



*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

## FILOGEOGRAFÍA DEL DESMÁN IBÉRICO (*GALEMYS PYRENAICUS*) Y SU DISTRIBUCIÓN EN LA RED DE PARQUES NACIONALES

JOSÉ CASTRESANA<sup>1</sup>, JAVIER IGEA<sup>1,2</sup>, PERE AYMERICH<sup>3</sup>,  
ÁNGEL FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ<sup>4</sup> Y JOAQUIM GOSÁLBEZ<sup>3</sup>

### RESUMEN

El desmán ibérico (*Galemys pyrenaicus*) es un mamífero semiacuático amenazado del que no se conocen algunos aspectos básicos sobre diversidad y estructura genética. Además, existe poca información actualizada sobre su distribución. En este estudio se muestrearon los ríos y arroyos que resultaban en principio favorables para la presencia de esta especie en los tres parques nacionales con citas previas (Picos de Europa, Ordesa y Monte Perdido, y Aigüestortes i Estany de Sant Maurici), con el objetivo de encontrar excrementos de desmán y actualizar su distribución en estos parques. Asimismo, se puso a punto un método de identificación genética de los excrementos basado en la amplificación y secuenciación de genes mitocondriales que permitiera confirmar la especie de procedencia, ya que algunos excrementos de desmán pueden equivocarse con los de otros mamíferos semiacuáticos como los del género *Neomys*. Usando este protocolo pudimos confirmar rastros de desmán en algunas cuencas del Parque Nacional de Picos de Europa, pero en otras resultó muy escaso o ausente. También se encontraron excrementos de desmán en la parte oriental del Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici, pero en su parte occidental y en el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido no se encontró ninguno. Estos resultados ponen de manifiesto una distribución muy fragmentada de las poblaciones de desmán, incluso en lugares aparentemente óptimos para la especie. Además, un análisis de las secuencias mitocondriales de estas muestras junto con otras del resto del área de distribución permitió constatar una fuerte estructuración genética, con las poblaciones de desmán divididas en dos grupos principales, a su vez subdivididos en cuatro linajes sin apenas intercambios genéticos entre ellos. Estos datos genéticos permitieron inferir que la historia evolutiva del desmán ibérico estuvo muy determinada por la existencia de refugios glaciales dentro de la península Ibérica, ubicándose el más importante en la zona noroccidental. Por otro lado, se comprobó que, a pesar de los fuertes requerimientos acuáticos del desmán, la estructura genética de esta especie no está tan condicionada por las cuencas fluviales como se esperaba. Todos estos resultados deberían ser tenidos en cuenta en los programas de conservación del desmán ibérico, tanto en la Red de Parques Nacionales como a nivel de todo el área de distribución de la especie.

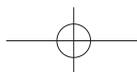
**Palabras clave:** genética de la conservación, mamíferos, genes mitocondriales, desmán ibérico, endemismo ibérico, semiacuático

<sup>1</sup> Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF), Passeig Marítim de la Barceloneta 37, 08003 Barcelona, España. E-mail: jose.castresana@csic.es

<sup>2</sup> Imperial College London, Silwood Park Campus, Ascot, Berkshire SL5 7PY, Reino Unido. E-mail: javier.igea@ibe.upf-csic.es

<sup>3</sup> Departament de Biologia Animal, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, 08028 Barcelona, España. E-mail: pere\_aymerich@yahoo.es, jgosalbez@ub.edu

<sup>4</sup> Biosfera Consultoría Medioambiental S.L., Calle Candamo 5, 33012 Oviedo, España. E-mail: angelfg@biosfera.es



## SUMMARY

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a threatened semi-aquatic mammal of which we ignore some basic aspects of its genetic diversity and structure. Moreover, there is limited updated information about its distribution. In this study, we sampled the rivers and streams a priori favorable for this species in the three National Parks with previous records (Picos de Europa, Ordesa y Monte Perdido, and Aigüestortes i Estany de Sant Maurici), with the aim of finding desman droppings and updating its distribution in these Parks. Moreover, we developed a method of genetic identification of excrements based on the amplification and sequencing of mitochondrial genes that allowed us to confirm the species of origin, since some desman excrements can get confused with those of other semi-aquatic mammals such as species of the genus *Neomys*. Using this protocol we could confirm desman droppings in some basins of the National Park of Picos de Europa, but in others it was very scarce or absent. We also found desman excrements in the eastern part of the National Park of Aigüestortes i Estany de Sant Maurici, but in its western part and in the National Park of Ordesa y Monte Perdido, we did not find any desman excrement. These results reveal a very fragmented distribution of desman populations, even in places apparently optimal for the species. In addition, an analysis of mitochondrial sequences of these samples along with others of the rest of the distribution range helped to confirm a strong genetic structure, with the desman populations divided into two main groups, which were further subdivided into four lineages with little genetic exchange between them. These genetic data allowed us to infer that the evolutionary history of the Pyrenean desman was largely determined by the existence of glacial refugia within the Iberian Peninsula, with the most important refugium placed in the north-western part. Furthermore, it was found that, despite the strong aquatic requirements of the desman, the genetic structure of this species was not as influenced by river basins as expected. All these results should be considered in conservation programs of the Pyrenean desman in both the Spanish Network of National Parks as well as at the level of the whole distribution range of the species.

**Key words:** conservation genetics, mammals, mitochondrial genes, Pyrenean desman, Iberian endemism, semi-aquatic

## INTRODUCCIÓN

El desmán ibérico, *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811), es un mamífero semiacuático endémico de la península Ibérica a nivel de género y especie. Junto con el desmán ruso, *Desmana moschata* (LINNAEUS, 1758), son las dos únicas especies vivas de la subfamilia Desmaninae. Esta subfamilia fue mucho más diversa en número de especies en el pasado (MCKENNA *et al.*, 1997; ARRIBAS, 2004), por lo que se trata de un linaje relicto que ha experimentado unas elevadas tasas de extinción. Además, este grupo de especies presenta adaptaciones a la vida acuática desde hace más de 10 millones de años, con lo cual el desmán ibérico es uno de los dos únicos representantes actuales de un linaje adaptado a vivir en unas condiciones ecológicas muy particulares.

