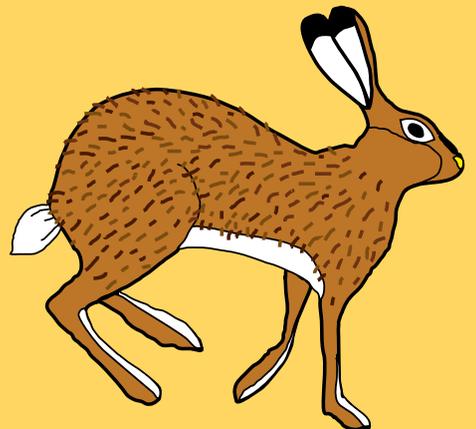
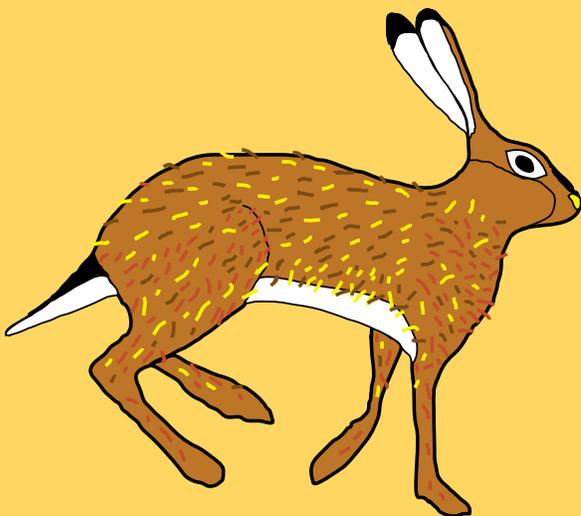


LIEBRES FANTASMAS

La Evolución de Las Liebres en La Península Ibérica



EDICIÓN

Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos
(CIBIO/InBIO) da Universidade do Porto
Julio de 2015

Edición simultánea en portugués, castellano e inglés.

Traducción: Rita Campos y Pelayo Acevedo.

Revisión (edición en inglés): James D. Harris.

ISBN 978-989-98732-7-8

DISEÑO Joana Monteiro

Sugerencia para cita: Campos R; Melo-Ferreira J, Acevedo P. (2015).

Liebres fantasmas: la evolución de las liebres en la Península Ibérica.

CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos.
Porto, Portugal.

Este libro electrónico es distribuido gratuitamente y sin restricciones de uso siempre que el contenido no sea alterado, ni sea usado para fines comerciales.

La edición de este libro fue financiada por EcoMito (EXPL/AAG-MAA/1082/2013), proyecto de investigación del Programa Operacional Potencial Humano (POPH) - Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN) del Fondo Social Europeo y del Ministério da Educação e Ciência del gobierno portugués.



LIEBRES FANTASMAS

La Evolución de las Liebres en la Península Ibérica

AUTORES

Rita Campos
José Melo-Ferreira
Pelayo Acevedo

Centro de Investigação
em Biodiversidade
e Recursos Genéticos
(CIBIO/InBIO)
da Universidade do Porto,
Portugal

Instituto de Investigación
en Recursos Cinegéticos (IREC),
UCLM-CSIC-JCCM, España

AGRADECIMIENTOS

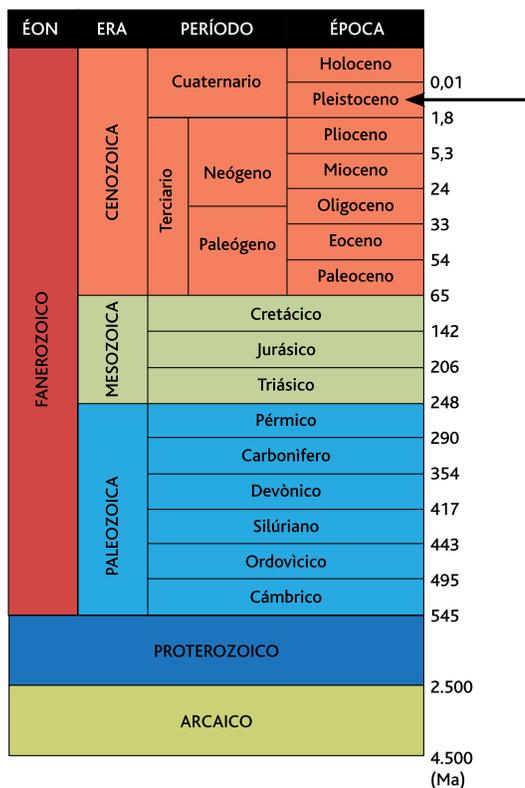
Tenemos que agradecer a las sociedades de cazadores las facilidades durante todos estos años para acceder a las muestras de los animales cazados, ya que sin ellas estos estudios no habrían sido posibles. En estos últimos años algunos de los más activos fueron los cazadores de Arcediano y Narros de Matalayegua (Salamanca), de Santa Marta de Magasca y Plasencia (Cáceres), de Burgos, de Villarta de San Juan (Ciudad Real), y los galgueros de Palencia, de Cuéllar y Cantimpalos (Segovia), de Móstoles (Madrid), de Villaluenga de la Sagra (Toledo) y de Miguelturra (Ciudad Real).

R. Campos y J. Melo-Ferreira son investigadora postdoctoral (SFRH/BPD/64365/2009) e investigador auxiliar (IF/00033/2014), respectivamente, de la Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), y están financiados por QREN-POPH, por el Fondo Social Europeo y por el Ministerio de Educación y Ciencia. P. Acevedo tiene un contrato financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y la Universidad de Castilla-La Mancha dentro del programa Ramón y Cajal (RYC-2012-11970).

- ¡Mucha, mucha nieve!
- ¿De verdad?
- Y hielo. ¡Estaba todo helado! O mejor, todo no, había zonas sin nieve donde incluso había comida y rincones para dormir.
- ¿Refugios?
- ¡Eso es! Había refugios. Eran buenos para las que tenían frío. Las otras vivían bien en la nieve. ¡Y mira que había mucha, mucha nieve!

Hace cerca de 21 mil años la Península Ibérica estaba helada y gran parte de Europa estaba también cubierta de nieve. Estábamos al final del Pleistoceno, la época geológica del Cuaternario que antecedió la actual, el Holoceno. Fue durante esta época cuando una gran parte del planeta vivió numerosos eventos glaciares y por eso es que también se conoce al Cuaternario como el periodo glacial. ¡Periodo glacial moderno, porque hubo otros cuatro! Una de las grandes consecuencias de estas oscilaciones climáticas fue la alteración de la distribución geográfica y variabilidad genética de las especies, principalmente de aquellas que vivían en las regiones más afectadas por las glaciaciones.

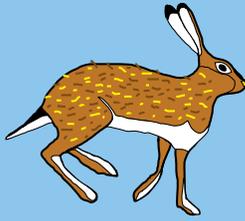
Pero, ¿por qué estamos hablando del Cuaternario, Pleistoceno, Península Ibérica, Europa y nieve? ¡Porque vamos a hablar de liebres!



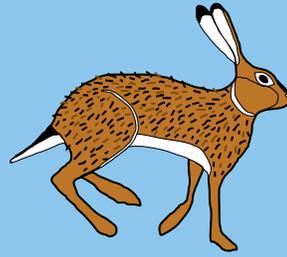
La historia del planeta Tierra se divide en varios momentos. Durante el Pleistoceno, marcado con una flecha, ocurrieron profundas oscilaciones climáticas que determinaron la evolución de muchos seres vivos, entre los cuales se encuentran las liebres ibéricas y europeas.

DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA DE LAS LIEBRES

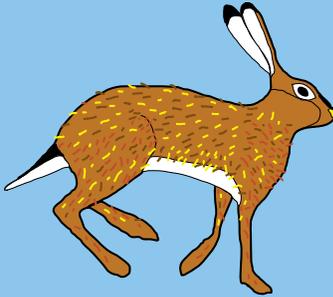
Las liebres son lagomorfos, es decir, son mamíferos que pertenecen al orden Lagomorpha. En este orden se reconocen dos familias: los ocotónidos (Ochotonidae) y los lepóridos (Leporidae). Las liebres, al igual que los conejos, pertenecen a esta última familia. Esta es una familia grande, compuesta por 11 géneros. Las liebres pertenecen al género *Lepus*, que, a su vez, es también bastante rico en especies: ¡se conocen actualmente 32 especies de liebres! Las protagonistas de esta historia pertenecen a las especies *Lepus granatensis* (liebre ibérica), *Lepus castroviejo* (liebre de piornal), *Lepus europaeus* (liebre europea) y *Lepus timidus* (liebre variable o liebre de montaña).



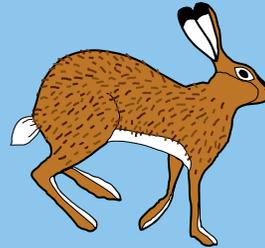
LIEBRE
IBÉRICA



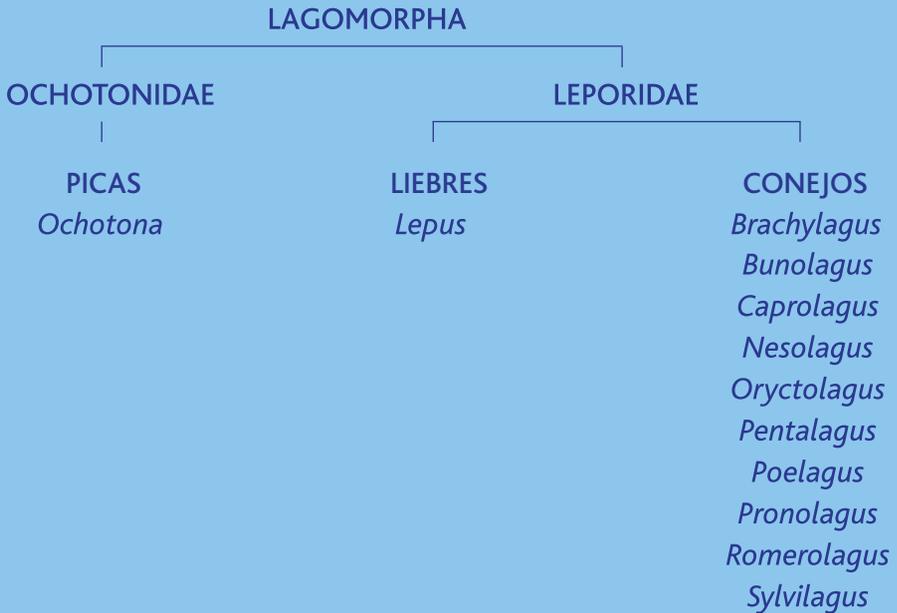
LIEBRE DE
PIORNAL



LIEBRE
EUROPEA



LIEBRE
VARIABLE



Actualmente viven en la Península Ibérica tres especies de liebre: la liebre ibérica, la de pional y la europea. La europea también existe en otros países europeos y de medio oriente, como Alemania o Irak, pero la ibérica y la de pional sólo se encuentran en la Península Ibérica. La liebre ibérica ocupa casi toda la Península, excepto la franja norte entre Asturias y Cataluña, que es donde vive la liebre europea, y la liebre de pional se encuentra restringida a la Cordillera Cantábrica.

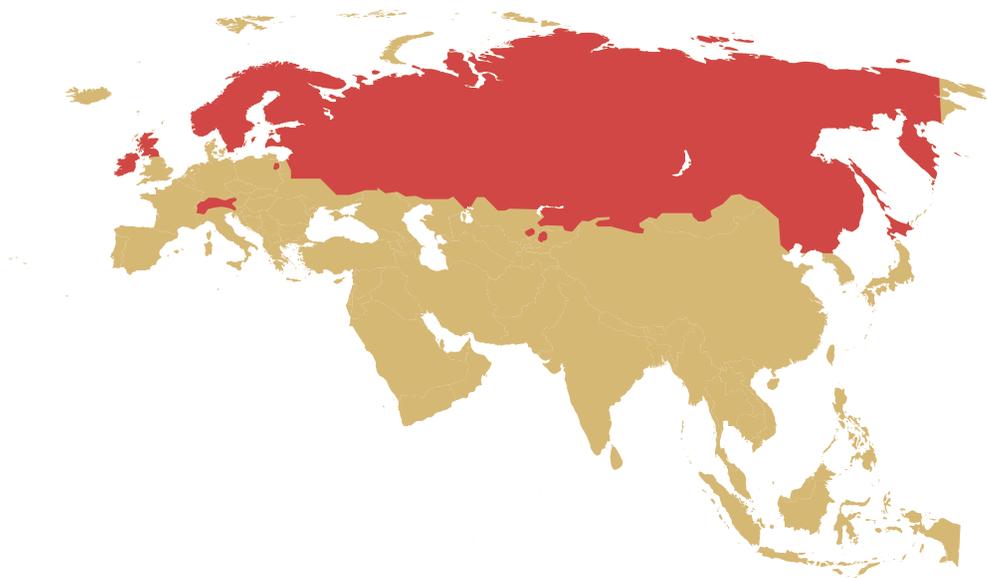
Estas son las especies que habitan la Península en nuestros días. Pero hace muchos años – ¡21 mil años! – vivía en la Península Ibérica otra especie de liebre: la liebre variable.



La liebre ibérica y la liebre de pional son especies endémicas de la Península Ibérica, es decir, únicamente habitan de manera natural en esa región. La liebre ibérica (verde claro) se encuentra distribuida por gran parte del territorio peninsular, y la de pional (verde oscuro) se encuentra restringida a la Cordillera Cantábrica. Por su parte, la liebre europea (verde medio) en la Península Ibérica se distribuye en su franja norte.

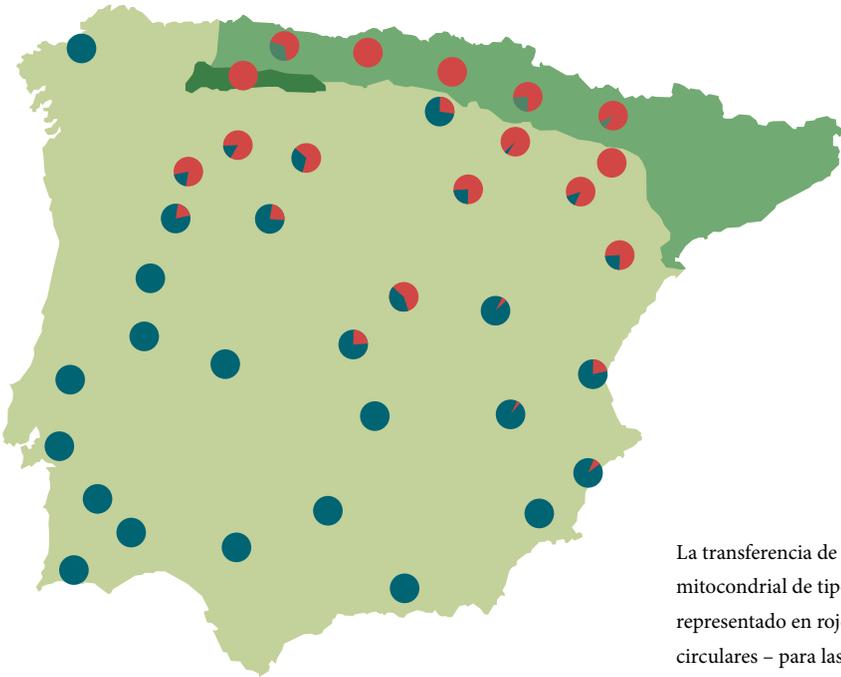
La liebre variable es una especie que está bien adaptada a vivir en regiones con bajas temperaturas y periodos prolongados de nieve. Hace unos 21 mil años, durante las glaciaciones del Cuaternario, la Península Ibérica ofrecía esas condiciones. Hoy en día esta especie ya no se encuentra en la Península, pero sí sus vestigios.

