a l'Europa de l'Est, i un de més petit, al País Basc, Navarra, La Rioja i la costa atlàntica francesa. Tret que s'expandeixin i s'ajuntin – cosa molt poc probable almenys a curt i a mitjà termini – o que un d'ells s'extingeixi – per desgràcia una possibilitat més real que l'anterior – aquests dos nuclis podrien seguir camins evolutius diferents podent esdevenir, d'aquí a centenars de milers d'anys, unitats taxonòmiques diagnosticables. Malauradament, i d'acord amb Templeton i al. [2001] i tenint en compte que aquesta espècie està greument amenaçada d'extinció, si no es vetlla pel seu futur el més probable és que s'extingeixi enlloc de separar-se en dues espècies.

Un altre efecte no desitjat de l'acció humana és la translocació d'espècies a regions geogràfiques que no les corresponen. Les espècies exòtiques o invasores alteren els processos evolutius de les espècies natives mitjançant l'exclusió competitiva, el desplaçament de nínxol, la hibridació, la introgressió, la depredació i, finalment, l'extinció [Mooney i Cleland 2001]. A vegades, les espècies invasores s'adapten exitosament al nou ambient gràcies, per exemple, a la flexibilitat comportamental i a les interaccions mutualístiques. El visó americà és un cas exemplar d'espècie invasora. Aquesta espècie és originària d'Amèrica del Nord, però a causa dels alliberaments d'individus captius, accidentals i provocats, de granges de pelleteria, actualment també

està extensament distribuïda per una bona part d'Europa, centre i est d'Àsia i Amèrica del Sud meridional. Aquestes poblacions naturalitzades, a part d'estar evolucionant independentment de les seves poblacions progenitores, són un dels factors responsables, a Europa, de la situació crítica per la qual passa el visó europeu. La hibridació entre aquestes dues espècies és improbable a causa de la gran divergència evolutiva que les separa (vegeu Capítol I). No obstant, el visó americà competeix avantatjosament amb el visó europeu, li ha transmès la malaltia parvovírica aleutiana del visó i, aprofitant que el període reproductor del visó americà és anterior al de l'europeu, els mascles de visó americà copulen amb les femelles de visó europeu impeding la reproducció d'aquesta espècie [Maran i Henttonen 1995].

4. **ALGUNES REFLEXIONS SOBRE LA CONSERVACIÓ DE LA BIODIVERSITAT**

Genètica i conservació de la biodiversitat

En els darrers 20 anys la genètica ha anat assolint un paper destacat en la biologia de la conservació. La contribució de la genètica en aquest camp es basa principalment en donar assessorament sobre com conservar el potencial evolutiu de les espècies en perill d'extinció i, com veurem en el següent subapartat, en la clarificació de relacions filogenètiques i de taxonomies. Malgrat el potencial que té la genètica de la conservació, cada vegada hi ha més experts que pensen que encara està en un estadi massa immadur per ser aplicada eficientment en el camp. De fet, encara no s'ha arribat a un consens sobre com incorporar la diversitat genètica en els plans de conservació [Moritz i Faith 1998]. El paper de la genètica en la conservació de la biodiversitat ha estat sovint massa emfatitzat, oblidant les limitacions teòriques i empíriques que presenta l'ús de la informació genètica per solucionar problemes ecològics i demogràfics [Domingo-Roura i al. 2001]. Malgrat que disposem de bons recursos tecnològics, el nexa d'unió entre la variabilitat molecular i les necessitats de les espècies amenaçades encara no es coneix bé. La dinàmica dels gens és complexa, molts dels caràcters fenotípics són multigènics i la interaccions que hi ha entre els gens o epistasies encara compliquen més la comprensió de les relacions genotip-fenotip-ambient. D'altra banda, hem de tenir molta cura en l'execució de plans de conservació en espècies amenaçades, malgrat la urgència que sovint requereixen aquests casos, doncs les recomanacions equivocades poden ser nefastes per les espècies i també per l'ecosistema. Recomana, per exemple, la gestió per separat de poblacions amb mides

poblacionals ja reduïdes pot afavorir la consanguinitat; en canvi la connexió de poblacions separades pot desencadenar la hibridació entre grups d'animals que estaven adaptats específicament a diferents ambients.

Freqüentment s'ha correlacionat la diversitat genètica amb l'eficàcia biològica i també s'ha parlat dels riscos dels efectes nocius dels al·lels perjudicials en les espècies que estan en perill d'extinció a causa de les seves baixes mides poblacionals. A la pràctica s'han observat diferents casos d'espècies o poblacions que, després de superar un coll d'ampolla (en alguns molt sever), han sobreviscut i fins i tot les seves poblacions han augmentat de mida espectacularment. Exemples com el guepard, *Acinonyx jubatus*, [O'Brien i al. 1987]; el castor, *Castor fiber* [Ellegren i al. 1993]; l'elefant marí, *Mirounga angustirostris*, [Hoelzel i al. 1997] i el teixó [Domingo-Roura i al. 2003] no són precisament casos il·lustratius de la lògica de la teoria. Possiblement la relació entre la diversitat genètica i l'eficàcia biològica sigui específica d'espècie i no lineal [Lynch 1991]. Un coll d'ampolla pot tenir també, per atzar, un "efecte purificador" eliminant variants genètiques perjudicials per deriva genètica com suggereix Wilson [1992].

Cada vegada hi ha més interès en detectar, estudiar i comprendre la variació perjudicial i adaptativa – revisat a Hedrick [2001] – la qual cosa segurament contribuirà a construir una genètica de la conservació més aplicable a casos reals. Per detectar les variants que són responsables de la baixa eficàcia biològica o, al contrari, de la supervivència d'una espècie, cal que els genetistes tinguin el màxim d'informació de les mostres amb les que treballen, fet imprescindible per poder correlacionar les variants genotípiques amb les fenotípiques i ecològiques o ambientals. Això implica que hi ha d'haver una estreta col·laboració entre genetistes, fisiòlegs, morfòlegs, etòlegs i ecòlegs.

Tenint en compte l'extraordinària complexitat que hi ha en tots els nivells de l'expressió de la vida i en els processos de les poblacions, s'ha d'evitar que la gestió de la fauna es basi simplement en anàlisis de biologia molecular. La conservació animal ha d'estar recolzada per l'anàlisi de dades obtingudes de fonts independents. En cas contrari es pot interpretar de manera equivocada un problema i en conseqüència cometre errors greus de gestió com exemplifico en el següent cas. En el guepard, durant força temps, s'ha atribuït la baixa supervivència de les cries als efectes de la consanguinitat, fins que es va observar que, en poblacions salvatges del Serengeti, el 95% dels cadells no superaven el primer any de vida a causa de, principalment, la depredació per part de lleons i hienes juntament amb l'abandonament per part de les mares en èpoques

d'escassetat d'aliments. Per tant, en aquest cas un programa de conservació centrat exclusivament en l'increment de la variabilitat genètica de l'espècie seria de poca utilitat. Hem de ser conscients també que la informació molecular no sempre és tan crítica per la supervivència d'una espècie com ho poden ser, per exemple, la conservació del seu hàbitat i la reducció de l'explotació, per part de l'home, dels recursos naturals que hi estan inclosos. En poblacions de mida molt petita i geogràficament molt localitzades, el risc d'extinció és molt més elevat a causa de les fluctuacions demogràfiques aleatòries o catàstrofes naturals que no pas pels efectes detrimentals que es poden derivar de l'endogàmia.

Un dels punts on la genètica de la conservació pot desenvolupar un paper clau actualment és en la detecció d'hibridacions entre poblacions o espècies. Les taxes d'hibridació i d'introgressió s'estan incrementant considerablement a causa de les translocacions d'organismes i de les modificacions dels hàbitats. La hibridació pot contribuir a la pèrdua de biodiversitat afavorint l'extinció d'espècies, sobretot d'aquelles que són rares i que estan en contacte amb altres espècies abundants que en són filogenèticament molt properes. Però la hibridació també juga un paper important en l'evolució ja que, a partir de la hibridació d'espècies filogenèticament properes se'n poden formar de noves. La hibridació es pot detectar amb relativa facilitat mitjançant marcadors genètics altament polimòrfics i la distribució del desequilibri gamètic entre parells de loci pot ajudar a datar quan va succeir. No obstant, això no és suficient en gestió, doncs també s'ha de determinar si aquesta hibridació es produeix de manera natural o per causes antropogèniques, s'ha d'interpretar la seva rellevança evolutiva i també determinar el paper que ha de desenvolupar aquest fenomen en els plans de conservació; coses gens fàcils segons Allendorf i al. [2001]. Penso que l'ús de les tècniques moleculars pot ser decisiu per detectar fenòmens d'hibridació. Aleshores s'hauria d'afavorir la conservació de les hibridacions ocorregudes de manera natural i les més antigues, per la seva importància evolutiva, i s'hauria de reduir aquelles que són produïdes per l'acció de l'home, més freqüents que les anteriors i que poden tenir efectes devastadors. No obstant, tampoc s'han de seguir aquestes regles al peu de la lletra. El visó europeu i el turó europeu se sap que hibriden de forma natural. Aquesta hibridació, encara que sigui natural, representa una altra amenaça pel futur del visó europeu, el qual està molt compromès. Crec que és molt necessari quantificar el grau d'hibridació entre aquestes dues espècies i detectar zones on aquest fenomen es

produeix mitjançant tècniques moleculars i a partir d'aquí plantejar actuacions, si es vol assegurar el futur d'aquesta espècie.

En un context més general, la genètica pot contribuir a detectar àrees geogràfiques on hi hagi una concentració important de variabilitat genètica de moltes espècies. La conservació d'aquestes àrees significaria, per una banda, la protecció de les reserves genètiques significatives per la salut i l'evolució d'aquestes espècies i, per l'altra, una major probabilitat de conservar variants genètiques amb possibles utilitats mèdiques o econòmiques. Un exemple d'això podrien ser les diferents regions del sud d'Europa que durant el Plistocè van ser els refugis glacials de moltes espècies. Segons Taberlet i al. [1998], Itàlia té una especial rellevança perquè és la regió que conserva més llinatges endèmics a causa de la barrera que ha significat el massís dels Alps per moltes espècies. A més a més, en els refugis del sud d'Europa és on es concentra la major part de variabilitat genètica del continent. Penso que aquestes àrees són de gran interès i s'ha de potenciar la seva conservació.

Un altre punt on es centren els esforços de la genètica en conservació és la identificació dins d'una espècie d'unitats de gestió o evolutivament significatives. Tenint en compte els diferents criteris que hi ha per identificar Unitats Evolutivament Significatives i la falta d'unanimitat sobre la seva definició, penso que l'opció més pràctica és la proposada per Fraser i Bernatchez [2001]. Segons aquests autors el criteri a seguir o la definició d'Unitat Evolutivament Significativa serà diferent en funció de cada cas. Per exemplificar això em referiré a dos casos de la meua recerca. La definició de Moritz [1994] (vegeu taula 1.2) no és totalment aplicable en el cas del macac japonès. Aquest autor considera que una Unitat Evolutivament Significativa ha de ser monofilètica segons els marcadors mitocondrials. Les poblacions de macac japonès estudiades han resultat ser totes monofilètiques segons la regió control de l'ADN mitocondrial. No obstant, aquest resultat no és representatiu de tots els individus de la població ja que l'ADN mitocondrial s'hereta per via materna, i en el cas dels macacs les femelles són filopàtriques mentre que els mascles són migrants. Això ha fet que els llinatges mitocondrials evolucionin independentment i es diferenciïn en poblacions locals mentre que la variació nuclear es distribueix més extensament al llarg del territori. Si apliquéssim estrictament la definició de Moritz [1994] basant-nos només en marcadors mitocondrials sobreestimaríem, en aquest cas, el nombre d'Unitats Evolutivament Significatives a definir. En el cas de les espècies en que les femelles

presentin comportaments filopàtrics, les Unitats Evolutivament Significatives s'haurien de definir sobretot basant-se en marcadors nuclears.

En el teixó l'aplicació d'aquesta definició em sembla més adequada ja que ambdós sexes presenten un comportament dispersiu força limitat. En el teixó euroasiàtic els resultats obtinguts poden servir com una primera guia sobre la gestió de les poblacions que estan més amenaçades com són les dels Països Baixos i de Creta. Segons l'anàlisi de la variació de la regió control, els individus dels Països Baixos formarien part de la mateixa Unitat Evolutivament Significativa que els de la resta d'Europa continental i les Illes Britàniques. Per tant, qualsevol d'aquestes poblacions podria ser donadora en cas de ser necessari un programa de reintroducció d'aquesta espècie, per exemple en els Països Baixos. No obstant seria preferible confirmar aquesta semblança genètica amb un estudi filogeogràfic del teixó a nivell europeu amb marcadors més variables com els microsatèl·lits per intentar detectar una possible estructuració filogeogràfica en aquesta espècie i en aquest continent. En la llúdriga, la regió control de la qual tampoc presenta estructuració filogeogràfica al llarg d'Europa, els marcadors microsatèl·lit han sigut força informatius [Randi i al. 2003]. També se sap que el teixó presenta diferents graus de comportament social en diferents llocs d'Europa, com s'ha dit a l'apartat 4.1 de la Introducció. Per tant, si es vol translocar teixons als Països Baixos cal tenir en compte, a part dels criteris genètics, la informació procedent d'estudis realitzats en el camp sobre l'ecologia i els requeriments ambientals de l'espècie en aquest país i les possibles poblacions candidates a ser donadores d'animals per la introducció. D'altra banda tenim evidències que els teixons de l'illa de Creta procedeixen de l'Àsia Menor o del Pròxim Orient i possiblement van arribar a l'illa portats pels primers colonitzadors humans. A més a més, sembla evident que no es tracta d'una subespècie endèmica d'aquesta illa sinó que formaria part de la subespècie *Meles meles canescens* distribuïda pel sud-oest asiàtic de manera que la seva conservació estaria poc justificada segons el criteri taxonòmic i pel fet que aquest animal possiblement va ser introduït artificialment en aquesta illa.

Penso que el treball en conservació a nivell intraespecífic ha d'anar més enllà de la identificació d'Unitats Evolutivament Significatives. Taylor i Dizon [1999] alerten sobre els riscos de basar la gestió, en aquest nivell, només en criteris genètics i comparteixo amb ells que els genetistes hem de treballar en cooperació amb els gestors de fauna si volem fer la feina eficientment. La informació proporcionada per la filogeografia és molt valuosa per guiar la conservació d'una espècie però això no vol dir

170- DISCUSSIÓ GENERAL

que la gestió de la biodiversitat s'hagi de dirigir des d'un laboratori. En conservació, no ens hem de conformar en detectar o no flux gènic a partir d'un estudi filogeogràfic. També hem d'esbrinar com el paisatge i les característiques ambientals del medi influeixen en la presència o absència d'aquest flux. Altres aspectes, com per exemple el control de la demografia, la densitat i la distribució geogràfica de l'espècie a conservar i els seus possibles depredadors, inclòs l'home, són també de vital importància per assegurar el seu futur immediat. Crec que a part de la distinció genètica, també s'ha de tenir en compte la distinció ecològica, tal com suggereixen Crandall i al. [2000], ja que ambdós factors estan implicats en els processos evolutius de les poblacions.