Este pequeño mamífero se encuentra en ríos y arroyos de aguas permanentes y limpias. La altitud no es muy importante para el desmán ibérico pero los cursos de agua que habita han de tener una cierta pendiente y una profundidad no muy grande para asegurar la oxigenación del agua (NORES *et al.*, 2007). Asimismo, las riberas deben tener características específicas para poder albergar refugios, de gran importancia para la especie (MELERO *et al.*, 2012). Entre los principales factores que regulan su presencia está su gran dependencia de macroinvertebrados bentónicos, principalmente larvas de tricópteros, efemerópteros y plecópteros, que constituyen su dieta principal (SANTAMARINA, 1993; CASTIEN & GOSÁLBEZ, 1999). Esto hace que, aunque el desmán sea capaz de soportar niveles moderados de contaminación orgánica, la alteración de las comunidades de sus presas pueda limitar su pre-

*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

sencia en zonas de elevada eutrofización. Debido a sus elevadas exigencias ecológicas, se considera que el desmán ibérico es un excelente indicador de la calidad del hábitat. Por su elevado grado de endemidad, su área de distribución cada vez más restringida y el grado de amenaza de muchas de sus poblaciones, el desmán ibérico está considerado por la IUCN como especie "Vulnerable" (FERNANDES *et al.*, 2008). En el Estado español figura en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas en la categoría "Vulnerable" excepto las poblaciones del Sistema Central, que aparecen como "En peligro de extinción".

El área de distribución actual del desmán ibérico se extiende por las cuencas fluviales de Pirineos, Cordillera Cantábrica, Galicia, norte de Portugal, parte del Sistema Ibérico y algunas zonas del Sistema Central. Falta de gran parte del País Vasco, de modo que las poblaciones cantábricas y pirenaicas no estarían conectadas. Tampoco estarían conectadas las poblaciones del Sistema Ibérico y las del Sistema Central con otras poblaciones. De esta forma, el área de distribución del desmán ibérico se configura en varios núcleos poblacionales posiblemente aislados entre sí. Aunque se supone que el desmán es relativamente frecuente en muchos lugares de la parte septentrional de su área, aún existe un gran desconocimiento sobre la extensión de la distribución y abundancia actual de la especie. Sí que se sabe que las poblaciones de desmán en situación más crítica son las del Sistema Central y parece que se habría extinguido al este de la Sierra de Gredos, pero aún no se conocen de manera clara las causas del declive que está experimentando esta especie (NORES *et al.*, 2007).

Un problema de conservación añadido en el caso del desmán es que, debido a su elevado grado de adaptación al medio acuático, parece que el intercambio de individuos entre poblaciones independientes tan solo se ve facilitado en áreas de terreno suave con redes hidrográficas extensas donde las conexiones entre cuencas son relativamente frecuentes. En cambio, en zonas de relieve abrupto y red fluvial limitada, el intercambio de individuos entre las diferentes cuencas puede verse restringido a las zonas de alta montaña

donde las cabeceras de los ríos se encuentren a escasa distancia. En este contexto, un hipotético intercambio de individuos entre subcuencas siguiendo río abajo y remontando después por otro afluente, con recorridos largos por hábitats muy desfavorables, parece altamente improbable (AYMERICH & GOSÁLBEZ, 2002).

El desmán ibérico presenta un cierto grado de variabilidad individual en su área de distribución, pero el estatus taxonómico de las diferentes formas ha sido objeto de amplio debate. Así, la subespecie *G. p. rufulus* (GRAELLS, 1897) fue descrita inicialmente en el Sistema Central atendiendo a una coloración más clara que la de otras poblaciones. La validez de esta subespecie fue refrendada en revisiones subsiguientes, pero en base a un mayor tamaño de los individuos que se encuentran desde Galicia hasta el Sistema Central, considerando a la subespecie típica *G. p. pyrenaicus* para los Pirineos y la Cordillera Cantábrica. La división subespecífica se mantuvo en revisiones más recientes (JUCKWER, 1990). Sin embargo, GONZÁLEZ-ESTEBAN *et al.*, (1999), con abundante material, encuentran que ni la coloración ni las medidas corporales apoyan estos criterios subespecíficos. Finalmente, LÓPEZ-FUSTER *et al.*, (2006), en un análisis morfométrico separado por sexos, encuentran que las poblaciones pirenaicas son las más diferentes de las demás. De este modo, no descartan la validez de las subespecies *G. p. pyrenaicus* y *G. p. rufulus*, aunque con una distribución de las mismas diferente a la clásicamente considerada, y especulan con la posibilidad de que la diferenciación ocurriera por aislamiento durante las glaciaciones pleistocénicas.

A pesar del interés que representa tener un género como *Galemys* endémico de la península Ibérica, y de los numerosos estudios que se han realizado a lo largo de los últimos años para conocer diversos aspectos sobre su taxonomía, biología, ecología, distribución y conservación (véanse referencias en Norens (2007)), en ningún trabajo se ha analizado la variabilidad genética del desmán ibérico en su área de distribución. Entre otros muchos aspectos, las herramientas moleculares podrían ser muy útiles para: 1) clarificar el estatus taxonómico de las dos



CASTRESANA, J. Y COLS.

