

IDENTIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA PARDELA BALEAR (*Puffinus mauretanicus*)

JAVIER JUSTE¹, MERITXELL GENOVART², DANIEL ORO², GIORGIO BERTORELLE³,
MAITE LOUZAQ², MANUELA.G. FORERO¹ Y J. MANUEL IGUAL²

RESUMEN

La pardela balear (*Puffinus mauretanicus*) es una de las especies de aves marinas más amenazadas del mundo. En este trabajo nos hemos centrado en la evaluación de la identidad genética de la especie y el estudio de sus niveles de variabilidad genética. Además hemos evaluado otro posible problema genético como es su hipotética hibridación con la especie próxima, la pardela mediterránea (*P. yelkouan*). Para ello se ha muestreado la casi totalidad de las colonias de la especie y analizado genéticamente dos fragmentos de ADN mitocondrial (aproximadamente 1.200 pb). Se ha comprobado la existencia de haplotipos de ADN característicos de la especie próxima que indican una posible introgresión a nivel mitocondrial, sin que se puedan descartar todavía otros orígenes evolutivos. Esta presencia de haplotipos se concentra casi exclusivamente en Menorca cuyos individuos presentan tamaños corporales inferiores a los del resto de colonias. Sin embargo, las diferencias morfométricas se mantienen independientemente al tipo de haplotipo que presenten los individuos. Probablemente nos encontramos frente a un contacto secundario entre las dos especies con una introgresión resultante de un intercambio genético antiguo y puntual. El esclarecimiento de este interesante fenómeno evolutivo requiere profundizar los análisis moleculares y extender los comparativos a otras poblaciones mediterráneas.

No se ha detectado pérdida de variabilidad genética en la pardela balear en relación a otras especies. Sin embargo, y a pesar del comportamiento altamente filopátrico de *P. mauretanicus*, se ha apreciado una débil estructuración poblacional. Ello podría deberse a una conectividad entre colonias superior a la esperada, aunque puede también estar reflejando una homogenización genética entre colonias, asociada a una expansión demográfica en un pasado reciente. Finalmente, algunas colonias presentan un claro desequilibrio entre las tasas teóricas de inmigración y emigración sugiriendo una posible heterogeneidad espacial en la calidad de las mismas.

Palabras Clave: Pardela balear, *Puffinus mauretanicus*, Islas Baleares, *Puffinus yelkouan*, estructura genética, hibridación, ADN mitocondrial.

SUMMARY

The Balearic shearwater (*Puffinus mauretanicus*) is one of the most endangered seabirds in the world. In this study, we focus on the assessment of the genetic identity, levels of genetic variability and on an additional

¹ Estación Biológica de Doñana (CSIC), Avda. M^a Luisa s/n, Aptdo. 41080 Sevilla

² Institut Mediterrani d'Estudis Avançats IMEDEA (CSIC-UIB), Miquel Marquès 21, 07190 Esporles, Mallorca

³ Dipartimento di Biologia, Università di Ferrara, Via Borsari 46, 44100 Ferrara, Italia

juste@ebd.csic.es

potential problem as is its hypothetical hybridization with the closest species Mediterranean shearwater (*P. yelkouan*). For that, we sampled almost all the breeding colonies and studied two fragments of mitochondrial DNA (approx. 1200 bp). We have confirmed the presence of haplotypes typically associated to *P. yelkouan* that indicate a possible introgression. These haplotypes were found almost only in Menorca's shearwaters, which are all statistically smaller than those from other Balearic Islands but size reduction occurs in all individuals, independently of the haplotype they have.

Levels of genetic variability found in the Balearic shearwater are quite high in relation to other birds, whereas only a shallow geographic structure was found among colonies. This could reflect either a higher than expected connectivity among colonies and/or a homogeneity due to a recent demographic expansion event. Finally, several colonies show unbalanced theoretical immigration and emigration rates, indicating a possible spatial heterogeneity in their colony quality.

Keywords: Balearic shearwater, *Puffinus mauretanicus*, *Puffinus yelkouan*, sibling species, Balearic Islands, genetic structure, mitochondrial DNA.

INTRODUCCIÓN

En este proyecto se propuso, de forma coordinada y complementaria con el anterior, proporcionar los datos genéticos imprescindibles para conocer la historia evolutiva reciente de la pardela balear (*Puffinus mauretanicus*), una de las especies más emblemáticas de la fauna española. Además nos propusimos proporcionar la información genética básica para organizar una estrategia de gestión adecuada y que garantice la conservación de esta especie altamente amenazada en la actualidad (ORO *et al.*, 2004).

Para ello se ha estudiado la estructura poblacional, flujo génico e integridad genética de las poblaciones de la pardela balear en el Parque Nacional de Cabrera y poblaciones aledañas a partir de marcadores de ADN.

La aplicación de técnicas moleculares a la genética de la conservación proporciona una importante guía para la elección de los criterios a seguir para el manejo de especies amenazadas (AVISE 1989, CARVALHO 1998). Existen varias fuerzas contrapuestas cuya resultante determina finalmente la estructura genética de una población o especie. La teoría de genética de poblaciones, predice que sin acción de selección natural la variabilidad genética de una población aumenta con su tamaño (KIMURA 1983) mientras que su tasa de diferenciación aumenta

de forma inversa al tamaño poblacional. Además, las especies presentan poblaciones a menudo subdivididas por razones geográficas, ecológicas o de comportamiento que por lo tanto favorecen la diferenciación y/o estructuración genética. Por el contrario, el flujo genético entre grupos conduce a una homogenización del material génico. Por lo tanto, cuando la tasa de intercambio es muy baja o nula, la selección natural y otras fuerzas azarosas como la mutación y la deriva genética determinan una diferenciación genética (HEDRICK 1942, SLATKIN 1987). En aves, las poblaciones de algunas especies presentan falta de diferenciación genética que se ha explicado por su capacidad de vuelo y consecuentemente de dispersión (BALL *et al.* 1988, BURSON 1990, BALL & AVISE 1992, AUSTIN *et al.* 1994, VAN TREUREN *et al.* 1999). Sin embargo, otras características específicas como la fidelidad a la colonia (filopatría), la distribución a grandes escalas geográficas o separaciones históricas entre grupos, etc., pueden determinar una diferenciación genética entre poblaciones en otros casos.

En este contexto, las pardelas son unas aves marinas extraordinarias en muchos aspectos. Su adaptación a este particular medio es tal que solo acuden a tierra para realizar sus puestas, y no todos los años. En el medio marino realizan desplazamientos extraordinariamente largos. Esta 'autoecología' tan especial, determina que el estudio de estas aves constituya un enorme reto y ayude a

entender el enorme desconocimiento que se tiene incluso de aspectos básicos de su biología. Además, la existencia de una uniformidad notable en los patrones morfológicos y de plumaje, ha determinado que la sistemática de las pardelas se haya mantenido confusa hasta nuestros días. En efecto, el propio reconocimiento de la pardela balear a nivel específico ha tenido que esperar hasta finales de los 90 y hasta entonces, su historia ha estado asociada a la pardela mediterránea (*P. yelkouan*), especie de menor tamaño y mucho más abundante. La distinción de la forma balear respecto a la forma mediterránea se basa en caracteres externos (el color ventral del plumaje no es blanco puro), morfométricos (la forma balear es significativamente mayor en todas las medidas corporales) y ecológicos (patrón de muda diferente entre ellas). La recopilación de todas estas diferencias apoyó la distinción específica entre ambas formas (MAYOL 1997). Esta distinción recibió el espaldarazo definitivo con un estudio genético del grupo (HEIDRICH *et al.* 1998), encontrándose valores de distancia genética entre las dos formas mediterráneas similares a los existentes entre otras especies reconocidas en el grupo.