Sistemàtica i conservació de la biodiversitat

Al subapartat anterior he parlat de com es gestiona una espècie. En aquest reflexiono sobre alguns dels arguments que s'utilitzen per decidir quines espècies s'han de conservar. Parlar de la conservació d'espècies pot ser tant ambigu com la seva definició i ens podem plantejar preguntes com la següent – totes les espècies han de tenir el mateix valor de cara a la seva preservació, o el valor d'una espècie ha de ser determinat per la seva distinció filogenètica?

Segons Wilson [1992] s'ha de prioritzar la conservació d'espècies filogenèticament antigues ja que en molts casos són les úniques sobrevivents del seu grup taxonòmic, el qual no es podria recuperar si aquestes espècies desapareguessin. En canvi altres autors com Erwin [1991] pensen que els grups que s'estan diversificant han de tenir prioritat sobre els taxons filogenèticament aïllats perquè en els primers la biodiversitat es pot recuperar més ràpidament després d'un episodi d'extinció. Segons la meua opinió, la distinció i rellevança filogenètica i taxonòmica han de ser factors a tenir en compte a l'hora de prioritzar la conservació d'una determinada espècie però no necessàriament han de ser els únics, ni els més importants, com veurem més endavant. Els resultats presentats al Capítol I posen en evidència que la desaparició de les espècies de mustèlids que actualment estan catalogades com a amenaçades pot suposar la pèrdua de llinatges molt o moderadament antics, que estan representats per diferents gèneres i espècies de llúdrigues (especialment la gegant); i el golut. La desaparició de totes les espècies de llúdrigues amenaçades suposaria una important pèrdua de diversitat filogenètica per tota la família i tan sols la desaparició de la llúdriga gegant, *Pteronura brasiliensis*, i de la llúdriga de mar, *Enhydra lutris* – dues de les espècies de llúdrigues que tenen el futur més compromès – suposaria la pèrdua de dos llinatges que segons els

nostres càlculs van divergir fa entre 10 i 7 milions d'anys (vegeu Capítol I). Per tant, crec que és justificable que es faci un esforç a nivell internacional per assegurar el futur d'aquesta subfamília per l'important valor filogenètic que té respecte el conjunt dels mustèlids a part de les seves peculiars característiques ecològiques.

Ara bé, centrar-se massa en els criteris filogenètic i taxonòmic pot conduir a perdre de vista altres aspectes tant o més interessants. És acceptable deixar de destinar recursos per la conservació d'espècies que han divergit molt recentment i que tenen el seu estatus taxonòmic qüestionat malgrat que estiguin greument amenaçades d'extinció? Jo crec que si ens basem només en aquests criteris tenim un alt risc d'equivocar-nos. Com exemples d'això poso el turó de peus negres, que està pràcticament extingit de la natura, i el visó europeu. El turó de peus negres habitava les praderies d'Amèrica del Nord des d'Alberta i Saskatchewan (Canadà) fins al sudoest dels Estats Units. Les poblacions i l'àrea de distribució d'aquesta espècie van començar a patir una dramàtica disminució des de finals del segle XIX principalment a causa de l'erradicació de les seves principals preses, els gossos de les praderies, *Cynomys* spp. Cap a finals de la primera meitat del segle XX es va considerar que el turó de peus negres s'havia extingit; no obstant els anys 1964 i 1981 es van descobrir dues poblacions salvatges que posteriorment van desaparèixer [O'Brien i al. 1989]. Des de fa uns anys, diferents parcs zoològics dels Estats Units i del Canadà estan participant en un programa de cria en captivitat per recuperar aquesta espècie i evitar la seva extinció i s'estan tornant a alliberar individus a la natura. El turó de peus negres és el depredador principal dels gossos de les praderies i, per tant, un factor clau en la regulació de les poblacions d'aquestes espècies de rosegadors. A més a més, pel fet d'estar en un dels pisos superiors de la cadena tròfica, pot ser una espècie força rellevant per l'ecosistema.

El visó europeu és un dels carnívors més amenaçats d'Europa [Maran i al. 1998; Sidorovich 2000]. Els resultats obtinguts en el Capítol I, com he dit més amunt, qüestionen l'estatus específic del visó europeu. A més a més, el visó europeu és molt proper filogenèticament al turó europeu amb el qual és simpàtric i pot hibridar. Segons Davison i al. [2000], i tenint en compte les diferències morfològiques i les diferents preferències ecològiques i comportamentals que hi ha entre aquestes dues espècies, es podrien considerar diferents Unitats Evolutivament Significatives d'acord amb la definició de Crandall i al. [2000] a la qual es tenen en compte dades genètiques i ecològiques. La presència de membranes interdigitals en el visó europeu suggereix que està millor adaptat als ambients aquàtics que la seva "espècie germana", el turó europeu.

172- DISCUSSIÓ GENERAL

A més a més, el visó europeu té preferència pels cursos mitjans i baixos dels rius, de corrent lenta, amb densa cobertura vegetal i bona qualitat de l'aigua [Palomo i Gisbert 2002]. Això converteix en visó europeu en una espècie bioindicadora de la bona qualitat de l'aigua i de l'hàbitat. La presència del visó europeu pot ser un argument més per recuperar i conservar zones sovint degradades com són els cursos baixos dels rius i que tenen un gran interès ecològic. Per tant, per justificar la conservació d'una espècie concreta, és tant o més important el paper que pugui desenvolupar en un ecosistema que la seva rellevança filogenètica o taxonòmica.

Una taxonomia mal aplicada pot significar un ús inadequat dels recursos econòmics limitats que tenen els conservacionistes per gestionar la biodiversitat. No hi ha evidències genètiques [Capítol I, Nozawa i al. 1991], ni morfològiques [Groves 2001] que recolzin l'estatus subespecífic de les poblacions de macac de l'illa de Yakushima. Es podria justificar la seva conservació tenint en compte que és una de les poblacions més viables de tota l'espècie [Hill 1992] i que presenta diferències apreciables a nivell ecològic respecte a les altres poblacions de macac japonès [Maruhashi 1980]. No obstant, això no és res més que una conseqüència del bon estat de conservació i de les peculiaritats ecològiques del seu hàbitat. En aquest cas jo crec que pel que s'ha de vetllar és per preservar els boscos de l'illa de Yakushima – on per exemple a l'àrea corresponent al Parc Nacional de Kirishima-Yaku hi ha un dels boscos primaris més importants del món ja que és continu des del nivell del mar fins als pics més alts de l'illa, a 1900 m [Hill 1992] – que prioritzar la conservació del macac. El macac japonès és una espècie extraordinàriament adaptable – com es pot deduir del fet que al 1972 uns 150 individus de la població japonesa d'Arashiyama van ser portats a un ranxo del sud de Texas on van augmentar a 300 individus el 1980 i fins als 730 individus el 1993 [Fedigan i Zohar 1997] – i la població de Yakushima, en cas de desaparèixer, es podria recuperar fàcilment en el futur introduint animals d'altres poblacions.

La conservació de les espècies ha d'estar fonamentada en criteris de rellevança ecològica, taxonòmica i filogenètica i la importància de cada un d'ells s'ha de decidir en funció de cada cas i de la disponibilitat de recursos. Per exemple, una espècie o una unitat pot ser molt poc rellevant filogenèticament o taxonòmicament i, en canvi, tenir un paper clau pel manteniment d'un ecosistema del qual depenen moltes altres espècies. És cert que la taxonomia juga un paper important en conservació ja que dona nom a allò que s'ha de conservar. No obstant, penso que la justificació dels programes de

conservació depèn massa de la categoria d'espècie. És evident que interessa destinar recursos per conservar aquelles entitats que reuneixen tots els requisits per ser classificades com espècies, doncs la seva desaparició representaria la pèrdua irrecuperable de llinatges ben diferenciats. Però tenint en compte l'ambigüitat de la definició d'espècie, crec que tota unitat categoritzable taxonòmicament pot tenir la seva conservació justificada, tot i que també penso que la biologia de la conservació no ha de quedar subordinada a la taxonomia. S'han d'establir prioritats i, per mi, és preferible la rellevança que una espècie té en el manteniment de l'ecosistema on viu, abans que les seva rellevança sistemàtica.

Noves eines pel control del tràfic il·legal d'espècies amenaçades

Un altre punt clau en conservació on la genètica pot intervenir és el seguiment del tràfic i comerç de productes derivats d'espècies en perill d'extinció, un problema que compromet el futur d'un gran nombre d'espècies. La majoria de vegades l'estat d'aquests productes està tant modificat que és pràcticament impossible saber a quina espècie pertanyen a partir dels mètodes basats en el fenotip o el reconeixement visual dels productes. Per tant, la genètica forense pot ser una gran aliada per ajudar a complir les directrius de la Convenció Internacional pel Comerç d'Espècies Amenaçades de Fauna i de Flora (CITES). Actualment és possible recuperar ADN fins i tot de mostres molt degradades i a partir d'aquí és possible seqüenciar regions del genoma que siguin diagnòstic per identificar l'espècie o fins i tot la població a la que pertanyen. La genètica forense ha estat decisiva en la detecció de comerç il·legal d'espècies en perill d'extinció. Per exemple, mitjançant seqüències de la regió control s'ha demostrat el comerç il·legal de carn de balena amb gep, *Megaptera novaeangliae*, en mercats del Japó i de Corea del Sud [Baker i Palumbi 1994]. Mitjançant seqüències del gen citocrom *b* s'ha demostrat la venda il·legal de carn de tigre, *Panthera tigris*, a la Xina [Wan i Fang 2003]; i que sis escultures confiscades pel Departament d'Agricultura de Taiwan havien estat fabricades a partir de banyes de diferents espècies de rinoceronts [Hsieh i al. 2003].

Perque el protocol tingui èxit, diferents factors importants han de ser tinguts en compte com per exemple la quantitat d'ADN que es pot obtenir, la seva estabilitat, la presència d'inhibidors de la PCR, la reproductibilitat i la presència de contaminants. L'ús de marcadors mitocondrials és especialment útil en forense a causa de l'elevat número de còpies de cada seqüència que hi ha per cèl·lula, la qual cosa fa possible la

174- DISCUSSIÓ GENERAL

preservació d'un major número de còpies d'ADN mitocondrial durant períodes de temps més prolongats que d'ADN nuclear [Jehaes i al. 2001]. L'ADN es comença a degradar a partir de la mort de l'individu a causa de l'hidròlisi, l'oxidació, els efectes de les radiacions, la presència de microorganismes i les temperatures altes [Carter 2002]. En el cas dels productes derivats d'animals cal tenir en compte, a més a més, els diferents tractaments químics que poden haver patit per evitar que es degradin i que poden haver afectat l'estabilitat de la molècula d'ADN. La quantitat i la qualitat de l'ADN extret es pot incrementar variant alguns dels paràmetres durant el procés d'extracció com poden ser els temps d'incubació amb EDTA o amb proteïnasa K [Schmerer i al. 1999]. La presència d'inhibidors de PCR és l'altre obstacle que s'ha de superar. Actualment hi ha tot un seguit de protocols que redueixen la presència d'aquests inhibidors com són els mètodes d'extracció d'ADN basats en sílica [Yang i al. 1998] o chelex [Singer-Sam 1989]. El perill de les contaminacions es pot minimitzar utilitzant material estèril o autoclavant els estris o solucions d'ús repetit, executant en habitacions separades els processos de pre i post-PCR, fent els experiments en laboratoris que no treballin habitualment amb els taxons que volem diagnosticar i, evidentment, utilitzant controls negatius a les diferents fases del procés. No cal dir que l'èxit i la fiabilitat de tot aquest procés també depèn de que el genotip que s'obtingui sigui estadísticament representatiu del que es vulgui identificar, per tant abans de tot cal que hi hagi com a precedents estudis filogenètics i filogeogràfics representatius del grup taxonòmic (família, gènere) o de les poblacions que puguin servir de controls amb un número mínim d'animals de les diferents classes per assegurar la robustesa de les dades.

La presència de múltiples posicions polimòrfiques informatives a la regió control de l'ADN mitocondrial del teixó (Figura 2.3 de la introducció i Capítol II) permet identificar l'origen, a nivell continental, de productes derivats d'aquesta espècie (vegeu Capítol III). Així es pot saber si un producte s'ha elaborat a partir de restes de teixons europeus, del sud-oest d'Àsia, de la resta d'Àsia o del Japó i, per tant, aquesta tècnica es pot aplicar al control del seu comerç en aquells països on el teixó està protegit. En el treball presentat al Capítol III hem demostrat el comerç de brotxes d'afaitar de luxe fabricades a partir de pèls de teixó als Països Baixos i Espanya, dos dels països on aquesta espècie està protegida.

La conservació de la biodiversitat més enllà de gens i espècies

Entendre els gens ens pot ajudar a conservar una espècie amb una major eficiència però no ens hem de conformar només en això. No hem d'intentar salvar totes les espècies, ni hem de mantenir la biodiversitat immutable. Això seria antinatural, el registre fòssil ens ha ensenyat que aproximadament el 99% de les espècies que han existit durant tota la història de la Terra han desaparegut. Del que es tracta és de reduir el nostre impacte en l'extinció d'espècies i també de conservar els mecanismes que poden crear-ne de noves en el futur. Segons Bowen [1999] el que és important és preservar els processos de la vida i això implica identificar i protegir les diverses branques de l'arbre de la vida (d'acord amb la filogènia), mantenir els sistemes de suport dels organismes vius com són els ecosistemes (d'acord amb l'ecologia) i vetllar perquè els organismes puguin adaptar-se a ambients canviants (d'acord amb la biologia evolutiva). Treballs com els que s'han presentat en aquesta tesi tenen implicacions en dos dels grans blocs bàsics en biologia de la conservació, la sistemàtica i la biologia evolutiva, però conservar espècies té una finalitat molt més important que va més enllà d'elles mateixes; la conservació dels seus hàbitats.

Els biòlegs de la conservació han classificat les amenaces a la biodiversitat en funció de la magnitud dels seus efectes. En primer lloc hi ha la destrucció dels hàbitats, seguit de la introducció d'espècies exòtiques, la contaminació, l'increment de la població humana i la sobreexplotació. De bon tros, la destrucció dels hàbitats i la introducció d'espècies exòtiques són les que tenen els efectes més nefastos [Diamond 1989], però no són res més que les conseqüències de la sobrepoblació humana. Cada vegada som més conscients que ens trobem en els inicis de la sisena extinció en massa i que la diversitat a nivell global està disminuint [Sax i Gaines 2003]. No obstant, els mateixos autors afirmen que la diversitat de molts grups taxonòmics està augmentant a escales regionals i, a escales locals, està disminuint en ambients antropogènics i s'ignora el seu estat en ambients més o menys intactes. Dues causes d'aquests efectes són la introducció d'espècies exòtiques i la destrucció d'hàbitats, cosa que fa possible el contacte entre espècies que estaven geogràficament aïllades. Encara que, a nivell regional la diversitat pot augmentar a causa de l'arribada de noves espècies, això causa una disminució de la diversitat a nivell global ja que sovint implica pèrdues importants d'espècies natives.