«Filogeografía del desmán ibérico y su distribución en la Red de Parques Nacionales»

subespecies descritas; 2) conocer el efecto que tienen y que han tenido las barreras geográficas en la distribución actual de la especie; 3) identificar las rutas de colonización seguidas por el desmán después de las glaciaciones pleistocénicas; 4) investigar el nivel y dirección del flujo génico entre las diferentes poblaciones; 5) conocer el grado de diversidad genética de la especie tanto a escala global como local para identificar qué zonas de la península Ibérica albergan la máxima diversidad genética; 6) delimitar las unidades básicas de gestión de las diferentes poblaciones; y 7) investigar aspectos demográficos básicos de cara a dilucidar si ha habido expansiones poblacionales recientes o cuellos de botella que hayan producido una reducción drástica del tamaño de las poblaciones.

Una de las razones que han podido dificultar los trabajos genéticos a nivel intraespecífico sobre el desmán ibérico es la complicación que entraña conseguir un número suficiente de muestras. Una alternativa para este propósito es el muestreo de excrementos, utilizado desde hace tiempo para detectar la presencia de esta especie y que, a pesar de las limitaciones que presenta, se considera un método globalmente útil para estudiar su distribución en grandes áreas y para el seguimiento de la evolución de sus poblaciones (QUEIROZ *et al.*, 1996; AYMERICH *et al.*, 2001). Un aspecto importante de los excrementos es que estos pueden ser utilizados, no sólo para determinar la presencia de la especie, sino también para realizar análisis genéticos y evolutivos.

Debido al buen estado de conservación y al elevado nivel de protección, los parques nacionales representan lugares idóneos para la supervivencia de este endemismo de la península Ibérica. Según la cartografía de referencia sobre la distribución de mamíferos en España, el desmán ibérico estaría presente en los parques nacionales de Picos de Europa, Ordesa y Monte Perdido, y Aigüestortes i Estany de Sant Maurici (NORES *et al.*, 2007). De hecho, estos tres parques nacionales tienen una red hidrológica amplia y con muchas zonas propicias para el desmán ibérico. Sin embargo, algunas de estas citas son antiguas y otras muchas dudosas por estar basadas en observa-

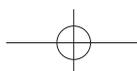
ciones o rastros sin confirmar. Por ello, es pertinente una revisión de la distribución del desmán ibérico en estos parques para, a modo de estudio piloto, examinar su estado de conservación. En este trabajo se describen los resultados de dicho estudio a la vez que se exponen las principales conclusiones obtenidas, con muestras de todo el área de distribución, sobre la estructura y variabilidad genética del desmán ibérico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestréos de excrementos del desmán ibérico

En este estudio se muestrearon los ríos y arroyos que resultaban en principio favorables para la presencia de desmán ibérico en los tres parques nacionales con citas previas de esta especie: Picos de Europa, Ordesa y Monte Perdido, y Aigüestortes i Estany de Sant Maurici (NORES *et al.* 2007). El objetivo era encontrar excrementos con características propias de desmán que normalmente depositan en las piedras centrales del curso de los ríos. Se realizaron muestreos en diferentes tramos fluviales de los tres parques nacionales siguiendo una metodología ya puesta a punto y contrastada (AYMERICH *et al.*, 2001; AYMERICH & GOSÁLBEZ, 2002). Para asegurar la fiabilidad de los puntos negativos en la medida de lo posible, se muestrearon varias veces los tramos negativos en distintas épocas del año así como en distintos años para poder prospectar el río con diferentes condiciones de caudal, lo que pudiera afectar a la presencia y detectabilidad de la especie.

Además, para poder entender los patrones de diversidad genética de *G. pyrenaicus* se muestrearon excrementos en otros lugares seleccionados del área de distribución de la especie: Pirineos, Cordillera Cantábrica, Sistema Ibérico y Sistema Central. Se obtuvieron muestras de algunos puntos de Pirineos, Cordillera Cantábrica y Sistema Ibérico, pero las prospecciones en el Sistema Central no tuvieron éxito. Finalmente, se pudo completar el área de estudio gracias a muestras de tejido procedentes de distintas colecciones biológicas.



*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

### **Caracterización genética de los excrementos del desmán ibérico**

Algunos excrementos de desmán son difíciles de distinguir de los de otras especies semiacuáticas, en particular de los de musgaños (*Neomys sp.*), que son frecuentes en los mismos ríos habitados por el desmán. Por lo tanto, se hace necesaria la confirmación de los excrementos de desmán en el laboratorio, lo cual hasta ahora se ha venido haciendo mediante la detección de pelos característicos que suelen estar presentes en los excrementos (QUEIROZ *et al.*, 1996; AYMERICH *et al.*, 2001). Para este trabajo pusimos a punto un protocolo alternativo consistente en la confirmación genética a partir del ADN mitocondrial extraído del excremento. Todos los excrementos se identificaron genéticamente, haciendo uso de este protocolo, para confirmar la especie de procedencia.

Los excrementos recogidos en el campo se conservaron en pequeños tubos con etanol absoluto y se tomaron las coordenadas de los puntos de recogida. Una vez en el laboratorio, los tubos se guardaron a 4 °C hasta su procesamiento.

Las extracciones de ADN a partir de excrementos de desmán se realizaron usando un kit comercial diseñado especialmente para tratar con este tipo de muestras, que maximiza la cantidad de ADN endógeno obtenido y, al mismo tiempo, minimiza la concentración de compuestos presentes en las heces que puedan inhibir la reacción de PCR. El gen que se usó para las identificaciones iniciales mediante su amplificación por PCR fue el gen mitocondrial del citocromo *b*. El ADN obtenido a partir de extracciones de excrementos se caracteriza por un elevado nivel de degradación y una baja concentración, por lo que se procedió a amplificar este gen utilizando varios fragmentos solapantes de PCR. En primer lugar, usando una secuencia conocida de las bases de datos (CABRIA *et al.*, 2006), se procedió al diseño de cebadores específicos de *G. pyrenaicus* que amplificaban 278 pares de bases de este gen. Con estos cebadores se realizaron las reacciones de PCR a partir de las muestras de ADN purificado. Cuando

la PCR resultaba positiva para *Galemys* se procedía a otras tres PCR que incluían el citocromo *b* entero y un fragmento de la región D-loop del genoma mitocondrial, con cebadores también específicos. En todas las extracciones se usaron blancos de extracción (sin muestra) y en todas las PCR se incluyeron blancos de PCR (sin ADN) para comprobar que no existían contaminaciones durante el proceso.