Los registros fósiles mostraron que durante el Pleistoceno la liebre variable habitó zonas donde hoy no la podemos encontrar, tales como la Península Ibérica y el sur de Francia. Un hecho curioso: las áreas donde vivió la liebre variable durante los ciclos glaciales del Pleistoceno sufrieron alteraciones de tamaño. ¿Por qué este resultado es importante para esta historia? ¿Porque las alteraciones permitieron que las liebres variables tuviesen oportunidad de contactar con otras liebres, aumentando así la probabilidad de cruzamientos y el consecuente intercambio de material genético entre los individuos de las diferentes especies!



La liebre variable es una especie boreal/ártica que habita el norte de Eurasia; en Escocia, Polonia, Alpes y Japón se encuentran poblaciones aisladas de esta especie.

La prueba de que ocurriesen estos cruzamientos entre liebres variables y las especies que habitan hoy en día la Península Ibérica es que, a pesar de no existir actualmente liebres variables en esta región, su ADN persistió hasta la actualidad. El análisis de muchos individuos de las tres especies ibéricas mostró que todos los individuos de la liebre de piornal y casi todos los de la liebre europea que viven en la Península tienen ADN mitocondrial de la liebre variable. Este ADN es también muy frecuente en individuos de liebre ibérica que viven en la mitad norte de la Península.



La transferencia de ADN mitocondrial de tipo ártico – representado en rojo en los gráficos circulares – para las liebres de la Península Ibérica fue un fenómeno a gran escala que afectó a las tres especies ibéricas, la liebre ibérica (en verde claro), la liebre de piornal (verde oscuro) y la liebre europea (con un tono intermedio). La frecuencia de este tipo de ADN mitocondrial es superior en la franja norte de la Península.

LIEBRE Y ALTERACIONES CLIMÁTICAS

Las rápidas alteraciones climáticas que viene sufriendo el planeta Tierra debidas a acciones humanas afectarán principalmente a las especies que tiene requerimientos ecológicos más específicos, es decir, especies que únicamente consiguen vivir en lugares con determinadas características ambientales. En el caso de las liebres, estas alteraciones climáticas podrán tener un impacto importante en su supervivencia a largo plazo. Un ejemplo de esto es la ya conocida liebre variable. La utilización de modelos climáticos dejó entrever que esta especie tiene preferencia por zonas frías, con un marcado contraste entre la temperatura del día y la de la noche, y que tengan veranos muy secos.

Las especies que tienen una mayor dependencia de la temperatura máxima serán las que presenten una mayor sensibilidad a las alteraciones climáticas, ya que el límite térmico superior que las especies pueden tolerar está altamente conservado en la naturaleza. ¿Y esto que significa? Significa que las especies que viven en zonas con temperaturas próximas a las temperaturas máximas que consiguen soportar son las que tendrán más dificultades para adaptarse al calentamiento del planeta.

En realidad, el calentamiento global causado por el hombre ya está afectando a la supervivencia de la liebre variable en algunas regiones, como los Alpes y el límite sur de su área de distribución. En ambos casos, la disminución de la calidad del hábitat para la liebre variable se acompaña con la llegada y progresiva sustitución de esta especie por la liebre europea.

Regresando al pasado, es posible que el calentamiento natural del planeta de la era pos-glacial afectase a la distribución de la liebre variable de la misma forma: disminuyendo las zonas donde esta especie podía vivir y favoreciendo la ocupación de esas zonas por otras especies de liebre que habitaban la Península Ibérica.

¿Por qué decimos que las especies ibéricas tienen el ADN mitocondrial de la liebre variable en lugar de decir que la liebre variable existe en la Península Ibérica?

La respuesta es relativamente simple: el análisis del ADN nuclear de las cuatro especies muestra, en general, cuatro grupos bien distintos. Es decir, si usáramos como información genética para clasificar las especies el ADN del núcleo tenemos cuatro especies distintas de liebre y la variable no existe en la Península Ibérica. Pero si usamos sólo la información del ADN mitocondrial entonces la clasificación se vuelve confusa, ya que algunas liebres ibéricas o europeas serán identificadas como liebres variables, y por ello pasaríamos a decir que la liebre variable existe en la Península Ibérica, lo que no es cierto porque además de la genética se usan otras fuentes de información para clasificar e identificar a las especies y, en este caso, las cuatro especies de liebre son fácilmente distinguibles desde el punto de vista de la morfología y de la ecología.

LA SISTEMÁTICA DE LAS LIEBRES

La sistemática es la ciencia que se ocupa de la clasificación de los seres vivos teniendo en cuenta su historia y relaciones evolutivas. En el caso de las liebres, su evolución tiene algunas particularidades interesantes. Por ejemplo, muchas de las especies de liebre evolucionaron más o menos en la misma época, siendo este un tipo de evolución conocida como “radiación rápida”. Es este el caso de las liebres de la Península Ibérica, que se originaron en los últimos 2 millones de años. Una de las consecuencias de este tipo de diversificación tan rápida y próxima en el tiempo es que las diferentes especies conservan muchas de las características de la especie ancestral, compartiendo además una

fracción grande de su patrimonio genético y, por tanto, también muchas características (tales como la morfología, fisiología o ecología). Este motivo sería suficiente para complicar la clasificación de estas especies, pero en el caso de las liebres de la Península Ibérica tenemos una complicación adicional: ¡la existencia de individuos con un ADN mitocondrial “fantasma”, el ADN mitocondrial de la liebre variable!

¿Cuál será entonces la mejor manera de clasificar los seres vivos? Para cualquier caso lo mejor es usar siempre varias fuentes de información, y evaluar las informaciones de cada una de ellas de manera crítica.

¿Lo intentamos? Necesitamos tener:

- Tarjetas con información de un fragmento de ADN mitocondrial de individuos de las cuatro especies de liebre que habitaban la Península Ibérica hace cerca de 21 mil años: liebre variable, liebre ibérica, liebre europea y liebre de piornal.
- Tarjetas con información de un fragmento de ADN del núcleo que codifica un gen concreto de las mismas cuatro especies.
- Tarjetas con imágenes de individuos de las cuatro especies.

Las tarjetas (adjuntas) con cada tipo de dato – ADN mitocondrial, ADN nuclear y morfología – deben distribuirse a cada jugador o equipo de jugadores. Cada vez que se recibe las tarjetas, el jugador (o equipo) debe formar grupos usando como criterio la similitud entre informaciones. Por ejemplo, si recibió las tarjetas con el fragmento de ADN mitocondrial, debe buscar fragmentos con el menor número de mutaciones entre ellos – esto es, de diferencias – y agruparlas.

Después de tener hechas las agrupaciones con cada tipo de información, hay que confrontar los grupos con la identificación real de cada individuo y discutir la importancia de usar fuentes de información variadas para clasificar la biodiversidad. Se pueden aprovechar las informaciones aportadas en este texto para discutir, por ejemplo, el papel de la selección natural y de las diferencias de información que nos dan las diferentes regiones genéticas.

Se recomienda discutir sobre la naturaleza de la ciencia: en el ejemplo de las liebres, si en los primeros trabajos en los que se usó la información genética para clasificar las especies sólo se hubiera considerado ADN mitocondrial, ¿cuál habría sido el resultado? ¿Hay liebre variable en la Península Ibérica! Pero la ciencia es un proceso que nunca para y siempre cuestiona. Por eso, se buscaron más datos y se volvieron a evaluar las conclusiones: sabemos que hay realmente ADN mitocondrial de la liebre variable en la Península Ibérica, pero es como si fuera un fantasma, una impresión digital molecular de una especie que vivió aquí, pero que no vive desde el Último Máximo Glacial, hace aproximadamente 21 mil años. Lo que sabemos hoy no significa que los primeros científicos que trabajaron en este tema estuvieran equivocados; significa que las conclusiones dependen de los datos y que debemos tener un espíritu abierto y crítico para incorporar nuevos datos y reconsiderar nuestras conclusiones.

Aún hay otro resultado interesante: el ADN mitocondrial ártico en las liebres de la Península presenta diferencias en relación al ADN mitocondrial ártico de la liebre variable. Esto es coherente con la hipótesis de que este ADN hubiera sido transferido a las poblaciones ibéricas hace mucho tiempo – cerca de 21 mil años, ¡desde el último máximo glacial! – y desde entonces está evolucionando de forma independiente del ADN mitocondrial de la liebre variable.

