

ESTUDIO GENÉTICO DEL OSO PARDO CANTÁBRICO EN ASTURIAS



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Museo Nacional de Ciencias Naturales

CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE, ORDENACIÓN DEL
TERRITORIO E INFRAESTRUCTURAS
Principado de Asturias

ESTUDIO GENÉTICO DEL OSO PARDO
CANTÁBRICO EN ASTURIAS

DICIEMBRE DE 2003

JOSE LUIS GARCIA GARITAGOITIA
ISABEL REY FRAILE
IGNACIO DOADRIO VILLAREJO

Índice

Introducción.....	1
Tamaño poblacional.....	9
Variabilidad genética.....	12
Objetivos.....	15
Material y métodos.....	16
Muestreo.....	16
Extracción del ADN.....	17
Amplificación del ADN.....	19
Marcadores moleculares para determinar el sexo.....	21
Controles de confianza.....	22
Genotipado.....	23
Análisis de datos.....	24
Resultados.....	26
Muestreo.....	26
Extracciones positivas.....	26
Microsatélites amplificados.....	28
Identificación de ejemplares.....	29
Determinación del sexo.....	32
Parámetros de variabilidad genética.....	32
Grado de parentesco o índice de endogamia.....	34
Genealogía.....	35
Movimientos.....	36
Discusión.....	38
Aspectos metodológicos.....	38
Individualización y tamaño poblacional.....	40
Sexado.....	42
Variabilidad genética.....	43
Movimientos.....	47
Conclusiones.....	49
Agradecimientos.....	51
Relación de Guardas Rurales Participantes en la Recogida de Muestras.....	52
Bibliografía.....	53
Anexo I.....	61

MEMORIA FINAL

Proyecto: ESTUDIO GENÉTICO DEL OSO PARDO CANTÁBRICO EN ASTURIAS

INTRODUCCIÓN

Los primeros osos conocidos evolucionaron desde los miácidos a partir de un gran oso con apariencia de cánido. Este oso vivió en el oligoceno superior hace unos 27 millones de años. Aproximadamente hace unos 20 millones de años, durante el mioceno, se ha citado un pequeño oso (*Ursavis elemensis*) en Europa cuando esta tenía un clima más cálido y húmedo que el actual. Sin embargo, los osos modernos (*Ursus*) aparecen muy recientemente hace dos millones y medio de años. Dentro del género *Ursus* existen tres diferentes líneas evolutivas. Dos de las líneas se establecieron en Asia y dieron lugar al oso pardo (*Ursus arctos*) y al oso negro (*Ursus americanus*). La tercera línea se desarrolló en Europa dando lugar al oso de las cavernas (*Ursus spelaeus*). El oso de las cavernas era un animal de gran tamaño, cuyos machos llegaban a pesar más de 400 kilos y su alimentación era omnívora. El oso de las cavernas se extinguió hace unos 20.000 años (Hänni *et al.*, 1994) siendo sustituido, en su área de distribución europea, por el oso pardo actual (*Ursus arctos*).

Otro oso, también extinto, *Arctodus simus*, es conocido como oso americano de hocico corto. Sus restos fueron hallados en el sur de California, a donde llegó a través del Estrecho de Bering, que unía Norteamérica y Asia. Este oso, posiblemente, el mayor que jamás ha existido, era significativamente mayor al actual oso Kodiak de Alaska y era un

gran depredador. El oso de hocico corto desapareció hace 12.000 años, al igual que los mamuts, los tigres de dientes de sable y otros grandes mamíferos. Desde entonces su hábitat es ocupado por el oso pardo.

En la actualidad, el oso pardo (*Ursus arctos*, L. 1758) es una especie con una amplia distribución holártica. En Norteamérica vive en Canadá, Alaska y en los estados de Wyoming, Montana, Idaho, y Washington, ocupando hábitats muy diversos desde bosques hasta montañas subalpinas y tundra. En Europa y Asia las poblaciones se encuentran más fragmentadas distribuyéndose desde el norte de la Península Ibérica hasta China y Japón (figura 1).

