

SECCIÓN III

Genética poblacional del tejón en Catalunya

ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE TEJONES DE CATALUNYA

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han demostrado que la fragmentación del hábitat afecta al aislamiento genético de las subpoblaciones, incrementándose de este modo las divergencias genéticas entre ellas. Las recientemente desarrolladas técnicas genéticas de análisis con marcadores de microsatélites (unidades repetidas de pocos pares de bases de longitud, distribuidas por el genoma y a menudo altamente polimórficas) permiten estudiar los cambios a nivel genómico que sufren las poblaciones frente a fenómenos que alteran el equilibrio de intercambio genético propio de una población panmíctica.

La población de tejón en Catalunya parece haber sufrido cierta regresión en las últimas décadas en aquellas zonas en las que los ambientes agrícolas han disminuido, y en donde la presencia humana (urbanística e infraestructural) se ha intensificado. Es el caso de la población de la Sierra de Collserola, actualmente con una baja densidad de individuos (Bonet-Arbolí, 2003), considerada inferior a la de unas décadas atrás según la información obtenida de gente ligada a la vida agrícola de la sierra, a falta de datos demográficos para comparar. Este espacio natural, a parte de haber visto reducida su superficie agrícola (la cual se ha observado como hábitat preferente de los tejones para la ubicación de sus tejoneras y como lugar frecuentado de alimentación, Bonet-Arbolí, 2003) presente en la actualidad en un 8% de la superficie total, se encuentra rodeada por numerosas carreteras, autovías, vías ferroviarias, ciudades y polígonos industriales de muy difícil tránsito para un tejón. Aunque esta especie se organiza habitualmente en grupos sociales cuyos individuos presentan un alto grado de filopatría (Cheeseman *et al.*, 1987; da Silva *et al.*, 1994; Woodroffe *et al.*, 1995), también se ha demostrado que se da cierta dispersión de animales, sesgada hacia uno u otro sexo en función de la población estudiada, y con mayor frecuencia en las poblaciones por debajo de su capacidad de carga (Cheeseman *et al.*, 1988). La existencia de cierta dispersión, incluso en especies con tendencia a la filopatría, es de vital importancia para favorecer el flujo genético entre subpoblaciones y contrarrestar así los efectos de una posible

consanguinidad derivada de apareamientos sucesivos entre los miembros del mismo grupo, así como los efectos estocásticos de la deriva génica. De hecho, genéticamente se ha demostrado que los tejones tienden a evitar la consanguinidad mediante las cópulas extra-grupales (Evans & Macdonald, 1989; Carpenter, 2004; Carpenter *et al.*, 2005), que favorecen el intercambio genético intrapoblacional al intervenir más individuos y de grupos distintos en la dotación genética de las crías del grupo. Pero a pesar de la existencia de este mecanismo que evita el déficit de heterocigotos, las poblaciones deben poder intercambiar genoma y, por tanto, individuos, para no llegar al aislamiento genético de las mismas. Los animales están más forzados a dispersarse si los costes de permanecer en el territorio familiar exceden a los beneficios, balance que vendrá marcado por factores como la densidad poblacional y la saturación del hábitat (Aars & Ims, 2000; Hatchwell & Komdeur, 2000; Kokko & Lundberg, 2001). El objetivo de la dispersión es incrementar la probabilidad de reproducirse por sí mismos, respecto a las quizás bajas o nulas probabilidades que tendrían quedándose en el grupo familiar. Durante el proceso de dispersión los animales deben muestrear y evaluar zonas desconocidas en busca de nuevos parches de hábitat donde poder establecerse y fundar sus grupos o bien integrarse en grupos ya residentes, en el caso de especies con organización social como suele presentar el tejón. Los individuos, tanto dispersantes como residentes, procedentes de una zona limítrofe de un parque, reserva o parche de hábitat óptimo en general, sufrirán con mayor intensidad el efecto borde (Revilla *et al.*, 2001) el cual predice un incremento en la mortalidad en estas áreas periféricas. Los carnívoros, en general, debido a sus elevados requerimientos espaciales y a sus bajas densidades, son especialmente sensibles al efecto borde relacionado con la mortalidad inducida por el hombre (Clark *et al.*, 1996; Woodroffe & Ginsberg, 1998), bien sea accidentalmente a causa de los atropellos en las carreteras, como deliberadamente por la caza y el furtivismo (Revilla *et al.*, 2001).

Para proceder a la realización de este tipo de análisis es necesario contar con los suficientes loci polimórficos secuenciados para que permitan detectar la variabilidad genética existente, bien en los grupos, las subpoblaciones o las poblaciones, en función del nivel de análisis escogido. En el caso del tejón, muy recientemente se han aislado a partir de animales de una población inglesa 39 microsatélites polimórficos, 17 de los cuales fueron seleccionados para la creación de un conjunto de cebadores (Carpenter *et al.*, 2003), con el que hemos querido evaluar la diversidad genética de la población de

tejones de Catalunya y el grado de aislamiento genético de la subpoblación de Collserola.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

El material genético de 42 tejones se obtuvo a partir de muestras de sangre de animales capturados en el campo (n=15) y de tejido de animales encontrados muertos (n=27), casi siempre por atropello en las carreteras. Los animales capturados pertenecían a tres zonas distintas: la sierra de Collserola, la montaña de Montserrat y la sierra del Montseny, mientras que los cadáveres recolectados presentaron orígenes diversos, dentro del área de estudio global (Catalunya, NE Península Ibérica). En la figura 1 aparece la ubicación del origen de las muestras.