D'acord amb això pot semblar ineficient dedicar temps i diners a la conservació d'unes determinades espècies enlloc de destinar més recursos a la conservació

176- DISCUSSIÓ GENERAL

d'hàbitats i al control d'espècies invasores. No obstant, això no hauria de ser incompatible amb el que he comentat en els subapartats anteriors, ja que tots els nivells de la vida estan interconnectats. La desaparició d'una espècie concreta que sigui clau pot tenir conseqüències molt negatives pel seu ecosistema. A més a més, determinats canvis que succeeixen en les poblacions de les espècies (mida, nombre, distribució, composició genètica) que formen part d'un ecosistema poden afectar el funcionament d'aquest i, en conseqüència, els diferents serveis que ens dona [Luck i al. 2003]. Preservar un ecosistema també implica saber quin paper juguen les diferents espècies en el seu manteniment i, això vol dir que s'han d'identificar aquelles espècies que són claus pel seu bon funcionament.

Actualment cada vegada hi ha més interès en detectar i conservar punts calents de biodiversitat els quals considero que no han d'estar definits només en censos d'espècies, sinó també en funció del seu potencial evolutiu. Així també reben la importància que es mereixen aquelles àrees que concentren llinatges evolutivament distants i aquelles altres on hi ha contactes de múltiples espècies on en poden sorgir de noves. Per tant, és important prioritzar la conservació d'aquelles zones que continguin majors diversitats d'hàbitats, d'espècies i de variants genètiques que permetin noves adaptacions o radiacions d'organismes en el cas que es presentin canvis ambientals. Els hàbitats s'haurien de conservar en funció de la seva rellevança taxonòmica (número i diversitat d'espècies que continguin), evolutiva (si són aptes perquè hi hagi processos d'especiació o si contenen abundants llinatges antics), i ecològica (diversitat de comunitats, funcions ecosistèmiques). Això implica reconciliar els tres punts de vista sovint enfrontats: els dels sistemàtics, els dels ecòlegs i els dels biòlegs evolutius. La destrucció dels hàbitats i la introducció d'espècies exòtiques són els problemes que hem de resoldre amb més urgència, a la vegada que hem de prioritzar la identificació i conservació d'aquelles àrees que siguin riques en biodiversitat en tots els seus nivells i significatives en la formació de noves espècies. Tanmateix, perquè això tingui èxit, també hem de controlar la població de la nostra espècie i potenciar l'educació ambiental, tant en els adults com en els infants, per conscienciar a la societat sobre la necessitat de resoldre aquests problemes i per presionar als polítics perquè adoptin les mesures necessàries per fer-ho. Acabar amb les dificultats de comunicació i els conflictes d'interessos entre països pobres i rics també és un dels requisits indispensables per desaccelerar la pèrdua de biodiversitat, ja que la majoria de punts calents es localitzen en països pobres. Tenir en compte els coneixements dels sociòlegs

– per exemple sobre els desplaçaments i migracions humanes i les seves causes – i els coneixements dels economistes – sobretot tot el que es refereix al desenvolupament sostenible – també ens pot ajudar a lluitar contra la sisena extinció.

Per aconseguir una bona gestió i conservació de la biodiversitat cal una estreta col·laboració i un diàleg entre tothom qui hi està implicat. Malauradament, sembla ser que això no sempre passa, com han fet notar Golding i Timberlake [2003], els quals adverteixen sobre la manca de comunicació i cooperació que hi ha entre els taxònoms i els conservacionistes. D'altra banda hi ha la paradoxa que mentre que una de les eines més importants que tenen els conservacionistes per justificar un programa de conservació és el fet de disposar d'una bona taxonomia, els professionals que treballen en aquesta disciplina s'estan convertint en una altra espècie en perill d'extinció. Hopkins i Fleckleton [2002] adverteixen sobre una important disminució del nombre de taxònoms amateurs i professionals clàssics a la Gran Bretanya des de meitats del segle XX la qual cosa sembla ser una tendència general, sobretot a occident.

Possiblement a occident cada vegada és més difícil vendre un projecte sobre taxonomia, si no és per taxons molt rellevants i hi ha un treball molecular pel mig. Per Tautz i al. [2003] això no ha de ser un problema ja que, segons aquests autors, s'ha d'optar per una taxonomia basada exclusivament en seqüències d'ADN. Jo no comparteixo aquest punt de vista tant radical ja que, malgrat que la sistemàtica molecular i la filogeografia tenen un potencial molt gran en conservació, de poc serviran si no poden ser aplicades al camp. Per això calen també professionals que sàpiguen distingir els organismes a partir d'altres evidències que no siguin només una seqüència d'ADN. Els que treballem en sistemàtica molecular i els conservacionistes depenem d'aquests professionals. Quan ens envien una mostra al laboratori per ser utilitzada per un estudi filogenètic o filogeogràfic, abans ha estat diagnosticada per una persona que ha reconegut l'espècie a la qual pertany basant-se en la seva morfologia. Per decidir si una àrea és rellevant per ser conservada, sovint els conservacionistes recorren a inventaris d'espècies. La sistemàtica molecular no ha de substituir la sistemàtica tradicional, en tot cas, com s'ha vist en aquesta tesi, l'ha de complementar i millorar. Potser els taxònoms clàssics són una espècie clau en l'ecosistema de la biologia de la conservació i la seva desaparició pot dificultar seriosament els estudis que fem els moleculars i la feina dels conservacionistes. Per tant, no estaria de més que dissenyéssim un pla de recuperació d'aquesta espècie amenaçada, pel bé del nostre ecosistema i pel bé d'una bona gestió de la biodiversitat.



BIBLIOGRAFIA

180- BIBLIOGRAFIA

Abramov AV [2000] A taxonomic review of the genus *Mustela* (Mammalia, Carnivora). *Zoosystematica Rossica* **8**: 357-364.

Abramov AV [2001] Notes on the taxonomy of the Siberian badgers (Mustelidae: *Meles*). *Proceedings of the Zoological Institute of Russian Academy of Sciences* **288**: 221-233.

Abramov AV [2002] Variation of the baculum structure of the Palearctic badger (Carnivora, Mustelidae, *Meles*). *Russian Journal of Theriology* **1**: 57-60.

Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK [2001] The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 613-622.

Anderson E [1989] The phylogeny of mustelids and the systematics of ferrets. *A: Conservation Biology and the Black-footed Ferret* [US Seal, ET Thorne, MA Bogan, SH Anderson, Eds], pp. 10-20. Yale University Press, Connecticut.

Anderson E [1994] Evolution, prehistoric distribution and systematics of *Martes*. *A: Martens, Sables and Fishers: Biology and Conservation* [SW Buskirk, AS Harestad, MG Raphael, RA Powell, Eds], pp. 13-25. Cornell University Press, Ithaca.

Antunes A, Templeton AR, Guyomard R, Alexandrino P [2002] The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the *transferrin* gene in the brown trout. *Molecular Biology Evolution* **19**: 1272-1287.

Avise JC [1994] *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, London.

Avise JC [1998] The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* **7**: 371-379.

Avise JC, Nelson WS [1989] Molecular genetic relationships of the extinct Dusky Seaside Sparrow. *Science* **243**: 646-648

Avice JC, Ball RMJr [1990] Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* **7**: 45-67.

Avice JC, Arnold J, Ball RMJr, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC [1987] Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489-522.

Ax P [1987] *The Phylogenetic System. The Systematization of Organisms on the Basis of their Phylogenesis*. J. Wiley and Sons, Chichester.

Azuma S [1985] Ecological biogeography of Japanese monkeys (*Macaca fuscata* Blyth) in the warm and cold temperate forest. *A: Contemporary Mammalogy in China and Japan* [T Kawamichi, Ed], pp.1-5. Mammalogical Society of Japan, Osaka.

Azzaroli A [1946] La scimmia fossile della Sardegna. *Revista di Scienze Preistoriche* **1**: 68-76.

Baker CS, Palumbi SR [1994] Which wales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science* **265**: 1538-1539.

Baker CS, Lento GM, Cipriano F, Palumbi SR [2000] Predicted declining of protected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **267**: 1191-1199.

Baryshnikov GF, Potapova OR [1990] Variability of the dental system in badgers (*Meles*, Carnivora) of the USSR fauna. *Zoologicheskii Zhurnal* **69**: 84-97 [en rus amb resum en anglès].

Baryshnikov GF, Abramov AV [1997] Structure of baculum (os penis) in Mustelidae (Mammalia, Carnivora), Communication 1. *Zoologicheskii Zhurnal* **76**: 1399-1410 [en rus amb resum en anglès].

182- BIBLIOGRAFIA

Baskin JA [1998] North American Tertiary Mustelidae. *A: Evolution of Tertiary Mammals of North America: Terrestrial Carnivores, Ungulates, and Ungulate Like Mammals* [CM Janis, KM Janis, KM Scott, Eds], pp. 152-173. Cambridge University Press, Cambridge.

Baum BR [1992] Combining trees as a way of combining data sets for phylogenetic inference, and the desirability of combining gene trees. *Taxon* **41**: 3-10.

Baum DA, Shaw KL [1995] Genealogical perspectives on the species problem. *A: Experimental and Molecular Approaches to Plant Bioystematics* [PC Hoch, AG Stevenson, Eds], pp. 289-303. Missouri Botanical Garden, St. Louis.

Berli P, Felsenstein J [1999] Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* **152**: 763-773.

Benammi M, Calvo M, Prévot M, Jaeger JJ [1996] Magnetostratigraphy and paleontology of Aït Kandoula Basin (High Atlas, Morocco) and the African-European late Miocene terrestrial fauna exchanges. *Earth and Planetary Science Letters* **145**: 15-29.

Bermingham E, Avise JC [1986] Molecular zoogeography of freshwater fishes in southeastern United States. *Genetics* **113**: 939-965.

Bernstein I, Gordon T [1980] Mixed taxa introductions, hybrids, and macaque systematics. *A: The Macaques: Studies in Ecology, Behavior, and Evolution* [DG Lindburg, Ed], pp. 125-147. Van Nostrand-Reinhold, New York.

Bininda-Emonds ORP, Gittleman JL, Purvis A [1999] Building large trees by combining phylogenetic information: a complete phylogeny of the extant Carnivora (Mammalia). *Biological Reviews* **74**: 143-175.

Blanco JC [1998] *Guia de Campo de Mamíferos de España (vol 1)*. Editorial Planeta, Barcelona.

Bowen BW [1999] Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology* **8**: S5-S10.

Brower AVZ, DeSalle R, Vogler A [1996] Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**: 423-450.

Brown TA [2002] *Genomes*. Department of Biomolecular Science, UMIST, Manchester.

Bryant HN, Russell FLS AP, Fitch WB [1993] Phylogenetic relationships within the extant Mustelidae (Carnivora): appraisal of the cladistic status of the Simpsonian subfamilies. *Zoological Journal of the Linnaean Society* **108**: 301-334.

Cantatore P, Saccone C [1987] Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. *International Review of Cytology* **108**: 149-208.

Carter J [2002] DNA preservation in fluid preserved collections. *SPNHC Newsletter* **16**: 14-15.

Chakravarti A [1999] Population genetics-making sense out of sequences. *Nature Genetics Supplement*. **21**: 56-60.

Coates AG, Obando JA [1996] The geologic evolution of the Central American Isthmus. *A: Evolution and Environment in Tropical America* [JBC Jackson, AG Coates, A Budd, Eds], pp. 21-56. University of Chicago Press, Chicago.

Cooper SJB, Ibrahim KM, Hewitt GM [1995] Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* **4**: 49-60.

Corbet GB [1978] The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review. *Publications of the British Museum of Natural History* **788**: 1-314.

184- BIBLIOGRAFIA

Cracraft J [1983] Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* **1**: 159-187.

Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK [2000] Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 290-295.

Cronin JE, Cann R, Sarich VM [1980] Molecular evolution and systematics of the genus *Macaca*. *A: The Macaques: Studies in Ecology, Behavior, and Evolution* [DG Lindburg, Ed], pp. 31-51. Van Nostrand-Reinhold, New York.

Crozier RH [1997] Preserving the information content of species: genetic diversity, phylogeny, and conservation worth. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**: 243-268.

Cummings MP, Otto SP, Wakeley J [1995] Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **12**: 814-822.

Daugherty CH, Cree A, Hay JM, Thompson MB [1990] Neglected taxonomy and continuing extinctions of tuatara (*Sphenodon*). *Nature* **347**: 177-179.

Davison A, Birks JDS, Griffiths HI, Kitchener AC, Biggins D, Butlin RK [1999] Hybridization and the phylogenetic relationships between polecats and domestic ferrets in Britain. *Biological Conservation* **87**: 155-161.

Davison A, Griffiths HI, Brookes RC, Maran T, Macdonald DW, Sidorovich VE, Kitchener AC, Irizar I, Villate I, González-Esteban J, Ceña JC, Ceña A, Moya I, Palazón S [2000] Mitochondrial DNA and palaeontological evidence for the origins of endangered European mink, *Mustela lutreola*. *Animal Conservation* **4**: 345-355.

DeBry RW, Seshadri S [2001] Nuclear intron sequences for phylogenetics of closely related mammals: an example using the phylogeny of *Mus*. *Journal of Mammalogy* **82**: 280-288.

Deinard A, Smith DG [2001] Phylogenetic relationships among the macaques: evidence from the nuclear locus *NRAMP1*. *Journal of Human Evolution* **41**: 45-59.

Delson E [1975] Evolutionary history of the Cercopithecidae. *A: Contributions to Primatology (vol. 5) Approaches to Primate Paleobiology* [FS Szalay, Ed], pp. 167-217. Karger, Basel.

Delson E [1980] Fossil macaques, phyletic relationships and a scenario of deployment. *A: The Macaques: Studies in Ecology, Behavior, and Evolution* [DG Lindburg, Ed], pp. 10-30. Van Nostrand-Reinhold, New York.

Delson E [1996] The oldest monkeys in Asia. *A: Abstracts of the International Symposium: Evolution of Asian Primates* [O Takenaka, Ed], p. 40. Primate Research Institute, Inuyama, Japan.

De Queiroz K [1998] The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. *A: Endless Forms, Species and Speciation* [DJ Howard, SH Berlocher, Eds], pp. 57-75. Oxford University Press, Oxford.

De Queiroz K [1999] The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. *A: Species, New Interdisciplinary Essays* [RA Wilson, Ed], pp. 49-89. MA: MIT Press, Cambridge.

De Queiroz K, Gauthier J [1990] Phylogeny as the principle in taxonomic-phylogenetic definitions of taxon names. *Systematic Zoology* **39**: 307-322.

De Queiroz K, Good DA [1997] Phenetic clustering in biology: a critique. *The Quarterly Review of Biology* **72**: 3-30.

Diamond JM [1989] The present, past and future of human-caused extinctions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* **325**: 469-477.

186- BIBLIOGRAFIA

Dizon AE, Lockyer C, Perrin WF, DeMaster DP, Sisson J [1992] Rethinking the stock concept: a phylogeographic approach. *Conservation Biology* **6**: 24-36.

Doda JN, Wright CT, Clayton DA [1981] Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **78**: 6116-6120.

Domingo-Roura X [2002] Genetic distinction of marten species by fixation of a microsatellite region. *Journal of Mammalogy* **83**: 907-912.

Domingo-Roura X, Marmi J, López-Giráldez JF, Garcia-Franquesa E [2001] New molecular challenges in animal conservation. *Animal Biodiversity and Conservation* **24**: 19-29.

Domingo-Roura X, Macdonald DW, Roy MS, Marmi J, Terradas J, Woodroffe R, Burke T, Wayne RK [2003] Confirmation of low genetic diversity and multiple breeding females in a social group of Eurasian badgers from microsatellite and field data. *Molecular Ecology* **12**: 533-539.

