

Filogenia y evolución local de la cabra montés (*Capra pyrenaica*) en el yacimiento Cuaternario de Chaves (Huesca, España)

Phylogeny and local evolution of The Iberian Wild Goat (*Capra pyrenaica*) in the Quaternary site of Chaves (Huesca, Spain)

Irene Ureña¹, Juan Luis Arsuaga¹, M^a Ángeles Galindo-Pellicena¹,
Anders Götherström², Cristina Valdiosera^{1,3}

¹ Centro Mixto UCM-ISCIII de Investigación sobre Evolución y Comportamiento Humanos,
Avda. Monforte de Lemos 5 Pabellón 14 28029 Madrid, España,

urena@isciii.es, jlarsuaga@isciii.es, mgalindo@isciii.es

² Department of Evolutionary Biology, Uppsala University S752 36 Uppsala, Suecia,
anders.gotherstrom@ebc.uu.se

³ Centre for GeoGenetics, Natural History Museum of Denmark
University of Copenhagen Universitetsparken 15

DK-2100 Copenhagen, Dinamarca,
cvaldiosera@snm.ku.dk

PALABRAS CLAVE: *Capra pyrenaica*, Chaves, Neolítico, Paleolítico

KEYWORDS: *Capra pyrenaica*, Chaves, Neolithic, Paleolithic

RESUMEN

La cabra montesa ibérica (*Capra pyrenaica*, Schinz 1838) es un endemismo de la Península Ibérica que en los últimos siglos ha sufrido la pérdida de dos de sus cuatro subespecies (*C. pyrenaica pyrenaica* y *C. pyrenaica lusitanica*, actualmente extintas, *C. pyrenaica hispanica* y *C. pyrenaica victoriae*). La taxonomía para esta especie, al igual que para el género *Capra*, plantea un debate ya que la taxonomía habitualmente empleada se basa en caracteres morfológicos, tales como la morfología de los cuernos o el pelaje, que muchos autores sugieren que no son suficientes para definir una especie o subespecie. Los distintos problemas de conservación que plantea esta especie, así como su valor añadido por ser la pieza de caza mayor más importante de la Península, hacen que la gestión de esta especie sea una prioridad tanto desde el punto de vista biológico como socioeconómico. En este trabajo, se aplican las técnicas moleculares utilizadas en los estudios de ADN antiguo para investigar la historia paleo-genética de la cabra montesa en el yacimiento de Chaves (Huesca). Con los datos obtenidos se pretende analizar las relaciones filogenéticas entre las distintas subespecies de la Península así como las fluctuaciones demográficas y cambios en diversidad genética a través del tiempo. Este tipo de estudio es importante ya que nos proporciona información sobre los cambios genéticos sufridos por esta especie a través del tiempo y que han llevado a sus poblaciones a su situación actual. Por ello, esta información puede ayudar a tomar decisiones más fundamentadas para su gestión.

El estudio consistió en la amplificación y análisis de tres fragmentos del gen mitocondrial citocromo b de diecinueve muestras del yacimiento de Chaves de contextos neolíticos y paleolíticos. El análisis muestra, por un lado, una continuidad poblacional desde el Paleolítico hasta el presente en el yacimiento sin flujos genéticos externos y, por otro lado, una disminución de la diversidad genética desde el Paleolítico hasta el Neolítico sugiriendo que la reducción de biodiversidad que terminó con la extinción del bucardo ya estaba presente en el Neolítico. El estudio de las relaciones filogenéticas estimado por inferencia bayesiana agrupa en el mismo clado la cabra montesa y el íbice, apoyando este estudio la teoría de una sola ola de migración del género *Capra* en Europa seguido de una separación geográfica y especiación.

ABSTRACT

The Iberian wild goat (*Capra pyrenaica*, Schinz 1838) is an endemic species of the Iberian Peninsula that has recently suffered the loss of two of its four subspecies (*C. pyrenaica pyrenaica*, *C. pyrenaica lusitanica*, currently extinct, *C. pyrenaica hispanica* and *C. pyrenaica victoriae*). The taxonomic position of this species has opened an intense debate among researchers; this is due to the fact that its classification has been based mainly on morphological characters, in particular on the horn morphology. It has been argued that horn morphology does not provide enough information to define a species. In addition, given its conservation concerns and the value it represents as a hunting species within the Peninsula, the wild goat is a complicated species to manage from a conservation perspective. In this study, we apply ancient DNA techniques in order to investigate the paleo-genetic history of the wild goat in the site of Chaves (Huesca, Spain) and re-analyse the controversial phylogenetic relationships among the different subspecies

and other wild goat species, as well as, its demographic fluctuations and changes in gene diversity through the time. This information is important to analyse the population structure of the present goat populations to make educated conservation management decisions. For this, forty ancient goat bones were sampled (14 samples date back to the Neolithic and 26 to the Paleolithic). Three non overlapping fragments of the cytochrome b region were targeted and amplified with goat specific primers designed in this study with a total length of 264bp. The sequences recovered in this study were analysed together with modern sequences available in Genbank from the different goat subspecies and species using as outgroup *Capreolus pygargus*. The sequences were collapsed to haplotype and a haplotype network was constructed. In this, two groups were identified (see figure 1): one group with the modern Iberian Wild goats haplotypes (yellow) and the *Capra ibex* haplotype (green) and other group with the ancient haplotypes of Chaves (pink and blue). Whithin the latter, there is one haplotype that is found in the Paleolithic, in the Neolithic and in the modern goats. Thus, this analyses suggests that this haplotype, belonging to the recent extinct bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*), would have survived since the Paleolithic until recent times. The fixation index F_{st} was calculated and does not show population differentiation, suggesting that there has been population continuity within Chaves all throughout the Paleolithic to the present with no evidence of gene flow. Both Haplotype diversity (Hd) and Nucleotide diversity (P) analyses show a decrease of genetic diversity from the Paleolithic to the Neolithic suggesting that the reduction in levels of diversity, that led to the wild goat extinction, was already evident in the Neolithic, perhaps as a consequence of a bottleneck during the Paleolithic/Neolithic transitions. The presence of the domestic animals at the site during the Neolithic may have affected to the wild goats population in the area. The phylogenetic relationship estimated by Bayesian inference do not show a clear structure (see figure 2). This pattern has been observed by other authors when studying the taxonomy of the genus *Capra*. It can be observed that the Iberian Wild goats and the Alpine Ibex are grouped together within clade 3. The monophyletic origin for both species is concordant with the theory of a single migration wave of wild goats in Europe followed by a geographic separation and speciation 6, 7, 8, 9. It can be also observed that the bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*) seems to have a different common ancestor from the Alpine Ibex and the rest of modern Iberian Wild goats.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática del género *Capra* y origen de la *Capra pyrenaica*