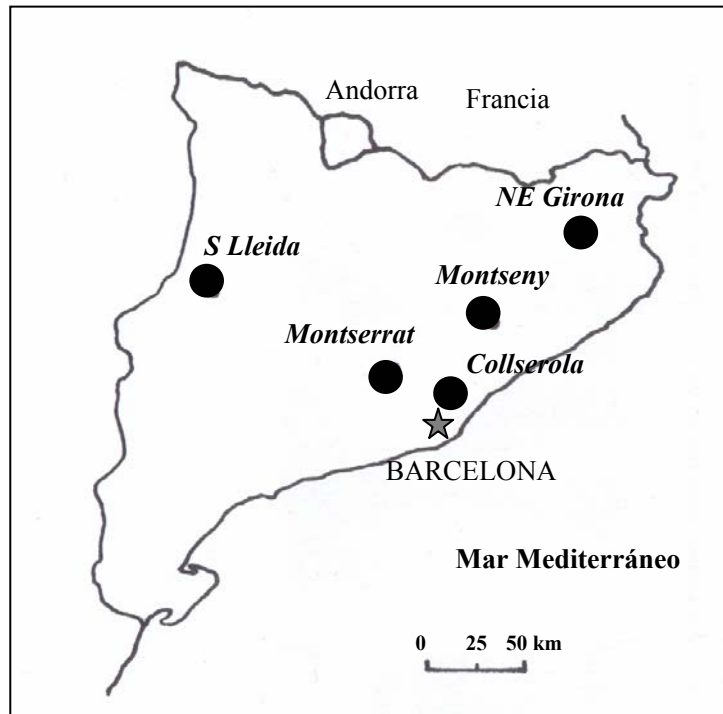


Figura 1. Mapa de Catalunya donde se sitúan las subpoblaciones muestreadas.

No todas las muestras de tejido pudieron ser aprovechadas para el análisis poblacional debido a dos causas: a) 3 de las muestras presentaron un ADN demasiado degradado por lo que no fue posible su correcta amplificación; b) 6 de las muestras procedían de lugares muy dispersos entre sí y no se pudieron agrupar dentro de las áreas que presentaban más muestras. Finalmente se incluyeron en el análisis las muestras de 33 individuos, agrupados en las siguientes subpoblaciones: Collserola (n=12), Montserrat (n=4), Montseny (n=6), NE Girona (n=8) y S Lleida (n=3).

Las muestras de sangre se conservaron en tubos heparinizados a -20°C. Las muestras de tejido se mantuvieron congeladas a -20°C hasta el momento de transportarlas para el análisis, cuando fueron preservadas en etanol.

Análisis de microsatélites

El ADN genómico fue extraído utilizando el enzima proteinasa K y fenol:cloroformo:isoamil alcohol (Sambrook *et al.*, 1989). Utilizamos 17 de los 39 microsatélites polimórficos aislados en tejón Eurasiático por Carpenter *et al.* (2003). Estos 17 microsatélites son los que Carpenter *et al.* (2005) utilizaron para un estudio sobre el sistema de apareamiento del tejón en una población inglesa, y fueron seleccionados por haber sido optimizados para su uso en el secuenciador de Applied Biosystems, modelo 377.

En cada reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction) se añadió unos 50 ng de ADN y 0,25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Thermoprime Plus, Advanced Biotechnologies). La amplificación por PCR se llevó a cabo en reacciones de 15 µl con una concentración final de: 1x tampón manufacturado (20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,01% (w/v) Tween), 0,25 µM de cada cebador, 0,1 mM de cada dNTP y 1,5 mM MgCl₂ (*Mel*101, 102, 103, 105, 106, 107, 109, 111, 113, 114, 116, 117) o 2,5 mM MgCl₂ (*Mel*104, 108, 110, 112, 115). Se utilizó un termociclador Hybaid TouchDown™ (Thermo Hybaid) para la amplificación por PCR. En todos excepto dos loci se utilizó un programa “touchdown”, cuya secuencia era la siguiente: 5 min a 95°C seguidos de 34 ciclos de 15 s a 94°C, 20 s a 64°C hasta 50°C (disminuyendo la temperatura en 2°C cada 2 ciclos con 20 ciclos a 50°C) y 30 s a 72°C. Para los loci *Mel*114 y *Mel*117 se utilizó una única temperatura de unión del cebador a la PCR de

57°C durante los 34 ciclos. Los productos de las PCRs se mezclaron para crear dos grupos de cebadores, con 10 y 7 cebadores respectivamente. Las muestras se hicieron correr en 10% gel desnaturalizante de poliacrilamida en el ABI PRISM 377 DNA Sequencer. Los programas GENESCAN 3.1 y GENOTYPER 2.5 (Applied Biosystems) fueron utilizados para medir el tamaño (en pares de base) de los alelos.

Análisis estadísticos

El locus *Mel110* tan sólo manifestó alelos en 8 de las muestras, por lo que se ha eliminado de los posteriores análisis estadísticos. Para los restante 16 loci los análisis de los datos fueron analizados con el programa FSTAT 2.9.3.2. (Goudet, 1995; <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>).