Las reacciones de PCR fueron preparadas en una sala especialmente dedicada y controlada, aislada de los lugares en los que se manipulan productos de PCR e irradiada regularmente con luz ultravioleta, ya que las contaminaciones pueden ser un problema debido al bajo contenido de ADN endógeno de los excrementos y a que éste puede estar muy degradado. Asimismo, el instrumental de laboratorio empleado en la preparación fue también irradiado con luz ultravioleta para eliminar cualquier resto posible de ácidos nucleicos. La secuenciación de ADN de los productos de PCR se llevó a cabo en distintos servicios de secuenciación.

### **Análisis filogeográfico**

Las secuencias de citocromo *b* y D-loop se concatenaron para su posterior análisis. Se estimó el modelo de evolución óptimo para estas secuencias, se reconstruyó un árbol de máxima verosimilitud con el programa PhyML (GUINDON *et al.*, 2010) y, a partir de este árbol, se obtuvo la genealogía de haplotipos. Los parámetros de diversidad nucleotídica se estimaron con DnaSP (LIBRADO & ROZAS, 2009).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Muestreos de excrementos del desmán ibérico y resultados de la confirmación genética**

Los porcentajes de excrementos determinados genéticamente como de desmán ibérico fueron muy variables dependiendo del lugar donde se realizaron las prospecciones. Por ejemplo, en zonas donde el desmán es escaso o falta com-



CASTRESANA, J. Y COLS.

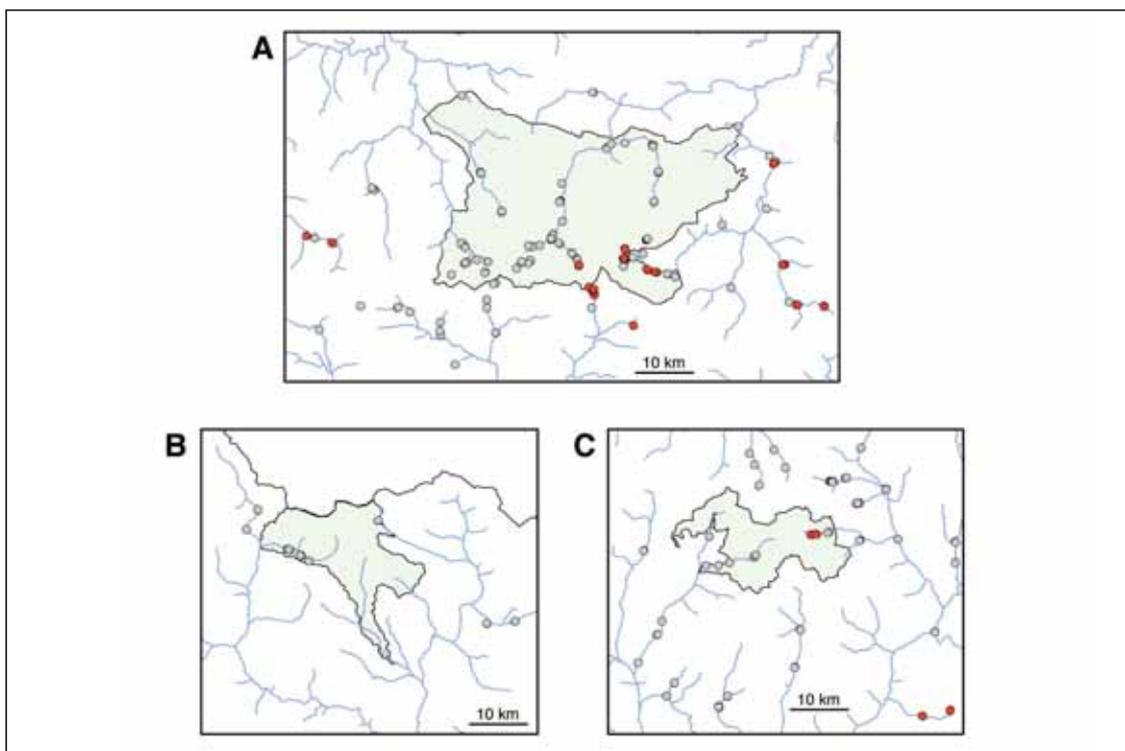
«Filogeografía del desmán ibérico y su distribución en la Red de Parques Nacionales»

pletamente, se deben recoger muchos excrementos, aunque sean dudosos, para poder determinar si alguno corresponde a la especie. En estos casos, los porcentajes de éxito pueden ser tan bajos como del 30%. En ríos donde la especie es más abundante y, por lo tanto, se pueden recoger excrementos frescos y con todas las características propias de la especie, los porcentajes de éxito suelen llegar al 50%. Incluso en estas circunstancias, la degradación del ADN en muchos de los excrementos encontrados limita que los porcentajes de éxito sean mayores, ya que puede ocurrir que algunos excrementos que sean efectivamente de desmán no generen un producto de PCR por lo degradado del material genético extraído.

### Distribución del desmán ibérico en los parques nacionales

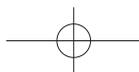
Para cada parque nacional y sus alrededores se señalan los puntos de muestreo para poder apreciar de manera cualitativa el esfuerzo de muestreo realizado en cada zona (Figura 1). No en todos estos puntos de muestreo se encontraron excrementos con características de *Galemys*.