La pardela balear, está considerada un endemismo en peligro de extinción. Es de gran importancia por lo tanto, establecer su diagnóstico genético y determinar el nivel de variabilidad genética de sus poblaciones y colonias y la tasa de flujo genético entre las mismas. Este ha sido el objetivo de este proyecto que se ha basado en el análisis de dos fragmentos de ADN mitocondrial, unos 1.000 pares de bases del gen citocromo b (*cit-b*) y unos 300 pares de bases de la región control (RC). Además, se ha empezado un estudio nuclear con la amplificación de 8 loci microsatélites que permitirán un estudio futuro complementario y basado en ADN nuclear del que no se tiene todavía resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recogida de muestras

Se han muestreado prácticamente la totalidad de las colonias conocidas de *P. mauretanicus* en el

archipiélago balear. En cada una de ellas se tomaron muestras de sangre de adultos y pollos. Para establecer niveles comparativos, también se obtuvieron muestras de la especie próxima *P. yelkouan* en la isla de Cerdeña y en Marsella. Los tamaños de muestra analizados por colonia o sub-colonia se presentan en la Tabla 1. Concretamente del Parque Nacional de Cabrera se tomaron muestras de tres colonias distintas: 'Es Corral' (9 muestras), 'Llumeta' (5 muestras) y 'Es Blanquer' (35 muestras). En general, las muestras se tomaron a partir de una punción en la vena femoral del ave y posterior, captación de la gota de sangre bien por capilaridad o con jeringa. La muestra de sangre obtenida era a continuación transferida a un tubo con etanol, puro o al 70%.

Extracción de ADN y amplificación de marcadores

En el laboratorio se procedió a la extracción de ADN de un total de 225 individuos procedentes de distintas colonias (tabla 1) siguiendo un protocolo que consistió en la incubación a 55° C en tampón SET, con 30 ml SDS al 10% y 2.5 unidades /ml de proteinasa K. A las 24 horas se procedió a la extracción de ADN con fenol / cloroformo estándar (SAMBROCK *et al.* 1989), resuspendiéndose el ADN obtenido en tampón TE.

LOCALIDAD	Anterior 2003 a 2003	2004	2005	Total	
Sa Cella		14	1	15	
Conills, Malgrats	10	10	2	22	
Menorca	7	7	12	26	
Espardell	4		2	5	11
Blanquer, Cabrera			13	22	35
Llumeta, Cabrera			5		5
Es Corral, Cabrera			1	8	9
Dragonera			3	7	10
Conillera, Eivissa		7	13		20
Es Bosc, Eivissa			3	17	20
Espartar, Eivissa				12	12
Tavolara, Sardegna				12	12
Figarolo, Sardegna				3	3
Marsella				25	25
Total	21	38	55	111	225

Tabla 1. Colonias y muestras analizadas de la pardela balear (*Puffinus mauretanicus*) y de la especie próxima pardela mediterránea (*Puffinus yelkouan*).

Table1. Description of colonies and individuals sampled of *P. mauretanicus* and *P. yelkouan*.

Para la amplificación de un fragmento del gen mitocondrial *cit-b*, se utilizaron los pares de primer mt-A (L-14970) y mt-Fr (H-16086) (HEIDRICH *et al.* 1998). Las amplificaciones se efectuaron en un volumen total de 25 μ l con: 1mM de cada primer, 0.25 mM dNTP, 1x Taq buffer, 1 U de Taq DNA polimerasa (Bioline), 0.01% gelatina (USB), 2.5 mM de Cl_2Mg y 1-2 μ l de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C 1 min., 50°C 1 min. y 72°C 1 min, con extensión final a 72°C 5 min. El producto de PCR se purificó y concentró por diálisis de centrifugación. Se comprobaron los resultados de amplificación y purificación cargando 1 μ l de producto en gel de agarosa al 1,5 %. El fragmento se secuenció directamente a partir de producto de PCR purificado utilizando un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, Warrington, UK) y las secuencias fueron revisadas a mano. Para la región control se usaron el primer ND6F (3'ATTTGATGCAACCGCTAACC 5'), diseñado específicamente para el extremo 5' de esta especie y el H505 (BURG & CROXALL 2001) que amplifican unos 300 pb en la primera región hipervariable (HV1).

Análisis filogenéticos y poblacionales

Una vez limpiadas y corregidas las secuencias, estas se alinearon mediante el programa CHROMASPRO hasta obtener un alineamiento sin ambigüedades para cada fragmento. Se utilizó el programa MODELTEST v 3.06 (POSADA & CRANDALL 1998) para seleccionar el modelo de sustitución que mejor se adaptaba a nuestros datos. En nuestro caso, el modelo evolutivo seleccionado para las dos regiones mitocondriales analizadas fue el modelo HKY85 (HASEGAWA *et al.* 1985). Las relaciones filogenéticas entre haplotipos se analizaron mediante aproximaciones de Mínima Evolución (ME) usando PAUP 4.0b10 (SWOFFORD 2003) y asumiendo el modelo evolutivo seleccionado. La robustez de los nodos se testó mediante análisis de bootstrap (FELSENSTEIN 1985) y Quartet Puzzling, respectivamente (STRIMMER *et al.* 1996).

Se utilizaron el número de secuencias diferentes (número de haplotipos), la diversidad génica

(heterozigosidad esperada) y diversidad nucleotídica (número promedio de 'pairwise differences' por posición) para describir la variabilidad genética dentro y entre poblaciones. Todos estos índices se calcularon con el programa ARLEQUIN (v.2.0.1.1.) (SCHNEIDER *et al.* 2000). Algunos individuos presentaron indicios de heteroplasmia mitocondrial y fueron descartados. Para estimar el grado de conectividad entre poblaciones y su posible variación a lo largo del tiempo se agruparon las colonias más cercanas en cuatro grupos pertenecientes a las 4 unidades geográficas más importantes (Mallorca, Cabrera, Menorca, y Pitiüesses, esta última correspondiendo a Eivissa y Formentera) que fueron utilizados como unidad de análisis.

Calculamos los estadísticos *Fst* y una AMOVA global (Análisis de Varianza Molecular, EXCOFFIER *et al.* 1992) con el programa Arlequin y con las distancias de secuencias corregidas. Efectuamos dos diseños de AMOVA: a) incluyendo todos los individuos; b) excluyendo los individuos de Menorca, donde la evidencia de hibridación es mayor.

Los patrones de migración y relaciones genéticas entre grupos se analizaron utilizando MIGRATE (BEERLI & FELSENSTEIN 1999, 2001) que por teoría de coalescencia estima las tasas de migración entre dos poblaciones. Este método usa toda la información de los datos y ofrece estimas fiables de divergencia genética, especialmente cuando las tasas de migración son elevadas, (y los valores de *Fst* consecuentemente bajos). Cada MCMC consistió en 10 cadenas cortas (muestreo de 10.000 árboles) y dos cadenas largas (muestreo de 5,000.000 árboles) con un periodo de burn-in de 10.000 árboles. La robustez de los estimadores se validó comparando resultados entre diferentes cadenas de Markov (ver BEERLI & FELSENSTEIN 1999, 2001). Con este método obtuvimos estimadores, del parámetro de migración M (tasa de migración escalada por la tasa de mutación) entre cada par de grupos y en las dos direcciones posibles de flujo. Para tener información adicional, estimamos la emigración e inmigración total para cada isla utilizando tanto el valor estimado de M como las puntuaciones relativas.