Variabilidad genética y equilibrio Hardy-Weinberg:

Se describen las frecuencias alélicas para cada locus en cada subpoblación, así como las frecuencias para el conjunto de las muestras, ponderadas y no ponderadas por el tamaño muestral. La variabilidad genética de cada subpoblación se expresa mediante el porcentaje de loci polimórfico, la diversidad alélica (medida como el número medio de alelos por locus) y la heterozigosidad observada (H_O) y esperada en caso de cumplirse las condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg (H_E) promedio para todos los loci. La heterozigosidad media esperada se ha calculado con el estimador no sesgado de Nei (1978). Mediante el test no-paramétrico de Wilcoxon se analiza la significación de las diferencias en la variabilidad entre pares de subpoblaciones, al comparar la heterozigosidad observada para cada locus en todas las subpoblaciones. Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg se evalúan para cada locus y subpoblación. Se calcula el déficit de heterocigotos mediante el coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) para cada locus y en cada subpoblación, y para el conjunto de loci en cada subpoblación.

Diferenciación genética:

Sobre el conjunto de la muestra y para cada locus se han calculado los valores de los estadísticos de Nei H_O , H_S , H_T y D_{ST} . H_O es la proporción observada de heterocigotos; H_S es la heterozigosidad esperada en cada subpoblación; H_T es la heterozigosidad esperada total para el conjunto de las subpoblaciones y D_{ST} es la cantidad de

heterocigosidad esperada entre subpoblaciones. Los tres últimos estadísticos se relacionan del siguiente modo:

$$H_T = D_{ST} + H_S$$

La diferenciación genética se cuantificó también con los F-estadísticos de Weir & Cockerham (1984). El estadístico F_{IS} (coeficiente de consanguinidad) mide el déficit de heterocigotos en cada población, mientras que F_{ST} (índice de fijación) lo mide entre poblaciones y F_{IT} (coeficiente de consanguinidad total) calcula el déficit global de heterocigotos. Se valoraron las desviaciones significativas de cero usando test con permutaciones, se obtuvieron valores promedios mediante “jackknifing” sobre todas las poblaciones y los intervalos de confianza (95%) mediante “bootstrapping”.

Se estimaron los F_{ST} para cada par de muestras. Como F_{ST} está estrechamente relacionada con una distancia genética (Reynolds *et al.*, 1983), se utiliza para comparar con otras variables como puede ser la distancia geográfica y testar así la existencia de correlación entre ambas (test de Mantel, Mantel, 1967). Este test aplica randomización porque las distancias genéticas calculadas para cada par de subpoblaciones no son independientes entre sí. Para estimar el nivel de significación el test de Mantel se realizaron 2000 randomizaciones.

Los valores promedios se expresan con la media \pm desviación estándar.

RESULTADOS

Variabilidad genética y equilibrio Hardy-Weinberg:

Se determinaron los genotipos de 42 individuos en 16 loci de ADN microsatélite, de los cuales 33 han sido utilizados para los siguientes análisis. Las frecuencias alélicas de todos los loci en todas las subpoblaciones aparecen en la tabla 2. El número de alelos por locus osciló entre 2 y 8, con un promedio de 4,44 ($\pm 1,71$) alelos/locus (una mediana de 4). En diversas ocasiones los alelos han sido exclusivos (alelos particulares) de determinadas subpoblaciones: 16 de los 71 alelos detectados en los 16 loci sólo se han encontrado en una subpoblación, distribuyéndose de la siguiente manera: 6 en NE

Girona, 4 en Montserrat, 3 en S Lleida, 2 en Montseny y 1 en Collserola. Las frecuencias de estos alelos particulares oscilaron entre 0,050 y 0,375 (ver tabla 2).

Tal y como se expresa en la tabla 1, el número de alelos por locus promedio para cada subpoblación varió entre 2,63 (\pm 0,96) encontrado en Collserola y 3,56 (\pm 1,41) del NE de Girona, no siendo las diferencias entre subpoblaciones significativas (test de Krukal-Wallis, $H(4, n=80)=6,032$; $p=0,197$). El número medio de alelos por locus no se correlacionó con el tamaño muestral en cada subpoblación ($r_s=0$; $n=5$; $p=1$). Las subpoblaciones presentaron altos grados de polimorfismo en los microsátélites analizados: de los 16 loci, entre el 87,5 y el 100% fueron polimórficos en las diversas áreas muestrales (ver tabla 1). Donde menos loci polimórficos aparecieron (14) fue en Montserrat. La única subpoblación con todos los loci polimórficos fue la de Lleida, mientras el resto tuvieron un locus monomórfico. La heterozigosidad media observada obtuvo valores entre 0,46 (\pm 0,27) y 0,58 (\pm 0,27), correspondientes a las muestras del S Lleida y Montseny, repectivamente. Las comparaciones de la heterozigosidad observada en cada locus para cada par de subpoblaciones mediante el test de Wilcoxon dio p-valores de entre 0,23 y 1. Estos resultados indican que no existen diferencias en la cantidad de variabilidad genética observada en las subpoblaciones testadas. Entre las H_O y H_E de cada locus en cada subpoblación, el test apareado de Wilcoxon demuestra que no se dieron diferencias significativas ($p=0,13$).