En el Parque Nacional de Picos de Europa y alrededores, de 172 excrementos encontrados con características tanto típicamente atribuibles a desmán como dudosas, sólo 50 resultaron ser de desmán después de los análisis genéticos (Figura 1A). Los resultados fueron bastante peores



**Figura 1.** Muestreos realizados en los parques nacionales de Picos de Europa (A), Ordesa y Monte Perdido (B), y Aigüestortes i Estany de Sant Maurici (C) y alrededores. Los puntos grises indican localidades de muestreo. Los puntos rojos indican localidades donde se encontraron excrementos de desmán ibérico, tal como se confirmó por los análisis genéticos.

**Figure 1.** Sampling localities in the National Parks of Picos de Europa (A), Ordesa y Monte Perdido (B), and Aigüestortes i Estany de Sant Maurici (C) and surroundings. Grey dots indicate sampling localities. Red dots indicate localities where we found excrement of Pyrenean desman, as confirmed by genetic analyses.



*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

de lo esperado, ya que sólo se encontraron rastros de desmán frecuentes en la cuenca del Deva, incluyendo su afluente Cantiján (sector sureste del Parque). También resultó ser frecuente en el río Puerma (sur del Parque, ya en la cuenca del Esla). A pesar de todas las prospecciones realizadas en la cuenca del río Cares (sector central del Parque) tan solo se encontró en un arroyo de la cabecera un excremento con características propias de desmán y que pudimos confirmar genéticamente como de esta especie. En las cuencas del Sella y Dobra (sector occidental del Parque) no se encontró ningún excremento de desmán. Es interesante destacar que las tres cuencas con desmán (Deva, Puerma y Cares) están separadas por muy poca distancia y conectadas por los collados de Pandetrave y Remoña.

Dentro del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido se prospectaron diversos tramos del río Arazas y del valle de Pineta, además de otros ríos cercanos al Parque. Tan solo se encontraron dos excrementos con características dudosas de desmán, pero ninguno resultó serlo después de su análisis genético (Figura 1B). Se confirman así estudios anteriores, basados en excrementos y su confirmación por pelos, en los que tampoco se habían encontrado rastros de desmán en este Parque Nacional (AYMERICH & GOSÁLBEZ, 2009). En realidad, estos estudios indican la falta de desmán en prácticamente todo el sector central del Pirineo, donde las características de los ríos y su difícil conexión con otras cuencas podrían no ser óptimos para su colonización por parte de esta especie después de la última glaciación (AYMERICH & GOSÁLBEZ, 2009).

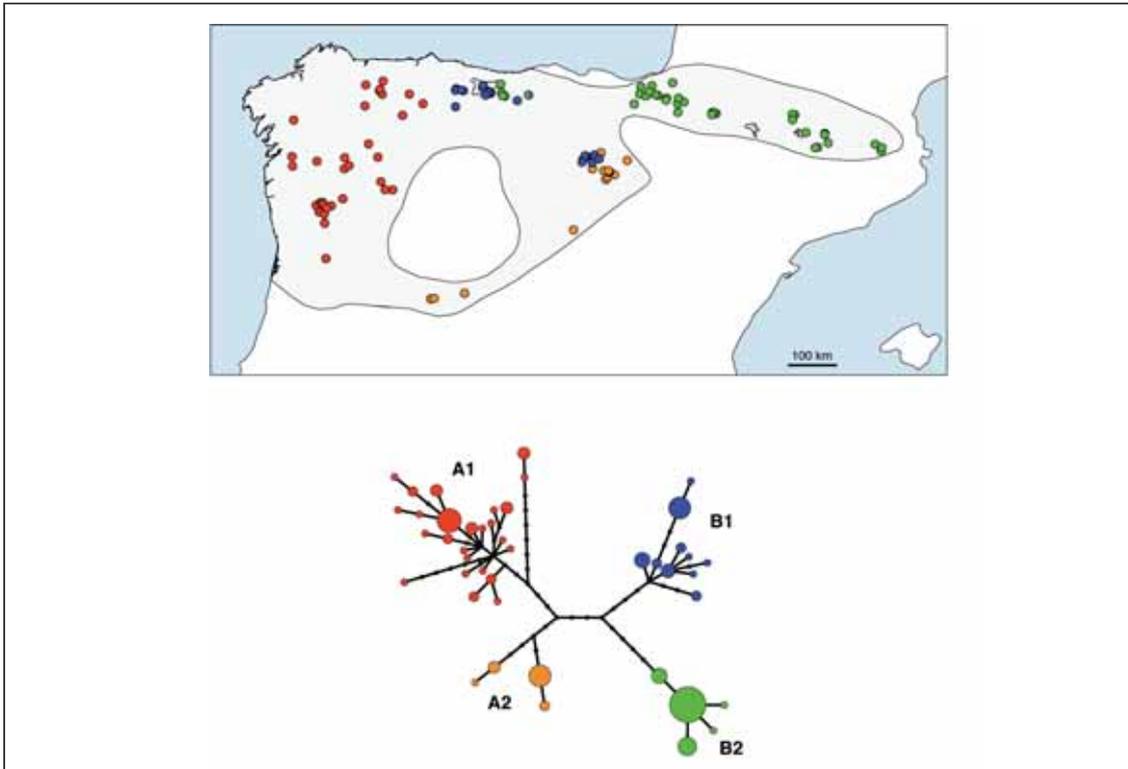
De nueve excrementos encontrados en el Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici y alrededores con características propias de desmán o dudosas, cuatro resultaron ser de desmán después de su análisis. Todos ellos se obtuvieron en dos localidades del río Escrita, que se encuentra en la parte oriental del Parque (Figura 1C). Otros dos excrementos adicionales aparecieron en una zona más alejada al sureste del Parque (Figura 1C). Estudios anteriores realizados

en este Parque Nacional (AYMERICH *et al.*, 2001) ya habían comprobado que sólo había desmán ibérico en el sector oriental del Parque y no en el sector occidental (ríos Sant Nicolau y Noguera de Tor). Por lo tanto, los muestreos realizados en este estudio confirman este mismo resultado.