Finalmente, los datos también sugieren que hubo dos momentos de transferencia de ADN mitocondrial de la liebre variable para las restantes especies de liebre de la Península Ibérica: uno durante el Pleistoceno Medio, que afectó al ancestral común de la liebre de piornal y de la liebre italiana (*Lepus corsicanus*; especie que habita el sur de Italia, Sicilia y Córcega), y otro durante el último máximo glacial, que afectó a las tres especies que habitaban la Península Ibérica.

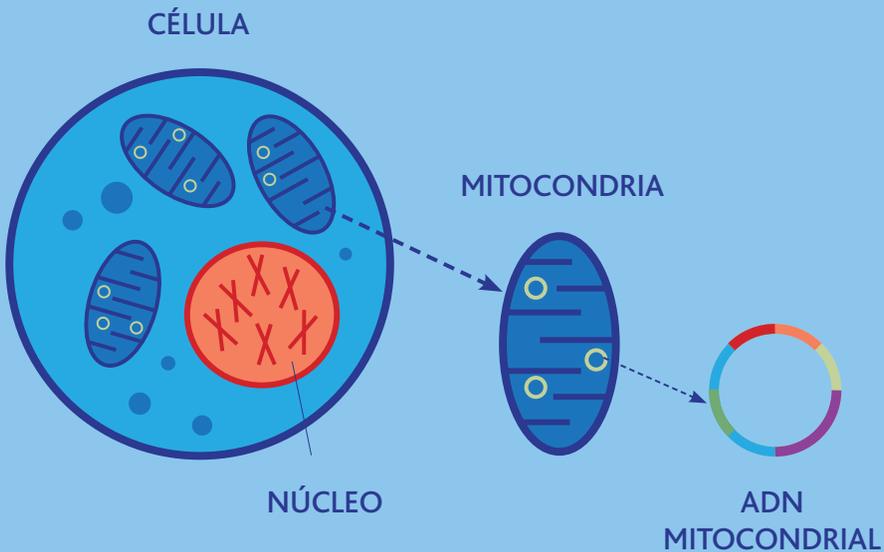
MITOCONDRIAS Y EVOLUCIÓN

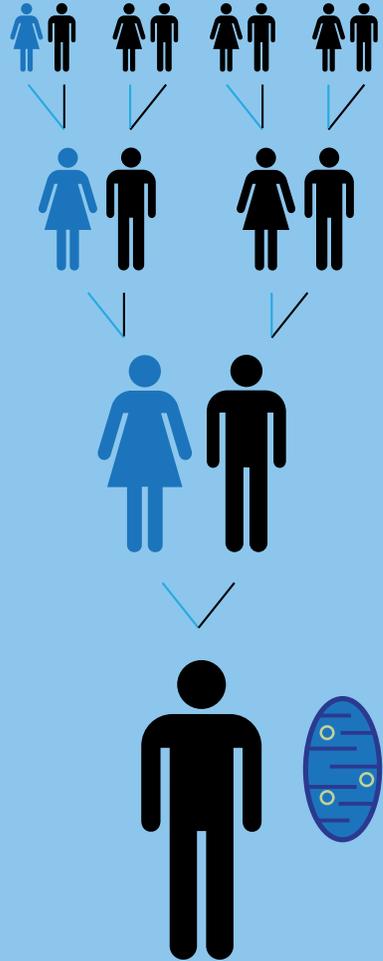
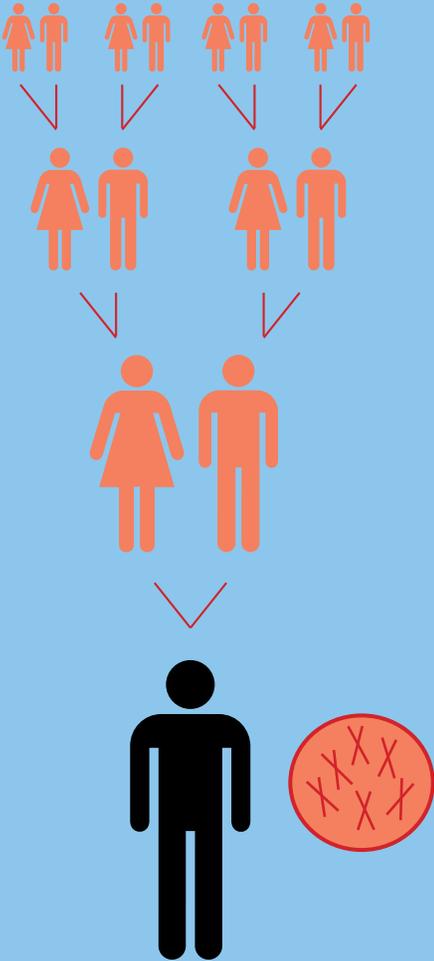
Las mitocondrias son orgánulos celulares encontrados en un elevado número de células de casi todos los eucariotas. Su función es vital para las células. Aun cuando son más conocidas por su papel en la producción de energía, las mitocondrias participan en diversos procesos celulares, tales como la diferenciación celular, la señalización celular o el mantenimiento del control del ciclo celular y del crecimiento de la célula. Hay enfermedades mitocondriales originadas por el mal funcionamiento de las mitocondrias.

Una de las características más particulares de este orgánulo es el hecho de poseer su propio genoma. A ese material genético le damos el nombre de ADN mitocondrial – siendo ADNmt su abreviatura. Este ADN difiere del ADN del núcleo no únicamente por su ubicación en la célula, sino también

porque tiene una configuración circular y porque, al contrario que el ADN nuclear que se hereda del padre y de la madre y por eso existen dos copias de cada información en nuestras células, el ADN mitocondrial sólo es transmitido por vía materna.

Estas características, junto al hecho de tener una tasa de mutación media más elevada que el ADN nuclear y ser inicialmente considerado libre de la influencia de la selección natural, convirtieron al ADN mitocondrial en un marcador genético muy usado, principalmente en estudios que pretendían reconstruir la historia evolutiva de las especies. Pero la aparente neutralidad del ADN mitocondrial fue desafiada: comenzaron a aparecer muchas evidencias de que este marcador también es objeto de selección natural, ¡incluyendo el caso del ADN mitocondrial de la liebre variable!





Entonces, en resumen, ¿qué sabemos sobre la presencia de la liebre variable y de la historia de las liebres en la Península Ibérica? Sabemos que hay más ADN mitocondrial del tipo ártico en las liebres que viven en la mitad norte de la Península, y que este ADN es también más diverso en esas poblaciones. Hay algunas evidencias que sugieren que la transferencia del ADN mitocondrial ártico a las liebres ibéricas ocurrió cuando la temperatura comenzó a aumentar tras el último máximo glacial y la liebre ibérica comenzó a ocupar el territorio que la liebre variable ocupaba. Algunas liebres ibéricas de las poblaciones más al sur de la Península tienen ADN nuclear de la liebre variable. Es probable, por tanto, que las liebres ibéricas hubieran sobrevivido a otros periodos fríos en refugios localizados en el centro de la Península Ibérica y colonizaran el resto del territorio donde hoy se encuentran a partir de estos refugios.

Lo que no se sabe bien aún es si la transferencia del ADN mitocondrial de la liebre variable a las restantes liebres de la Península Ibérica fue un proceso adaptativo, esto es, si hubo influencia de la selección natural.

Si no hubo influencia de la selección natural entonces la transferencia ocurrió únicamente por una cuestión de distribución geográfica y demográfica: durante una expansión normalmente hay unos pocos individuos que lideran cuando llegan a los nuevos sitios. Esos líderes normalmente encuentran muchos individuos de las especies que habitan esos sitios. En el caso de las liebres, como tienen muchas semejanzas, los individuos de la especie que estaba llegando consiguieron reproducirse con los individuos de la especie que vivía allí. La deriva genética, que es muy eficaz en poblaciones pequeñas, hace que la mitocondria de la especie que vivía allí consiga pasar a la especie que está llegando y sustituir su propia mitocondria! Esta sustitución sería aún más eficaz si las hembras de la especie que se está expandiendo fueran filopátricas, esto es, tuvieran propensión para permanecer toda su vida próximas al lugar donde nacieron, tal y como ocurre en el caso de las liebres.