La desviación de la variabilidad esperada bajo condiciones de neutralidad y estabilidad demográfica se testó mediante los estadísticos D de TAJIMA (1989) y F_s de FU (1997), con el uso del programa ARLEQUIN (v.2.0.1.1.). El estadístico F_s es particularmente sensible al crecimiento poblacional. Valores negativos de ambos estadísticos indican un proceso una expansión poblacional. Una posible expansión poblacional fue analizada por la distribución de "mismatch" entre pares de haplotipos usando Arlequin y representada gráficamente con DNASP (ROZAS *et al.* 2003). La distribución de mismatch tiende a ser multimodal en poblaciones en equilibrio demográfico y unimodal en aquellas que han experimentado una expansión demográfica (ROGERS & HARPENDING 1992). La comparación estadística de la distribución de mismatch se basó en la aproximación de SCHNEIDER & EXCOFFIER (1999), donde se compara la distribución observada con la esperada bajo un modelo nulo de expansión poblacional. En caso de no rechazarse la hipótesis nula, los parámetros de la expansión (edad y tamaño poblacional antes y después del evento) se han estimado asumiendo una tasa de evolución de 0.9% /MY para el *cit-b* basada en calibración fósil in Procellariidae de tamaño medio (NUNN & STANLEY, 1998), y un tiempo de generación de 11 años calculado para la especie (ORO *et al.* 2004). Finalmente, el patrón filogeográfico se investigó mediante un análisis de clados anillados (NCPA) (TEMPLETON 1998). Este análisis testa asociación geográfica entre haplotipos y sugiere posibles interpretaciones en el caso de haber asociaciones. Aunque ha recibido algunas críticas (KNOWLES & MADDISON 2002, aunque ver TEMPLETON 2004), el NCPA proporciona un marco empírico muy útil para dilucidar entre los procesos ecológicos e históricos determinantes de la estructura genética. Para ello se partió de una red de haplotipos de parsimonia utilizando el programa TCS (CLEMENT *et al.* 2000) para estimar los agrupamientos haplotípicos y visualizar el número de mutaciones entre ellos. Mediante el programa GEODIS (POSADA *et al.* 2000) se calcularon los estadísticos: D_c y D_n . D_c mide el rango geográfico de un clado particular y D_n compara el rango geográfico de un clado en relación a sus clados herma-

nos. La significación de la diferencia entre estos estadísticos, calculados en un clado apical y el correspondiente clado interior se estimó mediante permutaciones. Únicamente los clados con asociaciones geográfica significativa se analizaron posteriormente siguiendo la clave de inferencia (TEMPLETON 2004).

Análisis morfométrico

Se tomaron medidas corporales de 120 adultos reproductores. Longitud del pico-cráneo, altura mínima de pico, y tarso se midieron con un calibre digital (± 0.02 mm) y longitud de ala con una regla. Mediante un análisis de componentes principales (PCA) obtuvimos un índice de tamaño corporal. Utilizando este índice, aplicamos un Modelo General Linear (usando SPSS, versión 12.0) para analizar las relaciones entre tamaño corporal, haplotipo mitocondrial, origen geográfico y sexo.

RESULTADOS

Se obtuvo un fragmento de 850 pares de bases (pb) del gen *cit-b* y unos 300 pb de la región control (RC) respectivamente de 105 y 98 individuos de pardela balear (*P. mauretanicus*). Las localidades de muestreo, el número de individuos analizados para el *cit-b* y la RC, y los haplotipos detectados en cada una de las colonias de cría, vienen reflejados en la Tabla 2. Como referencia se incluyeron también las secuencias homólogas de 4 individuos de pardela balear y otros 4 individuos de la especie mediterránea (*Puffinus yelkouan*) depositadas en GeneBank por HEIDRICH *et al.* (1998). En el fragmento de *cit-b* se observaron un total de 29 sitios variables, de los cuales 24 eran informativos; mientras que en la RC, 34 sitios fueron polimórficos, de los cuales 30, informativos. Todas las secuencias están depositadas en el GenBank, con los números de acceso: DQ230131-DQ230316.

El modelo HKY85 (HASEGAWA *et al.* 1985) se escogió como el más apropiado para los dos fragmentos de estudio. Para el *cit-b*, encontra-

Localidad	<i>cit-b</i>	RC	Haplotipos
Menorca	24	22	<i>cit-b</i> : CB7(2),CB8,CB10(3),CB11,CB12(14),CB13, CB14,CB15 RC : DL6(2), DL7(3), DL8(4), DL9 (2), DL26, DL27, DL28, DL30(2), DL35, DL38, DL43 (2), 2 IND
Malgrats, Mallorca	19	17	<i>cit-b</i> : CB5, CB6(3), CB7(3), CB8, CB9(4), CB10(3), CB14(3),CB19 RC : DL2(2), DL3, DL4, DL5, DL6(3), DL7, DL22, DL29, DL31, DL36, DL37, DL43, 2 IND
Sa Cella, Mallorca	16	13	<i>cit-b</i> : CB7(12), CB9, CB10(2), CB14 RC : DL1(2), DL2, DL23, DL33, DL34 (2), DL39, DL42, 4 IND
Blanquer, Cabrera	11	12	<i>cit-b</i> : CB7(5), CB9(2), CB12,CB14, CB17(2) RC : DL1, DL6, DL15,DL16, DL17, DL18(2), DL39(2), DL41, 2 IND
Llumeta, Cabrera	5	5	<i>cit-b</i> : CB7(5) RC : DL10, DL12, DL13,DL14, 1 IND
Es Corral, Cabrera	1	1	<i>cit-b</i> : CB14 RC : 1 IND
Conillera, Pitiüses	20	17	<i>cit-b</i> : CB7(9), CB8, CB9, CB14, CB15, CB17(5), CB19(2) RC : DL6(2),DL10(4), DL19, DL20, DL21, DL24, DL25(2), DL31, DL39, 3 IND
Es Bosc, Pitiüses	2	3	<i>cit-b</i> : CB14, CB18 RC : DL6, DL13, DL19
Espardell, Pitiüses	5	5	<i>cit-b</i> : CB7(3), CB20, CB21 RC : DL5, DL10, DL11, DL18, DL32
Dragonera, Mallorca	2	3	<i>cit-b</i> : CB7, CB10 RC : DL2, DL6, DL40
TOTAL	105	98	

Tabla 2. Haplotipos detectados en las diferentes colonias de cría de pardela balear para el citocromo b (*cit-b*) y la Región Control (RC) mitocondriales. Los individuos a los que no se les pudo asignar un haplotipo concreto, debido a posible heteroplasmia, se codifican como IND.

Table 2. Haplotypes found in the Balearic shearwater in the mitochondrial *cit-b* and RC fragments. Ambiguous haplotypes are IND.