### Filogeografía del desmán ibérico

Los análisis filogeográficos realizados con 134 muestras de desmán ibérico procedentes de los distintos lugares de su área de distribución nos permitieron obtener resultados de gran interés para conocer la historia evolutiva de la especie y el origen de sus distintas poblaciones. Uno de los aspectos más destacados de los análisis de las secuencias mitocondriales fue el descubrimiento de una fuerte estructuración filogeográfica de esta especie, que se encontraría subdividida en dos grandes grupos (A y B), los cuales a su vez se subdividen en cuatro linajes (Figura 2) (IGEA *et al.*, 2013). El linaje A1 ocupa el noroeste de la península Ibérica, desde el norte de Portugal y Galicia hasta la parte central de la Cordillera Cantábrica (a la altura de Somiedo); el linaje A2 ocupa el Sistema Central y parte del Sistema Ibérico (Camos, Picos de Urbión y Sierra Cebojera); el linaje B1 ocupa desde la parte central de la Cordillera Cantábrica (a la altura de Redes), hasta el norte del Sistema Ibérico (Sierra de la Demanda); y el linaje B2 ocupa desde las estribaciones orientales de la Cordillera Cantábrica hasta los Pirineos. Estos linajes no se mezclan prácticamente en ningún sitio, lo que resulta un aspecto muy singular para esta especie. La única excepción la constituyen algunos ríos de la parte oriental de la Cordillera Cantábrica, donde se encuentran juntos desmanes de los linajes B1 y B2 (Figura 2).

Los análisis de variabilidad genética a lo largo del espacio también resultaron muy reveladores, ya que se corroboró que la mayor variabilidad genética se da en las poblaciones del noroeste (linaje A1;  $\pi = 0,0036$ ), lo que indicaría que esta zona habría sido uno de los principales refugios glaciares. Las menores medidas de diversidad genética se dan en las poblaciones pirenaicas



**Figura 2.** Análisis filogeográfico del desmán ibérico. En la parte superior de la figura se muestra el mapa de la mitad norte de la península Ibérica con el área de distribución histórica del desmán ibérico señalada en gris y los tres parques nacionales involucrados en este estudio, en verde. Los puntos indican las muestras de desmán usadas y los colores se corresponden con los cuatro linajes encontrados en el árbol de haplotipos mitocondriales de la parte inferior de la figura: A1, A2, B1 y B2. Un punto azul y verde indica que en la misma localidad se encontraron juntas muestras de los dos linajes correspondientes.

**Figure 2.** Phylogeographic analysis of the Pyrenean desman. The upper part of the figure shows the northern part of the Iberian Peninsula with the historical distribution area of the Pyrenean desman in grey, and the three National Parks involved in this study, in green. Dots indicate the Pyrenean desman samples used and colors denote the four mitochondrial lineages recovered in the tree of mitochondrial haplotypes: A1, A2, B1 and B2. The single dot with blue and green colors indicates that, in this locality, samples of both corresponding lineages were found together.

(linaje B2;  $\pi = 0,0004$ ), posiblemente debido a una colonización postglacial muy rápida y a través de un cuello de botella demográfico. Así, todos estos datos mitocondriales, junto con resultados complementarios derivados de secuencias obtenidas a partir de ocho intrones nucleares, nos permitieron reconstruir de manera fidedigna el origen de las distintas poblaciones de desmán y su dispersión postglacial a partir de cuatro refugios ibéricos (IGEA *et al.*, 2013).

Con respecto a la repartición de estos linajes en los parques nacionales, en Picos de Europa se encontraron individuos tan solo del linaje B1, aun-

que no se descarta que pudieran aparecer individuos del linaje B2 en el futuro ya que se encontraron ejemplares con este haplotipo en lugares muy cercanos al Parque. En el Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici tan solo se encontraron desmanes del linaje B2. Además, ninguno de los parques nacionales de la red acoge poblaciones del grupo A (linajes A1 y A2) que, como se ha indicado, contiene las poblaciones más diversas genéticamente. Por lo tanto, estos datos indican que la diversidad genética del desmán ibérico albergada en los parques nacionales es muy escasa con respecto al total de la especie.

*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

### **Utilización de marcadores moleculares para analizar el nivel y dirección del flujo génico entre las diferentes poblaciones del desmán ibérico**

Otro interesante resultado que encontramos con respecto a la estructuración genética del desmán ibérico es que las cuencas fluviales no suponen una barrera al flujo genético tan grande como se esperaba en una especie de estrictos requerimientos acuáticos. Así, cuando se agruparon las muestras de desmán por las principales cuencas hidrográficas, un 32% de la variación genética era atribuible a este agrupamiento por cuencas. Además, este valor fue mucho menor cuando el análisis se realizó sólo en el linaje A1, que no tiene tanta estructura genética y ocupa un área más compacta y, por lo tanto, no presentaría problemas de aislamiento por distancia. Esto indicaría que al menos algunas divisorias de las cuencas fluviales no suponen una barrera importante al flujo genético y, por tanto, parece que los desmanes se pudieran mover o se habrían movido recientemente entre algunas cuencas fluviales, posiblemente a través de collados que enlazan cabeceras próximas. Sin embargo, debieran realizarse estudios más centrados en cada cuenca concreta para poder determinar la cantidad de flujo genético reciente o histórico que ha habido entre cada una de ellas.