Tenemos que considerar también la hipótesis de que la selección natural actuara en esta transferencia. Esto es porque a pesar de que los primeros estudios de biología evolutiva consideraban al ADN mitocondrial libre de la acción de la selección natural, actualmente hay varios estudios documentando la influencia de este mecanismo en la evolución de la información genética que porta la mitocondria. Mirando al extraño caso del ADN mitocondrial de las liebres de la Península Ibérica es posible pensar que tal vez el ADN mitocondrial de la liebre variable hubiera pasado muchas veces para las otras especies porque resultase ventajoso. Es decir, este podría ser un caso en el que el ADN estuviera bajo la influencia de la selección natural. ¡Y la verdad es que los datos recientes sugieren esto! Otro aspecto interesante es que las proteínas que

participan en la cadena respiratoria – el proceso responsable de la producción de energía en las células – poseen subunidades codificadas tanto por genes del ADN mitocondrial como por genes del ADN nuclear. Las interacciones entre los dos genomas son, de hecho, extensas y la influencia de la selección natural puede ocurrir simultáneamente en los genes que interactúan. Esto hace que sea posible que la transferencia de ADN mitocondrial ártico a las liebres de la Península Ibérica hubiera estado acompañada de genes nucleares con los que interactuar – ¡un proceso de co-evolución! Los estudios más recientes se centran en este aspecto.

SELECCIÓN NATURAL Y DERIVA GENÉTICA

La selección natural y la deriva genética son dos mecanismos que llevan a una alteración de la frecuencia de las informaciones genéticas en las poblaciones y por eso influyen en su evolución. La gran diferencia entre estos dos mecanismos es que la deriva genética es un fenómeno neutro y afecta por igual a todas las porciones del ADN, mitocondrial y nuclear, y la selección natural actúa específicamente sobre determinadas regiones del ADN.

Ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes. Al contrario, debemos suponer que ambos actúan simultáneamente, y serán las diferentes situaciones las que harán que el resultado de un proceso u otro se vuelva más visible.

Por ejemplo, los hombres están produciendo continuamente espermatozoides, cada uno con una información genética única.

Sin embargo, sólo uno entre millares de espermatozoides fertiliza un óvulo, que crecerá para dar lugar a un nuevo bebé. Este bebé tendrá la mitad de su información genética proveniente de aquel único espermatozoide. ¿Tendrá esa información genética alguna característica especial? La respuesta más simple es: ¡no! Aquel espermatozoide consiguió fertilizar el óvulo por casualidad. Y la deriva genética es eso: la casualidad. Pero al mismo tiempo puede ocurrir que una parte de la información genética de aquel espermatozoide confiera algún tipo de ventaja al futuro bebé. En ese caso, esa información será objeto de la selección natural y el bebé, ya adulto, tendrá una mayor probabilidad de sobrevivir y de pasar esa valiosa información a sus descendientes, contribuyendo así a aumentar la frecuencia de esa información en la población.

En la mayoría de las ocasiones la deriva genética provoca alteraciones casi imperceptibles en las frecuencias genéticas de una población, porque generalmente las poblaciones son lo suficientemente grandes para que eso ocurra. Pero en ocasiones hay grandes disminuciones en el tamaño de las poblaciones que hacen que la deriva genética pase a ser muy eficaz provocando alteraciones. En el caso de nuestras liebres, la expansión de las liebres ibéricas en el proceso de colonización de los territorios ocupados por la liebre variable habrá ocurrido con pocos individuos – un poco a semejanza de un maratón: están muchos corredores juntos pero tras el silbato de salida sólo unos pocos salen destacados. Estos individuos habrán encontrado liebres variables con las que reproducirse. Como las hembras son filopátricas, esto es, tienden a permanecer próximas al lugar de nacimiento, los cruzamientos habrán sido entre machos de liebre ibérica y hembras de liebre variable, lo que hizo que la descendencia de estos cruzamientos pasase a tener ADN mitocondrial ártico. El hecho de haber más liebres variables que liebres ibéricas hizo que el número de individuos con el ADN mitocondrial ártico aumentase en cada generación.

Pero también puede ocurrir que el ADN mitocondrial ártico tenga alguna característica que lo convierte especialmente ventajoso, principalmente en zonas más frías. En ese caso, la transmisión de este material genético de la liebre variable a la liebre ibérica no habría sido fruto de la casualidad, como hablamos antes, pero sí debido a la acción de la selección natural.

¿Vemos cómo funcionan los dos mecanismos?

Necesitamos tener:

- Dos cajas opacas.
- Pequeñas bolas de colores.
- Discos de colores (6 colores diferentes e idénticos a los de las bolas).

En una de las cajas colocamos bolas de varios colores y en la otra colocamos bolas de un solo color (por ejemplo, amarillo). Las bolas deben llenar cerca de 2/3 de la caja. Separamos 6 discos de cada color (no olvidar los discos amarillos). Las bolas en las cajas simulan un determinado ambiente, y los discos son los individuos de una especie de liebre de la Península Ibérica – por ejemplo, la liebre europea – y los colores simulan los tipos de ADN mitocondrial.

Colocamos los discos que separamos en la caja con las bolas de diferentes colores y mezclamos. Tres participantes tienen cinco segundos para que, a la vez, intenten coger el mayor número de discos posible. Después deben separar los discos – que “murieron” – y sacar los restantes – que “sobrevivieron”. Observar los dos grupos y verificar las diferencias entre ellos. ¿Hubo algún color más atrapado? ¿Los colores que “murieron” y los que “sobrevivieron” guardan alguna relación con los colores del medio? Si repitiéramos la experiencia, ¿tendríamos grupos con una composición similar a esta? La respuesta a esta última pregunta será: no. ¿Por qué? Porque el mecanismo evolutivo que con mucha probabilidad está determinando la evolución de esta población es la deriva genética, es decir, la casualidad. Para seguir jugando, generamos la siguiente generación atribuyendo dos hijos a cada

disco que “sobrevivió” y eliminando a los supervivientes del juego. Es decir, la segunda generación estará compuesta únicamente por los hijos de la primera generación. Una vez más, cazamos los discos, observamos los grupos de los que “morirán” y de los que “sobrevivirán” e intentamos responder a las mismas cuestiones, ahora pudiendo también comparar los colores que fueron más o menos atrapados en las dos generaciones: ¿Fueron los mismos? (¡probablemente no!).

Para contrastar la evolución por deriva genética con la mediada por selección natural reiniciamos el juego, pero esta vez colocamos los discos en la caja que tiene bolas de un solo color. Repetimos la caza, la observación de los dos grupos y la simulación de la segunda generación. ¿Hay diferencias en relación a los colores que fueron cazados en la caja llena de bolas de colores? ¿Hay algún color menos cazado? Probablemente los discos amarillos fueron menos atrapados. ¿Por qué? Porque

al contrario de lo que ocurría en el juego anterior, en donde no había ninguna característica que fuera favorable en un medio multicolor, aquí el color amarillo parecer conferir una ventaja, permitiendo que estos individuos amarillos sean menos atrapados y tengan más oportunidades de dejar hijos, también amarillos – la frecuencia de discos amarillos aumentará en cada generación a la par que la frecuencia de los otros colores disminuirá. Es decir, el mecanismo evolutivo que muy probablemente está modulando la evolución de esta segunda población será la selección natural.

En la historia de nuestras liebres podemos discutir si el ADN mitocondrial de tipo ártico será un “color amarillo” en un medio “amarillo”, esto es, si realmente confiere ventajas a los individuos portadores y que cuando se reproducen transmiten dicha ventaja a sus descendientes.

¿Y ahora qué?

Entre 2014 y 2015 un grupo de investigadores de Portugal y de España decidió estudiar mejor el significado de algunos aspectos de este extraño fenómeno de las “mitocondrias fantasma”. Este trabajo suponía una continuación natural a los estudios anteriores, pero en este caso priorizando la perspectiva biogeográfica en los análisis. Esto fue así porque combinando la distribución de la información genética de una especie con la de su área de distribución (definida por las localidades en las que la especie está presente), es posible comprender mejor la historia evolutiva de la especie – a este análisis conjunto de genética y geografía se le da el nombre de filogeografía.

BIOGEOGRAFÍA Y EVOLUCIÓN

La rama de la ciencia que estudia e interpreta la distribución – pasada, presente y futura – de las especies en la Tierra se conoce con el nombre de Biogeografía. Una componente importante de los estudios biogeográficos es el análisis de las características físicas del ambiente y la forma en la que éstas afectan a las especies y modulan su distribución en el espacio.

Alfred Russel Wallace, el naturalista que presentó junto a Charles Darwin la teoría de la evolución por selección natural, fue uno de los primeros en utilizar datos de geografía y ecología para, junto a los conceptos de la teoría de la evolución, caracterizar los patrones de distribución de las especies. Al contrario de la idea predominante de que las especies son creadas de acuerdo al ambiente en el que viven, Wallace entendió que la geografía tenía un papel importante en la distribución de las especies, creando barreras que determinan diferentes procesos de evolución en regiones climáticas idénticas. Las observaciones de Wallace sobre cómo el clima, la geografía y la ecología determinan la evolución y distribución de las especies en el espacio son aún hoy consideradas válidas.

Pero Wallace, al igual que Darwin, tuvo la oportunidad de viajar por todo el mundo y era muy minucioso en sus observaciones. Fue por esto, que se dio cuenta de que en la Tierra había seis grandes regiones ecológicas. Por ejemplo, durante su estancia en Indonesia encontró grandes diferencias entre las especies que vivían en la región más asiática y las que vivían en la región más próxima a Australia, por lo que definió una línea para dividir ambas regiones. Esta línea es conocida como “línea de Wallace” y Wallace es reconocido hoy como el “padre de la biogeografía”.

Las regiones biogeográficas reconocidas por Wallace se corresponden aproximadamente con los seis continentes. Juntamente con lo que sabemos sobre deriva continental y tectónica de placas, las regiones de Wallace fueron una importante contribución para comprender las dinámicas de ocupación del espacio por las especies a lo largo del tiempo y sus relaciones evolutivas. Entre otros resultados sabemos que las especies de los continentes que se separaron más recientemente tienden a tener mayores similitudes genéticas.

Al estudiar la estrecha relación que existe entre las especies y las regiones que habitan, así como las relaciones que establecen con el resto de especies que habitan en una misma región, la biogeografía es una perspectiva fundamental para entender la capacidad de las especies para mantenerse en situaciones de drásticas alteraciones climáticas, como la que vivimos actualmente, y para ayudarnos a definir medidas de conservación adecuadas a cada especie y a cada región.

Para iniciar este trabajo el equipo planteó dos grandes preguntas:

- 1) ¿Por qué es tan común la transferencia del ADN mitocondrial de una liebre ártica a especies de climas templados?
- 2) ¿Podría ese ADN ártico conferir alguna ventaja adaptativa a las especies afectadas?

La primera cuestión que verificaron fue que, de hecho, las poblaciones de liebres ibéricas que tienen más individuos con la mitocondria ártica se localizan en zonas que tuvieron un clima favorable para la liebre variable cuando éstas habitaban la Península Ibérica. Es decir, parece que las localidades de la Península Ibérica donde hoy se encuentran liebres con ADN mitocondrial ártico son casi las mismas donde podríamos haber visto a las liebres variables, si hubiéramos estado allí durante el Último Máximo Glacial. Este resultado es interesante, ya que sugiere que la transferencia de la mitocondria ártica a las liebres ibéricas en estas zonas pudiera estar relacionada con una adaptación local. Este resultado da algunas pistas que favorecen la hipótesis de que esta transferencia pudo haber sido objeto de selección natural. Y es también un resultado importante para entender mejor el papel del clima en la evolución de las liebres.

Después de esta sugerencia sobre las localidades donde probablemente habría habitado la liebre variable cuando vivió en la Península Ibérica, se estudiaron con una mayor atención las localidades donde hoy viven las liebres con ADN de la liebre variable. Esto permitió ver que el número de individuos de liebre ibérica con el ADN ártico aumenta hacia el norte, y que este aumento está relacionado con una expansión de la liebre ibérica para las zonas donde vivía la liebre variable.

Lo que probablemente ocurrió fue que al final del Último Máximo Glacial, cuando las temperaturas comenzaron a subir, los individuos de la liebre ibérica que vivían en un refugio localizado en el centro de la Península Ibérica invadieron las zonas en las que vivía la liebre variable, entrando en competencia con esta y sustituyéndola. Es también posible que algunos de los individuos de la liebre ibérica hubieran salido del refugio para ocupar otras zonas de la Península Ibérica, no habitadas por la liebre variable, que serían aquellas en las que hoy encontramos el ADN ártico pero en menor frecuencia.

Como sabemos de otros trabajos, durante el Último Máximo Glacial la Península Ibérica tenía regiones al norte y al sur que eran buenas para la liebre ibérica, pero esta especie sobrevivió en refugios de la zona central. La explicación más probable para la expansión territorial de la liebre ibérica

al fin del Último Máximo Glacial tiene que ver con la presencia de liebre variable por toda la Península. Es decir, cuando las temperaturas eran muy bajas la liebre variable estaba mejor adaptada e impedía que la liebre ibérica ocupara esas localidades; pero cuando la temperatura comenzó a aumentar, la liebre ibérica consiguió invadir y expulsar a la liebre variable de la Península Ibérica – ¡no sin antes reproducirse con ella y así permitir la transferencia del ADN mitocondrial de la liebre variable a la liebre ibérica! Lo mismo pudiera haber ocurrido con la liebre europea, que llegó a la Península después del Último Máximo Glacial y ocupó la franja más al norte de la Península, que es la que ocupa en la actualidad.

Pero entonces, ¿las liebres con ADN ártico tendrán alguna ventaja respecto a las otras? Posiblemente sí.

¿Cómo sabemos eso?

Primero, se intentó comprender si el ADN mitocondrial de tipo ártico es más frecuente en determinados ambientes o si su distribución es sólo resultado de la geografía. Estos análisis muestran que los individuos de liebre ibérica con ADN mitocondrial ártico están en ambientes claramente diferentes de los ocupados por individuos sin este ADN. Es decir, existe concordancia entre la distribución del ADN mitocondrial ártico y alguno de los principales gradientes ambientales presentes en la Península, lo que es un resultado más a favor de la posible ventaja adaptativa del ADN mitocondrial ártico.

Posteriormente, para tener una idea sobre una posible ventaja conferida por el ADN ártico se determinaron algunos parámetros que ayudan a caracterizar la capacidad reproductora y la condición física de las liebres con y sin este tipo de ADN. El análisis de casi 200 individuos capturados en el límite sur de la distribución del ADN mitocondrial de tipo ártico mostró que hay una fuerte asociación entre la capacidad reproductora y la presencia de este ADN. Los datos también sugieren que los individuos con ADN ártico tienen una dieta de mejor calidad, lo que también sugiere que tendrán una mejor condición física. Es decir, los primeros resultados de un análisis que explora explícitamente una asociación entre ser portador de ADN mitocondrial ártico y tener alguna ventaja para la supervivencia y reproducción parecen indicar que esta existe, es decir, que ¡la selección natural parece haber tenido peso en la evolución de este ADN en las liebres ibéricas!

¿Cómo podremos confirmar estos primeros resultados?

Bueno, por un lado hay otros indicadores de la condición física (por ejemplo, niveles de leptina y la carga parasitaria) que pueden ayudar a confirmar la existencia de una relación entre tener el ADN mitocondrial ártico y una mejor aptitud física. Cuantificar el rendimiento de la actividad de los diferentes tipos mitocondriales también podría aportar alguna evidencia sobre la posible ventaja de la mitocondria ártica.

Por otro lado, sabemos que las expansiones poblacionales y los cruzamientos entre las diferentes especies dejaron señales en la variación genética de las poblaciones ibéricas actuales. Una de estas señales fue la transferencia de ADN mitocondrial de liebre variable para individuos de las tres especies ibéricas. Pero podrán haber pasado otras porciones del genoma nuclear – la información contenida en todo el material genético que se puede encontrar en el núcleo de las células.

Si la transferencia del material genético de la especie ártica a las especies ibéricas facilitó una mayor adaptación y capacidad de supervivencia y reproducción, entonces la transferencia de ADN nuclear deberá incluir, preferentemente, porciones del genoma que codifican para esas funciones, y la transferencia del mitocondrial podría haber determinado la transmisión de otras partes del genoma – porque las proteínas que resultan de la información contenida en el ADN mitocondrial y nuclear trabajan en conjunto en muchas funciones fundamentales de la célula, como la producción de energía. Estas cuestiones se están investigando actualmente mediante el uso de nuevas tecnologías de secuenciación de ADN, que están permitiendo estudiar toda la información genética de un individuo y no únicamente una pequeña porción. Con esto, la comparación de los genomas de las liebres de la Península Ibérica y de la liebre variable, ¡ayudará a revelar situaciones de adaptación y de co-evolución entre el ADN mitocondrial y nuclear!

SUGERENCIAS DE RECURSOS EDUCATIVOS

Para saber más sobre el proyecto:
<https://pelayoacevedo.wordpress.com/projects/ecomito/>

Para una descripción más detallada de las actividades sobre la deriva genética y la selección natural:
Campos R, Sá-Pinto A (2013). Early evolution of evolutionary thinking: teaching evolutionary biology in elementary schools. *Evolution: Education and Outreach* 6:25. [o artículo está disponible en:
<http://www.evolution-outreach.com/content/6/1/25>]
Sá-Pinto X, Campos R (2012). *As borboletas da floresta amarela*. CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos. Porto, Portugal. [o libro está disponible en:
https://dl.dropboxusercontent.com/u/206969216/As_Borboletas_da_Floresta_Amarela.pdf]

Para ejemplos sobre la influencia de la deriva genética y de la selección natural sobre la evolución de características humanas:

Campos et al. (2014). *Somos mutantes!* [Posters disponibles en:
http://cibio.up.pt/upload/filemanager/somos-mutantes_cartazes.pdf]

Para pequeñas “historias” sobre evolución y biodiversidad, y sugerencias de cómo corregir algunos de los conceptos erróneos más frecuentes en evolución:

Campos et al. (2013). *Um livro sobre evolução*. CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos. Porto, Portugal. [Disponible en:
<https://www.dropbox.com/s/t2iw0czeobtid5g/Um%20livro%20sobre%20evolucao.pdf>]

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo P, Melo-Ferreira J, Farello L, Beltran-Beck B, Real R, Campos R, Alves PC (2015). Range dynamics driven by Quaternary climate oscillations explain the distribution of introgressed mtDNA of *Lepus timidus* origin in hares from the Iberian Peninsula. *Journal of Biogeography*, *Journal of Biogeography* 42:1727-1735.
- Acevedo P, Melo-Ferreira J, Real R, Alves PC (2012) Past, present and future distributions of an Iberian endemic, *Lepus granatensis*: ecological and evolutionary clues from species distribution models. *PLoS ONE* 7(12): e51529
- Acevedo P, Jiménez-Valverde A, Melo-Ferreira J, Real R, Alves PC (2012) Parapatric species and the implications for climate change studies: a case study on hares in Europe. *Global Change Biology* 18:1509-1519
- Altuna J (1970). Hallazgo de una liebre artica (*Lepus timidus*) en el yacimiento prehistorico de Urtiga (Guipuzcoa). *Munibe* 22:165-168.
- Alves PC, Ferrand N, Suchentrunk F, Harris DJ (2003). Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:70-80.
- Alves PC, Harris DJ, Melo-Ferreira J, Branco M, Suchentrunk F, Boursot P, Ferrand N (2006) Hares on thin ice: introgression of mitochondrial DNA in hares and its implications for recent phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:640-641.
- Alves PC, Melo-Ferreira J, Freitas H, Boursot P (2008). The ubiquitous mountain hare mitochondria: multiple introgressive hybridization in hares, genus *Lepus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363:2831-2839.
- Alves PC, Hackländer K (2008). Lagomorph species: geographical distribution and conservation status. In *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation* (Alves PC, Ferrand N, Hackländer K, eds.), Springer-Verlag. Pp 395-405.
- Araújo MB, Ferri-Yáñez F, Bozinovic F, Marquet PA, Valladares F, Chown SL (2013). Heat freezes niche evolution. *Ecology Letters* 16(9):1206–1219.
- Avice JC (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Chapman JA, Flux JEC (2008). Introduction to the Lagomorpha. In *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation* (Alves PC, Ferrand N, Hackländer K, eds.), Springer-Verlag. Pp 1-9.
- Lopez-Martinez N (1980). Les lagomorphs (Mammalia) du pléistocène supérieur de Jaurens. *Nouvelles Archives du Museum d'Histoire Naturelle de Lyon* 18:5-16.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC (2005). Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology* 14:2459-2464.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Randi E, Kryukov A, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC (2007). The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene

glaciations: expansion and retreat with hybridization in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 16:605-618.

Melo-Ferreira J, Alves PC, Freitas H, Ferrand N, Boursot P (2009). The genomic legacy from the extinct *Lepus timidus* to the three hare species of Iberia: contrast between mtDNA, sex chromosomes and autosomes. *Molecular Ecology* 18(12): 2643-2658.

Melo-Ferreira J, Alves PC, Rocha J, Ferrand N, Boursot P (2011). Interspecific X-chromosome and mitochondrial DNA introgression in the Iberian hare: selection or allele surfing? *Evolution* 65:1956-1968.

Melo-Ferreira J, Boursot P, Carneiro M, Esteves PJ, Farello L, Alves PC (2012). Recurrent introgression of mitochondrial DNA among hares (*Lepus* spp.) revealed by species-tree inference and coalescent simulations. *Systematic Biology* 61: 367-381.

Melo-Ferreira J, Farello L, Freitas H, Suchentrunk F, Boursot P, Alves PC (2014). Home-loving boreal hare mitochondria survived several invasions in Iberia: the relative roles of recurrent hybridisation and allele surfing. *Heredity* 112: 265-273.

Melo-Ferreira J, Vilela J, Fonseca MM, da Fonseca R, Boursot P, Alves PC (2014). The elusive nature of adaptive mitochondrial DNA evolution of an arctic lineage prone to frequent introgression. *Genome Biology and Evolution* 6(4): 886-896.

Rand DM (2001). The units of selection on mitochondrial DNA. *Annual Review in Ecology and Systematics* 32: 415-448.

Smith AT, Johnston CH (2008). *Lepus timidus*. In: *IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Consultado em Abril 2015.

Thulin CG (2003). The distribution of mountain hares *Lepus timidus* in Europe: a challenge from brown hares *L. europaeus*? *Mammal Review* 33: 29-42.

Anexos

CLASIFICAR LAS ESPECIES DE LIEBRE – INFORMACIÓN DEL ADN NUCLEAR, FRAGMENTO DEL GEN ALBUMINA (INTRÓN)

La información contenida en las tarjetas es una secuencia con 15 nucleótidos que fueron extraídos de la información completa. La extracción de nucleótidos de la secuencia completa fue hecha para facilitar las comparaciones.

La información completa, secuencias con 611 nucleótidos, está publicada en el siguiente artículo: Melo-Ferreira J, Alves PC, Freitas H, Ferrand N, Boursot P. (2009). The genomic legacy from the extinct *Lepus timidus* to the three hare species of Iberia: contrast between mtDNA, sex chromosomes and autosomes. *Molecular Ecology* 18(12): 2643-2658.

Esta información podrá ser usada para, por ejemplo, discutir la existencia de ambigüedades relacionadas con el hecho de tratarse de un gen nuclear – si un individuo recibe dos informaciones diferentes de cada progenitor para una posición dada de la secuencia, las dos informaciones son registradas de acuerdo al código definido por IUPAC – o la existencia de otro tipo de información – las secuencias completas de los individuos de la liebre de pional tienen 4 nucleótidos menos que los restantes individuos, lo que sugiere que en esa especie ocurrió una delección de 4 pares de bases en esa posición del fragmento.