Subpoblación	n	Nº loci polimórficos (%)	Nº medio alelos per locus	Heterozigosidad observada	Heterozigosidad esperada
Collserola	12	15 (93,8%)	2,63 (0,96)	0,54 (0,28)	0,48 (0,20)
Montserrat	4	14 (87,5%)	2,75 (1,06)	0,51 (0,32)	0,55 (0,29)
Montseny	6	15 (93,8%)	3,00 (1,21)	0,58 (0,27)	0,56 (0,22)
NE Girona	8	15 (93,8%)	3,56 (1,41)	0,53 (0,26)	0,59 (0,24)
S Lleida	3	16 (100%)	2,69 (0,70)	0,46 (0,27)	0,66 (0,18)

Tabla 1. Variabilidad genética promedio (DE) para las subpoblaciones catalanas de tejón analizadas.

locus	Alelo (pb)	Collserola n=12	Montserrat n=4	Montseny n=6	NE Girona n=8	S Lleida n=3	Todos P (1)	Todos NP (2)
<i>Mel101</i> (AJ293349)	120	0.591	0.833	0.700	0.875	0.833	0.733	0.767
	122	0.409	0.000	0.300	0.125	0.167	0.250	0.200
	132	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	0.017	0.033
<i>Mel102</i> (AJ293353)	191	0.200	0.250	0.300	0.438	0.500	0.317	0.338
	193	0.600	0.500	0.500	0.375	0.333	0.483	0.462
	195	0.200	0.125	0.200	0.188	0.167	0.183	0.176
	201	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	0.017	0.025
<i>Mel103</i> (AJ293356)	259	0.000	0.125	0.000	0.143	0.167	0.067	0.087
	261	1.000	0.875	1.000	0.786	0.667	0.900	0.865
	263	0.000	0.000	0.000	0.071	0.167	0.033	0.048
<i>Mel104</i> (AJ293352)	321	0.333	0.375	0.167	0.125	0.000	0.227	0.200
	323	0.000	0.125	0.000	0.125	0.167	0.061	0.083
	325	0.000	0.000	0.000	0.000	0.333	0.030	0.067
	327	0.458	0.000	0.583	0.500	0.333	0.424	0.375
	331	0.208	0.500	0.250	0.250	0.167	0.258	0.275
<i>Mel105</i> (AJ293350)	134	0.000	0.000	0.167	0.000	0.000	0.031	0.033
	138	0.167	0.000	0.583	0.214	0.000	0.219	0.193
	144	0.000	0.375	0.000	0.000	0.000	0.047	0.075
	146	0.458	0.250	0.250	0.500	0.333	0.391	0.358
	148	0.083	0.250	0.000	0.214	0.667	0.172	0.243
	150	0.292	0.125	0.000	0.071	0.000	0.141	0.098
<i>Mel106</i> (AJ293355)	220	0.458	0.125	0.500	0.357	0.333	0.391	0.355
	222	0.458	0.625	0.167	0.286	0.667	0.406	0.440
	224	0.000	0.125	0.333	0.357	0.000	0.156	0.163
	226	0.083	0.125	0.000	0.000	0.000	0.047	0.042
<i>Mel107</i> (AJ293359)	282	0.000	0.000	0.167	0.063	0.000	0.045	0.046
	284	0.000	0.125	0.083	0.375	0.333	0.152	0.183
	286	0.500	0.750	0.333	0.438	0.500	0.485	0.504
	288	0.500	0.125	0.417	0.063	0.167	0.303	0.254
	290	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.015	0.013
<i>Mel108</i> (AJ293354)	322	0.313	0.500	0.300	0.357	0.500	0.365	0.394
	324	0.375	0.167	0.400	0.500	0.167	0.365	0.322
	326	0.313	0.333	0.300	0.143	0.333	0.269	0.284
<i>Mel109</i> (AJ293357)	106	0.208	0.000	0.083	0.143	0.000	0.129	0.087
	116	0.167	0.167	0.583	0.571	0.167	0.339	0.331
	123	0.000	0.000	0.000	0.000	0.167	0.016	0.033
	127	0.625	0.833	0.333	0.286	0.667	0.516	0.549