Dragoo JW, Honeycutt RL [1997] Systematics of mustelid-like carnivores. *Journal of Mammalogy* **78**: 426-443.

Ellegren H, Hartman G, Johanson M, Anderson L [1993] Major histocompatibility complex monomorphism and low levels of DNA fingerprinting variability in a reintroduced and rapidly expanding population of beavers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**: 8150-8153.

Ellerman JR, Morrison-Scott TCS [1951] *Checklist of Palaearctic and Indian Mammals (1758 to 1946)*. Trustees of British Museum (Natural History), London.

Erwin TL [1991] An evolutionary basis for conservation strategies. *Science* **253**: 750-752.

Evans BJ, Supriatna J, Melnick DJ [2001] Hybridization and population genetics of two macaque species in Sulawesi, Indonesia. *Evolution* **55**: 1686-1702.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM [1992] Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.

Fa JE [1989] The genus *Macaca*: a review of taxonomy and evolution. *Mammal Review* **19**: 45-81.

Fay JC, Wu CI [1999] A human population bottleneck can account for the discordance between patterns of mitochondrial versus nuclear DNA variation. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1003-1005.

Fedigan LM, Zohar S [1997] Sex differences in mortality of Japanese macaques: twenty-one years of data from the Arashiyama west population. *American Journal of Physical Anthropology* **102**: 161-175.

FitzSimmons NN, Moritz C, Moore SS [1995] Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* **12**: 432-440.

Fleming MA, Cook JA [2002] Phylogeography of endemic ermine (*Mustela erminea*) in southeast Alaska. *Molecular Ecology* **11**: 795-807.

Flynn JJ, Nedbal MA [1998] Phylogeny of the Carnivora (Mammalia): congruence vs incompatibility among multiple data sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9**: 414-426.

Flynn JJ, Nedbal MA, Dragoo JW, Honeycutt RL [2000] Whence the red panda? *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17**: 190-199.

Fooden J [1964] Rhesus and crab-eating macaques: intergradation in Thailand. *Science* **143**: 363-365.

188- BIBLIOGRAFIA

Fooden J [1997] Tail length variation in *Macaca fascicularis* and *M. mulatta*. *Primates* **38**: 221-231.

Fooden J [2000] *Systematic Review of the Rhesus Macaque, Macaca mulatta (Zimmermann, 1780)*. Field Museum of Natural History, Chicago.

Fraser DJ, Bernatchez L [2001] Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* **10**: 2741-2752.

Freudenstein JV, Pickett KM, Simmons MP, Wenzel JW [2003] From basepairs to birdsongs: phylogenetic data in the age of genomics. *Cladistics* **19**: 333-347.

Gallagher J, Clifton-Hadley RS [2000] Tuberculosis in badgers; a review of disease and its significance for other animals. *Research in Veterinary Science* **69**: 203-217.

Garcés M, Krijgsman W, Agustí J [1998] Chronology of the late Turolian deposits of the Fortuna basin (SE Spain): implications for the Messinian evolution of the eastern Betics. *Earth and Planetary Science Letters* **163**: 69-81.

Garza JC, Desmarais E [2000] Derivation of a simple microsatellite locus from a compound ancestor in the genus *Mus*. *Mammalian Genome* **11**: 1117-1122.

Gauthier J, Kluge AG, Rowe T [1988] Amniote phylogeny and the importance of fossils. *Cladistics* **4**: 105-205.

Geist V [1992] Endangered species and the law. *Nature* **357**: 274-276.

Geraads D [1987] Dating the northern African cercopithecoid fossil record. *Human Evolution* **2**: 19-27.

Gibbs S, Collard M, Wood B [2002] Soft-tissue anatomy of the extant hominoids: a review and phylogenetic analysis. *Journal of Anatomy* **200**: 3-49.

Ginsburg L, Morales J [2000] Origine et évolution des Melinae (Mustelidae, Carnivora, Mammalia). *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris (2A)* **330**: 221-225.

Godfray HCJ [2002] Challenges for taxonomy. The discipline will have to reinvent itself if it is to survive and flourish. *Nature* **417**: 17-19.

Golding JS, Timberlake J [2003] How taxonomists can bridge the gap between taxonomy and conservation science. *Conservation Biology* **17**: 1177-1178.

Goloboff PA, Pol D [2002] Semi-strict supertrees. *Cladistics* **18**: 514-525.

Grakov NN [1994] Kidus-a hybrid of the sable and the pine marten. *Lutreola* **3**: 1-4.

Graur D, Li WH [2000] *Fundamentals of Molecular Evolution (2nd edition)*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

Griffiths HI, Thomas DH [1997] *The Conservation and Management of the European Badger (Meles meles)*. Nature and Environment, No. 90. Council of Europe, Strasbourg.

Groves C [2001] *Primate Taxonomy*. Smithsonian Institution, Washington.

Gura T [2000] Bones molecules...or both? *Nature* **406**: 230-233.

Haig SM [1998] Molecular contributions to conservation. *Ecology* **79**: 413-425.

Haldane JBS [1956] Can species concepts be justified? *A: The Species Concept in Paleontology* [PC Sylvester-Bradley, Ed], pp. 95-96. Systematics Association, London.

Hare MP [2001] Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 700-706.

Harris E [2000] Molecular systematics of the Old World monkey tribe Papionini: analysis of the total available genetic sequences. *Journal of Human Evolution* **38**: 235-256.

190- BIBLIOGRAFIA

Harrison RG [1998] Linking evolutionary pattern and process: the relevance of species concepts for the study of speciation. *A: Endless Forms, Species and Speciation* [DJ Howard, SH Berlocher, Eds], pp. 19-31. Oxford University Press, Oxford.

Hatefi Y [1985] The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry* **54**: 1015-1069.

Hayasaka K, Horai S, Shotake T, Nozawa K, Matsunaga E [1986] Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese monkeys, *Macaca fuscata*. *Japanese Journal of Genetics* **61**: 345-359.

Hayasaka K, Horai S, Gojobori T, Shotake T, Nozawa K, Matsunaga E [1988] Phylogenetic relationships among Japanese, rhesus, Formosan, and crab-eating monkeys, inferred from restriction-enzyme analysis of mitochondrial DNAs. *Molecular Biology and Evolution* **5**: 270-281.

Hayasaka K, Fujii K, Horai S [1996] Molecular phylogeny of Macaques: implications of nucleotide sequences from an 896-base pair region of mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* **13**: 1044-1053.

Hedrick PW [2001] Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 629-636.

Helbig AJ, Knox AG, Parkin DT, Sangster G, Collinson M [2002] Guidelines for assigning species rank. *Ibis* **144**: 518-525.

Henry C, Lafontaine L, Mouches A [1988] *Encyclopedie des Carnivores de France, Vol. 7*. Société Française d'Etude et Protection de Mammiferes, Nort s/Erdre.

Heptner VG, Naumov NP, Yurgenson PB, Sludskiy AA, Chirkova AF, Bannikov AG [1967] *Mammals of the Soviet Union, Vol. 2. Sea Cows and Carnivora*. Vyshaya Shkola, Moskow [en rus].

Hewitt GM [1998] Diversity in insect species using DNA sequences. *A: Molecular Tools for Screening Biodiversity* [A Karp, PG Isaac, DS Ingram, Eds], pp. 419-425. Chapman and Hall, London.

Hewitt GM [1999] Post-glacial recolonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.

Hewitt GM [2001] Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**: 537-549.

Hey J [2000] Human mitochondrial DNA recombination: Can it be true? *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 181-182.

Hey J [2001] *Genes, Categories and Species*. Oxford University Press, Oxford.

Hickman CP, Roberts LS, Larson A [2003] *Animal Diversity*. MacGraw-Hill Higher Education, Boston.

Highton R [1998] Is *Ensatina escholtzii* a ring species? *Herpetologica* **54**: 254-278.

Hill DA [1992] Conservation of Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*) in Yakushima: the need for effective protected areas. *A: Topics in Primatology, Vol 2: Behavior, Ecology and Conservation* [N Itoigawa, Y Sugiyama, GP Sackett, Thompson RKR, Eds], pp. 395-401. University of Tokyo Press, Tokyo.

Hoelzel AR [1997] Molecular ecology of pinnipeds. *A: Molecular Genetics of Marine Mammals* [AE Dizon, SJ Chivers, WF Perrin, eds.], pp. 147-157. Society for Marine Mammalogy, Oxford.

Hopkins GW, Freckleton RP [2002] Declines in the number of amateur and professional taxonomists: implications for conservation. *Animal Conservation* **5**: 245-249.

Howell N, Gilbert K [1988] Mutational analysis of the mouse mitochondrial cytochrome *b* gene. *Journal of Molecular Biology* **203**: 607-618.

192- BIBLIOGRAFIA

Hsieh H-M, Huang L-H, Tsai L-C, Kuo Y-C, Meng H-H, Linacre A, Lee JC-I [2003] Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome *b* gene. *Forensic Science International* **136**: 1-11.

Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC [1991] Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* **32**: 128-144.

Jaarola M, Searle JB [2002] Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* **11**: 2613-2621.

Jarne P, Lagoda PJJ [1996] Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 424-429.

Jehaes E, Toprak K, Vanderheyden N, Pfeiffer H, Cassiman JJ, Brinkmann B, Decorte R [2001] Pitfalls in the analysis of mitochondrial DNA from ancient specimens and the consequences for forensic DNA analysis: the historical case of the putative heart of Louis XVII. *International Journal of Legal Medicine* **115**: 135-141.

Joseph L, Moritz C, Hugall A [1995] Molecular support for vicariance as a source of diversity in rainforest. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **260**: 177-182.

Kambysellis MP, Craddock EM [1997] Ecological and reproductive shifts in the diversification of the Hawaiian *Drosophila*. *A: Molecular Evolution and Adaptive Radiation* [TJ Givnish, K Sytsma, Eds], pp. 475-509. Cambridge University Press, Cambridge.

Kamei T [1969] Mammals of the glacial age in Japan – especially on Japanese monkey. *Monkey* **106**: 5-12 [en japonais].

Kluge AG [1983] Cladistics and the classification of the great apes. *A: New Interpretations of Ape and Human Ancestry* [RL Ciochan, RS Corruccini, Eds], pp. 151-177. Plenum, New York.

Knapp S, Bateman RM, Chalmers NR, Humphries CJ, Rainbow PS, Smith AB, Taylor PD, Vane-Wright RI, Wilkinson M [2002] Taxonomy needs evolution, not revolution. *Nature* **419**: 559.

Knowles LL, Maddison WP [2002] Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* **11**: 2623-2635.

Koepfli KP, Wayne RK [1998] Phylogenetic relationships of otters (Carnivora: Mustelidae) based on mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Journal of Zoology, London* **246**: 401-416.

Koepfli KP, Wayne RK [2003] Type I STS markers are more informative than cytochrome *b* in phylogenetic reconstruction of the Mustelidae (Mammalia: Carnivora). *Systematic Biology* **52**: 571-593.

Köhler M, Moyà-Solà S, Alba DM [2000] *Macaca* (Primates, Cercopithecidae) from Late Miocene of Spain. *Journal of Human Evolution* **38**: 447-452.

Kuchta SR, Meyer D [2001] A genealogical view of geographical variation. *Molecular Ecology* **10**: 2569-2576.

Kuhner M, Yamato J, Felsenstein J [1998] Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. *Genetics* **149**: 429-434.

Kurose N, Kaneko Y, Abramov AV, Siriaroonrat B, Masuda R [2001] Low genetic diversity in Japanese populations of the Eurasian badger *Meles meles* (Mustelidae, Carnivora) revealed by mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Zoological Science* **18**: 1145-1151.

194- BIBLIOGRAFIA

Kurtén B [1968] *The Pleistocene Mammals of Europe*. Weidenfeld and Nicolsan, London.

Laborda AJ, Domínguez J [2000] *Filogenia Animal. ¿Un Acto de Fe?*. Secretariado de Publicaciones, Universidad de León.

Lamboy WF [1994] The accuracy of the maximum parsimony method for phylogeny reconstruction with morphological characters. *Systematic Botany* **19**: 489-505.

Lanyon S [1993] Phylogenetic frameworks: towards a firmer foundation for the comparative approach. *Biological Journal of the Linnean Society* **49**: 45-61.

Latorre C, Quade J, McIntosh WC [1997] The expansion of C4 grasses and the global change in the Late Miocene: stable isotope evidence from the Americas. *Earth Planet Science Letters* **146**: 83-96.

Ledge C, Arnason U [1996] Phylogenetic analyses of complete cytochrome *b* genes of the order Carnivora with particular emphasis on the Caniformia. *Journal of Molecular Evolution*. **42**: 135-144.

Lee MSY [2002] Online data base could end taxonomic anarchy. *Nature* **417**: 787-788.

Lindburg DG [1971] The rhesus monkey in north India: an ecological and behavioral study. *A: Primate Behavior (Vol. 2) Developments in Field and Laboratory Research* [LA Rosenblum, Ed]. Academic Press, New York.

Losos JB, Glor RE [2003] Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 220-227.

Luck GW, Daily GC, Ehrlich PR [2003] Population diversity and ecosystem services. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 331-336.

Ludt CJ, Schroeder W, Rottmann O, Kuehn R [2004] Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. [En premsa].

Lynch JD [1989] The gauge of speciation: on the frequencies of modes of speciation. *A: Speciation and Its Consequences* [D Otte, JA Endler, Eds.], pp. 527-553. Sinauer Associates, Massachusetts.

Lynch M [1991] The genetic interpretation of inbreeding and outbreeding depression. *Evolution* **45**: 622-629.

Lynch JM [1994] Morphometric variation in the badger (*Meles meles*): clinal variation in cranial size and shape across Eurasia. *Small Carnivore Conservation* **10**: 6-7.

Lynch JM, Whelan R, Il Frituri AI, Hayden TJ [1997] Craniometric variation in the Eurasian badger, *Meles meles*. *Journal of Zoology, London* **242**: 31-44.

Macdonald DW [2001] *The New Encyclopedia of Mammals*. Oxford University Press, Oxford.

Macdonald DW, Barrett P [1993] *Mammals of Britain and Europe*. Harper Collins, London.

Mahmut H, Masuda R, Onuma M, Takahashi M, Nagata J, Suzuki M, Ohtaishi N [2002] Molecular phylogeography of the red deer (*Cervus elaphus*) populations in Xinjiang of China: comparison with other Asian, European, and North American populations. *Zoological Science* **19**: 485-495.

Makova KD, Nekrutenko A, Baker RJ [2000] Evolution of microsatellite alleles in four species of mice (genus *Apodemus*). *Journal of Molecular Evolution* **51**: 166-172.

Maran T, Henttonen H [1995] Why is the European mink (*Mustela lutreola*) disappearing? A review of the process and hypotheses. *Annales Zoologici Fennici* **32**: 47-54.

196- BIBLIOGRAFIA

Maran T, Macdonald DW, Kruuk H, Sidorovich V, Rozhnov VV [1998] The continuing decline of the European mink, *Mustela lutreola*: evidence for the intraguild aggression hypothesis. *Symposium of the Zoological Society of London* **71**: 297-323.

Marincovich L, Gladenkov AY [1999] Evidence for an early opening of the Bering Strait. *Nature* **397**: 149-151.

Martin LD [1989] Fossil history of the terrestrial Carnivora. *A: Carnivore Behaviour, Ecology and Evolution* [JL Gittleman, Ed], pp. 536-568. Comstock Publishing Associates, New York.