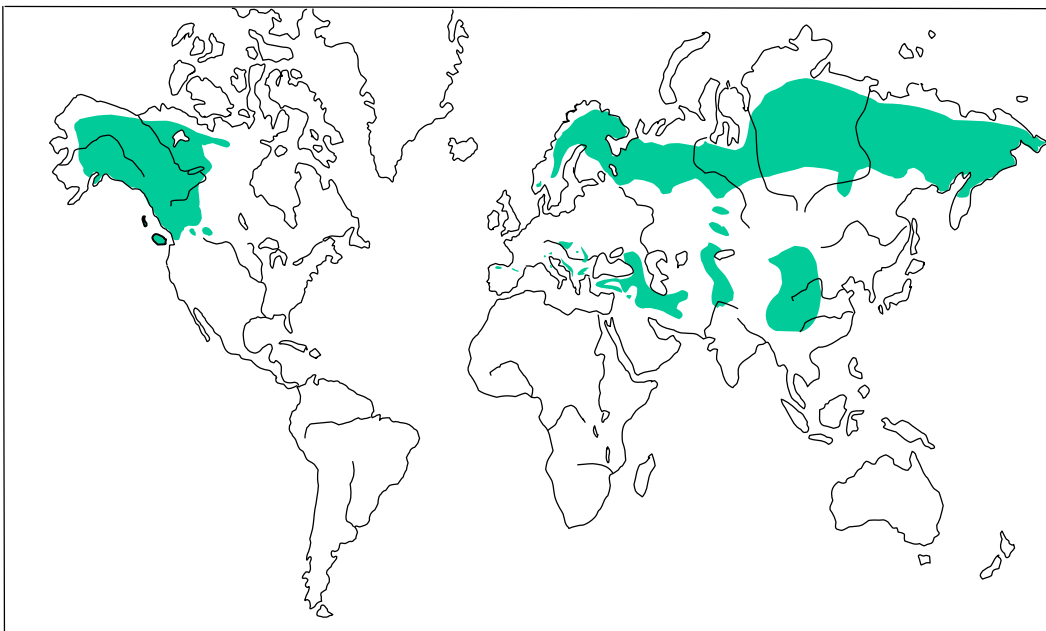


Figura 1.- Distribución actual del oso pardo (*Ursus arctos*).

Dentro de esta amplia distribución, sus poblaciones presentan características genéticas, biológicas, ecológicas y estados de conservación muy diferentes.

En Norteamérica el oso pardo se ha diversificado en dos grandes líneas que constituyen dos subespecies: el oso grizzly (*Ursus arctos horribilis*), que se distribuye por el continente norteamericano, y el oso de Kodiak (*Ursus arctos middendorffi*) que se distribuye por las islas de Kodiak, Shuyak, y Afognak, en Alaska. El rango que ocupa en la actualidad el oso pardo en Norteamérica es la mitad que hace cien años, cuando los osos vivían en hábitats favorables en la mayor parte del oeste americano, desde el Océano Ártico hasta el centro de México. Desde que comenzó en 1922 el aislamiento de las poblaciones por fragmentación de su hábitat y por la caza, el declive del oso pardo en Norteamérica ha sido muy rápido y muchas de las poblaciones que quedaron aisladas por fragmentación se han extinguido. Actualmente, el oso pardo en Norteamérica se concentra a lo largo de Alaska y oeste de Canadá, donde aún es una especie cinegética. Sin embargo, menos de 1.000 ejemplares sobreviven en cinco subpoblaciones que permanecen aisladas en los estados norteamericanos de Wyoming, Montana, Idaho y Washington.

En Eurasia siguiendo el concepto de Unidad Evolutiva Significativa (ESU) desarrollado por Ryder (1986), podemos distinguir tres grandes líneas evolutivas para el oso pardo (Taberlet y Bouvet, 1994). Estos últimos autores estudiaron mediante técnicas moleculares la filogeografía del oso pardo en Europa encontrando una clara concordancia entre la distribución geográfica de los animales y sus haplotipos de la región control mitocondrial.

Se distinguieron dos linajes. El oriental y el occidental, que a su vez está dividido en dos clados. Los dos linajes principales se separaron hace 850.000 años. Esta separación ocurrió en un estado inicial en la historia de la especie y sería debida al aislamiento geográfico en los periodos fríos del Cuaternario inferior.

El linaje occidental aparece organizado en dos clados. Uno incluye a osos de Abruzzo, Trentino, Eslovenia, Bosnia, Croacia, Grecia y Bulgaria. Corresponden a

poblaciones que quedaron aisladas en un refugio glacial en los Balcanes. El segundo clado está compuesto por los osos del Pirineo, la Cordillera Cantábrica y del sur de Suecia y Noruega. Se puede asumir que estas últimas poblaciones se originaron a partir de un refugio ibérico, y fueron capaces de alcanzar el sur de Escandinavia a través de tierras de baja altitud durante el último calentamiento post-glacial. Durante el mismo periodo, para los osos balcánicos, los hielos de los Alpes pudieron constituir una barrera hacia el norte y el oeste, de ahí su expansión hacia el este.