locus	Alelo (pb)	Collserola n=12	Montserrat n=4	Montseny n=6	NE Girona n=8	S Lleida n=3	Todos P (1)	Todos NP (2)
<i>Mel111</i> (AJ230692)	130	0.000	0.000	0.083	0.063	0.000	0.036	0.029
	132	0.125	0.500	0.500	0.625	0.333	0.411	0.417
	134	0.813	0.333	0.417	0.188	0.667	0.482	0.483
	138	0.063	0.167	0.000	0.125	0.000	0.071	0.071
<i>Mel112</i> (AJ230700)	418	0.563	1.000	0.667	0.375	0.667	0.574	0.654
	420	0.438	0.000	0.333	0.625	0.167	0.407	0.313
	424	0.000	0.000	0.000	0.000	0.167	0.019	0.033
<i>Mel113</i> (AJ230713)	120	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.034	0.025
	122	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.017	0.013
	124	0.111	0.500	0.333	0.000	0.500	0.207	0.289
	126	0.889	0.500	0.667	0.813	0.500	0.741	0.674
<i>Mel114</i> (AJ230695)	233	0.813	1.000	0.917	1.000	0.833	0.904	0.913
	235	0.188	0.000	0.083	0.000	0.167	0.096	0.088
<i>Mel115</i> (AJ230703)	329	0.400	0.000	0.000	0.000	0.333	0.179	0.147
	333	0.000	0.250	0.083	0.357	0.000	0.125	0.138
	338	0.000	0.250	0.000	0.143	0.333	0.089	0.145
	342	0.050	0.250	0.167	0.071	0.167	0.107	0.141
	346	0.200	0.000	0.583	0.071	0.000	0.214	0.171
	350	0.000	0.000	0.083	0.143	0.167	0.071	0.079
	354	0.300	0.250	0.083	0.214	0.000	0.196	0.170
	358	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.010
<i>Mel116</i> (AJ293351)	115	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.016	0.017
	121	0.000	0.000	0.250	0.125	0.000	0.078	0.075
	123	0.000	0.000	0.000	0.250	0.333	0.094	0.117
	125	0.409	0.125	0.167	0.250	0.000	0.250	0.190
	130	0.000	0.125	0.083	0.125	0.167	0.078	0.100
	131	0.591	0.625	0.167	0.000	0.500	0.359	0.377
	132	0.000	0.000	0.000	0.188	0.000	0.047	0.038
	133	0.000	0.125	0.250	0.063	0.000	0.078	0.088
<i>Mel117</i> (AJ293358)	174	0.000	0.500	0.500	0.313	0.500	0.293	0.363
	187	0.833	0.500	0.417	0.313	0.500	0.534	0.513
	189	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.017	0.013
	193	0.167	0.000	0.083	0.188	0.000	0.121	0.088
	195	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.034	0.025

Tabla 2. Frecuencias alélicas para cada locus en cada subpoblación y para el conjunto de muestras (Total), (1) Total P: ponderadas por el tamaño muestral; (2) Total NP: no ponderadas por el tamaño muestral.

Los valores de F_{IS} obtenidos muestran que en la mayoría de locus x subpoblación hubo equilibrio Hardy-Weinberg al no ser significativas las desviaciones hacia un exceso ni un déficit de heterocigotos respecto a los valores de randomización (tabla 3). Sin embargo, en el locus *Mel113* en Collserola, en el *Mel104* en Montseny y en el *Mel106* en NE Girona, hubo un ligero déficit de heterocigotos, que no fueron significativos tras la aplicación del nivel de significación corregido por el método de Bonferroni. Lo mismo sucedió en el locus *Mel114* en Collserola, que presentó un exceso de heterocigotos con un nivel de significación del 0,05, pero no tras la corrección de Bonferroni. Al combinar los datos de todos los loci en cada subpoblación observamos únicamente un déficit de heterocigotos en S Lleida, significativo para $p < 0,00063$. Cabe recordar que de esta subpoblación tan sólo se contaba con una muestra de 3 individuos, lo cual dificulta la interpretación de sus resultados.

Locus	Collserola	Montserrat	Montseny	NE Girona	S Lleida
<i>Mel101</i>	-0,67	0,00	-0,33	-0,08	0,00
<i>Mel102</i>	0,16	0,37	-0,19	-0,32	0,60
<i>Mel103</i>	-	0,00	-	-0,13	0,50
<i>Mel104</i>	0,38	-0,13	0,75*	0,11	0,27
<i>Mel105</i>	-0,20	-0,26	-0,08	0,41	1,00
<i>Mel106</i>	0,31	0,25	0,00	0,62*	1,00
<i>Mel107</i>	-0,64	0,50	-0,14	-0,08	0,11
<i>Mel108</i>	-0,06	-0,50	0,20	0,36	0,60
<i>Mel109</i>	-0,04	0,00	-0,47	0,08	0,50
<i>Mel111</i>	-0,11	0,11	0,49	0,16	-0,33
<i>Mel112</i>	-0,75	-	-0,43	0,00	-0,14
<i>Mel113</i>	1,00*	0,50	-0,43	-0,11	-1,00
<i>Mel114</i>	-0,17†	-	0,00	-	0,00
<i>Mel115</i>	-0,23	0,00	0,00	-0,22	0,27
<i>Mel116</i>	0,11	0,25	0,06	-0,02	0,11
<i>Mel117</i>	-0,14	0,50	-0,39	0,23	0,50
Total	-0,09	0,11	-0,03	0,09	0.31**

Tabla 3. Equilibrio Hardy-Weinberg evaluado con los coeficientes de consanguinidad, F_{IS} , para cada locus en cada subpopulation.

Valores de significación para el déficit de heterocigotos: * $P < 0,05$; ** $P < 0,00063$ (nivel de significación (del 5%) ajustado tras la aplicación de la corrección de Bonferroni)

Valores de significación para el exceso de heterocigotos: † $P < 0,05$.