Martin AP, Pardini AT, Noble LR, Jones CS [2002] Conservation of a dinucleotide simple sequence repeat locus in sharks. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23**: 205-213.

Maruhashi T [1980] Feeding behaviour and diet of the Japanese monkey (*Macaca fuscata yakui*) on Yakushima Island, Japan. *Primates* **21**: 141-160.

Masuda R, Yoshida MC [1994] A molecular phylogeny of the family Mustelidae (Mammalia, Carnivora), based on comparisons of mitochondrial cytochrome b nucleotide sequences. *Zoological Science* **11**: 605-612.

Matassi G, Sharp PM, Gautier C [1999] Chromosomal location effects on gene sequence evolution in mammals. *Current Biology* **9**: 786-791.

May RT [1990] How many species? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* **330**: 293-304.

Mayer F, von Helversen O [2001] Cryptic diversity in European bats. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **268**: 1825-1832.

Mayr E [1963] *Animal Species and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.

Mayr E, Ashlock PD [1991] *Principles of Systematic Zoology*. MacGraw Hill Inc, New York.

McKenna MC, Bell SK [1997] *Classification of Mammals Above the Species Level*. Columbia University Press, New York.

Melnick DJ, Jolly CJ, Kidd KK [1986] The analysis of a wild population of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). II. The Dunga Gali population in species-wide perspective. *American Journal of Physical Anthropology* **71**: 129-140.

Melnick DJ, Hoelzer G, Absher R, Ashley M [1993] mtDNA diversity in rhesus monkeys reveals overestimates of divergence time and paraphyly with neighboring species. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 282-295.

Minelli A [1993] *Biological Systematics: The State of the Art*. Chapman and Hall, London.

Miyamoto MM i Fitch WM [1995] Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Systematic Biology* **44**: 64-76.

Mooney HA, Cleland EE [2001] The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**: 5446-5451.

Moore WS [1995] Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* **49**: 718-726.

Moritz C [1994] Defining “evolutionary significant units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **9**: 373-375.

Moritz C, Hillis DM [1996] Molecular systematics: context and controversies. *A: Molecular Systematics, 2nd Edition* [DM Hillis, C Moritz, BK Mable, Eds], pp.1-13. Sinauer Associates, Massachusetts.

198- BIBLIOGRAFIA

Moritz C, Faith DP [1998] Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* **7**: 419-429.

Neal E [1948] *The Badger*. Collins, London.

Neal E, Cheeseman C [1996] *Badgers*. T & AD Poyser Ltd, London.

Nixon KC, Carpenter JM [2000] On the other “Phylogenetic Systematics”. *Cladistics* **16**: 298-318.

Nowak RM [1991] *Walker’s Mammals of the World 5th ed.* John Hopkins University Press, Baltimore.

Nozawa K, Shotake T, Minezawa M, Kawamoto Y, Hayasaka K, Kawamoto S, Ito S [1991] Population genetics of Japanese monkeys: III. Ancestry and differentiation of local populations. *Primates* **32**: 411-435.

O’Brien SJ [1994] Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annual Review of Genetics* **28**: 467-489.

O’Brien SJ, Wildt DE, Bush M, Caro TM, Fitzgibbon C, Aggundey I, Leakey RE [1987] East African cheetahs: evidence for two population bottlenecks? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **84**: 508-511.

O’Brien SJ, Martenson JS, Eichelberger MA, Thorne ET, Wright F [1989] Genetic variation and molecular systematics of the black-footed ferret. *A: Conservation Biology and the Black-footed Ferret* [US Seal, ET Thorne, MA Bogan, SH Anderson, Eds], pp. 21-33. Yale University Press, Connecticut.

Ognev SI [1931] *The Mammals of the Eastern Europe and Northern Asia. Vol. 2.* Gosizdat, Moskow [en rus]

Osborn HF [1910] *The age of Mammals in Europe, Asia and North America.* MacMillan Company, New York.

-
- Palomo LJ, Gisbert J [2002] *Atlas de los Mamíferos Terrestres de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-SECEM-SECEMU, Madrid.
- Pasbøll PJ, Arctander P [1998] Primers for animal mitochondrial DNA: the importance of species-specific primers. *A: Molecular Tools for Screening Biodiversity* [A Karp, PG Isaac, DS Ingram, Eds], pp. 249-255. Chapman and Hall, London.
- Patterson C, Williams DM, Humphries CJ [1993] Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 153-188.
- Pérez-Losada M, Crandall KA [2003] Can taxonomic richness be used as a surrogate for phylogenetic distinctness indices for ranking areas for conservation. *Animal Biodiversity and Conservation* **26**: 77-84.
- Petit E, Balloux F, Excoffier L [2002] Mammalian population genetics: why not Y? *Trends in Ecology and Evolution* **17**: 28-33.
- Petitpierre E [1985] Els estudis genètics en taxonomia. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural* **50**: 315-326.
- Petrov VV [1953] The data on the intraspecific variability of badgers (genus *Meles*). *Uchenye Zapiski Leningradskogo Pedagogicheskogo Instituta* **7**: 149-205. [En rus]
- Petter G [1971] Origine, phylogenie et systematique des blaireaux. *Mammalia* **35**: 567-597.
- Poe S, Wiens JJ [2000] Character selection and the methodology of morphological phylogenetics. *A: Phylogenetic Analysis of Morphological Data* [JJ Wiens, Ed], pp. 20-36. Smithsonian Press, Washington DC.
- Porter AH [1990] Testing nominal species boundaries using gene flow statistics: the taxonomy of hybridizing admiral butterflies (*Limenitis*: Nymphalidae). *Systematic Zoology* **39**: 148-161.

200- BIBLIOGRAFIA

Pough FH, Heiser JB, McFarland WN [1985] *Vertebrate Life 3rd*. McMillan Publishing Company, New York.

Purvis A, Agapow PM, Gittleman JL, Mace GM [2000] Nonrandom extinction and the loss of evolutionary history. *Science* **288**: 328-330.

Pusey AE, Packer C [1987] Dispersal and philopatry. *A: Primate Societies* [BB Smuts, DL Cheney, RM Seyfarth, RW Wrangham, TT Struhsaker, Eds], pp. 250-266. The University of Chicago Press, Chicago.

Quicke DLJ [1993] *Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy*. Blackie Academic and Professional, London.

Ragan MA [1992] Phylogenetic inference based on matrix representation of trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **1**: 53-58.

Raitio M, Lindroos K, Laukkanen M, Pastinen T, Sistonen P, Sajantila A, Syvanen AC [2001] Y-chromosomal SNPs in finno-ugric-speaking populations analysed by minisequencing on microarrays. *Genome Research* **11**: 471-482.

Randi E, Davoli F, Pierpaoli M, Pertoldi C, Madsen AB, Loeschcke V [2003] Genetic structure in otter (*Lutra lutra*) populations in Europe: implications for conservation. *Animal Conservation* **6**: 1-10.

Rannala B [1995] Polymorphic characters and phylogenetic analysis: a statistical perspective. *Systematic Biology* **44**: 421-429.

Redfern R [2000] *Origins*. Cassell and Co, London.

Rico C, Rico I, Hewitt G [1996] 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **263**: 549-557.

Rogers AR, Harpending H [1992] Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 552-569.

Rögl F [1998] Palaeogeographic considerations for Mediterranean and Parathethys seaways (Oligocene to Miocene). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* **99A**: 279-310.

Ryder OA [1986] Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* **1**: 9-10.

Saccone C, Lanave C, Pesole G, Sbisà F [1993] Peculiar features and evolution of mitochondrial genome in mammals. *A: Mitochondrial DNA in Human Pathology* [S DiMauro, DC Wallace, Eds], pp. 27-37. Raven Press, New York.

Sato JJ, Hosoda T, Wolsan M, Tsuchiya K, Yamamoto Y, Suzuki H [2003] Phylogenetic relationships and divergence times among mustelids (Mammalia: Carnivora) based on nucleotide sequences of the nuclear interphotoreceptor retinoid binding protein and mitochondrial cytochrome *b* genes. *Zoological Science* **20**: 243-264.

Satunin KA [1914] *Key to the Mammals of Russian Empire. Vol. 1*. Tipografiya Kantselyarii Namestnika, Tiflis. [En rus]

Savage DE, Russell DE [1983] *Mammalian Paleofaunas of the World*. Addison-Wesley Publishing Co-Ltd, London.

Sax DF, Gaines SD [2003] Species diversity: from global decreases to local increases. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 561-566.

Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C [1997] Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* **205**: 125-140.

202- BIBLIOGRAFIA

Schierup MH, Hein J [2000] Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics* **156**: 879-891.

Schlötterer C [2000] Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**: 365-371.

Schluter D [2000] *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press, Oxford.

Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B [1999] Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis* **20**: 1712-1716.

Schmidt-Kittler N [1981] Zur Stammesgeschichte der marderverwandten raubtiergruppen (Musteliodea, Carnivora). *Eclogae Geologicae Helvetiae* **74**: 753-801.

Seberg O, Humphries CJ, Knapp S, Stevenson DW, Petersen G, Scharff N, Andersen NM [2003] Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 63-65.

Semple C, Steel M [2000] A supertree method for rooted trees. *Discrete Applied Mathematics* **105**: 147-158.

Sibley CG, Ahlquist J [1987] Avian phylogeny reconstructed from comparisons of the genetic material, DNA. *A: Molecules and Morphology in Evolution: Conflict or Compromise?* [C Patterson, Ed], pp. 95-121. Cambridge University Press, Cambridge.

Sidorovich V [2000] The on-going decline of riparian mustelids (European mink, *Mustela lutreola*, polecat, *Mustela putorius*, and stoat, *Mustela erminea*) in eastern Europe: a review of the results to date and an hypotheses. *A: Mustelids in a Modern World. Management and Conservation Aspects of Small Carnivore Human Interactions* [HI Griffiths, Ed], pp. 295-317. Dr. W Backhuys, Leiden.

Simpson GG [1945] The principles of classification and a classification of mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **85**: 1-350.

Simpson GG [1961] *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia University Press, New York.

Singer-Sam JR, Tanguay C, Rigs AD [1989] Use of Chelex to improve PCR signal from a small number of cells. *Amplifications* **3**:11.

Sites JW Jr, Marshall JC [2003] Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 462-470.

Slade RW, Moritz C, Heideman A [1994] Multiple nuclear-gene phylogenies: application to pinnipeds and comparison with a mitochondrial DNA gene phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* **11**: 341-356.

Slatkin M, Maddison WP [1989] A cladistic measure of gene flow inferred from the filogenies of alleles. *Genetics* **123**: 603-613.

Sprague DS, Maruhashi T [1994] Japanese monkeys: capture and habitat loss. *Japan Primate Newsletter* [http://www.primat.wisc.edu/majordomo/primat-talk/msgs.9405/0042.html]

Springer MS, DeBry RW, Douady C, Amrine HM, Madsen O, de Jong WW, Stanhope MJ [2001] Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 132-143.

Spurway H [1955] The subhuman capacities for species recognition and their correlation with reproductive isolation. *A: Proceedings of the XI International Ornithological Congress, Basel, 1954* [A Portmann, E Sutter, Eds], pp. 340-349. Birkhäuser Verlag.

Stewart JR, Lister AM [2001] Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 608-613.

204- BIBLIOGRAFIA

Stone KD, Flynn RW, Cook JA [2002] Post-glacial colonization of northwestern North America by the forest-associated American marten (*Martes americana*, Mammalia: Carnivora: Mustelidae). *Molecular Ecology* **11**: 2049-2063.

Strasser E, Delson E [1987] Cladistic analysis of cercopithecoid relationships. *Journal of Human Evolution* **16**: 81-99.

Strauss E [1999] Can mitochondrial clocks keep time? *Science* **283**: 1435-1438.

Swofford DL, Olse SH [1990] Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. *Systematic Zoology* **36**: 293-325.

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF [1998] Comparative phylogeography and postglacial colonisation routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.

Taylor BL, Dizon AE [1999] First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology* **8**: 11-16.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP [2003] A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 70-74.

Templeton AR [1989] The meaning of species and speciation: a genetic perspective. *A: Speciation and its Consequences* [D Otte, JA Endler, Eds], pp. 3-27. Sinauer, Sunderland.

Templeton AR, Robertson RJ, Brisson J, Strasburg J [2001] Disrupting evolutionary processes: the effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**: 5426-5432.

Ternovsky DV [1977] *Biology of Mustelidae*. Nauka, Novosibirsk. [En rus].

Thomas H, Petter G [1986] Révision de la faune de mammifères du Miocène Supérieur de Menacer (ex-Marceau), Algérie: discussion sur l'âge du gisement. *Geobios* **19**: 357-373.

Tinaut A, Ruano F [2002] Biodiversidad, clasificación y filogenia. *A: Evolución: la Base de la Biología* [M Soler, Ed], pp. 293-306. Proyecto Sur Ediciones, Granada.

Tosi AJ, Morales JC, Melnick DJ [2000] Comparison of Y chromosome and mtDNA phylogenies leads to unique inferences of macaque evolutionary history. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17**: 133-144.

Tosi AJ, Disotell TR, Morales JC, Melnick DJ [2003] Cercopithecine Y-chromosome data provide a test of competing morphological evolutionary hypotheses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**: 510-521.

Tuytens FAM, Delahay RJ, Macdonald DW, Cheeseman CL, Long B, Donnelly CA [2000] Spatial perturbation caused by a badger (*Meles meles*) culling operation: implications for the function of territoriality and the control of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*). *Journal of Animal Ecology* **69**: 815-828.

Vogler AP, DeSalle R [1994] Diagnosing units of conservation management. *Conservation Biology* **6**: 170-178.

Vrana PB, Milinkovitch MC, Powell JR, Wheeler WC [1994] Higher level relationships of the arctoid Carnivora based on sequence data and "total evidence". *Molecular Phylogenetics and Evolution* **3**: 47-58.

Wada K [1980] Seasonal home range use by Japanese monkeys in the snowly Shiga heights. *Primates* **21**: 468-483.

Wagner H [1976] A new species of *Pliotaxidea* (*Mustelidae*, *Carnivora*) from California. *Journal of Palaeontology* **50**: 107-127.

206- BIBLIOGRAFIA

Wan Q-H, Fang S-G [2003] Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *Forensic Science International* **131**: 75-78.

Wang Y, Jiang X [1995] Today and tomorrow of primatological studies in China. *A: Primate Research and Conservation* [X Wuping, Z Yongzu, Eds], pp. 1-14. China Forestry Publishing House, Beijing.

Waples RS [1991] Pacific salmon, *Oncorhynchus* ssp. and the definition of "species" under the endangered species act. *Marine Fisheries Reviews* **53**: 11-22.

Waples RS [1995] Evolutionary significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. *A: Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique Units in Population Conservation* [JL Nielsen, GA Powers, Eds], pp. 8-27. Symposium 17. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

Wayne RK, Ostrander EA [1999] Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *BioEssays* **21**: 247-257.

Wells MM, Henry CS [1998] Songs, reproductive isolation, and speciation in cryptic species of insects. *A: Endless Forms: Species and Speciation* [DJ Howard, SH Berlocher, Eds], pp. 217-233. Oxford University Press, New York.

Wiens JJ [1999] Polymorphism in systematics and comparative biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**: 327-362.

Wiley EO [1978] The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology* **27**: 17-26.