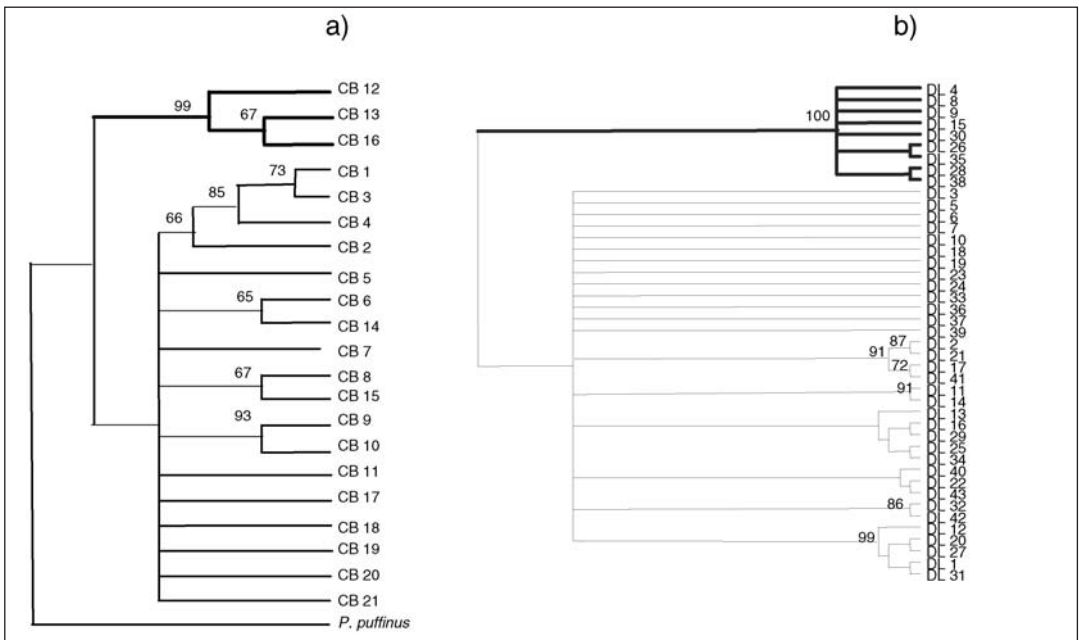


Figura 1. Reconstrucción filogenética de las relaciones entre los haplotipos encontrados en la pardela balear de los fragmentos mitocondriales (a) del citocromo b (*cit-b*) y (b) la región control (RC) según los criterios de Mínima Evolución (ME) y según un modelo evolutivo HKY85 y HKY85 + G respectivamente. Con líneas de mayor grosor se marca el clado de haplotipos “tipo yelkouan” encontrados (ver texto).

Figure 1. Reconstruction of phylogenetic relationships among haplotypes found in the mitochondrial (a) *cit-b* and (b) RC fragments according to ME and HKY85 and HKY85 + G evolutionary models.

Colonia Citocromo b	N	Hapl	S	H [^]	Nuc.div (%)	π
Menorca	9	6	7	0.89 +/- 0.09	0.26 +/- 0.00	2.29 +/- 1.38
Malgrats	19	8	9	0.89 +/- 0.03	0.298 +/- 0.02	2.610 +/- 1.46
Sa cella	16	4	4	0.44 +/- 0.14	0.092 +/- 0.00	0.81 +/- 0.61
Cabrera,Blanquer	10	4	4	0.73 +/- 0.12	0.127 +/- 0.10	1.11 +/- 0.79
Cabrera,Llumeta	5	1	0	0.00 +/- 0.00	0.00 +/- 0.00	0.00 +/- 0.00
Eivissa, Conillera	20	7	7	0.75 +/- 0.08	0.137 +/- 0.10	1.26 +/- 0.83
Espardell	5	3	3	0.70 +/- 0.22	0.135 +/- 0.12	1.20 +/- 0.91
Promedio	105	16	23	0.81 +/- 0.03	0.4 +/- 0.00	3.52 +/- 1.81
Región Control						
Menorca	8	4	17	0.82+/-0.10	2.4 +/- 1.44	7.25 +/- 3.80
Malgrats	14	11	28	0.96+/-0.04	2.87 +/- 1.58	8.61 +/- 4.23
Sa Cella	9	7	25	0.94+/-0.07	3.56 +/- 2.1	9.7 +/- 4.91
Cabrera,Blanquer	9	7	26	0.94+/- 0.07	3.06 +/- 1.8	9.29 +/- 4.72
Cabrera,Llumeta	4	4	14	1 +/- 0.18	2.4 +/- 1.7	7.18 +/- 4.27
Eivissa, Conillera	14	9	31	0.91 +/- 0.06	2.56 +/- 1.4	7.96 +/- 3.94
Espardell	5	5	14	1 +/- 0.13	2.2 +/- 1.43	6.55 +/- 3.73
Promedio	84	43	50	0.97+/- 0.01	3.72+/- 0.02	11.03 +/- 5.06

Tabla 3. Índices de variabilidad genética calculados a partir de los dos marcadores mitocondriales para cada una de las colonias muestreadas de pardela balear. Detallamos el tamaño de muestra (N), los haplotipos detectados (Hapl), el grado de diversidad genética (H[^]), la diversidad nucleotídica (Nuc. Div) y la distancia promedio por posición (p).

Table 3. Genetic diversity indexes for both mitochondrial markers and for each sampled colony.

mos tasa de evolución equivalentes para todos los sitios. En la RC, el valor estimado del parámetro α de la distribución gamma fue de 0.3102. Como se comprueba en la Figura 1, las topologías obtenidas para los dos fragmentos fueron concordantes. Los dos árboles distinguen dos clados principales bien apoyados que corresponden a las dos especies de pardela del mediterráneo: la pardela mediterránea, y la pardela balear. Un mínimo de 10 sustituciones separan los dos clados en el fragmento del *cit-b*, que es menos variable. Con la excepción de un pollo muestreado en Cabrera, todos los otros individuos con haplotipos de pardela mediterránea provienen de la isla de Menorca. De hecho, en Menorca, 15 de 24 individuos muestreados presentaron haplotipos 'tipo *yelkouan*' 14 de los cuales eran idénticos a la secuencia depositada en GenBank que corresponde a un individuo de Creta (AJ004216) (Haplotipo CB12). La distancia promedio entre los haplotipos correspondientes a las dos especies fue de 0.94%, que indicaría aplicando un reloj molecular, una edad aproximada del ancestro común más reciente de 1 millón de años, si nos basamos en la tasa calculada para Procellariidae.