Por otro lado, son muy destacables las barreras al flujo genético mitocondrial que detectamos tanto en la Cordillera Cantábrica (en la zona entre Somiedo y Redes) como en el Sistema Ibérico (a ambos lados del río Najerilla), ya que los individuos pertenecientes a un clado no penetran en las zonas correspondientes al otro clado a pesar de situarse a distancias muy cortas, especialmente en el Sistema Ibérico. Sin embargo, debido a que el genoma mitocondrial es de transmisión materna, estos datos sólo se refieren a las hembras y no se puede descartar, de momento, que la dispersión de machos sea mayor. En todo caso, serán necesarios estudios más detallados y con una gran cantidad de genes nucleares para poder saber a qué se debe este efecto de barrera genética en estas zonas.

### **Evaluación del estatus taxonómico de las dos subespecies del desmán ibérico**

La existencia de dos grandes grupos de linajes mitocondriales en el desmán ibérico (A y B) podría corresponderse, en principio, con las dos subespecies descritas, *G. p. pyrenaicus* y *G. p. rufulus*. La distribución de los linajes mitocondriales y la localización de las zonas de contacto no encajan bien con ninguna de las áreas de distribución propuestas, que han variado en los distintos trabajos realizados sobre estas subespecies (JUCKWER, 1990; GONZÁLEZ-ESTEBAN *et al.*, 1999; LÓPEZ-FUSTER *et al.*, 2006). Si bien los estudios descriptivos iniciales sobre este tema estaban basados en muy pocos ejemplares, los más recientes (GONZÁLEZ-ESTEBAN *et al.*, 1999; LÓPEZ-FUSTER *et al.*, 2006) emplearon un mayor número de individuos. Sin embargo, éstos fueron agrupados por grandes regiones geográficas que englobaban varios de los linajes mitocondriales aquí descritos. Por ejemplo, todos los especímenes del Sistema Ibérico se agruparon en una sola población cuando, en realidad, hay dos linajes muy distintivos en esta región. Esto podría haber ocultado la detección de diferencias morfológicas entre las subespecies. Por tanto, estudios dirigidos a analizar específicamente posibles gradientes morfológicos teniendo en cuenta las zonas de contacto detectadas en este estudio genético podrían ayudar a determinar mejor la validez de las subespecies descritas.

Por el momento, el grupo A se correspondería con *G. p. rufulus*, ya que el área de distribución propuesto para esta subespecie y la de este grupo genético coinciden bastante. Además, la localidad tipo para *G. p. rufulus* (Valsaín - Venta de los Mosquitos, al norte del Puerto de Navacerrada, en Segovia) se encuentra dentro del área del grupo genético A. Por otro lado, el grupo B se correspondería con *G. p. pyrenaicus*, ya que sus áreas solapan en buena medida y la localidad tipo de esta subespecie (Tarbes, Río Adour, en el Pirineo francés) se encuentra enclavada en el área del grupo B.



CASTRESANA, J. Y COLS.

«Filogeografía del desmán ibérico y su distribución en la Red de Parques Nacionales»

### Aplicación de los resultados obtenidos a la conservación y gestión del desmán ibérico en los parques nacionales afectados

Las principales aplicaciones de este estudio para los parques nacionales afectados son tres. En primer lugar, hemos puesto a punto un método de prospección de desmán ibérico basado en excrementos y su confirmación genética, lo que puede facilitar los trabajos de censo de esta especie, muy esquiva y difícil de detectar por otros medios. Los análisis confirmatorios son necesarios para poder excluir que los excrementos de morfología atípica puedan pertenecer a especies de musgafíos del género *Neomys*, ya que algunos excrementos de estas especies, generalmente muy frecuentes, se pueden confundir fácilmente con los de desmán, como se ha señalado. Esta metodología de confirmación genética puede ser práctica para muestrear zonas concretas y resulta especialmente útil en situaciones de baja densidad del desmán, cuando se encuentran pocos excrementos y es más improbable detectar heces que por su morfología se puedan atribuir inequívocamente a la especie. Debe destacarse que la confirmación de excrementos de desmán también puede realizarse mediante el análisis en lupa de pelos característicos (QUEIROZ *et al.*, 1996; AYMERICH *et al.*, 2001).

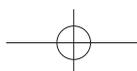
Otro importante resultado ha sido la constatación de la escasez o incluso la ausencia de *G. pyrenaicus* en los tres parques nacionales prospectados. Así, el desmán no está tan extendido en el Parque Nacional de Picos de Europa como se esperaba e indicaban datos anteriores, ya que sólo lo encontramos en las cuencas del Deva y Puerma y, mucho más escaso, en la cuenca del Cares. Asimismo, las prospecciones realizadas en el Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici corroboran la presencia de la especie en el sector oriental y su ausencia en el occidental. Finalmente, en el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido no se encontró ni un solo excremento positivo a pesar de la existencia de zonas aparentemente adecuadas para el desmán. Los presentes resultados contribuyen a clarificar y establecer la distribución actual de la especie en los tres parques nacionales estudiados

mediante técnicas de muestreo apropiadas y, en este caso, de determinación genética. Además, la constatación de la fuerte fragmentación de las poblaciones de desmán será fundamental para la gestión futura de este importante endemismo ibérico. No obstante, será necesario un esfuerzo mayor, especialmente en zonas donde las prospecciones han dado resultados negativos hasta ahora, para poder confirmar la ausencia de la especie en estas áreas.