Wiley EO [1979] An annotated Linnaean hierarchy, with comments on natural taxa and competing systems. *Systematic Zoology* **28**: 308-337.

Willemsen GF [1992] A revision of the Pliocene and Quaternary Lutrinae from Europe. *Scripta Geologica* **101**: 1-115.

-
- Wilson EO [1992] *The Diversity of Life*. Harvard University Press, Cambridge.
- Wolsan M [1993] Phylogeny and classification of early European *Mustelida* (*Mammalia: Carnivora*). *Acta Theriologica* **38**: 345-384.
- Wolsan M [1999] Oldest mephitine cranium and its implications for the origin of skunks. *Acta Palaeontologica Polonica* **44**: 223-230.
- Wolsan M [2001] Remains of *Meles hollitzeri* (Carnivora, Mustelidae) from the lower Pleistocene site of Untermassfeld. *A: Das Pleistozän von Untermassfeld bei Meiningen (Thüringen)* [IA Dubrovo, H-D Kahlke, J-A Keiler, R Musil, MV Sotnikova, A Turner, M Wolsan, Eds], pp. 659-671. Römisch-Germanisches Zentralmuseum and Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft.
- Wozencraft WC [1989] The phylogeny of the recent Carnivora. *A: Carnivore Behaviour, Ecology and Evolution* [JL Gittleman, Ed], pp. 495-453. Cornell University Press, New York.
- Wozencraft WC [1993] Carnivora. *A: Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference* [DE Wilson, DM Reeder, Eds], pp. 279-348. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Wurster DH, Benirschke K [1968] Comparative cytogenetics studies in the order Carnivora. *Chromosoma (Berlin)* **24**: 336-382.
- Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dudar C, Saunders SR [1998] Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology* **105**: 539-543.
- Youngman PM [1982] Distribution and systematics of the European mink *Mustela lutreola* Linnaeus 1761. *Acta Zoologica Fennica* **166**: 1-48.
- Youngman PM [1994] Beringian ferrets-mummies, biogeography, and systematics. *Journal of Mammalogy* **75**: 454-461.

208- BIBLIOGRAFIA

Zardoya R, Vollmer DM, Craddock C, Streelman JT, Karl S, Meyer A [1996] Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **263**: 1589-1598.

Zhang YP, Shi LM [1993] Phylogenetic relationships of macaques as inferred from restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Folia Primatologica* **60**: 7-17.

Zuckerandl E, Pauling L [1965] Evolutionary divergence and convergence in proteins. *A: Evolving Genes and Proteins* [V Bryson, HJ Vogel, Eds], pp. 97-166. Academic Press, New York.



ANNEXOS

1

Phylogeny, subspeciation and genetic structure of the Eurasian badger (*Meles meles*) in the Iberian Peninsula and the World

**Josep Marmi, Alexey V. Abramov, Pavel V. Chashchin i
Xavier Domingo-Roura**

Ecology and Conservation of the Badger in Mediterranean Ecosystems (eds. Virgós E, Mangas JG, Revilla E, Domingo-Roura X), Sociedad Española para la Conservación y el Estudio de los Mamíferos, Málaga (en premsa).

PHYLOGENY, SUBSPECIATION AND GENETIC STRUCTURE OF THE EURASIAN BADGER (*Meles Meles*) IN THE IBERIAN PENINSULA AND THE WORLD

J. Marmi¹, A.V. Abramov², P.V. Chashchin³ and X. Domingo-Roura¹

¹Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain; ²Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya nab. 1., Saint Petersburg 199034 Russia; ³Ilmensky State Reserve, Russian Academy of Sciences, Urals Branch, Miass 456317 Russia.

Abstract

The Eurasian badger, *Meles meles*, is a mustelid of the Melinae subfamily, evolutionarily close to the hog badger, *Arctonyx collaris*. It is extensively distributed in most of Eurasia showing a notable amount of morphological variation throughout its geographic range that complicates its taxonomy at the intraspecific level. Morphological studies support the existence of three species, *M. meles* in Europa, *M. leucurus* in Asia, and *M. anakuma* in Japan. The first two species would be divided into several subspecies. Nevertheless, this division in three species is not supported by molecular data. The analysis of the genetic variability in a 543 base pairs fragment of the mitochondrial DNA control region in 31 badgers from 15 different countries did not show evidences of subspeciation in Europe. The species has low genetic variability and little geographic structuring both in the Iberian Peninsula and Europe, excluding Crete. The individuals from Crete and Japan analysed have mitochondrial DNA haplotypes divergent from the haplotypes found in mainland Europe and the British Islands.

Badger's closest relatives

The Eurasian badger, *Meles meles* (Linnaeus, 1758) is classified within the mustelids (Mustelidae), the most diverse carnivore family. Nowadays, the Mustelidae is usually divided into five subfamilies: Mustelinae (weasels, minks, polecats, martens, tayra and wolverine), Lutrinae (otters), Mellivorinae (ratel), Taxidiinae (American badger), and Melinae (true badgers) (Macdonald 2001). Skunks traditionally were considered mustelids but nowadays form their own family called Mephitidae (Dragoo and Honeycutt 1997, Macdonald 2001). The phylogenetic relationships among badgers and the remaining mustelid subfamilies are under debate. Through the comparison of cranial characters it has been suggested in the past that badgers are a sister group of skunks (Simpson 1945). Other authors suggested from the fossil record that badgers and otters shared a common ancestor, the *Mionictis* genus, that lived during the Miocene (Willemsen 1992). In a phylogenetic analysis based on 46 morphological characters including 23 mustelid genera, *Meles*, *Arctonyx* and *Mydaus* appear within a clade together with otters and skunks (Bryant et al. 1993). In this analysis, *Meles* and *Arctonyx* are a sister group of otters, whereas *Mydaus* is grouped with skunks.

Traditionally it has been suggested that the Eurasian badger shares the subfamily Melinae with the following genera: i) *Arctonyx* widely distributed along Southeast Asia, ii) *Mydaus* in the islands of Sumatra, Java, Borneo and the North of Natuna, and iii) *Melogale* in India, Nepal, Burma, China, Taiwan, Assam, Indochina, Java and Borneo. However, it is quite clear now that skunks are not mustelids. Moreover, neuroanatomical data (Radinsky

1973), cranial morphology (Bryant et al. 1993), combined phylogenetic analysis of three genes (Dragoo and Honeycutt 1997) and bacular morphology (Baryshnikov et al., 2003) also support close phylogenetic relationships between *Mydaus* and skunks.

Within Melinae subfamily, the Eurasian badger and the hog badger, *Arctonyx collaris* Cuvier 1825, are the only closely related species. The phylogenetic relationships for the remaining genera are unclear. It has been suggested that badgers could not constitute a natural group but they would be a paraphyletic group (Bryant et al. 1993, Bininda-Emonds et al. 1999). Similarities in some morphological characters in the tympanum and teeth used to define this subfamily are likely due to ethological and ecological convergence (Petter 1971).

In spite of disagreements among studies based on morphological data, the studies based on molecular data agree with badgers being a sister group of a clade including subfamilies Lutrinae and Mustelinae. This has been suggested from 12S and 16S ribosomal DNA (Dragoo and Honeycutt 1997) and cytochrome *b* mitochondrial gene sequences (Ledge and Arnason 1996, Koepfli and Wayne 1998), and combining cytochrome *b* mitochondrial data and nuclear data from a microsatellite flanking region (Marmi et al. in press).

Taxonomic review of Eurasian badgers: morphology supports the existence of three different species

The Eurasian badger inhabits forested and stepped areas in the Palearctic region from the British Islands and the Iberian peninsula in the West to the Japanese archipelago in the East and from Scandinavia and West Siberia in the

North to Palestine, Iran, South China and Tibet in the South (Heptner et al. 1967, Corbet 1978, Macdonald 2001). It is a widely distributed species with an important geographic variability that complicates its taxonomy at the intraspecific level (see Abramov 2001 for a review).

A common view among mammalogists is to consider *M. meles* as a single species including 2-24 subspecies throughout its distribution (Ellerman and Morrison-Scott 1951, Petrov 1953, Heptner et al. 1967, Long and Killingley 1983, Wozencraft 1993). However, many authors indicated the remarkable differences between the European and Asian badgers in cranial characters and coloration and divide the genus into 2 or 3 species (Satunin 1914, Ognev 1931, Neal 1948, Baryshnikov and Potapova 1990, Abramov 2001, Baryshnikov et al. 2003, Abramov and Medvedev 2003). Bacular structure also supports the separation in three species in Europe (*M. meles*), continental Asia (*M. leucurus*) and Japan (*M. anakuma*) (Abramov 2002). Differences between European and Asian badgers in the coloration (head "mask" patterns), shape and proportions of first upper molar, amount of roots and size of the second lower premolar, shape of the auditory bullae, the frequency of loss of the first premolars, and the bacular structure are clear and unmistakable. It is assumed on the basis of analysis of teeth characters of fossil and recent badgers that *Meles* from Europe and Asia developed separately since the Middle Pleistocene (Baryshnikov and Potapova 1990, Baryshnikov et al. 2003).

The relationship between Japanese badgers and other Asian (continental) populations is questionable. Some authors consider the Japanese badger a subspecies being close to the Far Eastern populations of

continental Asian badger (Heptner et al. 1967, Baryshnikov and Potapova 1990). Other scientists consider Japanese badgers as a distinct species, *M. anakuma* (Ognev 1931, Neal 1948, Abramov 2001, 2002). The Japanese badger is significantly different in coloration and the size and proportions of skull and molars from all continental Asian badgers (Lynch 1994, Abramov 2001).

The definition of badger subspecies is confusing not only because it is still not clear if *Meles* includes more than one species but also because there is not enough molecular data to support or reject morphological studies. If we assume the existence of three different *Meles* species in Europe, Asia and Japan, an argument not confirmed yet with molecular data, the tentative subspecies distribution for each one of these three species would be:

The European badger *M. meles* (Linnaeus, 1758) is distributed throughout Europe (including Scandinavia) to West side of Volga River (Russia), Caucasus, Kopet Dagh Mtns, South and West Tien Shan Mtns; South to Israel, Iraq, Iran, and on Ireland, Britain, Crete, and Rhodes. Badgers along this distribution show reduced morphological variability. Most part of Europe is inhabited by the large *M. m. meles* (= *britannicus*, *caucasicus*, *danicus*, *heptneri*, *marianensis*, *mediterraneus*, *tauricus*). Subspecies *M. m. marianensis* Graells, 1897 and *M. m. mediterraneus* Barrett-Hamilton, 1899 were described in the Iberian peninsula and are not supported any more. The badger classified as *M. m. canescens* Blanford, 1875 (= *minor*, *ponticus*, *severtzovi*) is distributed from Fore Asia (including Asia Minor and the plains of Armenia and Iran) and Transcaucasia to West Tien Shan and Pamir-Alai Mountains. These animals are smaller and with paler fur than

animals from the rest of Europe, with the exception of badgers in Southern Spain, where size and fur colour are not clearly discriminant. *M. m. arcalus* (= *rhodius*), is morphologically close to the badgers from Transcaucasia and Asia Minor and inhabits the Mediterranean islands of Crete and Rhodes. Recently a new subspecies *M. m. milleri* Baryshnikov, Puzachenko et Abramov, 2003, has been proposed for Southwestern Norway (Baryshnikov et al. 2003).

The Asian badger *M. leucurus* (Hodgson, 1847) is distributed from the East of Volga River (Russia) through Siberia, Kazakhstan, Middle Asia to China and Korea; reaching Tibet in the South. There is no unified opinion about the subspecific structure of this species. The Asian badger demonstrated the least diversity of dental characters throughout the entire distribution range (Baryshnikov et al. 2003). Nevertheless most taxonomists are convinced that small and dark-colored badgers from the Russian Far East and Korea belong to well-separated subspecies *M. l. amurensis* Schrenck, 1859 (= *melanogenys*, *schrenkii*). Three or four forms might be distinguished in the remaining part of the distribution: *arenarius* Satunin, 1895 from plain and semi-desert parts of Kazakhstan and Uzbekistan, *sibiricus* Kastschenko, 1900 (= *altaicus*, *raddei*) distributed in Siberia except Far East, and *tianschanensis* Hayningen-Huene, 1910 (= *talassicus*) from Tien Shan Mountains. Badgers from China and Mongolia are very homogenous and might be considered a single subspecies, *M. l. leucurus* (= *blanfordi*, *chinensis*, *leptorhynchus*, *hanensis*, *siningensis*, *tsingtauensis*) (Gray 1869, Allen 1938, Pocock 1941, Bannikov 1954). Multivariate analyses of craniometric characters (Chashchin, unpublished data) among *M. leucurus* from former Soviet

Union support the existence of only three subspecies in this territory: i) *M. l. amurensis* (= *schrenkii*) in the Far East; ii) *M. l. arenarius* (= *sibiricus*, *altaicus*, *raddei*, *aberrans*), distributed along a vast territory East from Volga, including Urals, East, Central and Western Kazakhstan, Western and East Siberia; and iii) *M. l. leucurus* (= *talassicus*, *tianschanensis*) distributed in the mountain and foothills of Central Asia to the North and to the East from Chatkalsky and Fergansky mountain range. Perhaps all badgers from the East side of Volga River to Eastern Siberia (except Far East), Mongolia and China belong to a single subspecies (Abramov 2001).

The third proposed species, the Japanese badger *M. anakuma* Temminck, 1844, inhabits the Japanese Islands of Honshu, Kyushu, and Shikoku but it is absent from Hokkaido. No subspecies differentiation has been proposed in Japan.

Genetic studies are scarce but do not support the existence of more than one species

Kariological (chromosomal) studies show that Eurasian badgers from the two continents have the same diploid number $2n=44$ but variation in the size of heterochromatine blocks occurs between European and Asian badgers (Graphodatsky et al. 1989). The incorporation of molecular data promises to keep the debate on the speciation/subspeciation of *Meles* open. Comparison of cytochrome *b* sequences demonstrated remarkable differences between the Japanese and continental populations (Kurose et al. 2001). These authors support the classification of Japanese badgers as subspecies *M. m. anakuma*. The recent analysis of the nuclear interphotoreceptor retinoid binding protein gene also found a marked divergence between the European and Japanese badgers

(Sato et al. 2003). Mitochondrial DNA control region sequences show four main lineages (*M. m. meles* in Europe, *M. m. canescens* in Asia Minor including Crete island, *M. m. leucurus* in the rest of continental Asia, and *M. m. anakuma* in Japan) but the divergence among them is not higher than the values found at intraspecific level in other mammalian species (Marmi et al. unpublished data).

The fossil origin of Iberian badgers

Fossils of the most primitive badger-like forms are from Middle Miocene. Among them genera *Taxodon*, *Trochictis* and *Palaeomeles* have been described (Petter 1971). *Meles* genus appeared in the Early Pleistocene and possibly was originated from *Melodon* genus, from the Chinese Pliocene (Kurtén 1968). Afterwards, the ancestors of the Eurasian badger evolved in temperate Asian forests before dispersing west up to Europe. The oldest Eurasian badger fossil found in Europe is approximately two million years old and belongs to *Meles thorali* (Viret 1950). Between Middle and Upper Pleistocene, Europe was already extensively inhabited by the Eurasian badger (Neal 1986). In Spain, in addition to *Meles thorali*, two fossil subspecies of Eurasian badger have been described: *Meles meles atavus* from Middle Pleistocene in Villacastín (Segovia) (Arribas 1994) and *Meles meles meles* from Upper Pleistocene in Guipuzcoa (Altuna 1971).