Los valores de variabilidad genética (Tabla 3) fueron altos y tanto la diversidad genética como nucleotídica,

registradas son comparables e incluso mayores que los de otras especies que no se encuentran amenazadas, tales como: *Oporornis tolmiei* (MILA *et al.* 2000), *Sterna fuscata* (QU *et al.* 2005), *Calidris alpina* (WENINK *et al.* 1993), *Alca torda* y *Uria aalga* (MOUM & ARNASON 2001), *Somateria mollissima* (TIEDEMANN *et al.* 2004), *Aquila heliaca* o *Milvus milvus* (ROQUES & NEGRO 2005). No observamos ninguna reducción evidente en la variabilidad genética tampoco dentro de colonias (Tabla 3). La única excepción fueron las colonia de Sa Cella y una colonia de Cabrera poco representada. Además esta reducción sólo se observó a nivel del *cit-b*. Como vemos en Tabla 4, la presencia de haplotipos 'tipo *yelkouan*' en más de la mitad de los individuos de Menorca, claramente introduce una fuerte estructuración geográfica en la variación genética. Cuando prescindimos de los individuos con haplotipo atípico o analizamos los datos sin los individuos de Menorca, los valores de *Fst* ya no son significativos ($P > 0.01$). Las comparaciones de *Fst* también revelan una baja diferenciación entre colonias, siendo sólo el grupo de Pitiüsses, el que muestra valores significativos y de un 10.0% ($P < 0.05$) y 6.5 % ($P < 0.05$) en la comparación del *cyt-b* con Menorca y Mallorca, respectivamente. Con la aproximación de máxima verosimilitud se estimaron los parámetros de migración *M* (Tabla 5) en los que

	Intra-poblaciones	Entre-poblaciones	Fst
Citocromo b			
Todos los individuos	64.21 %	35.79 %	0.358 *
Sin individuos de Menorca	93.78 %	6.22 %	0.062
Región Control			
Todos los individuos	83.95 %	16.05 %	0.161 *
Sin individuos de Menorca	101.57 %	-1.57 %	-0.016

Tabla 4. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) y valores del estadístico *Fst* (la significación a nivel $P < 0.01$ viene indicada por un asterisco). Se efectuaron dos diseños de AMOVA: incluyendo todos los individuos; y excluyendo todos los individuos de Menorca, dada la presencia en esta población de haplotipos típicos de la especie *P. yelkouan*.

Table 4. Molecular analysis of variance and *Fst* statistics for two designs: including all individuals and excluding Menorca's populations.

combinamos las estimas para cada fragmento para tratar de reducir los intervalos de confianza (Figura 2).

Tanto el estadístico *D* de Tajima como la F_s de Fu fueron significativamente negativos en el análisis del *cyt-b* ($D = -1.47$, $P < 0.05$; $F_s = -8.39$, $P < 0.005$).

	Suma de valores de M		Suma de puntuaciones de M	
	Inmigración	Emigración	Inmigración	Emigración
Menorca	2386	1235	15	14
Mallorca	4561	11993	17	29
Cabrera	8850	4289	25	15
Pitiüsses	6514	4794	21	20

Tabla 5. Patrones teóricos de inmigración y emigración estimados por máxima verosimilitud para cada una de las sub-poblaciones estudiadas de la pardela balear.

Table 5. Immigration and emigration theoretical parameters estimated by maximum likelihood for each population studied of Balearic shearwater.

También fueron negativos, estos estadísticos para la RC, aunque sólo la *F* de Fu fue significativo ($D = 0.4696$, n.s., $F_s = -8.889$, $P < 0.001$). Estos valores indican que la variación genética en la pardela balear es compatible con un modelo de expansión demográfica. De hecho, las distribuciones de "mismatch" para las dos regiones de ADN mitocondrial, son compatibles ($P > 0.05$) con un modelo de expansión (Fig. 3). Los parámetros de expansión estimados a partir de estas distribuciones son los tamaños efectivos de la población antes (\varnothing_0) y después

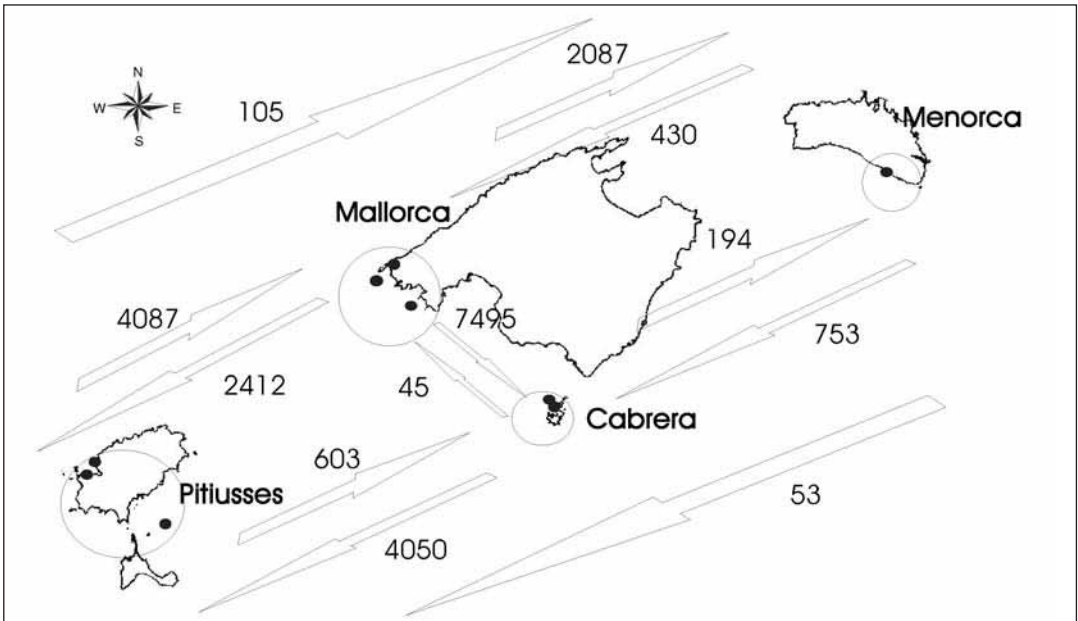


Figura 2. Valores estimados de tasas teóricas de migración (*M*) obtenidos tras promediar los valores de cada fragmento mitocondrial (después de multiplicar por 15 los valores de *M* observados para la RC). Estos valores estimados son relativos a la tasa de mutación.
Figure 2. Estimated values for migration (*M*) rates relative to mutation rates.

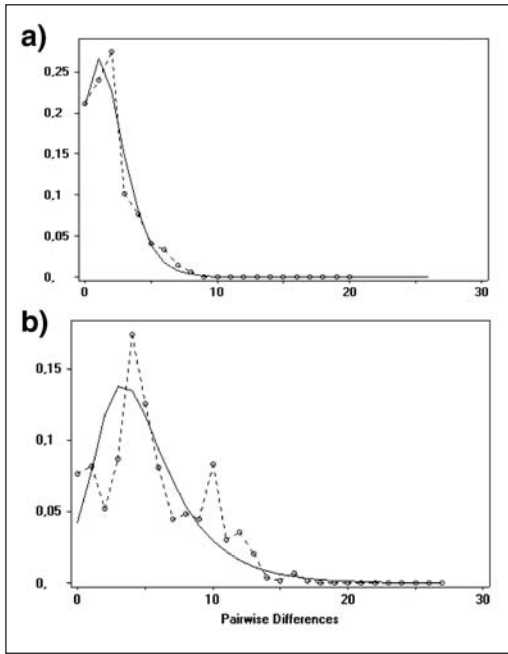


Figura 3. Distribuciones de “mismatch” para las dos regiones de ADN mitocondrial. (a) Citocromo b (*cit-b*) y (b) Región Control (RC) estudiadas en la pardela balear. La frecuencia esperada según el modelo se representa por la línea continua, mientras que la observada se representa con una línea discontinua.

Figure 3. Mismatch distributions for both mitochondrial (*cit-b*) and (RC) fragments.