Por último, los análisis de las secuencias de *G. pyrenaicus* nos han permitido determinar a qué unidades evolutivas o linajes pertenecen los desmanes de los parques nacionales. Así, los del Parque Nacional de Picos de Europa pertenecen al linaje B1 (sin descartar que aparezcan individuos del linaje B2, ya que hemos encontrado este haplotipo en zonas muy próximas al Parque) y los del Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici pertenecen al linaje B2. Estos linajes se han determinado, de momento, con genes mitocondriales y, por lo tanto, esta subdivisión corresponde, estrictamente hablando, a las hembras. Sin embargo, y a la espera de realizar estudios más completos y con un número de genes nucleares suficiente, se debería tener en cuenta la subdivisión en estos linajes o unidades evolutivas a la hora de gestionar la especie, por ejemplo, en caso de querer realizar planes de reintroducción si estos resultaran necesarios. Siguiendo un principio de precaución se debería respetar la identidad de estos linajes y gestionarlos, por tanto, como unidades de evolución independientes de cara a su conservación, sin realizar ninguna translocación que implique mezclas artificiales entre ellos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a todas las instituciones y personas que aportaron muestras y ayuda en el acceso a distintas colecciones: Colección BTVS del Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF), Colección de Tejidos de la Estación Biológica de Doñana (EBD, CSIC), Xunta de Galicia, Gobierno de Navarra, Diputación Foral de Gipuzkoa, Gobierno de La Rioja, Jorge González-



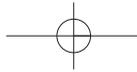
*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012*

Esteban (Desma), Asunción Gómez (Tragsatec), Julio Gisbert y Rosa García-Perea (Proyecto Galemia), Oscar Arribas, y Henrique Carvalho, Carla Marisa Quaresma y Carlos Santos (ICNF). Asimismo agradecemos a las siguientes instituciones por facilitar permisos para recolectar excrementos: Gobierno de La Rioja, Generalitat de Catalunya, Gobierno de Cantabria, Gobierno del Principado de Asturias, Gobierno de Aragón, Parque Nacional de Picos de Europa, Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido, Parque Na-

cional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici y ICNF. También agradecemos a Salvador Carranza, Jacint Ventura y María José López-Fuster por su ayuda durante las fases iniciales del proyecto. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos CGL2008-00434/BOS y CGL2011-22640/BOS del Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación y principalmente financiado por el proyecto 014/2008 de la Convocatoria de ayudas a proyectos de investigación en la Red de Parques Nacionales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRIBAS, O. 2004. Fauna y Paisaje de Los Pirineos en la Era Glaciar. Lynx Edicions, Barcelona.
- AYMERICH, P., CASADESÚS, F. & GOSÁLBEZ, J. 2001. Distribució de *Galemys pyrenaicus* (Insectívora, Talpidae) a Catalunya. *Orsis* 16: 93-110.
- AYMERICH, P. & GOSÁLBEZ, J. 2002. Factors de distribució de *Galemys pyrenaicus* (Insectívora, Talpidae) a Catalunya. *Orsis* 17: 21-35.
- AYMERICH, P. & GOSÁLBEZ, J. 2009. El desmán ibérico en los Pirineos. *Quercus* 279: 24-30.
- CABRIA, M.T., RUBINES, J., GÓMEZ-MOLINER, B. & ZARDOYA, R. 2006. On the phylogenetic position of a rare Iberian endemic mammal, the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *Gene* 375: 1-13.
- CASTIEN, E. & GOSÁLBEZ, J. 1999. Habitat and food preferences in a guild of insectivorous mammals in the western Pyrenees. *Acta Theriologica* 44: 1-13.
- FERNANDES, M., HERRERO, J., AULAGNIER, S. & AMORI, G. 2008. *Galemys pyrenaicus*. En: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012-2.
- GONZÁLEZ-ESTEBAN, J., CASTIÉN, E. & GOSÁLBEZ, J. 1999. Morphological and colour variation in the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 64: 1-11.
- GUINDON, S., DUFAYARD, J.F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W. & GASCUEL, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307-321.
- IGEA, J., AYMERICH, P., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A., GONZÁLEZ-ESTEBAN, J., GÓMEZ, A., ALONSO, R., GOSÁLBEZ, J. & CASTRESANA, J. 2013. Phylogeography and postglacial expansion of the endangered semi-aquatic mammal *Galemys pyrenaicus*. *BMC Evolutionary Biology* 13: 115.
- JUCKWER, E.A. 1990. *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) – Pyrenäen-Desman. En: *Handbuch der Säugetiere Europas: Insektenfresser, Herrentiere* (Niethammer, J. & Krapp, F., eds.). pp 79-92.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- LÓPEZ-FUSTER, M.J., GARCÍA-PEREA, R., FERNÁNDEZ-SALVADOR, R., GISBERT, J. & VENTURA, J. 2006. Craniometric variability of the Iberian desman, *Galemys pyrenaicus* (Mammalia: Erinaceomorpha: Talpidae). *Folia Zoologica* 55: 29-42.
- MCKENNA, M.C., BELL, S.K. & SIMPSON, G.G. 1997. Classification of mammals above the species level. Columbia University Press, New York.
- MELERO, Y., AYMERICH, P., LUQUE-LARENA, J.J. & GOSÁLBEZ, J. 2012. New insights into social and space use behaviour of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *European Journal of Wildlife Research* 58: 185-193.



CASTRESANA, J. Y COLS. «Filogeografía del desmán ibérico y su distribución en la Red de Parques Nacionales»

NORES, C., QUEIROZ, A.I. & GISBERT, J. 2007. *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811). En: Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España (Palomo, L.J., Gisbert, J. & Blanco, J.C., eds.). pp 92-98. Dirección General para la Biodiversidad - SECEM - SECEMU, Madrid.

QUEIROZ, A.I., QUARESMA, C.M., SANTOS, C.P., BARBOSA, A. & CARVALHO, H. 1996. Desman distribution in Portugal. Current knowledge. En: Council of Europe Environmental Encounters Series, N° 25 pp 19-27.

SANTAMARINA, J. 1993. Feeding ecology of a vertebrate assemblage inhabiting a stream of NW Spain (Riobo; Ulla basin). *Hydrobiologia* 252: 175-191.