El género *Capra* incluye varias formas de cabra salvaje, que ocupan hábitats de montaña desde el norte de Mongolia y Rusia hasta el oeste de Europa y Etiopía, y una forma doméstica cosmopolita (MANCEAU *et al.*, 1999a). El número y estatus de las especies y subespecies de *Capra*, no obstante, está todavía sometidos a debate. Así, por ejemplo, mientras que COUTURIER (1962) reconoce sólo una especie salvaje, SHACKLETON (1997) reconoce nueve especies y SCHALLER (1977) sólo seis. Uno de los problemas reside en que la clasificación taxonómica tradicional del género *Capra* está basada en caracteres morfológicos, principalmente en la forma de los cuernos de los machos adultos (MANCEAU *et al.*, 1999a). Pero la morfología de los cuernos puede no ser un carácter apropiado para resolver cuestiones cladísticas ya que es muy variable incluso dentro de una población, puede estar influenciado por selección sexual o ambiental (SCHALLER, 1977; COUTURIER, 1962; CLOUET, 1979) y podría ser un pobre indicador de la historia de las poblaciones (MANCEAU *et al.*, 1999b). Además, la hibridación entre diferentes taxones en cautividad puede producir descendencia fértil (COUTURIER, 1962). En estado silvestre también se ha documentado esta hibridación entre taxones salvajes y cabras domésticas (ZALIKHANOV, 1967). Los estudios llevados a cabo con alozimas (HARTL *et al.*, 1990, 1992) y con ADN mitocondrial (MANCEAU *et al.*, 1999a) tampoco concuerdan con la clasificación basada en caracteres morfológicos. La taxonomía usada en este trabajo es la reconocida por la

Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, IUCN (2010) que diferencia las nueve especies de cabra salvaje que distingue SHACKLETON (1997).

El registro fósil sugiere que el género *Capra* apareció en Asia Central y que durante el Plio-Pleistoceno tuvo lugar una radiación de taxones en un corto periodo de tiempo (HARTL *et al.*, 1990). Hay relativamente pocos datos paleontológicos disponibles para estas especies ya que sus preferencias por hábitats montañosos no son favorables para la preservación de los fósiles (SIMPSON, 1945). Todo esto hace que resulte difícil evaluar el número de especies y sus relaciones filogenéticas y que, por lo tanto, no se conozca suficientemente bien la historia evolutiva del género *Capra* (PIDANCIER *et al.*, 2006). Al igual que ocurre con la taxonomía del género, la taxonomía para el endemismo ibérico *Capra pyrenaica* Schinz, 1838 también es muy cuestionada ya que está basada sólo en dos criterios morfológicos: distribución de las manchas negras del pelaje de los machos y longitud y sección transversal de la cornamenta (CABRERA, 1911). La IUCN (2010) acepta las cuatro subespecies que distingue CABRERA (1911, 1914) de cabra montesa (FANDOS, 1991). Estas cuatro subespecies son *Capra pyrenaica lusitanica* Schlegel, 1872 (actualmente extinta, anteriormente se localizaba en el sur de Galicia y norte de Portugal), *Capra pyrenaica victoriae* Cabrera, 1911 (que ocupa las serranías centrales, fundamentalmente la sierra de Gredos), *Capra pyrenaica hispanica* Schimper, 1848 (que se distribuye por las sierras paralelas al Mediterráneo peninsular, con su población más importante en Sierra Nevada) y *Capra pyrenaica pyrenaica* Schinz, 1838 (el bucardo, localizado en el Pirineo y también en la Cordillera Cantábrica, virtualmente extinta).

El origen de *Capra pyrenaica* tampoco está claro. Una hipótesis sugiere que su origen está en una cabra emparentada con *Capra caucasica* que habitaba el borde este del Macizo Central francés y los Pirineos hace unos 80.000 años. Paulatinamente fueron apareciendo unos tipos intermedios entre *Capra caucasica* y *Capra pyrenaica*, diferenciándose claramente este último después de la glaciación Würm hace unos 15.000 años en los Pirineos (CRAMPE, 1990; CRÉGUT-BONNOURE, 2009). Previamente, en otra ola de inmigración distinta, habrían llegado las poblaciones de *Capra ibex* a Europa hace unos 300.000 años, y por lo tanto esta cabra no estaría emparentada con la cabra montesa ibérica (CRÉGUT-BONNOURE, 2009). Otra hipótesis considera que *Capra pyrenaica* deriva precisamente de un tipo de cabra emparentado con *Capra ibex* que habitaba los Pirineos en el periodo de tiempo entre las glaciaciones Riss-Würm (ENGLÄNDER, 1986). Los resultados que hay hasta la fecha con alozimas (HARTL *et al.*, 1992) y con ADN mitocondrial (MANCEAU *et al.*, 1999a) apoyan esta última hipótesis de una sola ola de inmigración de cabra en Europa seguida de una especiación que dio lugar a las dos especies la cabra montesa y el íbice alpino. La descripción paleontológica de una especie de cabra datada alrededor de 120.000 años en Alemania, *Capra camburgensis* (TOEPFER, 1934) que combina caracteres de los dos taxones europeos concuerda también con esta última hipótesis.

Por otro lado, se han encontrado restos fósiles de cabra en la Península Ibérica con más de un millón de años (ALADOS & ESCÓS, 1986). Entre éstos se encuentra el reciente hallazgo de restos fósiles de una nueva especie del género con unos dos millones de años (Ma) de antigüedad que comparte algunos caracteres morfológicos primitivos con la actual *Capra ibex* (ARRIBAS & GARRIDO, 2008). También hay evidencias de la presencia del género *Capra* durante el Pleistoceno Inferior en Quibas y Venta Micena (CARLOS CALERO *et al.*, 2006). Todos estos nuevos estudios aportan valiosos datos que junto con los estudios moleculares ayudan a plantear nuevas hipótesis y evaluar otras ya existentes que permitan conocer mejor la historia evolutiva de este género. En este contexto, el estudio de ADN de cabras fósiles de distintas edad y diversas localizaciones puede aportar una información muy interesante para contrastar estas hipótesis.

1.2. La cabra montés en la Península Ibérica

La abundancia de cabra montés en nuestra Península durante el Paleolítico y Neolítico está demostrada por las numerosas pinturas rupestres encontradas que evidencian que desde antiguo esta especie fue muy buscada por cazadores (ESCÓS & ALADOS, 1997) y por los restos fósiles hallados en diversos yacimientos a través de toda la Península. También durante la Edad Media era muy abundante según crónicas cinegéticas de

la época (GARCÍA-GONZÁLEZ & HERRERO, 1999), siendo su cornamenta un preciado trofeo junto con otras partes del cuerpo. Poco a poco, sus poblaciones fueron sufriendo un fuerte declive, llegando a desaparecer de ciertas áreas (ALADOS & ESCÓS, 1986). La gran presión de caza a la que se veía sometida la especie junto con el desarrollo de la agricultura y el deterioro del hábitat llevaron a su desaparición del Pirineo francés a mitad del siglo XIX y a la extinción alrededor de 1890 de la subespecie *C. pyrenaica lusitanica* (CABRERA, 1914; FANDOS, 1991; PÉREZ *et al.*, 2002). Este marcado declive demográfico y reciente cuello de botella en poblaciones históricas también ha sido estudiado en cabras modernas mediante el análisis del gen DRB1 del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (AMILLS *et al.*, 2004).

Hasta 1905 no se llevaron a cabo medidas de protección de la especie. En 1918 se creó la primera reserva, el Parque Nacional de Ordesa en el valle de Arazas en los Pirineos (PÉREZ *et al.*, 2002) y en los años 50 y 60 se promovió un programa de conservación global para estabilizar un sistema nacional de refugios y reservas que permitieran la introducción y reintroducción de poblaciones (CRAMPE, 1990; PÉREZ *et al.*, 2002; ALADOS & ESCÓS, 1986). En la mayoría de estas áreas protegidas, las poblaciones se han recuperado sustancialmente en los últimos años (MANCEAU *et al.*, 1999b) favoreciendo a esta recuperación el abandono de las tierras de cultivo y la desaparición de los grandes depredadores (ESCÓS & ALADOS, 1997). Pero en los Pirineos, a pesar de la estricta protección, la población nunca aumentó; la última hembra adulta murió en 2000 (PÉREZ *et al.*, 2002). De esta última hembra se extrajo el ADN y fue clonada, siendo el primer animal nacido de una subespecie extinta (FOLCH *et al.*, 2009). Sin embargo, el individuo murió a las pocas horas.

Aunque recientemente varias poblaciones de cabra montés sufrieron un estallido de sarna sarcóptica, principalmente en el sur de España, (FANDOS, 1991; PÉREZ *et al.*, 2002), las poblaciones de las dos subespecies vivientes se encuentran en buen estado. De hecho, en algunos lugares, como por ejemplo ocurre en la Sierra de Madrid, las poblaciones derivadas de la reintroducción han aumentado tanto que pueden llegar a suponer un problema, alterando el equilibrio del ecosistema.

En este contexto, el estudio de ADN antiguo ha demostrado ser útil tanto en la genética de la conservación como para evaluar los planes de gestión de especies. Resultaría valioso disponer de datos sobre el comportamiento de las poblaciones de cabra en el pasado y los flujos genéticos que han tenido lugar entre las distintas subespecies para poder gestionarla correctamente en el presente. Las poblaciones con una historia de aislamiento reproductivo merecen condiciones de manejo separadas y la información genética que proporcionan las poblaciones antiguas

permite determinar si las poblaciones han estado genéticamente conectadas en un pasado reciente o si son evolutivamente distintas (VALDIOSERA, 2008).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material paleontológico de Chaves

Los fósiles de *Capra pyrenaica* estudiados en este trabajo pertenecen al yacimiento de Chaves (Huesca). Debido a la gran cantidad de restos de cabra montés hallados en este yacimiento de diferentes cronologías, a la situación geográfica de la cueva y a las condiciones de conservación de la misma, el estudio del material genético de dichas cabras resulta muy interesante. La cueva de Chaves se sitúa en el antiguo término de Bastarás, integrado actualmente en Casbas de Huesca, y situado en plena sierra de Guara (CASTAÑOS, 1993). La cueva fue objeto de excavaciones arqueológicas sistemáticas desde el año 1984 hasta 1992 por parte del Museo Arqueológico Provincial de Huesca y del Departamento de Prehistoria de la Universidad de Zaragoza. Lamentablemente, en 2009 se dio a conocer la noticia de que el yacimiento había sufrido graves daños quedando prácticamente destruido.

Desde el punto de vista estratigráfico se distingue un estrato superficial, un conjunto de niveles neolíticos y un conjunto de niveles paleolíticos separados de los anteriores por una costra estalagmítica (BADELLOU & RODANÉS, 1989). La monótona estructura faunística encontrada en los niveles paleolíticos permite calificar al Magdalenense de Chaves como un cazadero de cabra montés notablemente especializado. CASTAÑOS (2004) en su estudio denomina bucardo a la cabra montesa recuperada en estos niveles. El bucardo, antes de su extinción, poblaba esta zona, lo que permite asociar, a priori, los restos fósiles de cabra montés a dicha subespecie. Este dato se contrastará con los resultados del estudio genético.

2.2. Extracción del ADN

Para este estudio se muestrearon 40 fósiles de cabra montés pertenecientes al yacimiento de Chaves de diferentes cronologías, de los cuales, el ADN de 19 fue exitosamente amplificado.

La extracción de polvo de hueso de las muestras se realizó en el Museo Provincial de Huesca, donde se encuentra almacenado el material. Se extrajeron alrededor de 150 mg de polvo de hueso de cada muestra siguiendo los protocolos pertinentes para evitar contaminación. La posterior extracción de ADN de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de ADN antiguo del Centro Mixto UCM-ISCIH utilizando el protocolo basado en el sílice (YANG *et al.*, 1998). Se utilizó un control negativo de extracción por cada grupo de tres muestras.

2.3. Amplificación y secuenciación de los productos de PCR

Para este estudio se seleccionaron tres regiones no solapantes del citocromo b que suman un total de 264 pares de bases y se diseñaron *primers* para las mismas:

CpCytb1.1F (5'-ATAGCCACAGCATTCATAG-3'),
CpCytb1.1R (5'-TCAGATTCATTCGACTAGG-3'),
CpCytb1.2F (5'-GCACAAACCTAGTCGAATG-3'),
CpCytb1.2R (5'-TGGACTATGGCGAGGGC-3'),
CpCytb1.4F (5'-ACCTACTAACACTCACATG-3') y
CpCytb1.4R (5'-TGTTTTCAATGGTGCTAGC-3').

El estudio de marcadores neutros de rápida evolución como son los genes mitocondriales (y en el caso concreto de este estudio, el gen citocromo b) permite detectar la diferenciación genética en las poblaciones naturales.

La amplificación de estas secuencias fue llevada a cabo en reacciones de 25 µl con PCR buffer 1X (Naxo), 1 mM de MgCl₂ (Naxo), 0.2 µg/µl de albúmina de suero bovino (Sigma), 0.08 mM de dNTPs (Sigma), 0.2 µM de cada primer (forward y reverse)(biomers), 4 unidades de HotStarTaqDNA Polymerase(Naxo) y 3 µl de extracto de ADN. Se preparó un blanco de PCR por cada cuatro muestras (tres muestras con ADN y un blanco de extracción). La PCR se realizó en un laboratorio independiente (en el CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) y las condiciones de la misma fueron: 15 minutos de activación a 95°C, 54 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de hibridación a la temperatura correspondiente de cada primer y 30 segundos a 72°C, y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con Exo-SAP-IT y secuenciados por el servicio de secuenciación del CNIO.

2.4. Análisis de los datos

Se obtuvieron de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) distintas secuencias del citocromo b de cabras actuales de todas las especies que distingue la UICN excepto para *Capra walie*, para la que no se encontraron resultados. De *Capra pyrenaica* se obtuvieron todas las secuencias disponibles para estos fragmentos. También se obtuvieron secuencias del corzo siberiano *Capreolus pygargus* para utilizarlo como grupo externo.

Las secuencias fueron editadas y alineadas manualmente utilizando los programas SequencherTM 4.5 y MEGA versión 4 (TAMURA *et al.*, 2007) respectivamente. El programa BLAST se utilizó para comprobar el origen de la secuencia comparándola con otras secuencias previamente publicadas en el banco de genes.

Las secuencias se colapsaron a haplotipos utilizando el programa FaBox (VILLESEN, 2007). La red de haplotipos se generó utilizando el programa TCS (CLEMENTE *et al.*, 2000) para la estimación

de genealogías a partir de secuencias de ADN y la visualización de la distribución de haplotipos y su frecuencia. La diversidad haplotípica, Hd, (probabilidad de que dos haplotipos cogidos al azar en una población sean diferentes) y nucleotídica, Π, (grado medio de divergencia nucleotídica entre los individuos presentes en una población) se calculó por separado para las muestras del Neolítico y del Paleolítico utilizando el programa DNAsp (LIBRADO & ROZAS, 2009). El índice de diferenciación genética (F_{ST}) se calculó con Arlequin 2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

Las relaciones filogenéticas fueron estimadas utilizando una inferencia bayesiana. El modelo de sustitución nucleotídica más adecuado para este conjunto de datos se eligió utilizando el programa FindModel, una implementación telemática de Modeltest (POSADA & CRANDALL, 1998). El modelo evolutivo de estas secuencias, Hasegawa-Kishino-Yano + Γ, se utilizó para generar las probabilidades posteriores. El muestreo vía la cadena Markov Monte Carlo se llevó a cabo de acuerdo a lo implementado en el programa MrBayes (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001; RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) utilizando 20.000.000 iteraciones, realizando un muestreo cada 1.000 iteraciones con un desecho del 25% como burn-in. Cada nodo está validado por probabilidades posteriores.

3. RESULTADOS

3.1. Diversidad genética

Se definieron distintos haplotipos en base a los tres fragmentos del citocromo b estudiados que presentan las cabras montesas obtenidas del banco de genes y en las muestras de Chaves. La diversidad genética para la población de Chaves analizada en base a la diversidad haplotípica (Hd) y a la diversidad nucleotídica (Π) (NEI, 1987) se muestra en la tabla I. El índice de diferenciación genética (F_{ST}) calculado fue $F_{ST}=0,492$ para las poblaciones de cabra montesa actual/población de Chaves del Neolítico, $F_{ST}=0,478$ para las poblaciones de cabra montesa actual/población de Chaves del Paleolítico, $F_{ST}=0$ (no significativo) para las poblaciones de Chaves del Neolítico/Paleolítico.

Tabla I. Diversidad genética de las cabras de Chaves: Hd (diversidad haplotípica), P (diversidad nucleotídica), DE (desviación estándar).

- Genetic diversity of the goats from the site of Chaves: Hd (Haplotype diversity), P (Nucleotide diversity) and DE (standard deviation).

Edad	Nº muestras	Nº Haplotipos	Hd	DE de Hd	Π	DE de Π
Neolítico	7	3	0,524	0,209	0,00613	0,00278
Paleolítico	12	11	0,985	0,040	0,01077	0,00195
Total	19	13	0,877	0,074	0,00903	0,00185

En la figura 1 se muestra la red de haplotipos. Se diferencian dos grandes grupos, uno con las cabras actuales y otro con las cabras antiguas. Hay un haplotipo que lo presentan tanto cabras actuales como las paleolíticas y las neolíticas (Cp19).

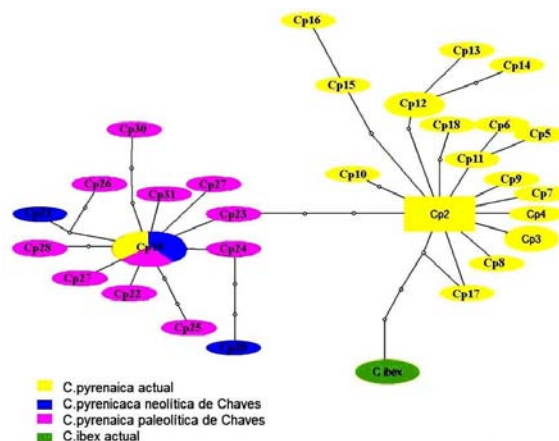


Fig. 1. Red de haplotipos de cabra montesa hallados en este estudio. A cada haplotipo se le nombra con un número. Cada segmento indica una sustitución nucleotídica.

- Haplotype network of wild goat found in this study. Each haplotype is named with a number. Each segment indicates a nucleotide substitution.

3.2. Estudio Filogenético

El árbol filogenético obtenido se presenta en la figura 2. Dentro de la filogenia, se observan tres clados principales basados en el citocromo b: el clado 1, que incluye a *Capreolus pygargus* como grupo externo (*outgroup*); el clado 2, que incluye a diferentes especies, entre ellas *C. hircus*, *C. caucasica*, *C. aegagrus*, *C. cylindricornis*, *C. sibirica* y *C. nubiana* y el clado 3, que se divide en dos subclados: el subclado 3A y el subclado 3B. El subclado 3A incluye a todas las cabras montesas actuales (en color amarillo) junto con *C. ibex* (en color verde). El subclado 3B incluye a todas las cabras montesas antiguas (paleolíticas en rosa y neolíticas en azul) junto con una sola secuencia de cabra montesa actual.

Los valores de confianza para cada nodo, representados en este árbol como probabilidades posteriores son los siguientes: el clado 1 muestra

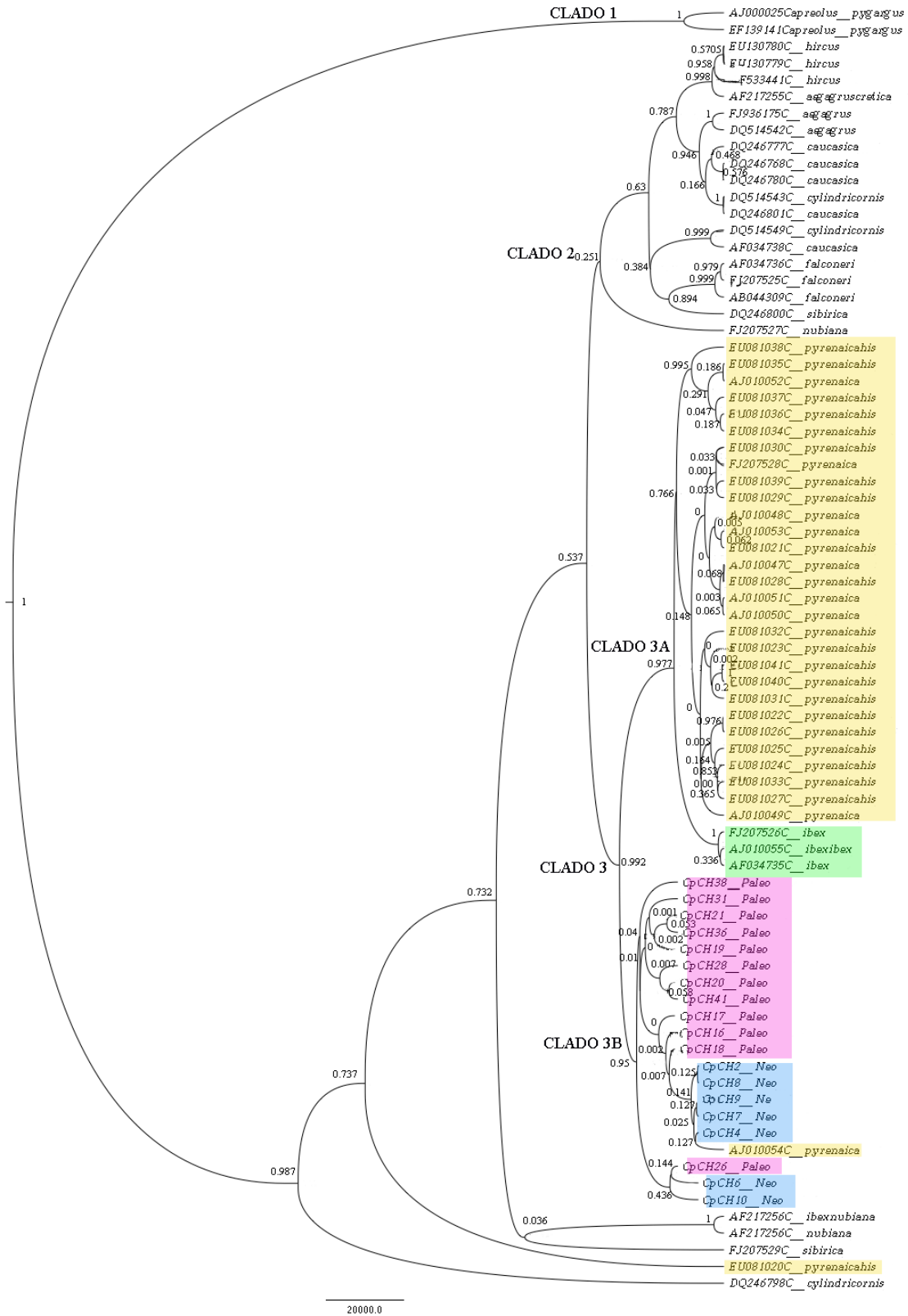


Fig. 2. Filogenia bayesiana del género *Capra* generada a partir de las secuencias de citocromo b definidas en este estudio usando *Capreolus pygargus* como grupo externo. Los valores de probabilidad posterior se indican en cada nodo.

- Bayesian phylogeny generated by using ancient and modern goats sequences and *Capreolus pygargus* sequences as outgroup. Posterior probabilities are shown in the nodes.

una probabilidad posterior de 1; el clado 2 de 0,251; el clado 3 de 0,992; el subclado 3A de 0,977 y el subclado 3B de 0,950. El nodo de separación entre el clado 2 y el clado 3 es de 0,537 y entre los subclados 3A y 3B es de 0,992.

4. DISCUSIÓN

4.1. Diversidad genética en la cabra montesa

De los haplotipos de *Capra pyrenaica*, hay uno que aparece tanto en la población paleolítica de Chaves como en la neolítica y que llega hasta nuestros días. Las secuencias obtenidas del banco de genes no siempre indicaban a qué subespecie de cabra montesa pertenecían o su localización geográfica. En concreto no se conoce la subespecie a la que pertenece la secuencia que presenta el mismo haplotipo encontrado en Chaves pero, debido a la ubicación geográfica del yacimiento, se puede asumir que pertenece a la subespecie *C. pyrenaica pyrenaica*, recientemente extinta (bucardo). Por lo tanto este haplotipo ya estaba presente en el Paleolítico.

Los haplotipos de cabra montesa neolíticos de Chaves están muy cercanos a los paleolíticos (como puede observarse en la red de haplotipos) lo que indica esta continuidad temporal de la población. El índice de diferenciación genética no muestra diferenciación poblacional entre las muestras del Paleolítico y las del Neolítico ($F_{st}=0$). Sin embargo, la diferenciación entre las poblaciones paleolítica y neolítica con respecto a la cabra montesa actual es altamente significativa (0,478 y 0,492 respectivamente). Así pues, la población de Chaves parece ser la misma a lo largo del tiempo y no debió sufrir flujos genéticos externos.

Las diversidades haplotípica y nucleotídica varían entre las poblaciones del Neolítico y el Paleolítico en Chaves. La diversidad genética que se observa en el Neolítico es considerablemente menor que en el Paleolítico. Esto probablemente indica que hubo uno o varios cuellos de botella entre estos dos periodos asociados a fluctuaciones demográficas que llevaron a un descenso poblacional. La gran cantidad de restos de cabra montesa encontrados en Chaves en los niveles paleolíticos (CASTAÑOS, 1993) sugieren la abundancia de la cabra montesa en el entorno del yacimiento durante ese periodo. Durante el Neolítico, en cambio, los restos de cabra montesa encontrados son menos numerosos y se observa un predominio claro de la ganadería doméstica frente a porcentajes claramente minoritarios de caza (CASTAÑOS, 2004). Es posible que en esta época la población de cabra montesa disminuyera de tamaño. Asimismo, la presencia de ganadería doméstica afecta directamente al hábitat de la cabra montés (ALADOS & ESCÓS, 1995) ya que causa cambios en la productividad y en la composición vegetal (RAWES, 1981), alterando

el ciclo natural de las plantas (CRAWLEY, 1983) y produciendo cambios en el hábitat físico y en el microclima (ALADOS & ESCÓS, 1995). Por lo tanto, es posible que la reducción en las poblaciones de cabra montesa fuera causada por la presencia de animales domésticos en su entorno que compitieran en recursos con ellas y que modificaran el entorno en el que vivían (ACEVEDO *et al.*, 2007). En los entornos de montaña neolíticos como Chaves, los grupos humanos se servían preferentemente de la ganadería para garantizar su sustento (BALDELLOU, 1987), por lo que el impacto de la ganadería en el entorno debió ser notable. Otras de las causas que podrían haber llevado a esta disminución en la diversidad genética observada son los procesos de endogamia y deriva genética causados por un posible aislamiento de la población. Por estas razones, se puede asumir que la diversidad genética del bucardo, recientemente extinto, fue disminuyendo desde el Paleolítico hasta la actualidad en esta localidad.

4.2. Estudio Filogenético

En el árbol filogenético (figura 2), se agrupan las muestras de Chaves neolíticas y paleolíticas junto con una secuencia de *Capra pyrenaica* actual (subclado 3B de la figura). La monofilia se soporta con un valor de probabilidad posterior de 0,950. Esto indica una continuidad temporal de la población de cabra montesa en Chaves que concuerda con los observado en el estudio de haplotipos.

El clado 3 indica una monofilia con un valor de probabilidad posterior de 0,992 para las cabras montesas y los íbices. Estudios realizados con anterioridad en cabras, tanto con ADN (región control y citocromo b de ADN mitocondrial y cromosoma Y) como con alozimas (HARTL *et al.*, 1992; MANCEAU *et al.* 1999a, 1999b, PIDANCIER *et al.*, 2006) también indican una distancia genética muy pequeña entre estas especies. Esta distancia a su vez es comparable con la encontrada comúnmente en otras subespecies de ungulados (HARTL *et al.*, 1992). Este estudio, por lo tanto, apoya también la hipótesis de una sola ola de inmigración para la llegada de la cabra salvaje a Europa. Los resultados obtenidos en este trabajo no sostienen la hipótesis basada en datos morfológicos que propone dos olas diferentes de inmigración desde el Cáucaso: primero una llegada poblacional hace unos 300.000 años que originó las poblaciones de *Capra ibex* y otra posterior ola de inmigración hace unos 80.000 años que dio origen a las poblaciones de *Capra pyrenaica* (CRAMPE, 1990; CRÉGUT-BONNOURE, 1992, 2009) según la cual estas dos especies no estarían emparentadas, a diferencia de lo que se observa en nuestro árbol. Los resultados obtenidos sí concuerdan, en cambio, con el escenario propuesto por otros autores (HARTL *et al.*, 1992; MANCEAU *et al.*, 1999a, 1999b, PIDANCIER *et al.*, 2006) en el que tuvo lugar una ola de inmigración de cabra salvaje

en Europa durante el periodo entre glaciaciones Riss-Würm (ENGLÄNDER, 1986) seguido de un proceso de separación geográfica y especiación de las dos especies. La descripción paleontológica de una especie de cabra, datada alrededor de 120.000 años en Alemania –*Capra camburgensis* (TOEPFER, 1934)– que combina caracteres de los dos taxones europeos, concuerda también con esta última hipótesis. Es necesario añadir, sin embargo, que el íbice ha sufrido recientemente un severo cuello de botella, por lo que su diversidad genética podría estar muy empobrecida; sería necesario ampliar el estudio con material fósil de esta especie.

Las cabras montesas actuales se agrupan en un solo clado monofilético junto con los íbices (subclado 3A), mientras que todas las cabras antiguas se agrupan en un clado monofilético distinto (subclado 3B). Esto indica que las cabras montesas actuales y los íbices comparten un mismo ancestro común distinto al de las cabras montesas antiguas de Chaves, lo que sugiere que las poblaciones actuales no son descendientes directas de las poblaciones del Paleolítico y el Neolítico del norte de la Península. En el estudio de MANCEAU *et al.* (1999a), también se observa que *C. ibex* aparece más emparentada con cabras montesas de subespecies diferentes al bucardo que con éste. Ellos proponen en su estudio que la población de los Pirineos pudo separarse del resto de la metapoblación justo después de la inmigración o poco después. Pero para poder testar esta hipótesis sería necesario disponer de una amplia distribución geográfica y cronológica del registro fósil de bucardo, así como un tamaño de muestra significativamente elevado de cabras montesas de otras subespecies e íbices actuales. Finalmente, la recuperación del genoma mitocondrial completo de estas muestras permitiría estimar la tasa de mutación y los tiempos de divergencia entre estas dos especies.

A pesar de la valiosa información que proporcionan las secuencias analizadas en el presente trabajo, dicha información, utilizada para construir el árbol, es parcial y puede que no haya sido lo suficientemente representativa como para resolver correctamente todos los clados. Estudios futuros con más secuencias que incluyesen la totalidad del ADN mitocondrial y marcadores nucleares, principalmente del cromosoma Y, podrían ayudar a resolver de forma más clara la filogenia.

5. CONCLUSIONES

El presente estudio llega a la conclusión, al igual que otros estudios moleculares anteriores (HARTL *et al.*, 1990, 1992; MANCEAU *et al.* 1999a, 1999b; PIDANCIER *et al.*, 2006) de que es preciso revisar la taxonomía del género *Capra*. Los resultados obtenidos también sostienen la hipótesis de una sola ola de migración de la cabra salvaje en Europa con el subsecuente proceso de

especiación, en contraposición a la teoría de dos olas independientes de inmigración del género *Capra* en Europa.

En el yacimiento de Chaves se observa una continuidad poblacional desde el Paleolítico hasta el presente, sin evidencias de flujo genético externo. Esta población sufrió además una disminución de su diversidad genética durante el Neolítico que debió continuar tanto en esta población como en las restantes poblaciones de *C. p. pyrenaica* hasta el presente llegando a producirse la extinción del bucardo. Es probable que, debido a algún aislamiento por distancia, la población de Chaves pueda haber evolucionado alopatricamente causando la diferenciación que se observa con las cabras montesas actuales. Esto también explicaría la pérdida de diversidad genética causada por endogamia y deriva genética.

Futuros estudios que incluyeran un rango más amplio y una mayor distribución cronológica de cabras montesas, así como de otras especies emparentadas, darían una mejor resolución de la filogenia, testando los posibles cuellos de botella que hubieran podido ocurrir durante la transición Paleolítico/Neolítico. El estudio de otros marcadores nucleares, principalmente del cromosoma Y, aportarían una información muy interesante y valiosa, ya que las cabras macho muestran menor grado de filopatría que las hembras.

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría dar las gracias al Museo Provincial de Huesca por permitirnos muestrear los fósiles del yacimiento de Chaves, a todos nuestros compañeros del Centro Mixto UCM-ISCIII por la ayuda y el apoyo mostrados, en especial a Asier Gómez, a Jaime Lira y a Ricardo Rodríguez, al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas por permitirnos el uso de sus instalaciones y a los revisores del manuscrito, Jordi Jordana y Jorge Cassinello Roldán, por sus comentarios y aportaciones.

Este estudio ha sido financiado con el proyecto CGL2009-12703-C03-03 del Ministerio de Ciencia e Innovación y, a su vez, I.Ureña y M.A. Galindo-Pellicena disfrutaron de dos becas FPI (BES-2008-008496 y BES-2007-15377).

Recibido el día 28 de febrero de 2011

Aceptado el día 12 de junio de 2011

Publicado en formato electrónico el día 6 de octubre de 2011

BIBLIOGRAFÍA

- ALADOS, C.L. & ESCÓS, J. 1986. Estudio preliminar de las poblaciones de cabra montés de la zona oriental de Sierra Nevada (*Capra pyrenaica*). *Boletín del Instituto de Estudios Almeriense*, **6**: 21-23.

- AMILLS, M., JIMÉNEZ, N., RICCARDI, A., FERNÁNDEZ-ARIAS, A., GUIRAL, J., BOUZAT, J.L., FOLCH, J. & SÁNCHEZ, A. 2004. Low diversity in the major histocompatibility complex class II DRB1 gene of the Spanish ibex, *Capra pyrenaica*. *Heredity*, **93**: 266-272.
- ACEVEDO, P., CASSINELLO, J. & GORTÁZAR, C. 2007. The Iberian ibex is under an expansion trend but displaced to suboptimal habitats by the presence of extensive goat livestock in central Spain. *Biodiversity and Conservation*, **16**: 3361-3376.
- ARRIBAS, A. & GARRIDO, G. 2008. *Los representantes más antiguos del género Capra (Bovidae, Artiodactyla, Mammalia) en el registro euroasiático (Fonelas P-1, Cuenca de Guadix, España)*. En: A. Arribas, Ed. Vertebrados del Plioceno superior terminal en el suroeste de Europa: Fonelas P-1 y el Proyecto Fonelas. Instituto Geológico y Minero de España, serie de Cuadernos del Museo Geominero, **10**: 461-473.
- BALDELLOU, V. 1987. Algunas consideraciones sobre el origen de la agricultura en el Altoaragón. *Bolskan*, **4**: 57-66.
- BALDELLOU, V. & RODANÉS, J.M. 1989. Un objeto óseo decorado de la cueva de Chaves (Bastarás-Huesca). *Bolskan: Revista de arqueología del Instituto de Estudios Altoaragoneses*, **6**: 15-32.
- CABRERA, A. 1911. The subspecies of the Spanish Ibex. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **LXVI**: 963-977.
- 1914. *Fauna ibérica. Mamíferos*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- CARLOS CALERO, J. A., VAN DER MADE, J. MANCHEÑO, M.A., MONTROYA, P., ROMERO, G. 2006. *Capra alba* Moyà-Solà, 1987 del Pleistoceno Inferior de la Sierra de Quibas (Albanilla, Murcia, España). *Estudios Geológicos*, **62** (1): 571-578.
- CASTAÑOS, P. 1993. Estudio de los macromamíferos de los niveles paleolíticos de Chaves (Huesca). *Bolskan*, **10**: 9-30.
- 2004. Estudios arqueozoológico de los macromamíferos del Neolítico de la cueva de Chaves (Huesca). *SALDVIE*, **4**: 125-171.
- CLEMENTE, M., POSADA, D. & KRANDALL, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**: 1657-1659.
- CLOUET, M. 1979. Note sur la systématique du bouquetin d'Espagne. *Bull. Soc.d'Hist.Nat. de Toulouse: Museum d'Histoire Naturelle de Toulouse*, **115**: 269-277.
- COUTURIER, M.A.J. 1962. *Le bouquetin des Alpes*. Privately printed. Grenoble.
- CRAMPE, J.P. 1990. Le bouquetin iberique. Elements pour une reintroduction au versant nord des Pyrénées occidentales. *Documents Scientifiques Du Parc National Des Pyrénées*, **26**: 187.
- CRAWLEY, M.J. (1983). *Herbivory: The dynamics of animal-plant interactions*. Blackwell Scientific Publications. Oxford
- CRÉGUT-BONNOURE, E. 1992 *Pleistocene tahrs, ibexes and chamois of France*. In: Ongulés/Ungulates 91. F.SPITZ, G.JANEAU, G.GONZÁLEZ & S.AUGLANIER, Eds., págs 49-56. SFEPM-IRGM. Paris-Toulouse.
- 2009. Biochronologie et grands mammifères au Pléistocène moyen et supérieur en Europe occidentale: l'apport des genres *Hemitragus* et *Capra*. *Quaternarie*, **20** (4): 481-508.
- ENGLÄNDER, H. 1986. *Capra pyrenaica*, Schinz, 1838 – *Spanischer Steinbock*. In: Handbuch der Säugetiere Europas, Vol 2III. J.NIETHAMMER & F. KRAPP, Eds. Págs 405-422. Aula-Verlag, Wiesbaden.
- ESCÓS, J. & ALADOS, C. L. 1997. Cabra montés. *Biológica*, **7**: 30-41.
- FANDOS, P. 1991. *La cabra montés Capra pyrenaica en el Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y las Villas*. CONA-CSIC, Madrid.
- FOLCH, J., COCERO, M.J., CHESNE, P., ALABART, J.L., DOMÍNGUEZ, V., COGNIE, Y., ROCHE, A., FERNÁNDEZ-ARIAS, MARTÍ, J.I., SÁNCHEZ, P., ECHEGOYEN, E., BECKERS, J.F., SÁNCHEZ BONASTRE, A. & VIGNON, X. 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, **71**: 1026-1034.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, R. & HERRERO, J. 1999. El bucardo de los Pirineos: historia de una extinción. *Galemys*, **11**(1): 17-26.
- HARTL, G.B., BURGER, H., WILLING, R. & SUCHENTRUNK, F. 1990. On the biochemical systematics of the Caprini and Rupicapri. *Biochemical Systematics and Ecology*, **18**: 175-182.
- HARTL, G.B., MENEGUZ, P.G., APOLLONIO, M., MARCO-SANCHEZ, I., NADLINGER, K. & SUCHENTRUNK, F. 1992. *Molecular systematics of ibex in Western Europe*. Congreso internacional del Género Capra en Europa, Ronda, 21-26.
- HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**: 447-448.
- IUCN (2010) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <www.iucnredlist.org>. [Consulta: 5-5-2010].
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**: 1451-1452.
- MANCEAU, V., CRAMPE, J.P., BOURSOT, P. & TABERLET, P. 1999a. Identification of evolutionary significant units in the Spanish wild goat, *Capra pyrenaica* (Mammalia, Artiodactyla). *Animal Conservation*, **2**: 33-39.
- MANCEAU, V., DEPRÉS, L., BOUVET, J. & TABERLET, P. 1999b. Systematics of the Genus *Capra* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**: 504-510.
- NEI, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- PÉREZ, J.M., GRANADOS, J.E., SORIGUER, R.C., FANDOS, P., MARQUEZ, F.J. & CRAMPE, J.P. 2002. Distribution status and conservation problems of the Spanish Ibex, *Capra pyrenaica* (Mammalia: Artiodactyla). *Mammal Review*, **32**: 26-39.
- PIDANCIER, N., JORDAN, S., LUIKART, G. & TABERLET, P. 2006. Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia:Artiodactyla): Discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **40**: 739-749.
- POSADA, D. & CRANDALL, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**: 817-818.
- RAWES, M. 1981. Further results of excluding sheep from high level grassland in the north Pennines. *Journal of Ecology*, **69**: 651-669.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**: 1572-1574.
- SCHALLER, G.B. 1977. *Mountain monarchs: Wild*

- Sheep and Goats of the Himalaya*, University of Chicago Press, Chicago.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. *Arlequin: a software for population genetics data analysis*. User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- SHACKLETON, D.M. 1997. *Wild Sheep and Goats and their Relatives: Status Survey and Conservation Action Plan for Caprinae*. IUCN, Gland.
- TOEPFER, V. 1934. Ein diluviales Steinbockgehörn aus Thüringen. *Paläontol. Zeitschr*, **16**: 276-281.
- SIMPSON, G.G. 1945. The principles of classification of mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **85**: 1-350.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. 2007. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596-1599. <<http://www.kumarlab.net/publications>> [Consulta: 3-10-2011].
- VALDIOSERA, C. 2008. *Cambios temporales y geográficos en la estructura genética de carnívoros del Pleistoceno y el Holoceno a través del ADN antiguo*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- VILLESÉN P. 2007. Fabox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 965-968.
- YANG, D.Y., ENG, B., WAYE, J.S., DUDAR, J.C. & SAUNDERS, S.R. 1998. Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology*, **105**: 539-543.
- ZALIKHANOV, M.C. 1967. *Tur in Kabardin-Balkaria*. Kabardin-Balkarian Publishers, Nal'chik.