La teoría de Taberlet y Bouvet (1994) asume que no ha existido ninguna introgresión genética entre las distintas poblaciones de osos.

La línea evolutiva oriental incluye las poblaciones de las tundras y de los bosques de taigas de Rusia y las regiones limítrofes con el norte de Corea, Mongolia y China. También se han encontrado pequeñas poblaciones en China central y en Turquía, y poblaciones aisladas en la frontera entre China y Rusia, en partes del norte de la India, en Pakistán, Irán, Irak, Siria y Japón (figura 1) (Servheen, 1989). Dentro de esta línea evolutiva, de cinco a seis mil osos sobreviven en el este de Europa, principalmente en Rumania. Rusia posee la mayor población, superior a 120.000, pero la caza legal e ilegal mata a un gran número de ejemplares cada año. Aún quedan osos en China y Mongolia, aunque sus poblaciones están en declive, y son raros en India y Pakistán. Tres pequeñas poblaciones viven en la isla japonesa de Hokkaido.

Las dos líneas occidentales comprenden las poblaciones europeas (figura 2), las cuales han sufrido una regresión importante en los últimos siglos. Así, en Dinamarca, desaparecieron hace 3.700 años. En el siglo X se extinguieron en Gran Bretaña, en el este de Alemania en 1770, en Bavaria en 1836, en Suiza en 1904 y en los Alpes franceses en 1937.

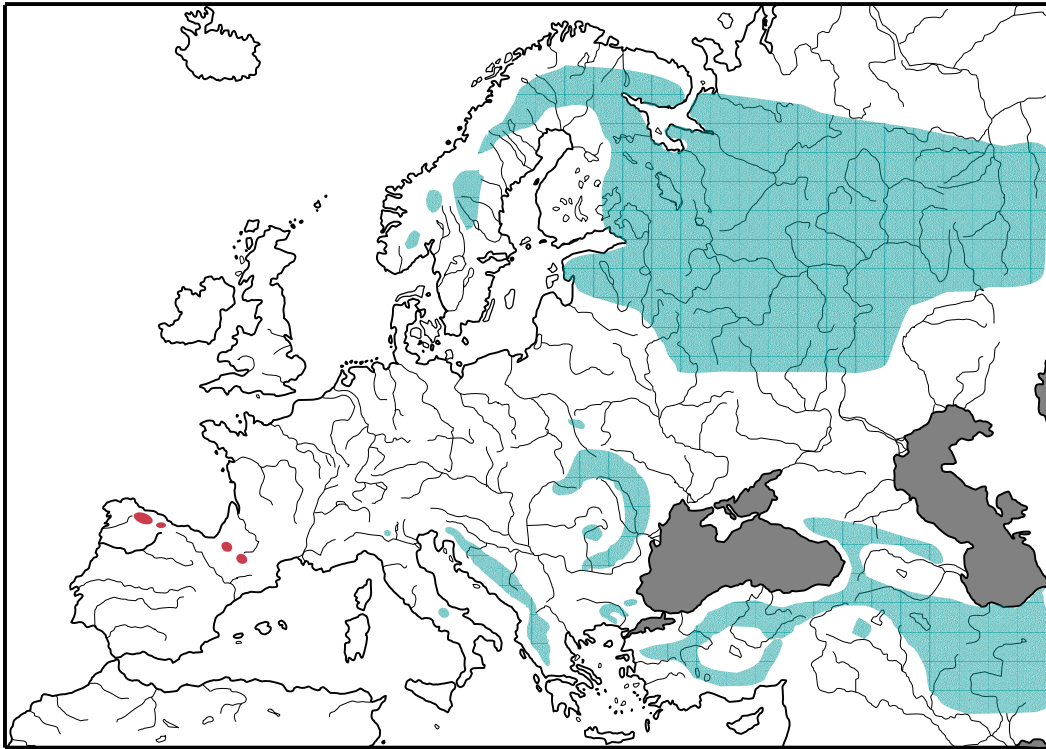


Figura 2.- Distribución del oso pardo en España. En rojo las poblaciones españolas

Una de las líneas occidentales comprende las poblaciones de los Balcanes, los Alpes y los Abruzzos italianos. En Italia, existen dos pequeñas poblaciones, una de entre cinco y diez animales en los Alpes Trentinos y otra de unos 70 u 80 animales en los Apeninos, en la zona del Parque Nacional de Abruzzo. En Grecia, las áreas montañosas incluyendo la península del Peloponeso, parece que estuvieron ocupadas de forma continua hasta el siglo XVI. La población ha decrecido rápida y dramáticamente en los últimos dos siglos. