

Máster en Investigación básica y aplicada en Recursos Cinegéticos

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Estructura y diversidad genética de las poblaciones de topillo campesino (*Microtus arvalis*) en España



Alumno: Julio César Domínguez Villaseñor

Tutor académico: Jesús García

Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC)

Univ. Castilla- La Mancha



Contenido

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Conocimientos generales sobre la especie y antecedentes del estudio	4
Proceso de colonización regional de <i>M. arvalis</i>	5
Asociación con factores ambientales.....	6
Conclusiones de la problemática en Castilla y León.....	7
Variación intraespecífica del género <i>Microtus</i>	8
Filogeografía del topillo campesino en Europa	9
El topillo campesino y la genética del paisaje	10
Justificación y objetivos	10
Material y Métodos	12
Recogida de muestras	12
Extracción de ADN.....	15
Amplificación y purificación de ADN.....	16
Secuenciación del ADN	17
Análisis.....	17
Diferenciación genética.....	17
Test de Mantel	18
Estructura Genética poblacional	18
Resultados	21
Estructura Genética poblacional	24
Análisis de diferenciación genética entre pares de poblaciones	25
Discusión.....	28
Diversidad genética.....	28
Neutralidad Selectiva	30
Estructura genética poblacional	31
Conclusiones.....	34
Bibliografía	36

Resumen

El topillo campesino (*Microtus arvalis*) se ha convertido en una especie de interés nacional debido al impacto socioeconómico que lleva asociado sus explosiones demográficas. Un mejor entendimiento de la especie en todos sus ámbitos podría significar una mayor comprensión de las circunstancias que han propiciado esta situación. El siguiente estudio tiene como objetivo una caracterización genética, a través del análisis del ADN mitocondrial, de las poblaciones que habitan la mitad norte de la península Ibérica. Se proponen tres escenarios de colonización basados en parámetros de diferenciación genética entre: a) poblaciones localizadas al Norte y al Sur del valle del Duero, b) poblaciones de distribución original/distribución reciente y c) poblaciones distribuidas al este de la región/distribuidas al Oeste. Los resultados aportados tras la conclusión del mismo nos permiten discernir una clara diferenciación genética entre las poblaciones localizadas a ambos lados del río Duero, sugiriendo un efecto de barrera geográfica, así como una posible zona de contacto. No encontramos evidencias suficientes para apoyar los otros dos escenarios de colonización, por lo que se hace un llamamiento a nuevos estudios para una mejor comprensión de la realidad.

Palabras clave: *Microtus arvalis*, ADN mitocondrial, genética de poblaciones, filogeografía.

Introducción

Conocimientos generales sobre la especie y antecedentes del estudio

El topillo campesino (*Microtus arvalis* Pallas, 1778) es una especie de pequeño roedor de la familia *Arvicolinae* (Amori et al. 2008) Habita principalmente áreas de pastizales a lo largo de un rango de distribución continuo desde la costa Atlántica de Francia hasta Rusia central, con poblaciones aisladas en la península ibérica y poblaciones introducidas en las islas Orcadas (Mitchell-Jones et al. 1999) (Figura 1). Esta especie de origen euroasiático (Jaarola, Martinkova et al. 2004), únicamente habría penetrado en la península Ibérica hasta la Cordillera Cantábrica, Sistemas Central e Ibérico y Pirineos (Luque-Larena, Mougeot et al. 2013) donde se mantuvo aislada en áreas de montaña y donde se llegó a diferenciar formando una subespecie que recibe el nombre de *Microtus arvalis asturianus* (Miller 1908). La subespecie *asturianus* es algo mayor en tamaño que la subespecie nominal (*Microtus arvalis arvalis*) pero se diferencia en rasgos muy leves de ésta, al igual que de *Microtus arvalis meridionalis*, subespecie que habita los Pirineos y de la que algunos autores niegan su existencia por su semejanza con la subespecie europea (Palomo y Gisbert 2002).



Fig 1. Rango de distribución de *M.arvalis* (figura elaborada a partir de datos de la IUCN. www.iucnredlist.org)

El topillo campesino es un roedor principalmente herbívoro cuyos hábitos alimenticios se desarrollan en superficie, aunque también crea unas estructuras subterráneas denominadas huras para la reproducción y el refugio. Se alimenta de especies herbáceas verdes, ocupando cualquier tipo de hábitat, llano o montañoso, en el que abunde este tipo de vegetación (Amori et al. 2008; Gonzalez-Esteban and Villate, 2007; Jacob et al. 2013). Se trata de una especie prolífica que en condiciones favorables es capaz de reproducirse durante todo el año, teniendo las hembras una descendencia de entre 2 y 11 crías. Las hembras alcanzan la madurez sexual al cabo del primer mes de vida, y tienen una gestación de unas 3 semanas, por lo que la existencia de nuevas generaciones es posible en menos de dos meses. Es una especie de comportamiento territorial en baja abundancia pero que en condiciones de alta densidad llega a adaptarse a vivir en colonias de individuos emparentados, lo que hace posible unos máximos demográficos que superan los 2000 individuos por hectárea (González-Esteban and Villate, 2007; Jacob et al. 2013). Se tiene constancia de que la especie presenta ciclos de población multianuales, con picos demográficos cada 3 o 5 años, pero pudiendo prolongarse este intervalo hasta los 10 (Delattre et al. 1999; Mackin-Rogalska and Nabaglo, 1986; Tkadle and Stenseth, 2001).

Su amplia distribución, la dieta herbívora y las altas densidades que puede alcanzar en años de picos poblacionales hacen que el topillo campesino esté considerado a nivel europeo una de las especies más dañinas para la agricultura (Jacob y Tkadlec, 2010).

Proceso de colonización regional de *M. arvalis*

Hasta mediados del S. XX la distribución del topillo campesino en España se encontraba restringida a unas pocas áreas de montaña de la mitad Norte de la península Ibérica (Rey. 1973). Entre principios de 1970 y finales de esa década se obtienen datos de presencia de la especie a ambos márgenes del río Duero (N y S), primero en cotas más altas y, progresivamente, a bajas altitudes (Luque Larena et al. 2013). A finales de los años 90 el proceso de colonización de la cuenca del Duero era casi completo y algunos trabajos recientes (González-Esteban & Villate 2007) han confirmado la presencia de la

especie en toda la región, hasta el punto de catalogarse como una especie plaga (Jacob y Tkadlec, 2010; Luque-Larena et al. 2013).

La estrategia a seguir desde principios de los 80 para minimizar los daños provocados en agricultura por parte del topillo ha consistido principalmente en el control químico, mediante la utilización de rodenticidas anticoagulantes o mediante la destrucción y quema de la vegetación capaz de albergar sus poblaciones. Estas medidas no sólo no han tenido el éxito esperado, sino que además han supuesto un daño importante para otras especies no diana y para el medio ambiente en general (ASAJA 2012; Luque-Larena et al. 2013; Sánchez-Barbudo et al. 2012; Vidal et al. 2009). Si a todo ello le sumamos su capacidad como reservorio de enfermedades zoonóticas como la Tularemia (Vidal et al. 2009; García San Miguel et al. 2013), parece más que justificado un mejor conocimiento de la especie en nuestro entorno más inmediato.

Asociación con factores ambientales

En los últimos años se han realizado diversos estudios intentando predecir la temporalidad de las explosiones demográficas de topillo campesino. En concreto, se ha tratado de relacionar la aparición de explosiones demográficas con factores climáticos o medioambientales como el clima (Tesis Jareño et al. 2014, Capítulo 2) o la vegetación (Tesis Jareño et al. 2014, Capítulo 3). En ninguno de los casos existió una fuerte correlación con estos factores. En relación con el clima, se encontró una tendencia favorable hacia años de explosión demográfica con otoños e inviernos más cálidos y lluvias primaverales más abundantes. La correlación fue negativa en cuanto a los veranos secos y a las lluvias otoñales. Esto podría parecer contradictorio en un principio, pero se ha estudiado el efecto de las inundaciones en la formación de huras, siendo esta una medida eficaz para el control poblacional de la especie (Arenaz. 2001). Por lo tanto, bajos los diferentes escenarios climáticos estudiados, el rango de distribución de *M.arvalis* se mantendría en su área original.

Del estudio realizado por Jareño (Tesis Jareño et al. 2014, Capítulo 3). relacionando la abundancia de topillos con el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) se concluyó que los años con gran abundancia de topillos mostraban índices más altos para el NDVI en verano, pero más bajos para el otoño previo, no encontrándose efectos significativos para los periodos de primavera y verano.

Al contrario que con el clima, se encontraron fuertes relaciones entre los cambios en los usos del suelo y la ocupación del topillo campesino (Tesis Jareño et al. 2014, Capítulo 2). De hecho, el incremento en los cultivos “de forrajeo” (alfalfa, cereales y otros cultivos de regadío) durante las últimas décadas parece haber sido la causa más probable de la expansión del topillo campesino en Castilla y León. Estos cultivos proveerían de alimento y refugio a la especie en períodos secos, mitigando las drásticas consecuencias sobre las poblaciones de la especie y manteniendo unas altas densidades durante todo el año. Adicionalmente, se encontró una relación positiva entre la reducción de la trashumancia y la expansión de los topillos. La explicación que se le dio a este fenómeno fue que el pastoreo perjudica a los topillos a la hora de construir sus huras debido a la compactación del suelo provocada por el tránsito del ganado (Evans et al. 2006; Steen et al. 2005; Wheeler. 2008; Torre et al. 2007).

Conclusiones de la problemática en Castilla y León

Tras la colonización de las llanuras agrícolas de Castilla y León, el topillo empezó a exhibir ciclos de población multianuales a nivel regional que no se habían producido hasta la fecha. Aparentemente, la especie colonizó un área nueva que le permitía exhibir ciclicidad y producir explosiones demográficas (Delibes. 1989; Luque-Larena et al. 2013). Estas explosiones demográficas han podido ser la causa del rápido aumento en su área de distribución en años de pico poblacional, sobrepasando las barreras geográficas en su camino (Ligvoet and van Wijngaarde, 1994; Luque-Larena et al. 2013).

La homogeneización del medio agrario parece haber contribuido a la expansión del topillo campesino (González Esteban et al. 1995), ya que se conoce que hábitats con menor diversidad son más susceptibles de ser

colonizados por nuevas especies que hábitats más complejos (Ligvoet and van Wijngaarde, 1994). La simplificación de este medio también llevaría aparejada una disminución en el número y diversidad de los depredadores, por no encontrar refugio y hábitat adecuados de reproducción (de Redon et al. 2010; Delattre et al. 1999).

Variación intraespecífica del género *Microtus*

Para poder hablar con propiedad de la subespecie que habita la meseta norte de la península ibérica es necesario una breve revisión de la filogenia del género. El tratamiento del género *Microtus* se caracteriza por su falta de consistencia entre distintos estudios (Musser and Carleton. 1993). El número de especies varía en función de las consideraciones de los autores, y muchas de ellas se han propuesto en los últimos años (Golenishchev et al. 2003; Kefelioglu and Krystufek. 1999; Krystufek and Kefelioglu. 2001; Yigit and Colak. 2002). Mientras que los estudios morfológicos (a partir de cráneos y análisis de la dentición) muestran una gran variedad intraespecífica, una alta convergencia adaptativa y algunos pares de especies hermanas (Chaline et al. 1999; Chaline and Graf. 1988; Nadachowski and Zagorodnyuk. 1996; Zakrzewski. 1985), la evolución del cariotipo, por el contrario, parece no acoplarse con los morfos (Baskevich. 1996; Suchentrunk et al. 1998). Una de las razones de esta falta de consistencia es que el género *Microtus* presenta una de las tasas más altas de variación cariotípica en mamíferos (Maryama and Imai. 1981; Modi. 1987).

Se han realizado numerosas aproximaciones filogenéticas mediante la aplicación de herramientas moleculares, usando alozimas (Suchentrunk et al. 1998), análisis de restricción enzimática de ADN mitocondrial (DeBry. 1992) y RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico) (Potapov et al. 1999) de un número limitado de especies de *Microtus*. Sin embargo, los estudios más detallados se han hecho mediante el análisis de las secuencias del gen mitocondrial citocromo B (Conroy and Cook 1999, 2000a; Conroy et al 2001). Todos los resultados arrojan una alta variación intraespecífica del gen mitocondrial citocromo B, sugiriendo incluso la existencia de especies crípticas, por lo que sigue siendo necesaria una mejor reconstrucción de la filogenia de este género.

Filogeografía del topillo campesino en Europa

En el estudio genético de muchas especies es frecuente encontrar un alto grado de estructuración genética espacial. Este hecho se atribuye normalmente a la especiación por aislamiento geográfico de poblaciones que encontraron refugio durante las glaciaciones, y a su posterior recolonización en períodos más cálidos (Hewitt, 2000). En el topillo campesino existe un debate abierto sobre el origen de la especie y su posterior expansión a través de Europa. Mientras que autores como Haynes (Haynes et al. 2003) defienden el clásico modelo de colonización general (expansión desde diferentes refugios localizados al sur del mediterráneo), Fink y Haeckel tienen una visión contraria. Para ellos, la diversidad genética encontrada a lo largo de Europa sugiere una supervivencia glacial del topillo fuera de los refugios clásicos y una colonización pre-glacial desde el Noreste al Suroeste de Europa (Fink et al. 2004; Haeckel et al. 2005). Lo que parece claro hasta la fecha, es la existencia de una clara estructura filogeográfica con cinco linajes evolutivos bien diferenciados. El linaje occidental, el oriental, el central, el de Freiburg (Alemania) y el italiano (I) (Tougaard et al. 2008). Los datos moleculares aportados por Tougaard et al (2008) indican que la divergencia poblacional entre los diferentes linajes europeos, entre los que se encuentra el clado ibérico sucedió hace 86.000 años y, por lo tanto, anterior al último máximo glacial. Además, se establece Europa central como la cuna de los diferentes linajes de *M. arvalis*. Estos cálculos corroboran los hallazgos de registros fósiles de más de 32.000 años de antigüedad en Jura, Francia (Chaline et al. 1995). Así pues, estos últimos estudios sugieren que la supervivencia de *M. arvalis* durante el último periodo glacial podría haber ocurrido en parches restringidos y hábitats favorables a lo largo de todo su rango geográfico, más que en determinados refugios localizados al Norte o al Sur del Mediterráneo. La historia evolutiva de la subespecie *asturianus* puede ser clave en este contexto, pese a que hasta la fecha no existe ningún estudio detallado sobre las características genéticas de esta subespecie.

El topillo campesino y la genética del paisaje

El presente trabajo aborda el estudio genético de las poblaciones de topillo campesino en España desde una perspectiva propia de la genética del paisaje. La meta última en esta disciplina es entender como el paisaje afecta a la distribución espacial de la variación genética en los organismos, y a la identificación de los posibles obstáculos (barreras geográficas) al movimiento de los individuos (Manel et al. 2003). La genética del paisaje nos permite entender también como los elementos del paisaje afectan a los patrones de dispersión (Frantz et al. 2010) y, apoyándonos con datos históricos y potentes métodos de análisis, nos pueden ayudar a reconstruir las rutas de invasión de algunas especies (Konecny et al. 2013)

Justificación y objetivos

Con los datos existentes hasta la fecha, parece indiscutible que el proceso de colonización de Castilla y León por parte del topillo campesino se produjo desde las áreas periféricas de montaña (Sistema central, Sistema Ibérico y Cordillera Cantábrica) hasta las partes centrales de menor altitud, probablemente a través de los valles de los ríos (Delibes & Brunett-Lecomte 1980), y que la ruta de colonización se inició en el Este y fue avanzando hacia el Oeste (González-Esteban et al. 1995, Luque-Larena et al. 2013).

Nuestra intención en este trabajo consiste en la realización del primer estudio para caracterizar la diversidad genética de las poblaciones de *M. arvalis asturianus* en la península ibérica. Intentaremos además arrojar luz sobre los posibles escenarios de colonización de esta especie en la cuenca del Duero desde la segunda mitad del siglo XX hasta la actualidad, mediante la utilización de técnicas moleculares y el estudio de las relaciones filogenéticas. En este sentido, y puesto que la dirección del rango de expansión de una especie puede ser explicada mediante un gradiente en la diversidad genética en las poblaciones causado por una serie de eventos fundadores durante el proceso de colonización (Ibrahim et al. 1996), calcularemos los parámetros básicos de diversidad genética y grado de diferenciación entre poblaciones.

Los resultados derivados de este estudio, no sólo nos proporcionarán información acerca del proceso de colonización de la especie, sino que se podrán inferir múltiples hipótesis de las razones por las que se produjo y como se produjo. En este sentido, partimos de una serie de predicciones:

- a) Los ríos, en especial aquellos de gran cauce, pueden haber actuado como barrera geográfica (a su través) al flujo genético y, a su vez, como corredores de dispersión (a lo largo de las riberas) en *Microtus arvalis*. Por ello, esperamos encontrar una estructura genética bien diferenciada entre las poblaciones muestreadas al Norte del principal río de la meseta norte (río Duero) y las poblaciones localizadas al sur.

- b) Basándonos en los datos de presencia de la especie a lo largo del tiempo recogidos en Luque-Larena (Luque-Larena et al. 2013), esperamos encontrar cierto grado de diferenciación entre las poblaciones de las que se tiene constancia que presentan una distribución original respecto a aquellas que han colonizado los territorios en las últimas décadas.

- c) Por último, y de acuerdo también a estudios previos (González-Esteban et al. 1995), esperamos encontrar un patrón de colonización en dirección este-oeste que estaría caracterizado por una mayor diversidad genética hacia el este de la distribución (poblaciones de origen) que hacia el oeste (poblaciones derivadas).

Material y Métodos

Para este estudio, partimos de los datos de presencia de la especie a lo largo del tiempo recogidos en el trabajo de Luque-Larena et al (2013)(Figura 2).

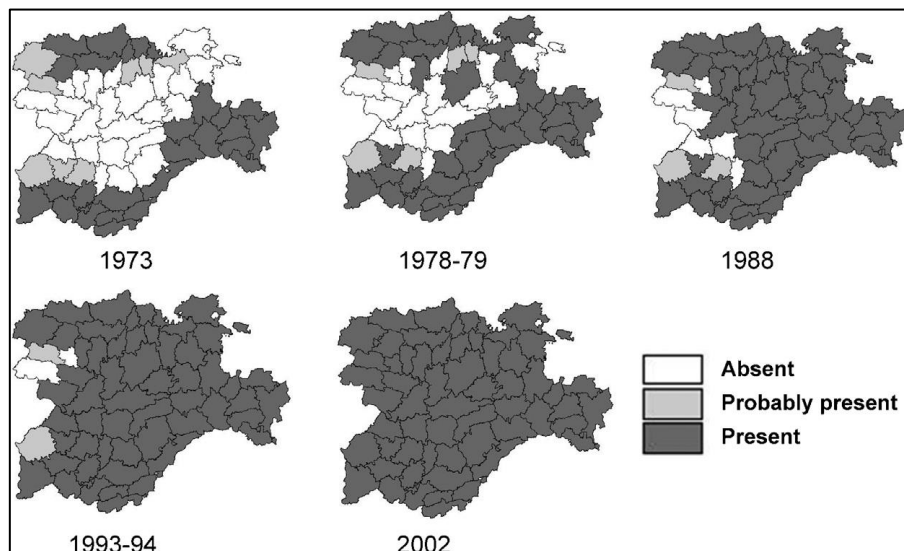


Figura 2. Proceso de colonización de *M.arvalis* en Castilla y León en 29 años. El mapa presenta presencia/ausencia de *M.arvalis* en comarcas agrarias (n=59) de acuerdo a los registros publicados. (Rey 1973; Delibes & Brunett-Lecomte 1980; Palacios et al. 1988; González-Esteban et al., 1994, 1995; González-Esteban & Villate 2002) (Figura extraída de Jareño et al. 2014, Tesis Doctoral).

Recogida de muestras

En el marco de un proyecto de investigación (REF: CGL BOS2011-30274) llevado a cabo en el Instituto de Investigación de Recursos Cinegéticos, (IREC) se procedió a la captura de ejemplares vivos de *Microtus arvalis* mediante trampa “Sherman”. Se recolectaron 790 ejemplares de topillo campesino procedentes de 31 localidades de Castilla y León, así como de una población (Grañón) situada en la comunidad de La Rioja y otra (Bello) en la comunidad de Aragón (Figura 3, Tabla 1).

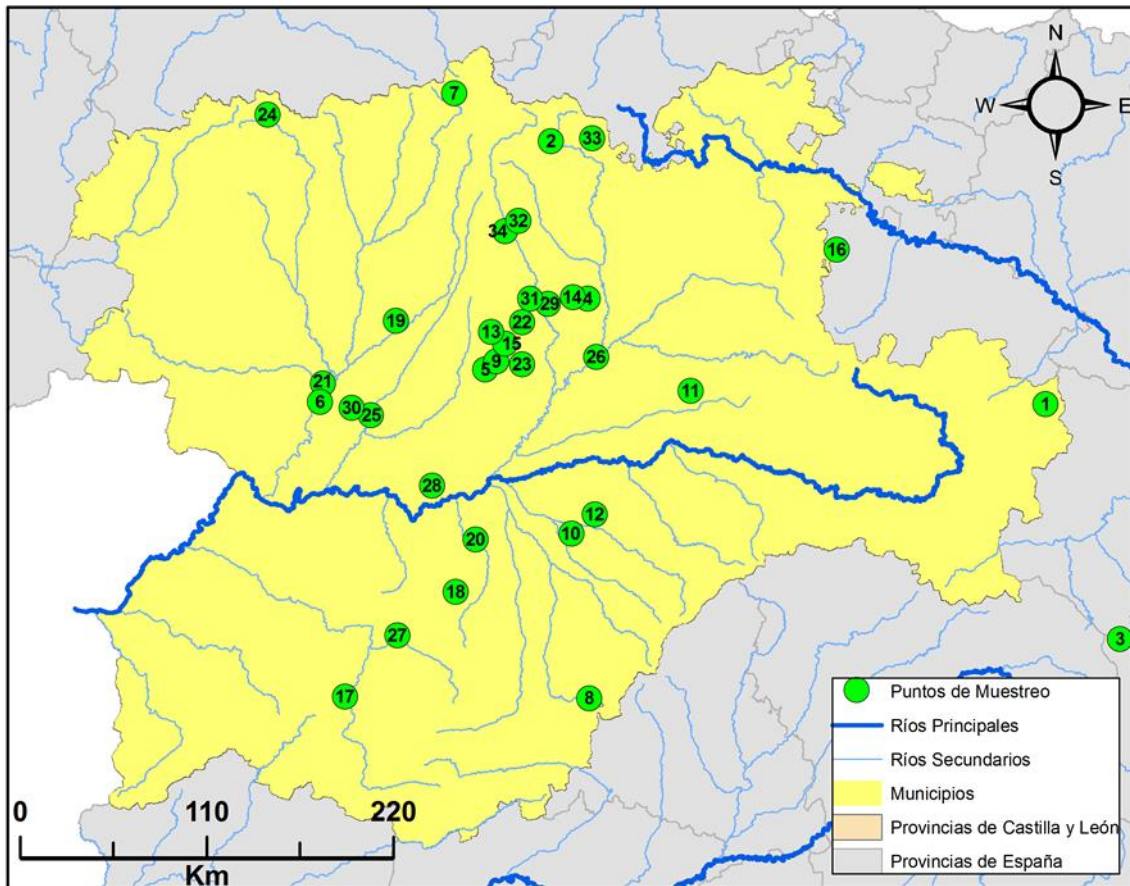


Figura 3. Puntos de muestreo de topillo campesino. (Mapa de elaboración propia. Capas de información cedidas por la Junta de Comunidades de Castilla y León, 2014). El identificador numérico de cada población puede consultarse en Tabla 1.

Las muestras consistieron en su mayoría en tejidos conservados a -20°C (trozos de oreja o cola), pero también se contó con algunas muestras conservadas en etanol.

Tabla 1. Localización (coordenadas UTM) de las poblaciones de topillo campesino analizadas y tamaño muestral (n) de cada población.

Localizador	Localidad	Longitud (X)	Latitud (Y)	Provincia	n
1	Ágreda	588492	4634728	Soria	47
2	Arbejal	377373	4749138	Palencia	32
3	Bello	626313	4530589	Teruel	46
4	Boadilla del Camino	388634	4678416	Palencia	27
5	Boada de Campos	345363	4649580	Palencia	27
6	Bretó	272790	4640295	Zamora	25
7	Burón	332878	4765447	León	7
8	Campoazalvaro	383215	4503726	Segovia	29
9	Castromocho	349623	4655043	Palencia	41
10	Chañe	383437	4576905	Segovia	11
11	Cilleruelo	427983	4759036	Burgos	4
12	Cuellar	391256	4585198	Segovia	19
13	Frechilla	347920	4666743	Palencia	4
14	Frómista	383991	4680404	Palencia	27
15	Fuentes de Nava	352521	4660536	Palencia	23
16	Grañón	498252	4700414	La Rioja	10
17	La Maya	280254	4508145	Salamanca	9
18	Madrigal de las Altas Torres	332113	4550611	Ávila	25
19	Mayorga	323265	4679005	Valladolid	8
20	Medina del campo	339691	4574776	Valladolid	26
21	Milles de la Polvorosa	273381	4644859	Zamora	25
22	Paredes de Nava	360004	4668129	Palencia	35
23	Revilla de Campos	358257	4651964	Palencia	23
24	San Emiliano	744600	4762035	León	10
25	San Martín de Valderaduey	294699	4632035	Zamora	30
26	Torquemada	390827	4654399	Palencia	17
27	Ventosa del río Almar	305562	4534367	Salamanca	45
28	Villalar de los Comuneros	321636	4601962	Valladolid	24
29	Villoldo este	368343	4678212	Palencia	27
30	Villafáfila	282911	4636274	Zamora	26
31	Villoldo oeste	366242	4678622	Palencia	18
32	Villorquite del Páramo	358133	4713866	Palencia	27
33	Villanueva de la Torre	474400	4492641	Palencia	19
34	Villaluenga de la vega	355007	4709456	Palencia	17

Extracción de ADN

El proceso de extracción de ADN mediante el método salino parte de la base de que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN, permitiendo así su disolución y posterior extracción de la célula. La extracción consta de dos etapas:

1. Lisis de las membranas celulares mediante un detergente o buffer de lisis, dejando el contenido molecular (ADN, ARN, carbohidratos, proteínas y otras sustancias) en una disolución tampón en la que se disuelve el ADN.
2. Precipitación del ADN de la mezcla con etanol frío.

Existen varios métodos de extracción, pero todos parten del mismo principio. En nuestro caso, para la extracción del ADN mitocondrial se utilizó el método de precipitación diferencial con etanol y sales de amonio.

A nuestro buffer de lisis (0.1M Tris, 0.005M EDTA, 0.2% SDS, 0.2M NaCl, pH 8.5), se le adicionó Proteinasa K (10mg/ml), que es una proteasa cuyo función es la de degradar las proteínas de membrana, facilitando su lisis y liberando el ADN. Para aumentar la eficacia de la proteasa, y por tanto, el proceso de lisis, se procedió a la digestión en baño con agitación de las muestras durante la noche a 56°C (temperatura de activación de la Proteinasa K). A continuación, utilizamos altas concentraciones de una sal, acetato de amonio (4M NH₄AC; ph= 7.5), cuyo objetivo es disminuir la solubilidad de las proteínas por incremento de la fuerza iónica del solvente, haciéndolas precipitar. Tras esto, se hace precipitar el ADN en alcohol, pues es insoluble en este, y se hace visible en la interfaz alcohol-agua. Primero con etanol absoluto (EtOH 99%), y luego volvemos a lavar y precipitar con EtOH 70%. Por último, el ADN es resuspendido en buffer TE (T₁₀E_{0.1}) que es una solución amortiguadora del PH cuyo fin es protegerlo durante el tiempo de almacenamiento.

La cuantificación del ADN de cada una de las muestras objeto de estudio se realizó mediante espectrofotometría, utilizando para ello un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop). Puesto que necesitamos

unas concentraciones de trabajo comprendidas entre 25-50 ng/μl de ADN, aquellas muestras que lo precisaron se diluyeron en tampón TE hasta alcanzar la concentración deseada para llevar a cabo la amplificación.

Amplificación y purificación de ADN

Se procedió a amplificar mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) una región de ADN mitocondrial de 989 bp del gen que codifica para el citocromo B.

Los “primers” (cebadores) utilizados para realizar las PCR’s en este estudio han sido utilizados previamente en otras especies de *Microtus* (Tougaard et al. 2008) y se presentan en la tabla adjunta (Tabla 2).

Tabla 2. Primers usados para la amplificación del citocromo B en *M. arvalis*.

cytochrome <i>b</i> gene primers	
Forward primer	
L7	5’-ACCAATGACATGAAAAATCATCGTT-3’
Reverse primer	
H6	5’-TCTCCATTTCTGGTTTACAAGAC-3’

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 10 μl. El protocolo consistió en una etapa inicial de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, seguido de una etapa de “annealing” a 50°C durante 45 segundos, una etapa de elongación a 68°C durante un minuto y treinta segundos, y una etapa final de elongación a 68°C durante 10 minutos. Tras la PCR, se procedió a realizar la electroforesis en geles de agarosa al 2% para comprobar que el producto de se había amplificado correctamente.

Los productos de PCR pasaron después por un procedimiento de purificación cuyo objetivo es el de eliminar “primers”, nucleótidos, enzimas, sales y otras impurezas de nuestras muestras de ADN para la posterior secuenciación del ADN. El proceso se basa en la utilización de dos enzimas hidrolíticas, la exonucleasa y la fosfatasa alcalina, que adicionadas en un buffer

a las muestras de ADN eliminan de nuestro producto de PCR los elementos no deseados, sin interferir en las aplicaciones posteriores. El protocolo consistió en una etapa inicial de incubación a 37°C durante 20 minutos y una posterior etapa de activación de la enzima a 80°C durante 15 minutos.

Secuenciación del ADN

Se secuenció un fragmento de una longitud de 989 bp del gen citocromo B del ADN mitocondrial para cada una de las 790 muestras de topillo campesino. La secuenciación directa fue realizada por MacroGen Europe, Meibergdreef 31 1105 AZ, Amsterdam (Holanda).

Análisis

Diferenciación genética

Las secuencias de ADN mitocondrial fueron editadas y alineadas manualmente con el software Bioedit 7.0.5.3 (Hall 1999). Los índices estandarizados de diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) se calcularon con el software DNAsp 5.0.1. La diversidad haplotípica mide la singularidad de un haplotipo en una población dada en relación con el tamaño muestral. La diversidad de nucleótidos es usada para medir el grado de polimorfismo en una población y se define como el número medio de diferencias de nucleótidos por lugar entre dos secuencias de ADN elegidas al azar entre la muestra poblacional (Nei and Li. 1979).

Para calcular las relaciones filogenéticas entre secuencias de ADN necesitamos conocer el modelo de evolución que mejor se ajuste a nuestros datos. Nuestro modelo evolutivo fue calculado usando jModelTest 2.1.6 (Posada, 2012) bajo el criterio estadístico de Akaike (AIC, Burnham & Anderson 2002). Usamos la corrección de Akaike puesto que nuestro tamaño de muestra (n : número de posiciones de la matriz) era pequeño ($n=30$) en relación con el número de parámetros libres (" K "=66-75), $n/K < 40$ (Posada, 2004).

Para comprobar si nuestras secuencias de ADN estaban evolucionando de forma aleatoria (neutral) o se encontraban bajo un proceso de selección, fueron sometidas a varios test de neutralidad selectiva. La neutralidad selectiva de nuestras poblaciones fue testada mediante los test de “Tajima’s D” (F Tajima. 1989) y “Fu’s FS” (Y.-X Fu. 1997) con un número de 100 permutaciones por análisis. El primero de ellos (Test de Tajima) tiene dos estadísticos principales; el número de posiciones nucleotídicas en las que se encuentra polimorfismo (S) y la media de diversidad nucleotídica (Pi). Estos parámetros nos proporcionan un valor de D con el que si se encuentra fuera del intervalo de confianza ($p > 0.05$) se puede rechazar la hipótesis nula de neutralidad. Por otro lado, Fu propone un estadístico basado en un modelo de mutación de sitios infinitos. Se basa en la probabilidad de observar una muestra aleatoria con un número de alelos igual o inferior a los observados, bajo la asunción de que todos los alelos son selectivamente neutros.

Test de Mantel

Para comprobar si existe aislamiento por distancia (si las diferencias genéticas entre poblaciones son efecto puro de la distancia geográfica entre poblaciones) se utilizó el test de Mantel (Mantel, N. 1967), con el que se comparó una matriz de distancias genéticas entre pares de poblaciones con una matriz de distancias geográficas. El análisis se realizó en Rstudio (2009-2013) con el paquete “ade4” y basado en 999 simulaciones.

Estructura Genética poblacional

Para comprobar si existe una estructura genética de nuestras poblaciones en función de; a) el efecto barrera del río Duero, b) la distribución geográfica de las poblaciones (distribución original vs. reciente) o c) el patrón de colonización Este-Oeste se realizaron análisis moleculares de la varianza (AMOVAs). Para el AMOVA del escenario a) se excluyeron las poblaciones de Ágreda, Bello y Grañón, debido a la dificultad para asignarlas a uno u otro lado del Duero y puesto que podrían verse más asociadas al río Ebro que al Duero. No obstante, se repitieron los análisis incluyendo a Grañón en el subconjunto Norte y a Bello en el Sur. En todos los análisis se excluyeron las poblaciones

de Frechilla y Cilleruelo debido a su bajo tamaño muestral ($n=4$). Los análisis fueron realizados con Arlequín 3.5.1.3 (L. Excoffier. 2009) con 100 permutaciones. Para el análisis del escenario b) se crearon dos “datasets” de acuerdo a los datos de presencia recogidos por Luque-Larena (Luque Larena et al. 2013), uno para distribución original y otro para distribución reciente. En el caso del AMOVA para el escenario c), creamos otros dos subconjuntos de poblaciones estableciendo Boada de Campos como punto de referencia; es decir, todas las muestras situadas al este de Boada de campos fueron consideradas subconjunto Este, y todas las localizadas al oeste, subconjunto Oeste (incluida Boada). Seguimos este criterio ya que dadas nuestras localizaciones, Boada de Campos era la localidad que se encontraba situada geográficamente más centrada en nuestro área de muestreo. Para profundizar más en este escenario hicimos una correlación de Pearson, con el programa Statistica (2005), entre la distribución longitudinal de las poblaciones (x) y la diversidad haplotípica, esperando encontrar poblaciones más diversas cuanto más al Este del rango de distribución.

Para determinar cual de los tres escenarios define mejor la estructura genética en nuestras poblaciones se tuvo en cuenta el porcentaje de varianza debido a la partición definida en cada escenario (varianza entre grupos) y la variación entre poblaciones dentro de grupos.

Adicionalmente, se calculó el índice FST entre pares de poblaciones (índice de fijación) con el programa Arlequin 3.5.1.3 (L. Excoffier. 2009) El índice FST es una medida de diferenciación de poblaciones en cuanto a su estructura genética. Mide la cantidad de varianza que puede ser explicada por la estructura poblacional, y por tanto, puede ser interpretado como una medida de similitud de los individuos de una misma población, comparados con la población total. Los valores oscilan entre 0 y 1, indicando 0 una completa panmixia, donde las poblaciones se cruzan libremente, y 1, una barrera al flujo genético. Se realizaron 100 permutaciones con un nivel de significación $p = 0.05$.

Por último, se procedió a la construcción de la red filogenética entre los haplotipos detectados en nuestras muestras mediante el software Network

4.6.1.2 (Polzin et al. 2003) con el método “Median Joining” (MJ) (Bandelt et al. 2009). El modelo de sustitución nucleotídica empleado fue el TrN (Tamura K, Nei M. 1993). En ambos modelos se incluyó una muestra de la subespecie *M. arvalis arvalis* procedente de Villiers en Bois (Francia) que actuó como “outgroup”.

Resultados

Tabla 3. Índices de diversidad genética (n= tamaño muestral, h= nº haplotipos Hd=diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica, Tajima's D y Fu's FS. [\ast = $p < 0.05$]). Para los valores medios de todas las poblaciones e han excluido las poblaciones de menos de 5 muestras.

Localidad	Provincia	n	h	Hd	π	Tajima'sD	Fu'sFS
Agreda	Soria	47	6	0.77613	0.00152	0.8151	0.1351
Arbejal	Palencia	32	5	0.53226	0.00115	-0.6727	-0.2287
Bello	Teruel	46	5	0.70145	0.00192	0.1237	1.7772
Boadilla del Camino	Palencia	27	6	0.75214	0.00167	-0.6350	-0.3263
Boada de Campos	Palencia	27	7	0.70655	0.0012	-0.6887	-2.3078
Bretó	Zamora	25	3	0.53	0.00059	0.2062	0.2340
Burón	León	7	2	0.28571	0.00116	-1.4341	2.0470
Campoazalvaro	Segovia	29	6	0.67241	0.00183	1.1559	0.9611
Castromocho	Palencia	41	6	0.60244	0.00098	-0.8123	-1.3404
Chañe	Segovia	11	3	0.56364	0.00184	1.2133	1.9102
Cilleruelo	Burgos	4	2	0.5	0.00051	-0.6124	0.1719
Cuellar	Segovia	19	3	0.36482	0.00131	-0.2877	1.8175
Frechilla	Palencia	4	4	1	0.00202	-0.7801	-1.8718*
Frómista	Palencia	27	2	0.48433	0.00098	1.8343	3.1635
Fuentes de Nava	Palencia	23	5	0.72332	0.00124	-0.2803	-0.4137
Grañón	La Rioja	10	5	0.84444	0.00283	0.5574	0.1636
El Hoyo	Salamanca	9	3	0.63889	0.00258	1.6483	2.3984
Madrigal de las Altas Torres	Ávila	25	4	0.70667	0.00202	1.4621	2.1516
Mayorga	Valladolid	8	2	0.25	0.00025	-1.0548	-0.1820
Medina del campo	Valladolid	26	4	0.68615	0.00121	1.2917	0.7184
Milles de la Polvorosa	Zamora	25	2	0.42	0.00042	0.9717	1.2057
Paredes de Nava	Palencia	35	4	0.65378	0.00148	1.2382	1.6073
Revilla de Campos	Palencia	23	5	0.6087	0.00125	-0.7388	-0.3971
San Emiliano	León	10	4	0.53333	0.00133	-1.0353	-0.3121
San Martin de Valderaduey	Zamora	30	7	0.65977	0.00114	-1.5605	-2.3044*
Torquemada	Palencia	17	4	0.70588	0.00195	0.2867	1.4158
Ventosa del río Almar	Salamanca	45	5	0.44545	0.00126	-0.8907	0.3960
Villalar de los Comuneros	Valladolid	24	5	0.71739	0.00112	-0.5062	-0.6277
Villoldo (este)	Palencia	27	6	0.67521	0.00131	-0.0081	-1.0329
Villafáfila	Zamora	26	4	0.58769	0.00091	-0.3896	0.0002
Villoldo (oeste)	Palencia	18	6	0.84967	0.00266	0.4506	0.2944
Villorquite del Páramo	Palencia	27	3	0.5812	0.00219	1.8769	4.0795
Villanueva de la Torre	Palencia	19	4	0.55556	0.00192	0.3358	1.5468
Villaluenga de la vega	Palencia	17	4	0.69853	0.00175	0.5592	1.1342
Estimaciones totales		782	34	0.87045	0.00244	0.107±0.98	0.53±1.47

Para el cálculo de los índices de diversidad genética media se excluyeron las poblaciones de Frechilla y Cilleruelo, debido a su bajo tamaño

muestral ($n=4$). Aun así, se repitieron los análisis incluyendo ambas poblaciones y la diversidad haplotípica media apenas varió ($Hd=0.86955$), al igual que la diversidad nucleotídica ($\pi=0.00243$). Para un análisis más fino, procedimos a realizar por tercera vez el cálculo, excluyendo todas aquellas poblaciones inferiores a 10 muestras, obteniendo un valor medio de $Hd=0.87108$, por lo que decidimos dejar nuestra muestra de trabajo en 32 poblaciones para posteriores análisis.

Cabe destacar que las poblaciones de Grañón (La Rioja) y Villoldo Oeste (Palencia) obtuvieron los valores de Hd más altos, mientras que la diversidad haplotípica más baja se encontró en las poblaciones de Cuellar y Milles de la Polvorosa (ver tabla 3).

De los 790 individuos secuenciados encontramos 34 haplotipos diferentes de ADN mitocondrial. La diversidad haplotípica media nos dio un valor estimado de 0.87 (ver tabla 3), lo que nos da una idea del alto grado de “cruzamiento” entre las poblaciones analizadas. Se hizo una correlación de Pearson entre el tamaño muestral y la diversidad haplotípica, obteniéndose un valor de $r=0.22$ ($p=0.23$) lo que indica “a priori”, que el número de haplotipos encontrados en las poblaciones muestreadas no estuvo relacionado con el esfuerzo de muestreo.

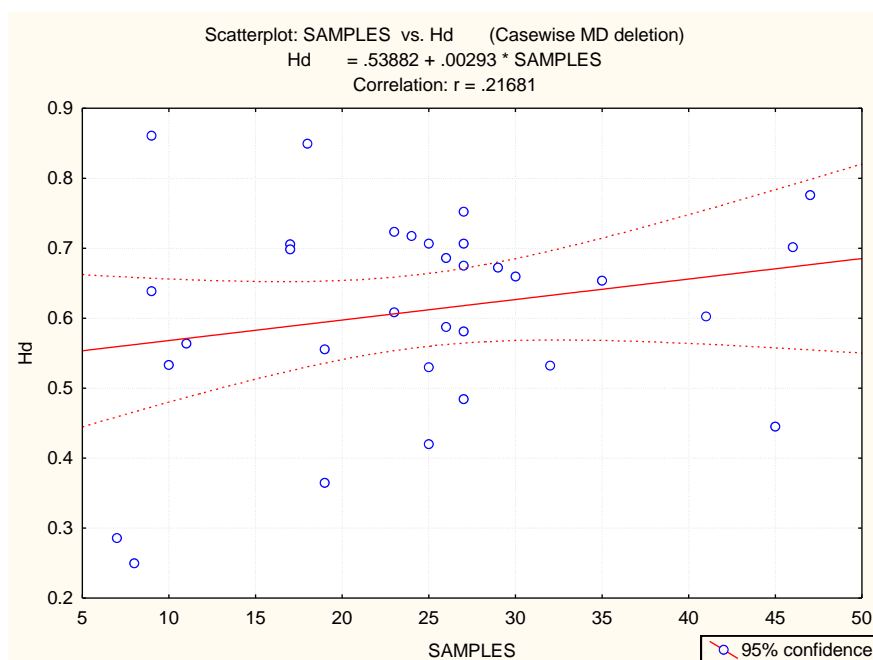


Figura 4. Correlación entre diversidad haplotípica (h) y tamaño muestral(n)

El modelo de sustitución nucleotídica seleccionado por el programa jModelTest, (Tabla 4) fue el que mostró menor valor de verosimilitud ($-\ln L = 207.3930$), en nuestro caso fue el modelo TIM2+I., No obstante, el siguiente modelo TrN (Tamura, Nei 1993) mostró un valor para $-\ln L = -1611.98057$ por lo que se ajusta también a nuestros datos. Se eligió este modelo de sustitución (TrN) porque es un modelo básico que aparece ya implementado en los distintos programas utilizados.

Tabla 4. Modelo de sustitución nucleotídica bajo criterio estadístico Akaike computado en jModelTest 2.1.6 (Posada 2012)

Tamaño de Muestra	989
Modelo seleccionado	TIM2+I
Partición	10232
- Ln	- 1610.614
K	73
freqA	0.2879
freqC	0.2922
freqG	0.1358
freqT	0.2841
R(a) [AC]	0.1689
R(b) [AG]	12.4121
R(C) [AT]	0.1689
R(d) [CG]	1
R(e) [CT]	4.3303
R(f) [GT]	1
p-inv	0.847

Respecto a los valores obtenidos del test de neutralidad selectiva de Tajima (Tabla 3), nuestras poblaciones oscilan entre unos valores de “D” de 1.88 y 1.83 para las poblaciones de Villorquite del Páramo y Frómista, respectivamente, y unos valores negativos de -1.56 y -1.43 para las poblaciones de San Martín de Valderaduey y Burón, respectivamente. Los valores positivos del estadístico indican un posible cuello de botella reciente, mientras que los valores negativos indican un posible crecimiento poblacional o un proceso de selección “purificadora” (selección en contra de las variantes raras). Respecto al test de Fu (Tabla 3), los valores más altos aparecen también en las poblaciones de Villorquite del Páramo (4.08) y Frómista (3.16), mientras que los más bajos aparecen en las poblaciones de San Martín de

Valderaduey (-2.3) y Boada de Campos (-2.31). La interpretación de los valores positivos y negativos de este test es similar a la del test de Tajima y, por tanto, ambos test ofrecen resultados comparables y congruentes en nuestras poblaciones. A la vista de los resultados parece claro que hay poblaciones que han sufrido cambios bruscos (cuello de botella, expansiones) en el pasado, mientras que la mayoría de las poblaciones no muestran signos claros de expansiones o contracciones poblacionales destacables.

Estructura Genética poblacional

Tabla 5. Análisis molecular de la varianza de las poblaciones localizadas al Norte del Duero (2, 4,5,6,7,9,14,15,19,21,22,23,24,25,26,28,29,30,31,32,33,34) y las localizadas al Sur (8,10,12,17,18,20,27) ; distribución original (1,2,3,7,8,16,17,24,33) y reciente (4,5,6,9,10,13,14,15,18,19,20,21,22,23,25,26,27,28,29,30,31,32,34); subconjunto Este (3,4,32,33,31,8,9,10,12,14,15,16,29,34,26,23,22,2,1) y subconjunto Oeste (20,24,25,19,27,28,17,30,7,6,5,18) (Ver Tabla 1 para identificar localizador)

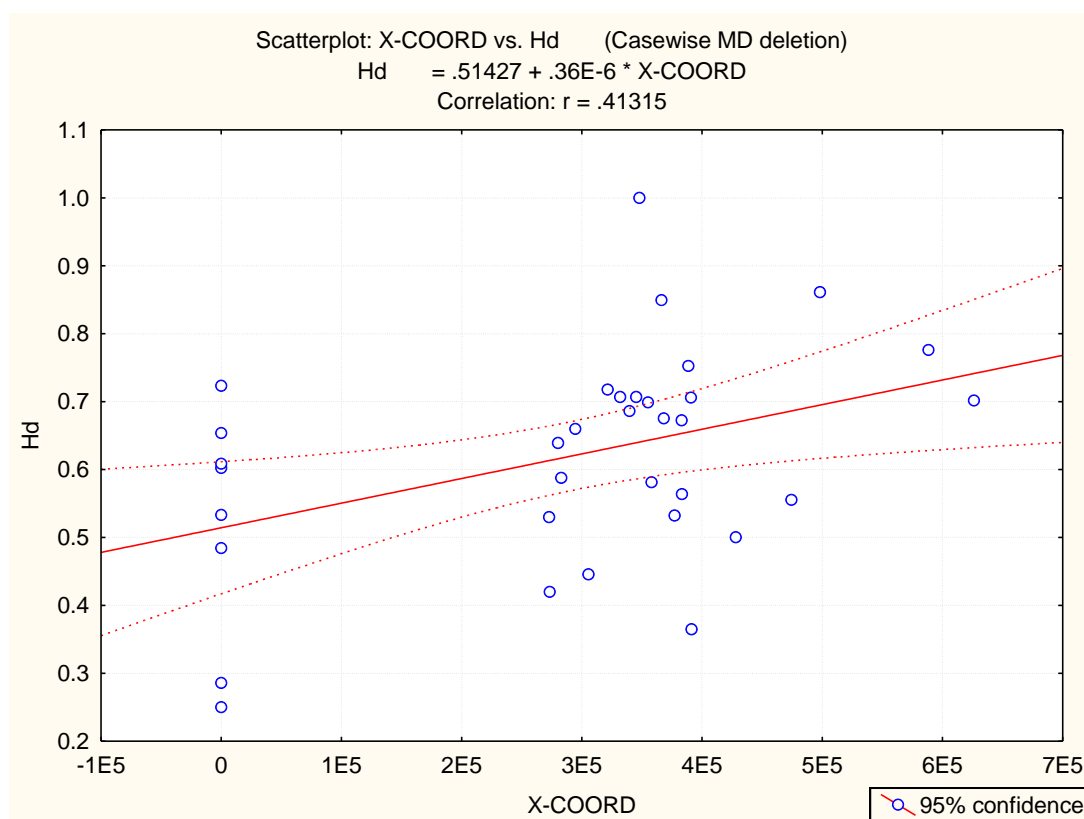
Estructura poblacional	d.f.	SS	%Varianza	P
Escenario				
Norte Duero vs. Sur Duero				
Entre grupos	1	105.856	28.06	0.0±0
Entre poblaciones dentro de grupos	27	216.93	23.12	0.0±0
Dentro (de poblaciones)	650	437.258	48.82	0.0±0
Original vs. Reciente				
Entre grupos	1	77.667	15.34	0.0±0
Entre poblaciones dentro de grupos	30	335.998	32.43	0.0±0
Dentro (de poblaciones)	750	527.321	52.24	0.0±0
Este vs. Oeste				
Entre grupos	1	51.505	8.09	0.009±009
Entre poblaciones dentro de grupos	30	362.159	36.85	0.0±0
Dentro (de poblaciones)	750	527.321	55.06	0.0±0

Respecto a la estructura poblacional, los tres escenarios testados ofrecen una estructura genética entre grupos de poblaciones que resultó significativa (ver tabla 5). De los tres escenarios, la estructuración genética en función del río Duero explica un mayor porcentaje de la varianza entre grupos (28.06%) a la vez que minimiza la varianza dentro de grupos (ver tabla 5), por lo que podemos considerarlo el mejor escenario de los tres. Cabe decir que, para dicho escenario, al incluir la población de Grañón en el subconjunto Norte y la de Bello en el subconjunto Sur, la varianza entre grupos disminuyó hasta un 21.9 %, mientras que aumentó hasta 27.67% la varianza entre poblaciones

dentro de los grupos, y hasta un 50.43 % entre poblaciones en general. Por lo tanto, el modelo “empeora” al incluir dichas poblaciones en los grupos norte y sur del Duero.

Respecto al escenario este-oeste, el coeficiente de correlación entre la longitud y la diversidad haplotípica ($r = 0.41$) no resultó significativo ($p = 0.009$), lo que apoya el escaso porcentaje de la varianza encontrado en este escenario en el AMOVA respecto a los otros dos escenarios testados.

Tabla 6. Correlación de Pearson entre la longitud de cada población y la diversidad haplotípica.



Análisis de diferenciación genética entre pares de poblaciones

Nuestros valores del índice F_{ST} de diferenciación genética entre pares de poblaciones oscilaron entre -0.1 y 0.74, existiendo por lo general unos altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones. La mayoría de las diferencias encontradas fueron significativas (Tabla 7). Un dato a resaltar es el de aquellas poblaciones como la de Bello o Ágreda, que presentan diferencias significativas en el análisis de muestras pareadas con el resto de poblaciones.

Este grado de diferenciación repercute de manera notable en los AMOVAs de los escenarios propuestos y por lo tanto, hay que ser cautos a la hora de incluirlos en los análisis

Tabla 7. Índices de diferenciación F_{ST} entre pares de poblaciones (Valores en negrita= $p < 0.05$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34					
1	0.00																																						
2	0.56	0.00																																					
3	-0.05	0.46	0.00																																				
4	0.26	0.60	0.28	0.00																																			
5	0.59	0.14	0.52	0.62	0.00																																		
6	0.76	0.18	0.62	0.71	0.15	0.00																																	
7	0.40	0.21	0.38	0.49	0.27	0.31	0.00																																
8	0.38	0.09	0.34	0.47	0.17	0.21	0.10	0.00																															
9	0.55	0.03	0.48	0.59	0.04	0.03	0.18	0.05	0.00																														
10	0.09	0.22	0.09	0.31	0.28	0.36	0.16	0.05	0.21	0.00																													
11	0.49	0.07	0.43	0.55	0.08	0.07	0.09	0.01	-0.01	0.14	0.00																												
12	0.27	0.19	0.25	0.36	0.25	0.33	0.14	0.00	0.15	0.01	0.10	0.00																											
13	0.59	0.08	0.50	0.61	0.05	0.02	0.20	0.06	-0.03	0.21	-0.02	0.16	0.00																										
14	0.15	0.15	0.14	0.31	0.23	0.29	0.05	0.06	0.16	0.00	0.10	0.04	0.18	0.00																									
15	0.34	0.43	0.22	0.52	0.49	0.55	0.45	0.41	0.47	0.26	0.44	0.39	0.48	0.21	0.00																								
16	0.19	0.23	0.21	0.36	0.30	0.40	0.03	0.05	0.21	0.02	0.13	0.03	0.23	0.00	0.37	0.00																							
17	0.14	0.40	0.18	0.34	0.43	0.54	0.24	0.14	0.35	0.01	0.28	0.05	0.37	0.11	0.44	0.05	0.00																						
18	0.57	0.07	0.50	0.60	0.10	0.04	0.20	0.05	-0.01	0.21	0.00	0.15	-0.02	0.19	0.50	0.23	0.35	0.00																					
19	0.75	0.35	0.64	0.72	0.25	0.14	0.40	0.34	0.20	0.41	0.20	0.42	0.18	0.37	0.58	0.46	0.59	0.21	0.00																				
20	0.50	0.06	0.43	0.55	0.03	0.09	0.15	0.02	-0.02	0.15	-0.02	0.10	-0.02	0.12	0.44	0.16	0.28	0.00	0.23	0.00																			
21	0.35	0.12	0.33	0.46	0.18	0.23	-0.01	0.03	0.09	0.10	0.03	0.07	0.11	0.01	0.37	0.02	0.20	0.12	0.34	0.06	0.00																		
22	0.72	0.03	0.52	0.66	0.12	0.14	0.16	0.10	-0.02	0.26	0.01	0.22	0.03	0.14	0.46	0.25	0.48	0.01	0.40	0.02	0.07	0.00																	
23	0.39	0.47	0.29	0.53	0.53	0.67	0.47	0.44	0.52	0.28	0.48	0.40	0.55	0.24	0.24	0.37	0.47	0.55	0.67	0.48	0.39	0.56	0.00																
24	-0.10	0.54	-0.02	0.27	0.57	0.69	0.40	0.37	0.53	0.11	0.47	0.27	0.55	0.19	0.35	0.21	0.15	0.54	0.69	0.48	0.36	0.62	0.38	0.00															
25	0.33	0.44	0.22	0.49	0.50	0.58	0.45	0.41	0.48	0.26	0.45	0.38	0.50	0.22	0.06	0.36	0.43	0.51	0.60	0.45	0.37	0.49	0.06	0.33	0.00														
26	0.47	0.36	0.39	0.52	0.36	0.51	0.35	0.29	0.36	0.25	0.33	0.26	0.38	0.23	0.43	0.28	0.37	0.38	0.56	0.31	0.27	0.43	0.15	0.43	0.30	0.00													
27	0.64	0.71	0.52	0.72	0.72	0.77	0.69	0.69	0.72	0.59	0.70	0.68	0.73	0.53	0.15	0.67	0.71	0.73	0.78	0.70	0.65	0.74	0.49	0.63	0.26	0.67	0.00												
28	0.19	0.39	0.10	0.38	0.45	0.53	0.37	0.32	0.42	0.14	0.38	0.25	0.43	0.14	0.13	0.25	0.29	0.44	0.57	0.38	0.29	0.44	0.16	0.19	0.06	0.28	0.42	0.00											
29	0.47	0.56	0.37	0.63	0.60	0.74	0.59	0.58	0.62	0.42	0.60	0.56	0.65	0.35	0.14	0.51	0.62	0.67	0.74	0.59	0.52	0.64	0.23	0.49	0.11	0.49	0.15	0.28	0.00										
30	0.07	0.52	0.15	0.31	0.55	0.62	0.42	0.38	0.52	0.21	0.47	0.29	0.52	0.28	0.46	0.26	0.20	0.53	0.64	0.47	0.39	0.56	0.44	0.11	0.43	0.44	0.67	0.30	0.57	0.00									
31	0.26	0.55	0.30	0.42	0.59	0.64	0.49	0.46	0.56	0.34	0.52	0.40	0.57	0.38	0.50	0.38	0.36	0.58	0.65	0.52	0.47	0.58	0.49	0.29	0.49	0.51	0.68	0.40	0.58	0.25	0.00								
32	0.56	-0.07	0.37	0.56	0.04	0.16	0.10	-0.06	-0.09	0.07	-0.08	0.02	-0.06	0.00	0.34	0.09	0.31	-0.08	0.37	-0.10	-0.03	0.05	0.38	0.48	0.34	0.23	0.69	0.27	0.49	0.45	0.49	0.00							
33	0.37	0.03	0.30	0.49	-0.07	0.15	0.09	-0.06	-0.08	-0.01	-0.10	0.00	-0.08	-0.01	0.34	0.04	0.19	-0.04	0.20	-0.12	-0.01	0.13	0.36	0.38	0.35	0.25	0.68	0.28	0.43	0.38	0.44	-0.11	0.00						
34	0.16	0.20	0.15	0.38	0.30	0.41	0.22	0.14	0.25	0.03	0.20	0.11	0.27	0.04	0.21	0.11	0.17	0.28	0.46	0.20	0.14	0.25	0.23	0.21	0.21	0.26	0.55	0.13	0.33	0.28	0.38	0.05	0.03	0.00					

Localizador	Población
1	Burón

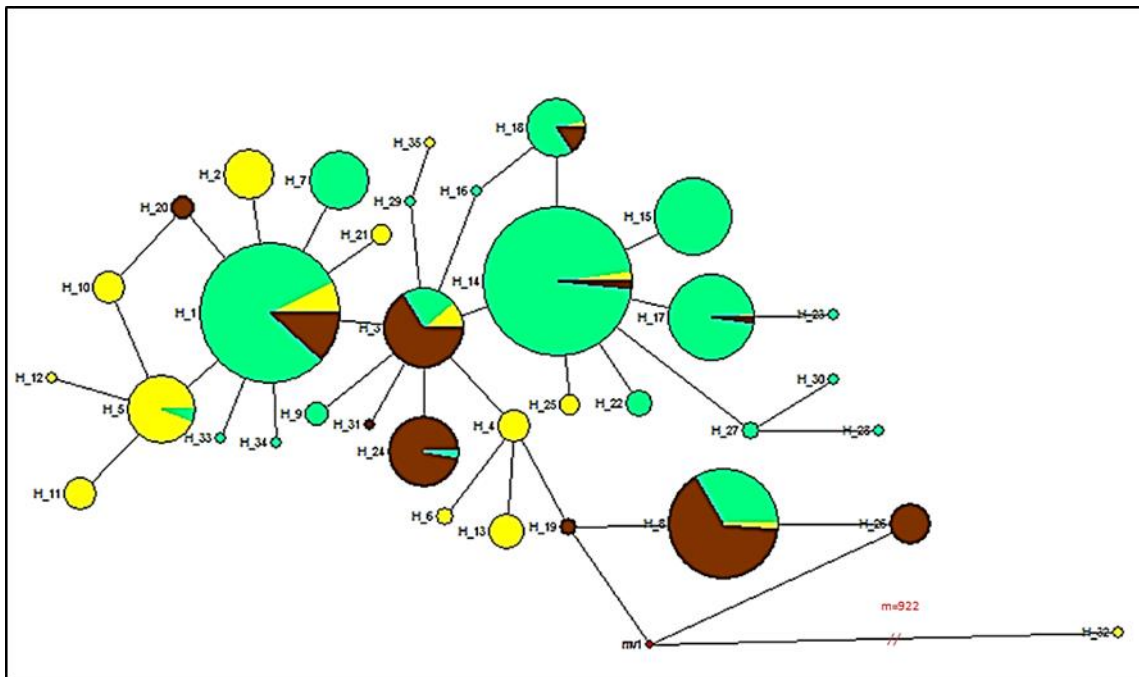


Figura 5. Red de haplotipos computada en Network 4.6.2.1. (Tamaño de nodo proporcional a la frecuencia de haplotipos, ramas proporcionales al número de mutaciones, Verde=haplotipos localizados en poblaciones al norte del Duero, Marrón= haplotipos localizados en poblaciones al Sur del Duero, Amarillo= otros haplotipos, m= n° mutaciones).

En la red de haplotipos de la figura adjunta (Figura 5), se puede apreciar como los haplotipos ancestrales es decir, los que se encuentran mas próximos al outgroup, son el H19 (localizado en 2 muestras en Campoazálvaro), el H26 (localizado en los municipios de Ventosa del río Almar y La Maya) y el H8, presente en dos terceras partes en las localidades del Sur y 1/3 en el Norte. No parece existir una clara asociación de grupos de haplotipos a zonas geográficas particulares, salvo quizá el haplogrupo formado por los haplotipos (H18,H15,H17, H23,H27, H30,H28 y H22) que están casi exclusivamente localizados al norte del Duero).

Discusión

Conocer el proceso de colonización de nuevos territorios por parte de las especies siempre ha sido un objetivo fundamental en el estudio de la ecología (Clobert et al. 2001). Averiguar sus movimientos y translocaciones a diferentes escalas nos puede aportar información muy valiosa acerca de la biología de una especie (Braaker et al. 2009, García et al. 2008). El topillo campesino es una buena especie modelo para el estudio de cuestiones evolutivas. Esto es debido a su corto tiempo entre generaciones, ecología bien definida y a su rápida tasa de mutación de ADN mitocondrial (Tougaard et al. 2008). Si a esto le sumamos las repercusiones socioeconómicas de esta especie en las últimas décadas (Viñuela et al. 2010) parecía imprescindible un trabajo de genética de poblaciones. Con el objetivo de entender la distribución espacial de la diversidad genética en las poblaciones de esta especie, este trabajo se ha enfocado también desde una perspectiva integradora con la genética del paisaje, intentando explicar cómo las características del medio (barreras físicas al movimiento de los individuos) influyen sobre los procesos microevolutivos (Storfer et al. 2007).

Diversidad genética

El género *Microtus* ha experimentado probablemente la mayor radiación de mamíferos en los últimos 2 millones de años (Fink et al. 2010). Muchas especies muestran diferencias genéticas intraespecíficas muy fuertes sin diferencias morfológicas aparejadas, lo que sugiere un posible proceso de especiación en marcha o la presencia de especies crípticas (Heckel et al. 2005; Bastos-Silveira et al. 2012; Pauperio et al. 2012). El primer resultado destacable es que las poblaciones de la región estudiada albergan una diversidad haplotípica relativamente alta y homogénea (Tabla 3). Las poblaciones de Grañón ($H_d=0.84$) y Villoldo Oeste ($H_d=0.85$) obtuvieron los valores de H_d más altos, mientras que la diversidad haplotípica más baja se encontró en las poblaciones de Cuellar ($H_d=0.36$) y Milles de la Polvorosa ($H_d=0.42$). En el primer caso (Grañón), la población se encuentra en un punto intermedio entre las poblaciones de la cuenca del Duero y las de la cuenca del

Ebro. El alto valor de diversidad se podría atribuir a un efecto de barrera geográfica para las poblaciones cercanas al valle del Ebro. El río actuaría como a su vez como zona de contacto y posterior corredor de dispersión de las poblaciones originales de Pirineos, Cordillera Cantábrica y Sistema Ibérico. Son numerosos los estudios en otras especies acerca de la influencia de las barreras geográficas sobre la diversidad genética (Beysard et al. 2014). La alta diversidad haplotípica también puede deberse a la supervivencia de pequeñas y aisladas poblaciones que se esparcieron cuando las condiciones fueron favorables (Tougaard, Renvoisé et al. 2008). En este caso, cuando la antropización del medio favoreció la dispersión de estos roedores. Para el caso de Villoldo Oeste, esta población se encuentra en el centro de la submeseta Norte y, por tanto, el intercambio genético con las poblaciones procedentes de la Cordillera Cantábrica y el Sistema Ibérico podrían explicar estos altos valores de diversidad. Existen estudios (Vuorinen & Eskelinen 2005) que defienden, que a pesar de los recurrentes cuellos de botella que sufren las poblaciones de topillo campesino, generalmente mantienen un alto nivel de diversidad genética. Esto se asocia con la recuperación de diversidad local debida a la inmigración de individuos distribuidos y aislados en pequeños “demes” que contribuyen a restaurar el pool genético (Berthier et al. 2006; Rikalainen et al. 2012). Es curioso, no obstante, que poblaciones cercanas a esta no presenten también altos valores de diversidad (tabla 3 y figura 1), por lo que deben existir otros factores de tipo local que definan las particularidades de las poblaciones en cuanto a diversidad genética.

Los valores de baja diversidad presentes en las poblaciones de Cuéllar y Milles de la Polvorosa se podrían atribuir a un efecto del muestreo. Pese a que la metodología en todo el estudio fue idéntica, cabe la posibilidad de que por la disposición de las trampas, o por la propia estructura social de la especie (González-Esteban and Villate. 2007) los individuos muestreados estuvieran estrechamente emparentados o incluso pertenecieran a la misma familia. Puesto que la transmisión del ADN mitocondrial es matrilineal, esto explicaría la baja diversidad haplotípica en estas localidades. Otra posible explicación sería la de que estas poblaciones de reciente colonización estarían constituidas por un muestreo no azaroso de los haplotipos en las poblaciones de origen. En

este sentido, Milles de la Polvorosa se localiza en una de las últimas comarcas en ser colonizada por esta especie, y los individuos de Cuellar podrían derivar de poblaciones situadas en el sistema central. La colonización puede haberse producido por individuos portadores de un menor número de haplotipos que los presentes en la población de origen.

Neutralidad Selectiva

Bajo condiciones demográficas estables se espera estabilidad en los patrones genéticos de acuerdo al equilibrio entre el efecto de la deriva genética y la migración (Wright 1931,1943). Sin embargo, en especies que exhiben ciclos poblacionales como los microtinios, esta condición de neutralidad selectiva suele variar a lo largo del tiempo y del espacio (Gauffre, Berthier et al. 2014). La teoría neutralista de la evolución molecular (Kimura, 1983), establece que la mayoría de los cambios evolutivos a nivel molecular son causados por la deriva genética de mutantes y no mutantes selectivamente neutros. Partiendo de este principio, F Tajima (1989), propuso un modelo alternativo a esta visión de la teoría neutralista basado en un modelo de mutación de sitios infinitos. La ventaja de este modelo, es que nos proporciona un estadístico “D” para evaluar si nuestras poblaciones se encuentran bajo un escenario de equilibrio evolutivo. En nuestro caso, las poblaciones de Villorquite del Páramo y Frómista distan positiva y significativamente del estadístico “D” (Tabla 3). La interpretación (Tajima 1989) a este fenómeno se podría atribuir a que tales poblaciones han sufrido recientemente un cuello de botella poblacional, en cuyo caso, el valor de π (diversidad nucleotídica) se vería poco afectado (a no ser que esta situación se prolongara en el tiempo e intensidad). Sin embargo, el valor de k (sitios de segregación), se vería sustancialmente reducido, dando lugar a una “D” positiva”. Para un valor de “D” negativo, como es el caso de las poblaciones de San Martín de Valderaduey y Burón, Tajima nos propone dos escenarios. El primero de ellos, se trata de un escenario de “selección purificadora” (selección en contra de variables raras) donde las mutaciones ocurren, pero no se expresan, dando lugar a un alto número de sitios de segregación que propician una “D” negativa. Este escenario sería plausible para las poblaciones de Burón, acantonadas en la

Cordillera Cantábrica. El segundo escenario implica una expansión o crecimiento poblacional reciente. Pese a que la “D” de Tajima ha sido ampliamente utilizada en la divulgación científica, existen autores críticos (K Zeng et al. 2006), que ponen en duda su potencia. Para el estadístico de Fu (Tabla 3) (Fu's Fs. Y.-X. 1997), encontramos los valores más altos para las poblaciones de Villorquite del Páramo (4.08) y Frómista (3.16), que son consistentes con los valores de “D”, mientras que los más bajos, para las de San Martín de Valderaduey (-2.3) la población de Boada de Campos (-2.31).

Así pues, los altos valores para el estadístico “D” indicarían un escenario de contracción poblacional, donde las poblaciones pierden variabilidad genética debido puede, al cese del flujo genético entre las poblaciones vecinas, mientras que los valores negativos serían consistentes con una expansión reciente. Esto último sería plausible para las poblaciones cercanas a la cuenca del Duero, que se encontrarían inmersas en un proceso de expansión poblacional.

Estructura genética poblacional

La estructura poblacional conformada por las muestras localizadas a ambas partes del río Duero nos ofreció el mejor escenario explicativo de la varianza entre los tres escenarios testados (Tabla 5). Esto es congruente con otros estudios (Beysard and Heckel 2014) que nos indican que durante el proceso dispersivo de muchas especies, éstas utilizan los márgenes de los ríos como ruta de colonización, convirtiéndose los valles fluviales en zonas de contacto de ADN mitocondrial. Esto, además, explicaría la alta diversidad de haplotipos encontrados en las poblaciones cercanas a las cuencas de los ríos principales. No obstante, el bajo tamaño muestral de este punto (n=10) (Tabla 1) hace que se tengan que tomar con cautela las posibles explicaciones a este suceso. Cabe decir, que para el primero de los escenarios, al incluir la población de Grañón en el subconjunto Norte y la de Bello en el subconjunto Sur, disminuyó hasta un 21.9 % la varianza explicada entre grupos, mientras que aumentó hasta 27.67% entre poblaciones dentro de los grupos, y hasta un 50.43 % entre poblaciones en general. Esto se puede deber al alto grado de diferenciación existente entre las poblaciones de Grañón con respecto al subconjunto Norte y al de Bello respecto al subconjunto sur. Esto concuerda

con las frecuencias de haplotipos presentes en Grañón, donde hay una predominancia del haplotipo 21 ($n=3$) y 25 ($n=3$), ambos haplotipos que no se encuentran en las poblaciones del subconjunto Norte. Al igual que en la población de Bello (Teruel), hay una marcada frecuencia ($n=22$) del haplotipo 5, presente también en Ágreda ($n=9$), que en su mayoría aparece en poblaciones que no pertenecen a los subconjuntos establecidos. Por último, esta explicación es consistente también para la población de Ágreda, donde hay una predominancia ($n=18$) del haplotipo 2, que no se encuentra presente ni en el subconjunto Norte ni en el subconjunto Sur. (Ver figura 5). Estos tres casos nos indican una marcada divergencia entre las poblaciones localizadas en zonas de transición desde la cuenca del Duero hacia el valle del Ebro, por lo que parece una decisión acertada mantener al margen del análisis principal las poblaciones de Grañón, Bello y Ágreda. No parece muy probable, por lo tanto, que las poblaciones de reciente colonización en la cuenca del Duero provengan de ninguna de estas tres poblaciones localizadas dentro del rango original de la especie y situadas al Este, desde donde algunos autores han sugerido que se inició el proceso de colonización.

Los haplotipos que se han encontrado con mayor frecuencia en las poblaciones muestreadas (Figura 5) han sido el haplotipo 1 ($n= 136$), y el haplotipo 14 ($n= 218$), ambos presentes en su mayoría en poblaciones del Norte del Río Duero y en mucha menor medida en el sur del Duero. El haplotipo 1 se ha detectado en poblaciones repartidas principalmente por el Norte del Duero y en 16 muestras al Sur. Cabe destacar que de estas 16 muestras pertenecientes al haplotipo 1 al Sur del Duero, 15 lo hicieron en la localidad de Cuéllar. Los haplotipos predominantes en el Sur han sido el 3, (con $n= 15$ en Campoazálvaro, $n=8$ en Madrigal de las Altas Torres y $n=6$ en Medina del campo), el haplotipo 24 ($n=13$ en Medina del Campo, $n=6$ en Madrigal de las Altas Torres y $n=7$ en Chañe) y por último el haplotipo 8, con 33 poblaciones en Ventosa del Río Almar. Un dato a resaltar es que los haplotipos H8, H19 y el H26, parecen ser los haplotipos ancestrales del resto, y los encontramos en su mayoría repartidos entre localidades próximas al Sistema central (Campoazálvaro, Ventosa del río Almar y La Maya). Esto sería

consistente con una distribución original en el Sistema central (Luque-Larena et al. 2013) y una posterior colonización hacia el río Duero desde el Sur.

De acuerdo a las relaciones filogenéticas, podemos decir con un grado de confianza del 70%, que los haplotipos 29 y 35 están emparentados directamente. Un hecho curioso, es pese a que solo tenemos una muestra de cada uno y por tanto no se puede inferir nada estadísticamente, éstas pertenecen a las poblaciones de San Emiliano y Villaluenga de la Vega, lo que sería plausible con un escenario de colonización de desde la cordillera Cantábrica hasta la submeseta Norte (Rey. 1973). El haplotipo 17, que se encuentra en gran proporción en la localidad de Bretó (n=15), está emparentado directamente (con un grado de confianza del 54%) con el haplotipo 23, localizado únicamente en Castromocho (n=1). Por último y con un grado de confianza del 84%, el haplotipo 30, presente en San Martín de Valderaduey está emparentado con los haplotipos 27 y 28, localizados en Revilla de Campos y San Emiliano (Figura 1). Estos grados de parentesco sugieren un alto intercambio genético entre las poblaciones periféricas y aquellas localizadas en el centro de la meseta, lo que atribuimos a una alta tasa de inmigración, ocupando los “parches” vacíos durante las fases de picos poblacionales (Berthier et al. 2006; Rikalainen et al. 2012).

Conclusiones

El objetivo original de este trabajo era la caracterización genética de las poblaciones de *Microtus arvalis* presentes en la meseta Norte de la Península Ibérica. Como objetivos secundarios se propuso testar una serie de predicciones en relación a los escenarios de colonización de la especie. Podemos concluir lo siguiente:

- a) La diversidad genética de las poblaciones de topillo campesino en España es alta, como cabe esperar de poblaciones con alto grado de intercambio de individuos.
- b) Algunas poblaciones muestran signos claros de cambios demográficos notables (expansiones, cuellos de botella) en el pasado, mientras que otras poblaciones parecen haber permanecido estables.
- c) Existe una estructura genética marcada entre las poblaciones muestreadas al Norte del valle del Duero y aquellas localizadas al Sur. Esto es congruente con los escenarios de colonización propuestos anteriormente, desde las regiones de montaña que rodean la región hasta las planicies castellanas (Delibes & Brunett-Lecomte. 1980, González-Esteban y Villate. 2002; Viñuela. 2007; Luque-Laren et al. 2013). La colonización de la cuenca del Duero, por tanto, parece haberse dado desde las montañas del norte y del sur hacia el centro de la cuenca, lo que sugiere la utilización de los valles fluviales (que discurren desde ambas cadenas montañosas hacia el centro de la cuenca) como corredores de dispersión durante la colonización.
- d) El río Duero parece haber supuesto una barrera al flujo genético para las poblaciones situadas a ambos lados, reduciendo o impidiendo el intercambio de individuos a su través.
- e) Nuestros resultados no apoyan una estructuración genética entre las poblaciones de distribución original y aquellas de distribución reciente.
- f) No observamos evidencias claras de un patrón de colonización en dirección Este-Oeste como habían propuesto otros autores en relación a las poblaciones estudiadas.

- g) Las poblaciones con una mayor proporción de variantes genéticas ancestrales se localizan principalmente en el sistema central y poblaciones cercanas al sur del Duero.

Si, de acuerdo a nuestra hipótesis inicial, el proceso de colonización se produjo desde las montañas periféricas hacia el centro de la cuenca del Duero siguiendo el curso de los ríos, sería interesante investigar si la antropización del medio (cambios en los usos del suelo en favor de los cultivos de regadío), ha contribuido de forma significativa a dicha colonización y a la expansión poblacional.

Bibliografía

Amori, G., Hutterer, B., Krystufek, B., Yigit, N., Mitsain, G., Palomo, L.J., 2008. *Microtus arvalis*, in: IUCN (Ed.) IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.

Araujo, M.B., Guilhaumon, F., Neto, D.R., Pozo, I., Calmaestra, R., 2011. Impactos, vulnerabilidad y Adaptación al cambio climático de la biodiversidad española. 2 Fauna de vertebrados. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, Madrid.

Arenaz, A.M., 2001. El topillo campesino y el topillo de montaña, In: Ediciones Mundi-Prensa (Ed.), Daños en la agricultura causados por vertebrados. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación, Madrid, pp. 61-66.

ASAJA 2012. ASAJA Palencia denuncia la preocupación del campo ante una nueva plaga de topillos en la provincia. ASAJA Palencia.

Baskevich, M.I., 1996. On the karyological differentiation in Caucasian populations of common vole (Rodentia, Cricetidae, *Microtus*). Zool. Zh. 75, 297–308 (in Russian with English summary).

Bastos-Silveira C, Santos SM, Monarca R, Mathias MDL, Heckel G (2012) Deep mitochondrial introgression and hybridization among ecologically divergent vole species. *Molecular Ecology*, 21, 5309–5323.

Berthier K, Charbonnel N, Galan M et al. (2006) Migration and recovery of the genetic diversity during the increasing density phase in cyclic vole populations. *Molecular Ecology*, 15, 2665–2676.

Beysard, M. and G. Heckel (2014). "Structure and dynamics of hybrid zones at different stages of speciation in the common vole (*Microtus arvalis*)." *Molecular Ecology* 23(3): 673-687.

Braaker, S. and G. Heckel, *Transalpine colonisation and partial phylogeographic erosion by dispersal in the common vole (Microtus arvalis)*. *Mol Ecol*, 2009. 18(11): p. 2518-31.

Burnham, K. P.; Anderson, D. R. (2002), *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach* (2nd edición), Springer-Verlag, ISBN 0-387-95364-7.

Chaline, J., Brunet-Lecomte, P., Montuire, S., Viriot, L., Courant, F., 1999. Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Ann. Zool. Fenn.* 36, 239–267.

Chaline, J., Graf, J.-D., 1988. Phylogeny of the Arvicolidae (Rodentia): biochemical and paleontological evidence. *J. Mammal.* 69, 22–33.

Chaline, J., P. Brunet-Lecomte, and M. Campy. 1995. The last glacial/interglacial record of rodent remains from the Gigny karst sequence in the French Jura used for palaeoclimatic and palaeoecological reconstructions. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 117:229–252.

Clobert, J., Danchin, E., Dhondt, A.A. y Nichols, J.D. 2001. *Dispersal*. Oxford, UK: Oxford University Press. 452pp.

Conroy, C.J., Cook, J.A., 1999. MtDNA evidence for repeated pulses of speciation within arvicoline and murid rodents. *J. Mamm. Evol.* 6, 221–245.

Conroy, C.J., Cook, J.A., 2000a. Molecular systematics of a holarctic rodent (*Microtus*: Muridae). *J. Mammal.* 81, 344–359.

Conroy, C.J., Hortelano, Y., Cervantes, F.A., Cook, J.A., 2001. The phylogenetic position of southern relictual species of *Microtus* (Muridae: Rodentia) in North America. *Mamm. Biol.* 66, 332–344.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.

- De Redon, L., Machon, N., Kerbiriou, C., Jilguet, F., 2010. Possible effects of roadside verges on vole outbreaks in an intensive agrarian landscape. *Mamm. Biol.* 75, 92-94.
- DeBry, R.W., 1992. Biogeography of New World taiga-dwelling *Microtus* (Mammalia: Arvicolidae): a hypothesis test that accounts for phylogenetic uncertainty. *Evolution* 46, 1347-1357.
- Delattre, P., De Sousa, B., Fichet-Calvet, E., Quéré, J.P. y Giraudou, P. 1999. Vole outbreaks in a landscape context: evidence from a six year study of *Microtus arvalis*. *Landscape Ecology* 14: 401-412.
- Delattre, P., De Sousa, B., Fichet-Calvet, E., Quere, J.p., Giraudoux, P., 1999. Vole outbreaks in a landscape context: evidence from a six year study of *Microtus arvalis*. *Lansc. Ecol.* 14, 401-412.
- Delibes, J., 1989. Plagas de topillos en España. *Quercus* 35 17-20.
- Delibes, M., Brunett-Lecomte, P., 1980. Presencia del topillo campesino iberico *Microtus arvalis asturianus* Miller 1908 , en la meseta del Duero. *Doñana Acta vertebrata* 15, 169-71.
- Evans, D.M., Redpath, S.M., Elston, D.A., Evans, S.A., Mitchell, R.J., 2006. To graze or not to graze? Sheep, voles, forestry and nature conservation in the British uplands. *Journal of applied ecology* 43, 499-505.
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- F Tajima, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.
- Fink S, Fischer MC, Excoffier L, Heckel G (2010) Genomic scans support repetitive continental colonization events during the rapid radiation of voles (Rodentia: *Microtus*): the utility of AFLPs versus mitochondrial and nuclear sequence markers. *Systematic Biology*, 59, 548-572.
- Fink, S., L. Excoffier, and G. Heckel, *Mitochondrial gene diversity in the common vole *Microtus arvalis* shaped by historical divergence and local adaptations*. *Mol Ecol*, 2004. **13**(11): p. 3501-14.
- Frantz, A.C., L.C. Pope, T.R. Etherington, G.J. Wilson and T. Burke. 2010. Using isolation-by-distance-based approaches to assess the barrier effect of linear landscape elements on badger (*Meles meles*) dispersal. *Mol. Ecol.* 19: 1663-1674.
- García San Miguel, L., Sierra, M.J., Suárez, B., Sánchez, A., Santos, S., Simón, F., Amela, C., 2013. Informe de situación y evaluación del riesgo de la tularemia en España. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES), Madrid.
- Garcia, J.T., et al., *Genetic and phenotypic variation among geographically isolated populations of the globally threatened Dupont's lark *Chersophilus duponti**. *Mol Phylogenet Evol*, 2008. **46**(1): p. 237-51.
- Gauffre, B., et al., *Short-term variations in gene flow related to cyclic density fluctuations in the common vole*. *Molecular Ecology*, 2014. **23**(13): p. 3214-3225.
- Golenishchev, F.N., Malikov, V.G., Nazari, F., Vaziri, A.S., Sablina, O.V., Polyakov, A.V., 2003. New species of guentheri group (Rodentia, Arvicolinae, *Microtus*) from Iran. *Russ. J. Theriol.* 1, 117-123.
- Gonzalez Esteban, J., Villate, I., Gosalbez, J., 1995. Expansión del area de distribución de *Microtus arvalis asturianus* Miller, 1908 (Rodentia, Arvicolidae) en la meseta norte (España). *Doñana. Acta vertebrata* 22, 106-110.

- González-Esteban, J. y Villate, I. 2002. *Microtus arvalis* (pallas, 1778), topillo campesino. Pp. 382-385. En: Palomo, L. J. y Gisbert, J. (eds). *Atlas de los Mamíferos terrestres de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. SECAM-SECEMU.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Haynes, S., M. Jaarola, and J.B. Searle, *Phylogeography of the common vole (Microtus arvalis) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago*. *Mol Ecol*, 2003. **12**(4): p. 951-6.
- Heckel, G., et al., *Genetic structure and colonization processes in European populations of the common vole, Microtus arvalis*. *Evolution*, 2005. **59**(10): p. 2231-42.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Ibrahim, K. M., R. A. Nichols, and G. M. Hewitt. 1996. Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* 77:282–291.
- Jacob, J., Manson, P., Barfknecht, R., Friedrichs, T., 2013. Common Vole (*Microtus Arvalis*) Ecology and Management: Implications For Risk Assessment of Plant Protection Products. *Pest Management Science*, n/a-n/a
- Jacob, J., Tkadlec, E., 2010. Rodent outbreaks in Europe: dynamics and damage, in: Singleton G., Belmain, S., Brown, P.R., Hardy, B. (Eds.), *Rodent Outbreaks: Ecology and Impacts*. IRRI.
- Jareño, D., Viñuela, J., Luque-Larena, J. J., F. Mougeot., 2014. (Tesis Doctoral). Las plagas de topillo campesino (*Microtus arvalis*) en Castilla y León: efectos del clima, los cambios en el uso del suelo, e impacto sobre el ecosistema global.
- K Zeng, Y.-X. Fu, S Shi, and C.-I. Wu. Statistical tests for detecting positive selection by utilizing high-frequency variants. *Genetics*, 174:1431-1439, 2006.
- Kefelioglu, H., Krystufek, B., 1999. The taxonomy of *Microtus socialis* group (Rodentia: Microtinae) in Turkey, with the description of a new species. *J. Nat. Hist.* 33, 289–303.
- Kimura, M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution* (en inglés). Cambridge: Cambridge University Press. p. xi.
- Konecny, A., A. Estoup, J.M. Duplantier, J. Bryja, K. Ba, M. Galan, C. Tatard and J.F. Cosson. 2013. Invasion genetics of the introduced black rat (*Rattus rattus*) in Senegal, West Africa. *Mol. Ecol.* 22: 286–300.
- Krystufek, B., Kefelioglu, H., 2001. Redescription of *Microtus irani*, the species limits and a new social vole from Turkey. *Bonn. Zool. Beitr.* 50, 1–14.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Ligtvoet, W., van Wijngaarden, A., 1994. The colonization of the island of Noord- Beveland (The Netherlands) by the common vole *Microtus arvalis*, and its consequences for the roor vole *M. oeconomus*. *Lutra* 37, 1-28.
- Luque-Larena, J. J., F. Mougeot, J. Vinuela, D. Jareno, L. Arroyo, X. Lambin and B. Arroyo (2013). "Recent large-scale range expansion and outbreaks of the common vole (*Microtus arvalis*) in NW Spain." *Basic and Applied Ecology* **14**(5): 432-441.
- Mackin-Rogalska R., Adamczewska-Andrzejewska K. and Nabaglo L. 1986. Common vole numbers in relation to the utilization of burrow systems. *Acta Theriologica* 31: 17-44.
- Manel, S., M.K. Schwartz, G. Luikart and P. Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 18: 189–197.

- Mantel, N. 1967. «The detection of disease clustering and a generalized regression approach». *Cancer Research* **27** (2): pp. 209–220.
- Maryama, T., Imai, H.T., 1981. Evolutionary rate of the mammalian karyotype. *J. Theor. Biol.* **90**, 111–121.
- Mitchell-Jones, A. J., G. Amori, W. Bogdanowicz, B. Krystufek, P. J. H. Reijnders, F. Spitzenberger, M. Stubbe, J. B. M. Thissen, V. Vohralik, and J. Zima. 1999. The atlas of European mammals. T. Poyser, A. D. Poyser, London.
- Modi, W.S., 1987. Phylogenetic analyses of chromosomal banding patterns among the Nearctic Arvicolidae (Mammalia: Rodentia). *Syst. Zool.* **36**, 109–136.
- Musser, G.G., Carleton, M.D., 1993. Family Muridae. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, second ed. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 510–756.
- Nadachowski, A., Zagorodnyuk, I., 1996. Recent Allophaiomys-like species in the Palaearctic: Pleistocene relicts or a return to an initial type? *Acta Zool. Cracov.* **39**, 387–394.
- Nei, M.; Masatoshi Nei and Wen-Hsiung Li (October 1, 1979). "Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases". *PNAS* **76** (10): 5269–73.
- Palomo, L.J. y Gisbert, J. 2002. Atlas de los mamíferos terrestres de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-SECEM-SECEMU, Madrid, 564 pp.
- Pauperio J, Herman JS, Melo-Ferreira J et al. (2012) Cryptic speciation in the field vole: a multilocus approach confirms three highly divergent lineages in Eurasia. *Molecular Ecology*, **21**, 6015–6032.
- Polzin T, Daneschmand S V (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs *Operations Research Letters* **31**:12-20
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**:37-48
- 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.
- Posada, D., Buckley, R. 2004. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. *Syst. Biol.* **53**(5):793-808.
- Potapov, S.G., Orlov, V.N., Kovalskaya, Yu.M., Malygin, V., M, Ryskov, A.P., 1999. Genetic differentiation in the voles of the tribe Arvicolini (Cricetidae, Rodentia) using DNA taxonprint and RAPD-PCR. *Russ. J. Genetics* **35**, 403–410.
- R, 2011 - R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rey, J.M., 1973. Las características biométricas y morfológicas del topillo campesino, *Microtus arvalis asturianus*, del Sistema Ibérico. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural- Biología* **71**, 283-297.
- Rikalainen K, Aspi J, Galarza JA et al. (2012) Maintenance of genetic diversity in cyclic populations—a longitudinal analysis in *Myodes glareolus*. *Ecology and Evolution*, **2**, 1491–1502.
- Sánchez-Barbudo, I.S., Camarero, P.R. Mateo, R., 2012. Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *Sci. Total Environ.* **420**, 280-288.
- StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.

Steen, H., A. Mysterud and G. Austrheim (2005). "Sheep grazing and rodent populations: evidence of negative interactions from a landscape scale experiment." *Oecologia* **143**(3): 357-364.

Storfer, A., M.A. Murphy, J.S. Evans, C.S. Goldberg, S. Robinson, S.F. Spear, R. Dezzani, E. Delmelle, L. Vierling and L.P. Waits. 2007. Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* **98**: 128–142.

Suchentrunk, F., Markov, G., Haiden, A., 1998. On gene pool divergence of the two karyotypically distinct sibling vole species *Microtus arvalis* and *M. rossiaemeridionalis* (Arvicolidae, Rodentia). *Folia Zool.* **47**, 103–114.

Tamura K, Nei M (1993). "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees". *Molecular Biology and Evolution* **10** (3): 512–526.

Tkadlec E. and Stenseth N. C. 2001. A new geographic gradient in vole population dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London, B* **268**: 1547–1552.

Torre, I., Diaz, M., Martinez Padilla, J., Bonal. R., Viñuela, J., Fargallo, J.A., 2007. Cattle grazing, raptor abundance and small mammal communities in Mediterranean grasslands. *Basic and applied ecology* **8**, 565-575.

Tougaard, C., E. Renvoisé, A. Petitjean and J.-P. Quéré (2008). "New Insight into the Colonization Processes of Common Voles: Inferences from Molecular and Fossil Evidence." *PLoS ONE* **3**(10): e3532.

Vidal, D., Alzaga, V., Luque-Larena, J.J., Mateo, R., Arroyo, L., Viñuela, J., 2009. Possible interaction between a rodenticide treatment and a pathogen in common vole (*Microtus arvalis*) during a population peak. *Sci. Total Environ.* **408**, 267-271.

Viñuela, J., Luque-Larena, J.J, Farbagalla, J.A., Olea, P., y Mougeot, F. 2010. Conflictos entre la agricultura y la conservación de la biodiversidad. Las plagas de topillo en Castilla y León. Pp. 199 -206. En: *Agricultura Familiar en España 2010. Anuario 2010*. Unión de Pequeños Agricultores y Ganaderos (UPA).334p.

Vuorinen JA, Eskelinen O (2005) Long-term stability of allozyme frequencies in a wood lemming, *Myopus schisticolor*, population with a biased sex ratio and density fluctuations. *Heredity*, **94**, 443–447.

Wheeler, P., 2008. Effects of sheep grazing on abundance and predators of field vole (*Microtus agrestis*) in upland Britain. *Agric. Ecosyst. Environ.* **123**, 49-55.

Y.-X. Fu, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics*, **147**:915{925.

Yigit, N., Colak, E., 2002. On the distribution and taxonomic status of *Microtus guentheri* (Danford and Alston, 1880) and *Microtus lydius* Blackler, 1916 (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Turk. J. Zool.* **26**, 197–204.

Zakrzewski, R.J., 1985. The fossil record. In: Tamarin, R.H.(Ed.), *Biology of New World Microtus*. American Society of Mammalogists. Special Publication No. 8, pp. 1–51.