($\hat{\theta}_1$) de la expansión, corregidos por la tasa de mutación y la edad de la expansión (τ), también corregida por la tasa de mutación. Para los datos de *cit-b*, las estimas fueron $\hat{\theta}_0 = 0.412$, $\hat{\theta}_1 = 6.149$ y $\tau = 1.68$, mientras que para la RC obtuvimos $\hat{\theta}_0 = 2.728$, $\hat{\theta}_1 = 36.464$ y $\tau = 6.664$. Muy importante, las comparaciones de los parámetros en las regiones de ADN son concordantes y sugieren que la tasa de mutación en el *cit-b* es entre 4 y 6.6 veces menor que en la RC. Los dos conjuntos de estimas apoyan una expansión de aproximadamente 13-14 veces la población. Utilizando la tasa calibrada de 0.9% / MY para el *cit-b*, y un tiempo de generación para la especie de 11 años, esto implicaría un cambio en el tamaño efectivo de la población de 4.700 a aproximadamente 70.500 después de la expansión, que se habría producido hace aproximadamente 212.000 años (intervalo de confianza, $\alpha = 0.05$: 74.000-546.000 años).

Finalmente, se aplicó un NCPA a la red de haplotipos del *cit-b* (Fig. 4) construida según el criterio de parsimonia utilizando el programa TCS (CLEMENT *et al.* 2000). La red fue capaz de conectar todos los haplotipos, incluyendo aquellos atribuidos a la pardela mediterránea. El NCPA rechazó la hipótesis nula de no asociación geográfica de los haplotipos ($P < 0.0001$) en el cladograma total. El método no pudo discriminar entre colonización a larga distancia unida a una subsiguiente fragmentación o una fragmentación antigua seguida por una expansión demográfica. Cuando analizamos específicamente los haplotipos baleares, detectamos una expansión contigua en los clados mayores (1-6 y 2-3), y flujo genético restringido con aislamiento por distancia en el clado 2.2.

Finalmente, el análisis morfométrico realizado a partir del índice de tamaño corporal entre poblaciones puso en evidencia que: (i) los individuos de Menorca son más pequeños, pero más variables que los individuos de las otras islas ($F_{81,3} = 72.63$ $P < 0.001$); (ii) que los individuos con haplotipos ‘*tipo yelkouan*’ en Menorca no son significativamente distintos que los que presentan haplotipo ‘*tipo balear*’ ($F_{20,3} = 0.120$, *n.s.*); (iii) que se confirma la existencia de un dimorfismo importante (GENOVART *et al.* 2003) en la especie balear, con los machos significativamente más grandes que las hembras ($F_{81,3} = 44.50$ $P < 0.001$). Sin embargo, (iv), no encontramos correlación en los individuos de Menorca entre las diferencias morfométricas y el tipo de haplotipo mitocondrial del individuo (Fig. 5).

DISCUSIÓN

El ADN mitocondrial, constituye una herramienta muy útil para estudios de estructuración poblacional dada su transmisión exclusiva por vía materna sin recombinación y su tasa de cambio relativamente rápida, acumulando mutaciones de 5 a 10 veces más rápidamente que el ADN nuclear (TABERLET 1996). Concretamente, la región control proporciona una resolución especialmente apta para estos estudios poblacionales ya que evoluciona 4-5 veces más

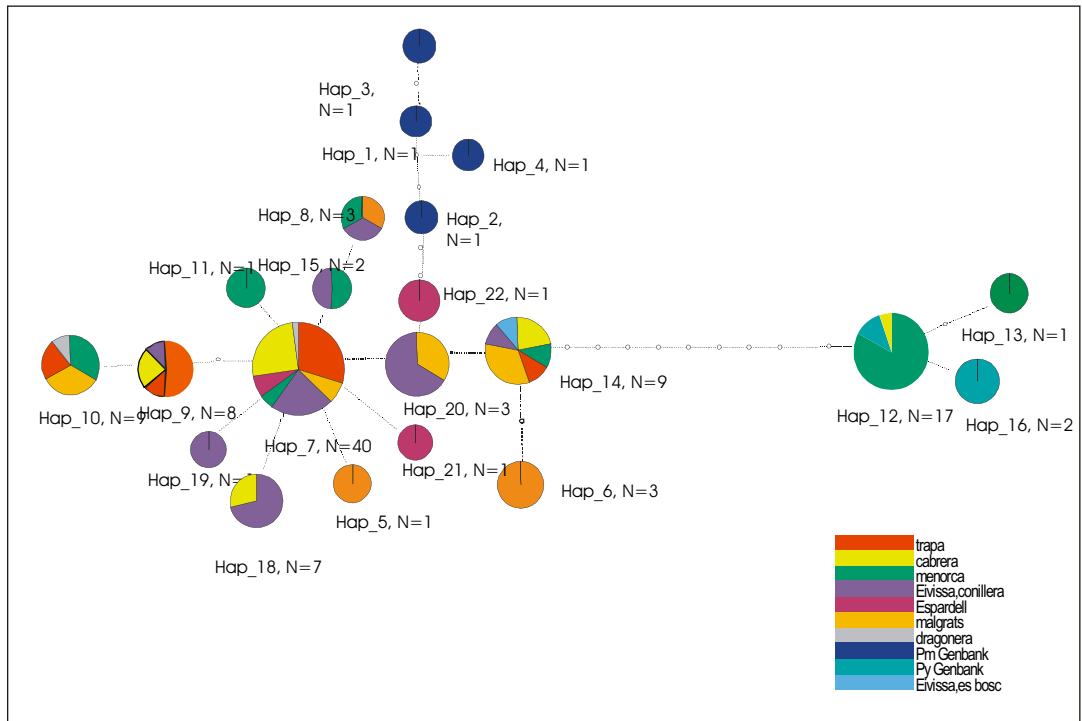


Figura 4. Red haplotípica calculada por Máxima Parsimonia. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo, y la sección coloreada es proporcional al porcentaje de individuos de cada colonia que presenta dicho haplotipo.

Figure 4. Haplotypic MP network. Sizes and colors are proporcional to abundance on each population.

rápido que el resto del ADN mitocondrial (GREENBERG *et al.* 1983, BROWN *et al.* 1993). Es por ello que la variabilidad de la región control ha sido analizada ampliamente en otras aves (QUINN & WILSON 1993, EDWARDS 1993a, EDWARDS 1993b, WENINK *et al.* 1993, WENINK *et al.* 1994, AVISE 1996).

En este estudio, se ha comprobado la presencia en la pardela balear de dos linajes claramente distintos de ADN mitocondrial que corresponden a las dos especies del género *Puffinus* que se reproducen en el Mediterráneo. La coincidencia del descubrimiento de linajes ‘tipo *yelkouan*’ en las pardelas baleares de Menorca, con el menor tamaño y coloración mas contrastada de las pardelas baleares menorquinas, hizo plantear en un principio la posibilidad de que ambas especies criaran en simpatría en esta isla (RUIZ *et al.* 2003; GENOVART *et al.* 2005). Sin embargo, la posterior comprobación de que las pardelas de Menorca presentan uniformidad morfológica (independiente-

mente del genotipo que posean) y un tamaño superior al de las típicas *P. yelkouan* indican una realidad más compleja y mucho más interesante desde un punto de vista evolutivo. De hecho, nuestros resultados apoyan la clara separación de la pardela balear de la mediterránea, apoyando la distinción de dos linajes propios e independientes y que han sido reconocidos formalmente a nivel específico. Por las distancias genéticas encontradas estimamos que las dos especies compartieron un ancestro común hace aproximadamente 1 millón de años; datación que concuerda con los resultados estimados por HEIDRICH *et al.* (1998), lo que indica una divergencia reciente entre ambas especies, en un proceso de especiación que ha podido ocurrir en el Mediterráneo tras la reapertura del estrecho de Gibraltar hace aprox. 5 millones de años (ZOTIER *et al.* 1999). Los haplotipos mitocondriales ‘tipo *yelkouan*’ hallados en Menorca podrían deberse a la presencia de un polimorfismo ancestral asociado a esta diferenciación reciente entre ambas pardelas mediterráneas.