Iberian badgers are not different in their mitochondrial DNA from other European badgers

Badgers in Iberia nowadays are included in the same subspecies as badgers from neighbouring European countries according to craniometric variation (Lynch 1994). However,

there is still a strong cline in size between north and south with small badgers inhabiting Southern Spain. To explore a possible genetic basis of these differences and the genetic relationships among Iberian badgers and badgers from the rest of Europe we compared eleven Spanish badgers (Catalonia $n=7$, Andalucia $n=4$) with individuals from other European countries: Austria ($n=1$), Finland ($n=2$), Germany ($n=1$), Crete, Greece ($n=2$), Ireland ($n=1$), Italy ($n=1$), Luxembourg ($n=2$), Norway ($n=2$), Poland ($n=2$), Sweden ($n=1$), Switzerland ($n=2$), The Netherlands ($n=1$), and The United Kingdom ($n=2$). We sequenced 543 base pairs of mitochondrial DNA control region in these 31 individuals using PCR primers *MelCR1* and *MelCR6* (Marmi et al. unpublished data). We also sequenced a badger from Japan as outgroup. Using programme MEGA v.2.1 (Kumar et al. 2001) we obtained a phylogenetic tree of haplotypes using neighbor-joining method, considering nucleotide differences and obtaining bootstrap values from 1,000 replicates. Using the same programme we calculated the mean number of differences among sequences from separate origins that have been assigned different subspecies names in the past: Iberian peninsula, rest of Europe, Crete, and Japan.

The phylogenetic tree (Figure 1) shows the existence of important similarities among sequences from continental Europe and from the British Islands and also shows that these sequences diverge considerably from those of island population of Crete and Japan. The number of nucleotide differences between badgers from Spain and the rest of Europe is considerably lower than the number of differences between these groups and badgers from Crete and Japan (Table 1). These results suggest that badger populations from Iberia

should not be considered a different subspecies from populations of the rest of Europe. According to our data, a single subspecies, *Meles meles meles*, exists in continental Europe and the British Islands. The Scandinavian badgers, including badger from Southeastern Norway (Ostfold Prov.) are very similar to badgers from other European populations (see also Baryshnikov et al. 2003). Nevertheless, our results would support populations from Crete being a different subspecies, *Meles meles arcalus*, but these animals could be related to animals from Asia Minor (Marmi et al. unpublished data) as has been proposed from morphological data (Baryshnikov et al. 2003).

There is also a lack of structuring in the geographic distribution of badger haplotypes from continental Europe and the British Islands (Fig.1). There are haplotypes shared among distant populations and geographic localities. We have found, for instance, an haplotype found in Spanish, British and Polish badgers and another haplotype shared among British, Swiss, German, Dutch and Polish badgers. This lack of differentiation in the control region among European individuals has been observed in other carnivore species such as wolf, *Canis lupus* Linnaeus, 1758, (Vilà et al. 1999), Eurasian otter, *Lutra lutra* Linnaeus, 1758, (Cassens et al. 2000), pine marten, *Martes martes* Linnaeus,

Figure 1: Phylogenetic tree of the different haplotypes found in this study. The country or countries of origin are marked for each haplotype. Bootstrap values above 50% are also shown.

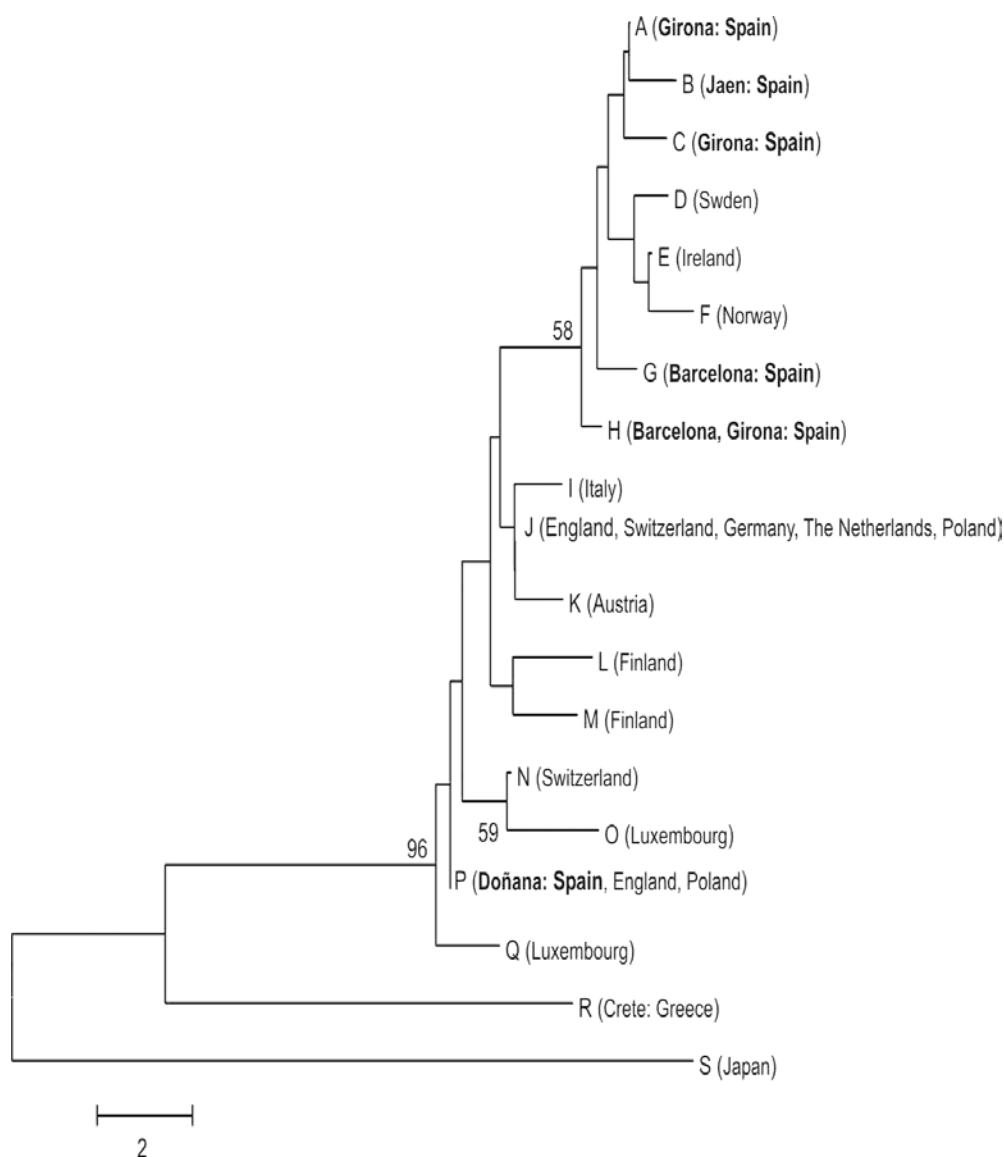


Table 1: Mean number of nucleotidic differences between (below diagonal) and within (diagonal) badgers of different geographic origins that have been assigned different subspecies names.

	Iberia	Europe	Crete	Japan
Iberia	2.0			
Europe	3.9	3.4		
Crete	18.3	16.4	0.0	
Japan	16.4	25.7	26.0	0.0

1758 (Davison et al. 2001), polecat, *Mustela putorius* Linnaeus, 1758 (Davison et al. 2001) and wolverine, *Gulo gulo* Pallas, 1780 (Walker et al. 2001). This pattern is likely due to the fact that some of these species colonized Europe after the last glaciation from only one of the glacial refuges located in South Europe during the Pleistocene.

Little genetic variability in Spain and Europe

The reduced levels of genetic variability in Eurasian badgers of a single geographic region has been reported in several occasions. Only when comparing animals from different geographic regions relevant levels of genetic differentiation are found. Using allozymes and RAPDs markers, Fakler and Schreiber (unpublished data) observed that populations from Norway and the British Islands showed lower levels of variability than populations from central Europe (Switzerland and Germany). Low levels of genetic variability in Danish populations have also been detected using allozymes (Pertoldi et al. 2000). Bijlsma et al. (2000) genotyped 105 badgers from The Netherlands and Denmark with microsatellite markers. Even if they found polymorphisms in the seven loci used, mean levels of observed heterozygosity were lower ($H_O=0.39$) than levels found in other mustelid species, such as the American mink, *Mustela vison* Schreber, 1777 ($H_O=0.62$, O'Connell et al. 1996), Eurasian

otters ($H_O=0.55$, Dallas and Piertney 1998) and ermine, *Mustela erminea* Linnaeus, 1758 ($H_O=0.75$, Fleming et al. 1999). Badger mean levels of observed heterozygosity were still higher than the ones found in pine martens ($H_O=0.20$, Bijlsma et al. 2000). Through the comparison of animals coming from different geographic regions (Iberian peninsula, British Islands, central Europe, Scandinavian peninsula, Crete, Mongolia and Japan) Domingo-Roura et al. (2003) have found twelve polymorphic microsatellite markers but only five of these were variable in the British population of Wytham Woods, Oxfordshire.

Levels of genetic variability in mitochondrial DNA control region in Europe are also low. In the 29 European individuals sequenced in this work excluding animals from Crete, we found 17 haplotypes with differences in only 12 of 543 nucleotide positions analysed, that is, only 2.2% of the positions are variable. In the pine marten, Davison et al. (2001) found 31 polymorphic positions in 325 base pairs (9.5%) in the same locus. Genetic variability levels (mean number of nucleotidic differences) of Spanish badgers ($d_A=2.0$) are similar to levels found in other regions of Europe: British Islands ($d_A=2.7$), central Europe ($d_A=2.8$) and Scandinavian peninsula ($d_A=4.4$). Nevertheless it is desirable to sequence a larger number of individuals to obtain a more complete picture of how mutation has accumulated in mitochondrial

DNA control region across the *Meles* range. Using complete sequences of cytochrome *b* gene (1140 base pairs), Kurose et al. (2000) found divergence levels significantly higher when comparing Japanese and continental sequences from East Europe and Siberia (6.95%) than when comparing different Japanese populations (0.49%). Even if we found an important genetic similarity among sequences coming from different regions of continental Europe and the British Islands, we also found an important divergence among these sequences and sequences from Crete and Japan (Table 1).

Meles is an interesting species showing low genetic variability, in particular in local populations, that nevertheless has an extensive distribution area and an important capacity for survival and adaptation. It is necessary to obtain additional molecular data, both mitochondrial and nuclear, to complement existing studies based on morphology, to be able to determine the phylogenetic relationships among Eurasian badgers and provide invaluable insight for understanding the evolution of *Meles*, and its colonisation history, and guidelines for possible reintroductions. In addition, some behavioural patterns, such as sociality, are different in different parts of their geographic distribution. The use of genetic markers can help to determine if these differences are due to evolutionary or ecological factors.

Acknowledgements

We thank G.F. Baryshnikov, O.E. Chashchina, M.V. Chibiyak, A.G. Vasilyev, and E.Y. Zakharova, for supporting this research. We are also grateful to I. Álvarez, E. Arberas, A. Arrizabalaga, E. Ballesteros, J.M. Barea, J. Brabec, H. Broseth, T. Burke, M.A. Campos, F. Canales, P. Fakler, I. Feiría, Y. Fukue, E. Geffen,

K. Hindenlang, H. Jansman, R. Kowalczyk, K. Kauhala, A. Laurie, S. Lavín, J. López, J.V. López, P. Lymberakis, M. Miralles, M. Moleón, G. Mucientes, M. Nadolska, T. Pakuno, J.C. Pérez, S. Pérez, I. Ponce, J. Prieta, E. Randi, E. Revilla, M. Saeki, L. Schley, P. Sleeman, F. Tuytens, X. Vilahur, R. Woodroffe, N. Yamaguchi, J. Zhang, and E. Zholnerovskaya for supporting the collection of badger samples around the world. J.M. and X. D-R were supported by People's Trust for Endangered Species (UK), Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Ref. 2000FI-00698), European Commission (INPRIMAT, QLR1-CT-2002-01325), and Fundació Territori i Paisatge (Spain) and A.V.A. had support from the Russian Foundation of Basic Research (02-04-48607) and from the Russian Academy of Sciences under the programme Scientific Bases of the Conservation of Biodiversity in Russia.

Bibliography

- Abramov, A.V. (2001). Notes on the taxonomy of the Siberian badgers (Mustelidae: *Meles*). *Proceedings of the Zoological Institute of Russian Academy of Sciences*. 288: 221-233. [In Russian with English summary]
- Abramov, A.V. (2002). Variation of the baculum structure of the Palaearctic badger (Carnivora, Mustelidae, *Meles*). *Russian Journal of Theriology* 1: 57-60.
- Abramov, A.V. and S.G. Medvedev (2003). Notes on zoogeography and taxonomy of the badgers (Carnivora: Mustelidae: *Meles*) and some of their fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae: *Paraceras*). *Zoosystematica Rossica* 11: 397-402.

- Allen, G.M. (1938). *The Mammals of China and Mongolia*. American Museum of Natural History, New York.
- Altuna, J. (1971). Fauna de mamíferos de los yacimientos prehistóricos de Guipuzcoa. *MUNIBE, Sociedad de Ciencias Naturales Aranzadi* 1-4: 191-330.
- Arribas, A. (1994). Los macromamíferos del yacimiento mesopleistoceno de Villacastín (Segovia, España). *Boletín Geológico y Minero* 105: 344-361.
- Bannikov, A.G. (1954). *The Mammals of Mongolian People Republic*. Izdatelstvo AN SSSR, Moscow. [In Russian]
- Baryshnikov, G.F. and O.R. Potapova (1990). Variability of the dental system in badgers (*Meles*, Carnivora) of the USSR fauna. *Zoologicheskii Zhurnal* 69: 84-97. [In Russian with English summary].
- Baryshnikov, G.F., A.Y. Puzachenko and A.V. Abramov (2003). New analysis of variability of cheek teeth in Eurasian badgers (Carnivora, Mustelidae, *Meles*). *Russian Journal of Theriology* 1: 133-149.
- Baryshnikov, G.F., O.R.P. Bininda-Emonds and A.V. Abramov (2003). Morphological variability and evolution of the baculum (os penis) in Mustelidae (Mammalia: Carnivora). *J. Mammal.* 84: 673-690.
- Bijlsma, R., M. van de Vliet, C. Pertoldi, R.C. van Apeldoorn and L. van de Zande (2000). Microsatellite primers from the Eurasian badger, *Meles meles*. *Mol. Ecol.* 9: 2155-2234.
- Bininda-Emonds, O.R.P., J.L. Gittleman and A. Purvis (1999). Building large trees by combining phylogenetic information: a complete phylogeny of the extant Carnivora (Mammalia). *Biol. Rev.* 74: 143-175.
- Bryant, H.N., F.L.S.A.P. Russell and W.B. Fitch (1993). Phylogenetic relationships within the extant Mustelidae (Carnivora): appraisal of the cladistic status of the Simpsonian subfamilies. *Zool. J. Linn. Soc. Lond.* 108: 301-334.
- Cassens, I., R. Tiedemann, F. Suchentrunk and G.B. Hartl (2000). Mitochondrial DNA variation in the European otter (*Lutra lutra*) and the use of spatial autocorrelation analysis in conservation. *J. Hered.* 91: 31-35.
- Corbet, G.B. (1978). The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review. *Publications of the British Museum of Natural History* 788: 1-314.
- Dallas, J.F. and S.B. Piernney (1998). Microsatellite primers for the Eurasian otter. *Mol. Ecol.* 7: 1248-1251.
- Davison, A., J.D.S. Birks, R.C. Brookes, J.E. Messenger and H.I. Griffiths (2001). Mitochondrial phylogeography and population history of pine martens *Martes martes* compared with polecats *Mustela putorius*. *Mol. Ecol.* 10: 2479-2488.
- Domingo-Roura, X., D.W. Macdonald, M.S. Roy, J. Marmi, J. Terradas, R. Woodroffe, T. Burke and R.K. Wayne (2003). Confirmation of low genetic diversity and multiple breeding females in a social group of Eurasian badgers from microsatellite and field data. *Mol. Ecol.* 12: 533-539.
- Dragoo, J.W. and R.L. Honeycutt (1997). Systematics of mustelid-like carnivores. *J. Mammal.* 78: 426-443.
- Ellerman, J.R. and T.C.S. Morrison-Scott (1951). *Checklist of Palaearctic and Indian Mammals (1758 to 1946)*. Trustees of British Museum (Natural History), London.