La identificación de los individuos en las tarjetas corresponde a las siguientes especies: L1 – L8: liebre ibérica; L9 – L16: liebre europea; L17 – L23: liebre de pional; y L24 – L29: liebre variable.



L1 - TAAACCTAATGTGCT

L2 - TAAACCTAATGTGCT

L3 - TAAACCTAATGTGCT

L4 - TAAACCTAATGTGCT

L5 - TAAACCTAATGTGCT

L6 - TAAACCTAATGTGCT

L7 - TAAACCTAATGTGCT

L8 - TAAACCTAATGTGCT

L9 - TCGATCTAGTGTGTT

L10 - TCGATCTAGTGTGTT

L11 - TCGATCTAGTGTGTT

L12 - TCGATCTAGTGTGTT

L13 - TCGATCTAGTGTGTT

L14 - TCGATCTAGTGTGTT

L15 - TCGATCTAGTGTGTT

L16 - TCGATCTAGTGTGTT

L17 - TCGATCAAATGTGTC

L18 - TCGATCAAATGTGTC



L19 - TCGATCAAATGGGTC

L20 - TCGATCAAATGTGTC

L21 - TCGATCAAATGTGTC

L22 - TCGATCAAATGTGTC

L23 - TCGATCAAATGTGTC

L24 - TCGATCTAATGTGTT

L25 - TCGATCTAATGTGTT

L26 - TCGATCTAATGTGTT

L27 - TCGATCTAATGTGTT

L28 - TCGATCTAATGTGTT

L29 - TCGATCTAATGTGTT

CLASIFICAR LAS ESPECIES DE LIEBRE – INFORMACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL, FRAGMENTO DEL GEN CITOCROMO B

La información contenida en las tarjetas es una secuencia con 15 nucleótidos que fueron extraídos de la secuencia completa. La extracción de nucleótidos de la secuencia fue hecha para facilitar las comparaciones.

La información completa, secuencias con 616 nucleótidos, está en la siguiente publicación: Melo-Ferreira J, Boursot P, Randi E, Kryukov A, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC. (2007). The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene glaciations: expansion and retreat with hybridization in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 16(3): 605-618.

Esta información podrá ser usada para, por ejemplo, discutir la existencia de diferentes tipos de ADN mitocondrial de tipo ártico en las liebres ibéricas, lo que sugiere que hubo contacto entre la liebre variable y las especies ibéricas en diferentes periodos – la hipótesis más parsimoniosa dice que cuanto más parecido con el ADN mitocondrial de individuos de liebre variable es un ADN mitocondrial de tipo ártico encontrado en las especies ibéricas, más reciente habrá sido el contacto y la introgresión (es decir, la transferencia del ADN mitocondrial entre especies).

La identificación de los individuos en las tarjetas corresponde a las siguientes especies: L1 - L6: liebre variable; L7 - L13: liebre de piornal; L14 - L21: liebre europea; L22 - L29: liebre ibérica. De acuerdo con las secuencias de las tarjetas, los individuos L8, L20, L21, L22 e L26 tienen ADN mitocondrial de tipo ártico.



L1 - AAGTCGAATCCCGTT

L2 - AAGTCGAATCCCGTT

L3 - AAGTCGAATCCCGTT

L4 - AAGTCGAATCCCGTC

L5 - AAGTCGAATCCCGTT

L6 - AAGTCGAATCCCGTT

L7 - AAGTCAAACCTCCGTT

L8 - AAGTCGAATCCCGTT

L9 - AAGTCAAACCTCCGTT

L10 - AAGTCAAACCTCCGTT

L11 - AAGTCAAACCTCCGTT

L12 - AAGTCAAACCTCCGTT

L13 - AAGTCAAACCTCATT

L14 - AGGCTAAACCCTACT

L15 - AGGCTAAACCCTACT

L16 - AGGCTAAACCCTACT

L17 - AGGCTAAACCCTACT

L18 - AGGCTAAACCCTACT



L19 - AGGCTAAACCCTATT

L20 - AAGTCGAATCCCGTT

L21 - AAGTCGAATCCCGTT

L22 - AAGTCGAATCCCGTT

L23 - TAGCCGAGCCCCATT

L24 - TAACCGAGCCCCATT

L25 - TAGCCGAGCCCCATT

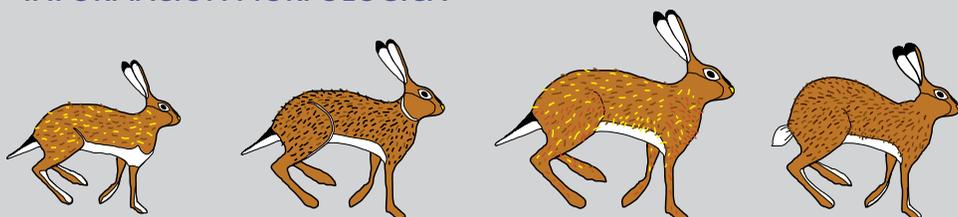
L26 - AAGTCGGATCCCGTT

L27 - TAGCCGAGCCCCATT

L28 - TAGCCGAGCCCCATT

L29 - TAGCCGAGCCCCATT

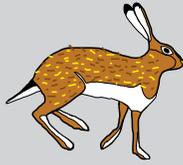
CLASIFICAR LAS ESPECIES DE LIEBRE – INFORMACIÓN MORFOLÓGICA



Liebre ibérica <i>Lepus granatensis</i>	Liebre de piornal <i>Lepus castroviejo</i>	Liebre europea <i>Lepus europaeus</i>	Liebre variable <i>Lepus timidus</i>
De menor tamaño	Grande, pero menor que la europea	De gran tamaño	Grande, pero menor que la europea, con cuerpo más redondeado
Pelo castaño-amarillento	Pelo castaño y negro	Pelo castaño-amarillento, con tonos rojidos en el cuello y zona superior de las patas	Pelo con varios tonos de castaño (pelaje de verano; en invierno la mayor parte de los individuos cambia para un pelaje blanco)
Partes superiores de las extremidades con manchas blancas	Partes superiores de las extremidades sin manchas blancas	Partes superiores de las extremidades sin manchas blancas	Partes superiores de las extremidades con manchas blancas
Sin banda facial	Con banda facial blanco-grisácea	Sin banda facial	Sin banda facial
Pelaje ventral blanco muy extenso, llegando a la zona superior de las patas delanteras, y con contraste nítido entre el pelaje ventral y dorsal	Pelaje ventral blanco menos extenso, y con contraste nítido entre pelaje ventral y dorsal	Pelaje ventral blanco poco extenso, y con zona de transición entre pelaje ventral y dorsal	Pelaje ventral blanco poco extenso, y con zona de transición entre pelaje ventral y dorsal
Cola negra en la parte superior y blanca en la inferior	Cola negra en la parte superior y blanca en la inferior	Cola negra en la parte superior y blanca en la inferior	Cola toda blanca
Orejas negras y puntiagudas	Orejas negras y puntiagudas	Orejas negras y puntiagudas	Orejas negras y puntiagudas, con el borde blanco



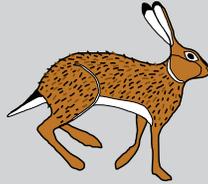
L1



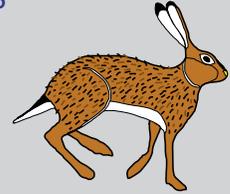
L5



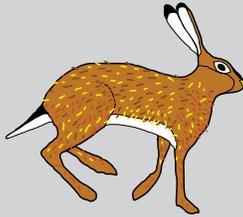
L2



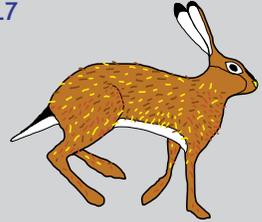
L6



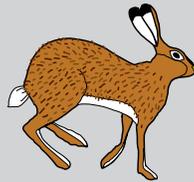
L3



L7



L4



L8