Diferenciación genética:

Los F-estadísticos de Nei nos indican cómo se distribuye la diversidad genética: en las subpoblaciones (H_S), entre las subpoblaciones (D_{ST}) y en el total de la población estudiada (H_T). Estas estimas de heterozigosis aparecen en la tabla 4, así como la heterozigosis observada (H_O) poblacional, por locus y total. Para el conjunto de los loci se aprecia que el 95,6% de la heterozigosis total esperada (H_T) es debida a las diferencias en cada subpoblación (H_S), mientras que tan solo un 4,4% es atribuida a las diversidad genética existente entre las diversas subpoblaciones (D_{ST}).

locus	H_O	H_S	D_{ST}	H_T
<i>Mel101</i>	0,467	0,364	0,013	0,377
<i>Mel102</i>	0,602	0,696	-0,038	0,657
<i>Mel103</i>	0,202	0,244	0,003	0,247
<i>Mel104</i>	0,525	0,724	0,026	0,75
<i>Mel105</i>	0,586	0,688	0,086	0,775
<i>Mel106</i>	0,374	0,664	0,006	0,67
<i>Mel107</i>	0,667	0,627	0,029	0,657
<i>Mel108</i>	0,622	0,723	-0,044	0,679
<i>Mel109</i>	0,531	0,545	0,047	0,592
<i>Mel111</i>	0,508	0,568	0,033	0,601
<i>Mel112</i>	0,542	0,418	0,063	0,481
<i>Mel113</i>	0,475	0,435	0,036	0,47
<i>Mel114</i>	0,175	0,167	-0,004	0,164
<i>Mel115</i>	0,847	0,809	0,065	0,873
<i>Mel116</i>	0,666	0,73	0,069	0,799
<i>Mel117</i>	0,492	0,594	0,018	0,612
Total	0,517	0,562	0,026	0,588

Tabla 4. Estimaciones de la heterozigosis mediante los F-estadísticos de Nei H_O , H_S , H_T y D_{ST} para cada locus y global.

Los valores de los estimadores de Weir & Cockerham F_{IT} , F_{ST} y F_{IS} para cada locus y para el conjunto de los loci para todas las subpoblaciones se muestran en la tabla 5. El valor medio de F_{IS} de 0,030 (95% Intervalo de Confianza: -0,074 a 0,0126) muestra que dentro de las poblaciones no se separan significativamente de un apareamiento al azar. Tan sólo en dos loci (*Mel104* y *Mel106*) se observa un déficit de heterozigotos

significativo. Los valores promedios de F_{ST} y F_{IT} sí que se separaron significativamente de cero, lo cual demuestra que las subpoblaciones presentaban una notable diferenciación genética entre ellas, no pudiendo asumirse un apareamiento al azar a nivel poblacional.

locus	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
Mel101	-0,297	0,075	-0,403
Mel102	0,006	-0,045	0,048
Mel103	0,126	0,064	0,065
Mel104	0,322**	0,02*	0,308*
Mel105	0,16*	0,118**	0,047
Mel106	0,397**	0,025	0,382**
Mel107	-0,083	0,097*	-0,2
Mel108	0,075	-0,071	0,136
Mel109	0,075	0,106	-0,035
Mel111	0,254*	0,133	0,14
Mel112	-0,203	0,107*	-0,347
Mel113	0,104	0,109**	-0,005
Mel114	-0,086	0,003	-0,089
Mel115	0,031	0,132**	-0,116
Mel116	0,197*	0,138**	0,069
Mel117	0,192	0,113*	0,089
media	0,103**	0,075**	0,030
95% I.C.	0,014 a 0,183	0,038 a 0,106	-0,074 a 0,126

Tabla 5. F -estadísticos F_{IT} , F_{ST} y F_{IS} estimados según Weir & Cockerham (1984) para cada loci, “jackknifing” media y 95% intervalo de confianza mediante “bootstrapping” sobre los loci. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Los valores de F_{ST} entre los pares de subpoblaciones oscilaron entre -0,0938 y 0,1261 (tabla 6). F_{ST} varía entre 0 y 1 pero en ocasiones, a causa de tamaños muestrales desiguales, pueden aparecer ligeros valores negativos (Lowe *et al.*, 2004). Tan sólo el valor F_{ST} entre Collserola y el NE Girona se alejó significativamente de cero para el nivel de significación $p < 0,005$, establecido tras la aplicación de la corrección estándar de Bonferroni sobre un valor nominal del 5%. La correlación entre la distancia geográfica y los F_{ST} fue negativa y no significativa (Mantel test, 2000 permutaciones, $r_s = -0,251$, $n = 10$, $p = 0,476$) (figura 2).

	Collserola	Montserrat	Montseny	NE Girona	S Lleida
Collserola		0,1058	0,0875	0,1261**	0,0745*
Montserrat	28,6		0,0718	0,0763	-0,0938
Montseny	41,1	50,7		0,0213	0,0457
NE Girona	105,4	112,5	64,3		0,0316
S Lleida	108,2	79,6	116,1	161,8	

Tabla 6. Comparaciones entre los pares de subpoblaciones muestreadas: por encima de la diagonal, valores de F_{ST} ; por debajo, las distancias geográficas (km).

* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$ (p-valor obtenido tras 1000 permutaciones por la aplicación de la corrección estándar de Bonferroni).