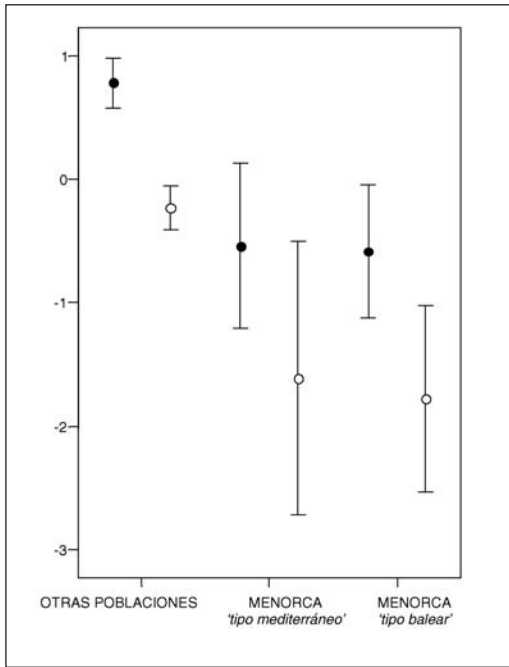


Figura 5. Diferencias en valores medios del índice de tamaño corporal y nivel de confianza del 95% entre individuos de Menorca con haplotipos mitocondriales 'tipo balear' e individuos con haplotipos 'tipo mediterráneo' y otras poblaciones (machos círculo abierto y hembras círculo cerrado).

Figure 5. Differences in mean values of a body index between individuals of Menorca' shearwaters bearing typical *P. mauretanicus* haplotypes and individuals bearing typical *P. yelkouan* haplotypes.

Sin embargo, un análisis exploratorio efectuado con IM (NIELSEN & WAKLEY 2001; SEGRAVES & PELLMYR 2004; WON & HEY 2005) ha detectado una sola dirección posible de flujo desde la pardela mediterránea hacia la balear y no al revés, indicando que nos encontramos probablemente frente a una introgresión de ADN mitocondrial de la especie mediterránea. Esta introgresión parece que se encuentra básicamente localizada en la isla de Menorca, donde más de la mitad de los individuos analizados muestran haplotipos de pardela mediterránea. La escasa variabilidad genética entre estos haplotipos de pardela mediterránea, sugiere que la introgresión se ha podido deber a una o pocas hembras y ha podido ser un fenómeno relativamente antiguo y puntual. Sin embargo, es necesario ampliar tanto el número de marcadores como el muestreo para llegar a conclusiones más sólidas al respecto.

Los niveles de variabilidad genética de la especie y en Cabrera en particular, son altos y no parece que exista problema alguno para la especie en este aspecto (solo la colonia "Llumeta", registró una baja variabilidad genética el *cit-b*, pero probablemente debida al pequeño tamaño de muestra). Sin embargo, esta alta variabilidad no está estructurada geográficamente lo que sugiere existe una mayor conectividad entre colonias que la esperada, lo cual sorprende dados los niveles de filopatría típica de estas aves (WARHAM 1990; RUIZ *et al.* 2003; ORO *et al.* 2004). Otra posible explicación podría ser una dispersión natal mayor a la esperada (especialmente en hembras), como ya se ha sugerido para otros Procellariiformes (MOUGIN *et al.* 1999; MARTÍNEZ-ABRAÍN *et al.* 2002). A nivel probabilístico, se detecta cierto flujo entre colonias con tasas muy asimétricas de emigración y de inmigración, sugiriendo una heterogeneidad espacial en la calidad e importancia de las colonias y la probable existencia de fuentes y sumideros a nivel metapoblacional. Concretamente en Cabrera, las elevadas tasas de inmigración en relación a las tasas de emigración detectadas, sugieren que esta población actúa de sumidero y que probablemente se ha mantenido gracias al aporte de nuevos individuos desde otras colonias. Los valores actuales de éxito reproductor (ver el otro sub-proyecto) no parecen indicar un problema de depredación en las colonias, si bien parece fundamental, continuar en Cabrera con los esfuerzos de desratización y control de gatos y otros carnívoros, para que el archipiélago contenga áreas de reproducción de calidad que aporte individuos (es decir, se convierta en fuente).

CONCLUSIONES

En resumen, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que:

- a) La pardela balear presenta haplotipos mitocondriales típicos de la especie próxima *P. yelkouan* en algunos individuos, fundamentalmente de Menorca debido posiblemente a un contacto genético puntual y antiguo entre ambas especies. Es necesario evaluar y realizar el segui-

miento de la dinámica de los genotipos típicos de la especie mediterránea entre las poblaciones de la especie balear.

b) La pardela balear presenta niveles relativamente altos de variabilidad genética sin que ésta parezca haberse visto afectada por el reciente declive poblacional.

c) La población de Cabrera está actuando en la actualidad más como sumidero que como fuente de variabilidad. Los esfuerzos de conservación se tienen que centrar prioritariamente en favorecer el aumento de los efectivos poblacionales manteniendo las colonias de cría libres de predadores, y con el objetivo principal de aumentar

la supervivencia adulta para que la población pueda recuperarse y llegar a ser población fuente para otras poblaciones de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Al OAPN por el interés mostrado en el proyecto desde el primer momento, y en particular, a J. F. Amengual del Parque Nacional de Cabrera. También queremos agradecer a Isa Afán por su ayuda en el campo y a Skua CB por su apoyo logístico en las visitas al Parque. Finalmente agradecer a Tonyo Alcover por sus estimulantes discusiones científicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTIN, J.J., WHITE, R.W.G. & OVENDEN, J.R. 1994. Population-genetic structure of a philopatric, colonially nesting seabird, the Short-tailed Shearwater (*Puffinus tenuirostris*). *Auk* 111: 70-79.
- AVISE, J.C. 1996. Three fundamental contributions of molecular genetics to avian ecology and evolution. *Ibis* 138:16-25
- AVISE, J.C. 1989. A Role for Molecular Genetics in the Recognition and Conservation of Endangered Species. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 279-281.
- BALL, R.M. & AVISE, J.C. 1992. Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian populations and the evolutionary significance of subspecies. *Auk* 109: 626-636.
- BALL, R.M., FREEMAN, S., JAMES, F.C., BERMINGHAM, E. & AVISE, J.C. 1988. Phylogeographic population structure of Red-winged Blackbirds assessed by mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 158-162.
- BEERLI, P. & FELSENSTEIN, J. 1999. Maximum likelihood estimation of migration rates and population numbers of two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152: 763-773.
- BEERLI, P. & FELSENSTEIN, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in *n* subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 98: 4563-4568.
- BROWN, J.R. BECKENBACH, A.T. & SMITH, M.J. 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Aspenser transmontanus*). *Molecular Biology and Evolution*. 10:326-341.
- BURG, T.M., & CROXALL, J.P. 2001. Global relationships amongst black-browed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology* 10:2647-2660.
- BURSON, S. L. 1990. Population genetics and gene flow of the Common Tern. *Condor* 92: 182-192.
- CARVALHO, G.R. 1998. Molecular Ecology: Origins and Approach. En: *Advances in Molecular Ecology*. (Ed. G.R. Carvalho). IOS Press.
- CLEMENT, M., POSADA, D. & CRANDALL, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1619.
- EDWARDS, S.V. 1993a. Long distance gene flow in a cooperative breeder detected in genealogies of mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 252: 177-185