- Fleming, M.A., E.A. Ostrander and J.A. Cook (1999). Microsatellite markers for American mink (*Mustela vison*) and ermine (*Mustela erminea*). *Mol. Ecol.* 8: 1352-1354.
- Graphodatsky, A.S., A.A. Sharshov, D.V. Ternovsky and Y.G. Ternovskaya (1989). Comparative cytogenesis of Mustelidae (Carnivora). *Zoologicheskii Zhurnal.* 68: 96-106. [In Russian with English summary].
- Gray, J.E. (1869). *Catalogue of Carnivorous, Pachydermatous and Edentate Mammalia in the British Museum*. Trustees of British Museum (Natural History), London.
- Heptner, V.G., N.P. Naumov, P.B. Yurgenson, A.A. Sludsky, A.F. Chirkova and A.G. Bannikov (1967). *Mammals of Soviet Union. Vol.2. Part 1. Sea Cows and Carnivora*. Vysshaya Shkola, Moscow. [In Russian]
- Koepfli, K.P. and R.K. Wayne (1998). Phylogenetic relationships of otters (Carnivora: Mustelidae) based on mitochondrial cytochrome b sequences. *J. Zool. Lond.* 246: 401-416.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen and M. Nei (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
- Kurose, N., Y. Kaneko, A.V. Abramov, B. Siriaroonrat and R. Masuda (2001). Low genetic diversity in Japanese populations of the Eurasian badger *Meles meles* (Mustelidae, Carnivora) revealed by mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Zool. Sci.* 18: 1145-1151.
- Kurtén, B. (1968). *Pleistocene Mammals of Europe*. Weidenfeld & Nicholson, London.
- Ledje, C. and U. Arnason (1996). Phylogenetic analyses of complete cytochrome b genes of the order carnivora with particular emphasis on the canifomia. *J. Mol. Evol.* 42: 135:144.
- Long, C.A. and C.A. Killingley (1983). *The Badgers of the World*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Lynch, J.M. (1994). Morphometric variation in the badger (*Meles meles*): clinal variation in cranial size and the shape across Eurasia. *Small Carnivore Conservation* 10: 6-7.
- Macdonald, D.W. (2001). *The New Encyclopaedia of Mammals*. Oxford University Press, Oxford.
- Marmi, J., J.F. López-Giráldez and X. Domingo-Roura. Phylogeny, evolutionary history and taxonomy of the Mustelidae based on sequences of *cyt b* gene and a complex repetitive-flanking region. *Zoologica Scripta* (in press).
- Neal, E. (1948). *The Badger*. Collins, London.
- Neal, E. (1986). *The Natural History of Badgers*. Guild Publishing, London.
- O'Connell, M., J.M. Wright and A. Farid (1996). Development of PCR primers for nine polymorphic American mink *Mustela vison* microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 5: 311-312.
- Ognev, S.I. (1931). *The Mammals of the Eastern Europe and Northern Asia*. Vol. 2. Gosizdat, Moscow-Leningrad. [In Russian]
- Pertoldi, C., V. Loeschcke, A.B. Madsen and E. Randi (2000). Allozyme variation in the Eurasian badger *Meles meles* in Denmark. *J. Zool.* 252: 544-547.
- Petrov, V.V. (1953). The data on the intraspecific variability of badgers (genus *Meles*). *Uchenye Zapiski Leningradskogo Pedagogicheskogo Instituta.* 7: 149-205. [In Russian]
- Petter, G. (1971). Origine, phylogenie et systematique des blaireaux. *Mammalia* 35: 567-597.

- Pocock, R.I. (1941). *The Fauna of British India, Including Ceylon and Burma. Mammalia*. Vol. 2. Taylor and Francis, Ltd., London.
- Radinsky, L. (1973). Are stink badgers skunks? Implications of neuroanatomy for mustelid phylogeny. *J. Mammal.* 54: 585–593.
- Sato, J.J., T. Hosada, M. Wolsan, K. Tsuchiya, Y. Yamamoto and H. Suzuki (2003). Phylogenetic relationships and divergence times among mustelids (Mammalia: Carnivora) based on nucleotide sequences of the nuclear interphotoreceptor retinoid binding protein and mitochondrial cytochrome b genes. *Zool. Sci.* 20: 243-264.
- Satunin, K.A. (1914). *Key to the Mammals of the Russian Empire*. Vol.1. Tipografiya Kantselyarii Namestnika, Tiflis. [In Russian]
- Simpson, G.G. (1945). The principles of classification and a classification of mammals. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 85: 1-350.
- Vilà, C., I.R. Amorim, J.A. Leonard, D. Posada, J. Castroviejo, F. Petrucci-Fonseca, K.A. Crandall, H. Ellegren and R.K. Wayne (1999). Mitochondrial DNA phylogeography and population history of grey wolf *Canis lupus*. *Mol. Ecol.* 8: 2089-2103.
- Viret, J. (1950). *Meles thoralis* n. sp. du loess Villafranchien de Saint-Vallier (Drôme). *Eclogae Geologicae Helvetiae* 43: 274-287.
- Walker, C.W., C. Vilà, A. Landa, M. Lindén and H. Ellegren (2001). Genetic variation and population structure in Scandinavian wolverine (*Gulo gulo*) populations. *Mol. Ecol.* 10: 53-63.
- Willemsen, G.F. (1992). A revision of the Pliocene and Quaternary *Lutrinae* from Europe. *Scripta Geologica* 101: 1-115.
- Wozencraft, W.C. (1993). Order Carnivora. In: D.E. Wilson y D.M. Reeder (eds.). *Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference*, 2nd ed. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. pp.279-348.

2

The IUCN Red List of Threatened Species 1994 Categories & Criteria (v.2.3)

EXTINCT (EX) - A taxon is Extinct when there is no reasonable doubt that the last individual has died.

EXTINCT IN THE WILD (EW) - A taxon is Extinct in the wild when it is known only to survive in cultivation, in captivity or as a naturalised population (or populations) well outside the past range. A taxon is presumed extinct in the wild when exhaustive surveys in known and/or expected habitat, at appropriate times (diurnal, seasonal, annual), throughout its historic range have failed to record an individual. Surveys should be over a time frame appropriate to the taxon's life cycle and life form.

CRITICALLY ENDANGERED (CR) - A taxon is Critically Endangered when it is facing an extremely high risk of extinction in the wild in the immediate future, as defined by any of the following criteria (A to E):

- A)** Population reduction in the form of either of the following:
- 1)** An observed, estimated, inferred or suspected reduction of at least 80% over the last 10 years or three generations, whichever is the longer, based on (and specifying) any of the following:
 - a)** direct observation
 - b)** an index of abundance appropriate for the taxon
 - c)** a decline in area of occupancy, extent of occurrence and/or quality of habitat
 - d)** actual or potential levels of exploitation
 - e)** the effects of introduced taxa, hybridisation, pathogens, pollutants, competitors or parasites.
 - 2)** A reduction of at least 80%, projected or suspected to be met within the next 10 years or three generations, whichever is the longer, based on (and specifying) any of (b), (c), (d) or (e) above.
- B)** Extent of occurrence estimated to be less than 100 km² or area of occupancy estimated to be less than 10 km², and estimates indicating any two of the following:
- 1)** Severely fragmented or known to exist at only a single location.
 - 2)** Continuing decline, observed, inferred or projected, in any of the following:
 - a)** extent of occurrence
 - b)** area of occupancy
 - c)** area, extent and/or quality of habitat
 - d)** number of locations or subpopulations
 - e)** number of mature individuals
 - 3)** Extreme fluctuations in any of the following:
 - a)** extent of occurrence
 - b)** area of occupancy
 - c)** number of locations or subpopulations
 - d)** number of mature individuals
- C)** Population estimated to number less than 250 mature individuals and either:
- 1)** An estimated continuing decline of at least 25% within three years or one generation, whichever is longer or
 - 2)** A continuing decline, observed, projected, or inferred, in numbers of mature individuals and population structure in the form of either:
 - a)** severely fragmented (i.e. no subpopulation estimated to contain more than 50 mature individuals)
 - b)** all individuals are in a single subpopulation
- D)** Population estimated to number less than 50 mature individuals.

E) Quantitative analysis showing the probability of extinction in the wild is at least 50% within 10 years or three generations, whichever is the longer.

ENDANGERED (EN) - A taxon is Endangered when it is not Critically Endangered but is facing a very high risk of extinction in the wild in the near future, as defined by any of the following criteria (A to E):

A) Population reduction in the form of either of the following:

1) An observed, estimated, inferred or suspected reduction of at least 50% over the last 10 years or three generations, whichever is the longer, based on (and specifying) any of the following:

- a)** direct observation
- b)** an index of abundance appropriate for the taxon
- c)** a decline in area of occupancy, extent of occurrence and/or quality of habitat
- d)** actual or potential levels of exploitation
- e)** the effects of introduced taxa, hybridisation, pathogens, pollutants, competitors or parasites.

2) A reduction of at least 50%, projected or suspected to be met within the next 10 years or three generations, whichever is the longer, based on (and specifying) any of (b), (c), (d), or (e) above.

B) Extent of occurrence estimated to be less than 5000 km² or area of occupancy estimated to be less than 500 km², and estimates indicating any two of the following:

1) Severely fragmented or known to exist at no more than five locations.

2) Continuing decline, inferred, observed or projected, in any of the following:

- a)** extent of occurrence
- b)** area of occupancy
- c)** area, extent and/or quality of habitat
- d)** number of locations or subpopulations
- e)** number of mature individuals

3) Extreme fluctuations in any of the following:

- a)** extent of occurrence
- b)** area of occupancy
- c)** number of locations or subpopulations
- d)** number of mature individuals

C) Population estimated to number less than 2500 mature individuals and either:

1) An estimated continuing decline of at least 20% within five years or two generations, whichever is longer, or

2) A continuing decline, observed, projected, or inferred, in numbers of mature individuals and population structure in the form of either:

- a)** severely fragmented (i.e. no subpopulation estimated to contain more than 250 mature individuals)
- b)** all individuals are in a single subpopulation.

D) Population estimated to number less than 250 mature individuals.

E) Quantitative analysis showing the probability of extinction in the wild is at least 20% within 20 years or five generations, whichever is the longer.

VULNERABLE (VU) - A taxon is Vulnerable when it is not Critically Endangered or Endangered but is facing a high risk of extinction in the wild in the medium-term future, as defined by any of the following criteria (A to E):

- A)** Population reduction in the form of either of the following:
- 1) An observed, estimated, inferred or suspected reduction of at least 20% over the last 10 years or three generations, whichever is the longer, based on (and specifying) any of the following:
 - a) direct observation
 - b) an index of abundance appropriate for the taxon
 - c) a decline in area of occupancy, extent of occurrence and/or quality of habitat
 - d) actual or potential levels of exploitation
 - e) the effects of introduced taxa, hybridisation, pathogens, pollutants, competitors or parasites.
 - 2) A reduction of at least 20%, projected or suspected to be met within the next ten years or three generations, whichever is the longer, based on (and specifying) any of (b), (c), (d) or (e) above.
- B)** Extent of occurrence estimated to be less than 20,000 km² or area of occupancy estimated to be less than 2,000 km², and estimates indicating any two of the following:
- 1) Severely fragmented or known to exist at no more than ten locations.
 - 2) Continuing decline, inferred, observed or projected, in any of the following:
 - a) extent of occurrence
 - b) area of occupancy
 - c) area, extent and/or quality of habitat
 - d) number of locations or subpopulations
 - e) number of mature individuals
 - 3) Extreme fluctuations in any of the following:
 - a) extent of occurrence
 - b) area of occupancy
 - c) number of locations or subpopulations
 - d) number of mature individuals
- C)** Population estimated to number less than 10,000 mature individuals and either:
- 1) An estimated continuing decline of at least 10% within 10 years or three generations, whichever is longer, or
 - 2) A continuing decline, observed, projected, or inferred, in numbers of mature individuals and population structure in the form of either:
 - a) severely fragmented (i.e. no subpopulation estimated to contain more than 1,000 mature individuals)
 - b) all individuals are in a single subpopulation
- D)** Population very small or restricted in the form of either of the following:
- 1) Population estimated to number less than 1,000 mature individuals.
 - 2) Population is characterised by an acute restriction in its area of occupancy (typically less than 100 km²) or in the number of locations (typically less than five). Such a taxon would thus be prone to the effects of human activities (or stochastic events whose impact is increased by human activities) within a very short period of time in an unforeseeable future, and is thus capable of becoming Critically Endangered or even Extinct in a very short period.
- E)** Quantitative analysis showing the probability of extinction in the wild is at least 10% within 100 years.

LOWER RISK (LR) - A taxon is Lower Risk when it has been evaluated, does not satisfy the criteria for any of the categories Critically Endangered, Endangered or Vulnerable. Taxa included in the Lower Risk category can be separated into three subcategories:

Conservation Dependent (cd). Taxa which are the focus of a continuing taxon-specific or habitat-specific conservation programme targeted towards the taxon in question, the cessation of which would result in the taxon qualifying for one of the threatened categories above within a period of five years.

Near Threatened (nt). Taxa which do not qualify for Conservation Dependent, but which are close to qualifying for Vulnerable.

Least Concern (lc). Taxa which do not qualify for Conservation Dependent or Near Threatened.

DATA DEFICIENT (DD) - A taxon is Data Deficient when there is inadequate information to make a direct, or indirect, assessment of its risk of extinction based on its distribution and/or population status. A taxon in this category may be well studied, and its biology well known, but appropriate data on abundance and/or distribution is lacking. Data Deficient is therefore not a category of threat or Lower Risk. Listing of taxa in this category indicates that more information is required and acknowledges the possibility that future research will show that threatened classification is appropriate. It is important to make positive use of whatever data are available. In many cases great care should be exercised in choosing between DD and threatened status. If the range of a taxon is suspected to be relatively circumscribed, if a considerable period of time has elapsed since the last record of the taxon, threatened status may well be justified.

NOT EVALUATED (NE) - A taxon is Not Evaluated when it has not yet been assessed against the criteria.