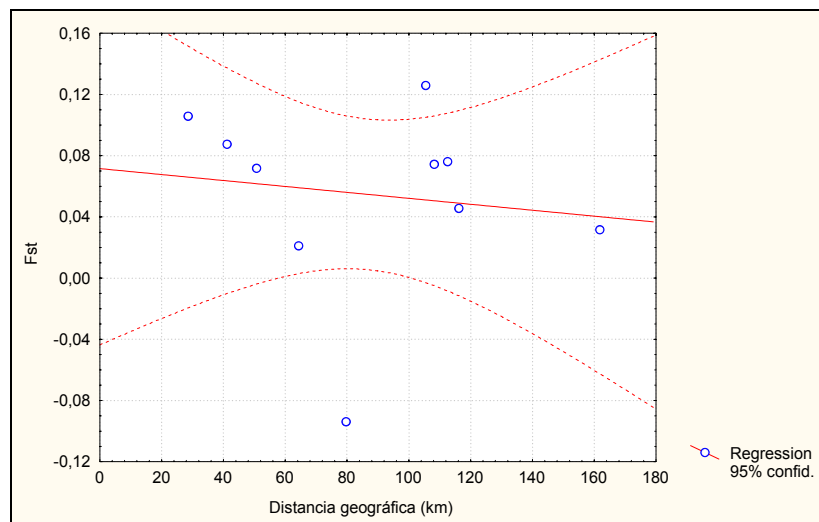


Figura 2. Correlación entre los F_{ST} entre pares de subpoblaciones y su distancia geográfica: es negativa y no significativa ($r_s = -0,251$, $n = 10$, $P = 0,476$).

En la tabla 6 y la figura 2 se observa que los valores más elevados de distancia genética respecto a la distancia geográfica son los que establece Collserola con el resto de subpoblaciones. De hecho se dieron diferencias significativas al comparar las distancias genéticas de Collserola con el resto, respecto al que establecen el resto de subpoblaciones entre ellas ($U = 1,00$, $Z = 2,34$, $p = 0,019$).

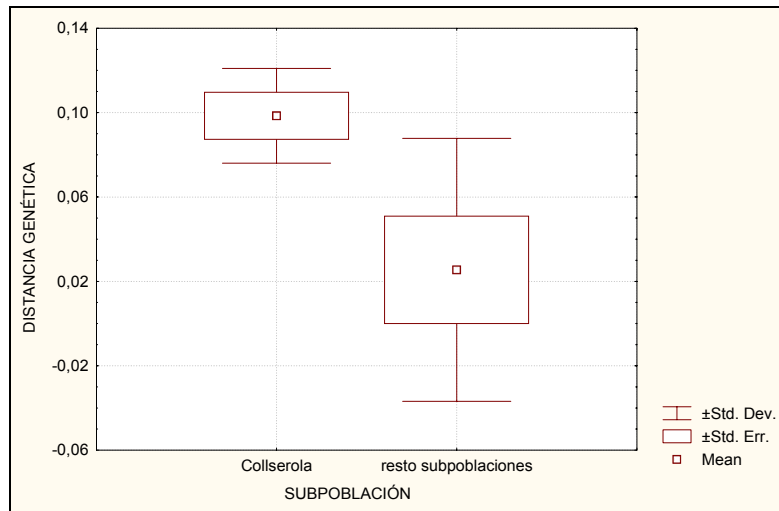


Figura 3. Comparación entre las distancias genéticas promedias ($\pm DE, \pm EE$) de Collserola con las diferentes subpoblaciones y las del resto de subpoblaciones entre sí.

DISCUSIÓN

La diversidad genética encontrada en la población de tejones catalana medida como el número de alelos por locus (media de 4,4 y mediana de 4) no difiere demasiado de la que Carpenter (2004) observa para la población inglesa de Woodchester Park, en Gloucestershire (mediana de 5) y es casi idéntica a la media de 4,3 registrada por Bijlsma *et al.* (2000) para animales de Holanda y Dinamarca. El rango de 2-8 alelos por locus es idéntico al descrito por Carpenter (2003), y muy similar al de 2-6 alelos que encuentran Bijlsma *et al.* (2000). Collserola, la subpoblación más aislada por factores antrópicos, fue la que mostró un menor número promedio de alelos por locus (2,63), aunque las diferencias no fueron significativas entre subpoblaciones. Las subpoblaciones han sido polimórficas en casi todos los loci analizados (entre el 87,5 y el 100%), otra evidencia de que la población de tejones catalana no presenta problemas de diversidad genética.

La heterocigosidad esperada total fue de 0,588, un poco superior al 0,536 de la población de Wytham, Inglaterra (Domingo-Roura *et al.*, 2003), y más distanciada del 0,45 de la muestra de Holanda y Dinamarca (Bijlsma *et al.*, 2000) y del 0,369 de la población danesa (Pertoldi *et al.*, 2005). Para los nombrados trabajos en Wytham, Holanda-Dinamarca y Dinamarca, fueron utilizados 5, 7 y 7 marcadores de

microsatélites, respectivamente. De entre las cinco subpoblaciones catalanas estudiadas, Collserola fue la que mostró una heterozigosidad esperada inferior (0,48). Las diferencias de las heterozigosidades observadas entre pares de subpoblaciones no fueron en ningún caso significativas, lo cual sugiere que existen pocas diferencias entre zonas en el grado de variabilidad genética.

Tres locus en subpoblaciones distintas mostraron un ligero déficit de heterozigotos, y sólo un locus en Collserola tuvo un ligero exceso de heterozigotos. De entre las subpoblaciones, sólo en el S Lleida se observó un déficit de heterozigotos significativo, lo cual de entrada cuesta de interpretar debido a que, aparentemente, esta subpoblación no sufre de un excesivo aislamiento ecológico. Es posible que el bajo valor muestral obtenido de esta zona puede estar enmascarando la tendencia real.