- EDWARDS, S.V.1993b. Mitochondrial gene genealogy and gene flow among island and mainland populations of a sedentary songbird, the grey-crowned babbler (*Pomatostomus temporalis*). *Evolution* 47:118-1137
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. & QUATTRO, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 343-59.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FU, Y.X., 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- GENOVART, M., JUSTE, J., & ORO, D. 2005. Two sibling species sympatrically breeding: a new conservation concern for the critically endangered Balearic shearwater. *Conservation Genetics*, 6:601-606.
- GENOVART, M., MCMINN, M., & BOWLER, D. 2003. A Discriminant Function for Predicting Sex in the Balearic Shearwater. *Waterbirds*, 26: 72-76.
- GREENBERG, B.D., NEWBOLD, J.E. & SUGINO, A. 1983. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene* 21: 33-49
- HASEGAWA, M., KISHINO, H., & YANO, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- HEDRICK, P.W. 1942. Genetics of populations. London: Jones & Bartlett Publishers.
- HEIDRICH P., AMENGUAL J.F. & WINK M. 1998. Phylogenetic relationships in Mediterranean and North Atlantic shearwaters (Aves: Procellariidae) based on nucleotide sequences of mtDNA. *Biochemist. Systematic. Ecology*. 26: 145-170.
- KIMURA, M. 1983. The neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge: Cambridge University Press.
- KNOWLES, L.L., & MADDISON, W.P. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623-2635.
- MARTÍNEZ-ABRAÍN, A., SÁNCHEZ, A. & ORO, D. 2002. Atlantic Cory's Shearwaters (*Calonectris diomedea borealis*) breeding in a colony of Mediterranean Cory's Shearwater (*C. d. diomedea*). *Waterbirds* 25: 221-224.
- MAYOL, J. 1997. La identitat específica de la baldritja de les Balears *Puffinus mauretanicus* (Lowe) 1921. *Anuari Ornitológic de les Balears*. 12: 3-11.
- MILA, B., GRIMAN, D.J., KIMURA, M., & SMITH, T.B., 2000. Genetic evidence for the effect of a post glacial population expansion on the phylogeography of a North American songbird. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 267: 1033-1040.
- MOUGIN, J.L., GRANADEIRO, J.P., JOUANIN, C., & ROUX, F., 1999. Philopatry and faithfulness to nest site in Cory's shearwaters *Calonectris diomedea* at Selvagem Grande. *Ostrich* 70: 229-232.;
- MOUM, T., & ARNASON, E., 2001. Genetic diversity and population history of two related seabird species based on mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology* 10: 2463-2478.
- NIELSEN, R., & WAKELEY, J., 2001. Distinguishing migration from isolation. A Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics* 158: 885-896.
- NUNN, G.B., & STANLEY, S.E., 1998. Body size effects and rates of *cit-b* evolution in tube-nosed seabirds. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1360-1371.
- ORO, D., AGUILAR, J.S., IGUAL, J.M., & LOUZAO, M. 2004. Modelling demography and extinction risk in the endangered Balearic shearwater. *Biological Conservation* 116: 93-102.
- POSADA, D. & CRANDALL, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 37-45.
- POSADA, D., CRANDALL, K.A., & TEMPLETON, A.R. 2000. GEODIS: a program from the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9: 487-488.
- QU, Y.H., LEI, F.M., YIN, Z.H., & FABRIZIO-De RITIS, S. 2005. Distribution patterns of snow finches (genus *Montifringilla*) in the Tibetan plateau of China. *Avocetta* 26: 11-18.
- QUINN T.W., & WILSON S.C. 1993. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *Journal of Molecular Evolution* 37:417-425

- ROGERS, A.R., & HARPENDING, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- ROQUES, S., & NEGRO, J. 2005. MtDNA genetic diversity and population history of a dwindling raptorial bird, the red kite *Milvus milvus*. *Biological Conservation* 126 41-50
- ROZAS, J, SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C., MESSEGUER, X., & ROZAS, R. 2003. DNAsp, DNA polymorphism analyzes by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- RUIZ, A., MCMINN, M., MARTÍ, R., 2003. Pardela Mediterránea *Puffinus yelkouan*. En Martí, R., Del Moral, J.C., (eds.). Atlas de las aves reproductoras de España. Pp 90-91. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Sociedad Española de Ornitología, Madrid.
- SAMBROCK J., FRITSCH E.F. & MANIATIS T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHNEIDER, S., & EXCOFFIER, L. 1999. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., & EXCOFFIER, L., 2000. Arlequin v. 2.0: A Software for Population Genetic Data Analysis, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SEGREAVES, K.A., & PELLMYR, O. 2004. Testing the out-of-Florida hypothesis on the origin of cheating in the Yucca-Yucca moth mutualism. *Evolution* 58, 2266-2279.
- SLATKIN, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural population. *Science* 236: 787-792.
- STRIMMER, K., & VON HAESLER, A. 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution* 13: 964-969.
- SWOFFORD, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- TABERLET, P. 1996. The Use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics. En: Molecular Genetic Approaches in Conservation.. Smith,T.B. and Wayne,R.K (Eds).
- TAJIMA, F., 1989. *Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism*. *Genetics* 123: 585-595.
- TEMPLETON, A.R., 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13: 789-809.
- TEMPLETON, A. R. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data:testing hypothesis about gene flow and population hystory. *Molecular Ecology* 7:381-397.
- TIEDEMANN, R., PAULUS, K.B., SCHEER, M., VON KISTOWEKY, K.G., & SKIRNISON, K. 2004. Mitochondrial DNA and microsatellite variation in the eider duck (*Somateria mollissima*) indicate stepwise postglacial colonization of Europe and limited current long-distance dispersal. *Molecular Ecology* 13: 1481-1494.
- VAN TREUREN, R., R. BIJLSMA, J.M. TINBERGEN, D. HEG & L. VAN DE ZANDE.1999. Genetic analysis of the population structure of socially organized oystercatchers (*Haematopus ostralegus*) using microsatellites. *Molecular Ecology*. 8: 181-187.
- WARHAM, J., 1990. The petrels: their ecology and breeding systems. Academic Press, London.
- WENINK, P.W., BAKER, A.J., & TILANUS, M.J. 1993. Hypervariable-control-region sequences reveal global population structuring in a long distance migrant shorebird, the Dunlin (*Calidris alpina*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 94-98
- WENINK P.W., BAKER A.J., & TILANUS M.J. 1994. Mitochondrial control-region in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies. *Molecular Biology and Evolution* 11:22-31
- WON, YJ, & HEY, J. 2005. Divergence population genetics of chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 22: 297-307.
- ZOTIER, R., BRETAGNOLLE, V., & THIBAUT, J-C., 1999. Biogeography of the marine birds of a confined sea, the Mediterranean. *Journal of Biogeography* 26: 297-313.