Según los valores obtenidos con los estimadores de Weir & Cockerham, las subpoblaciones no se separaron de un modelo de apareamiento al azar ya que el F_{IS} promedio para todos los locus fue de 0,030, valor no significativamente distinto de cero y muy bajo si lo comparamos con los grados de consanguinidad observados en la población inglesa de Gloucestershire ($F_{IS}=0,26$) (Evans *et al.*, 1989) y en la de Dinamarca ($F_{IS}=0,189$) (Petroldi *et al.*, 2000). En ambos estudios, sin embargo, se utilizó el análisis de alozimas y no de microsatélites, por lo que las comparaciones deben ser relativas, ya que las tasas de mutación en alozimas son inferiores a las de las regiones hipervariables que constituyen los microsatélites (Hedrick, 1999).

El valor promedio de $F_{ST}=0,075$ sí se separó significativamente de cero, y evidenció cierta diferenciación genética entre subpoblaciones, muy similar a la que Petroldi *et al.* (2005) encuentran en la población danesa, dividida en 3 subpoblaciones ($F_{ST}=0,072$). Estos autores atribuyen parcialmente esta segregación genética al sistema social que caracteriza a los tejones, con elevado grado de filopatría (Cheeseman *et al.*, 1987; da Silva *et al.*, 1994; Woodroffe *et al.*, 1995) que parece limitar en gran medida el flujo génico entre regiones geográficas (Petroldi *et al.*, 2005).

Al comparar los F_{ST} para cada par de subpoblaciones con la distancia geográfica que les separa, se observó una correlación negativa y no significativa, lo cual nos sugiere que, en el caso de la población catalana, el aislamiento por distancia geográfica no sería el

principal factor que determina la diferenciación genética observada entre subpoblaciones. Estos resultados sugieren que en el conjunto de Catalunya la diferenciación genética es mayor cuanto mayor es la distancia geográfica entre subpoblaciones, pero que Collserola sería un caso particular que rompería esta relación. Los valores más elevados de diferenciación genética entre subpoblaciones fueron los que se dieron entre Collserola y el resto de zonas muestreadas (F_{ST} entre 0,0745 y 0,1261), aunque Montserrat también se mostró bastante diferenciada genéticamente de otras dos zonas (las dos más hacia el NE de Catalunya, es decir, Montseny y NE Girona), además de Collserola, con valores de F_{ST} superiores a 0,07. La existencia de valores inferiores de F_{st} (entre 0,0213 y 0,0457) en las tres zonas más alejadas de los núcleos más humanizados de Catalunya (NE Girona, Montseny y S Lleida) nos puede estar indicando que algunas subpoblaciones sufren cierto aislamiento genético no explicado únicamente por la distancia geográfica, sino probablemente más acusado por el efecto barrera que suponen las infraestructuras viarias y la creciente urbanización del suelo, con la consiguiente pérdida de hábitat y el incremento de las dificultades para que se produzca el intercambio de genes mediante el goteo de individuos inmigrantes y emigrantes en cada subpoblación. Este fenómeno afectaría principalmente a la subpoblación más cercana al área metropolitana de Barcelona, Collserola, prácticamente aislada del contacto con el resto de espacios naturales cercanos, aunque también parece haber afectado a la zona de Montserrat. El área de Montserrat está situada a unos 30 km de Barcelona, pero a poca distancia se encuentran extensas zonas industriales. Por el este está rodeada por el río Llobregat, diversas carreteras y una autopista, mientras que por el suroeste presenta una autovía muy transitada. El resto de subpoblaciones (Montseny, S Lleida y NE Girona), aunque también cruzadas por carreteras, presentan un continuo de hábitat mucho más extenso que las dos precedentes. Únicamente unos pocos migrantes por generación son capaces de homogeneizar genéticamente las poblaciones en el tiempo (Slatkin, 1985), pero si las probabilidades de sobrevivir al proceso dispersivo son muy bajas (como sucede en aquellas zonas con gran afectación antropógena), el flujo génico se minimiza, provocando un incremento progresivo de las diferencias genéticas entre las poblaciones.

Concluimos así que, a pesar de que las subpoblaciones no muestran signos de sufrir problemas de consanguinidad y que presentan niveles aceptables de variabilidad genética, los resultados sugieren que existe cierta diferenciación genética entre

subpoblaciones, lo cual puede deberse, por un lado, al sistema social filopátrico que caracteriza a esta especie (Petroldi *et al.*, 2000, 2005) y por otro lado al aislamiento creado por el efecto barrera y la fragmentación del hábitat. Si no se toman medidas que potencien el intercambio de individuos y, por tanto, el flujo génico entre subpoblaciones, muy probablemente las diferencias genéticas se irán intensificando y quizás con el tiempo deriven en problemas de incremento de homocigosis en las poblaciones que queden aisladas, subdivididas, tal y como predice el efecto Wahlund (Wahlund, 1928). Sería de gran interés continuar este tipo de estudios, con un mayor tamaño muestral y considerando variables indicadoras del efecto barrera y la fragmentación, pero igualmente consideramos que a partir de estos resultados preliminares deberían ya marcarse algunas directrices para la conservación de esta especie (extrapolables seguramente a muchas otras), mediante acciones que minimicen la fragmentación del hábitat y potencien la conectividad entre zonas.

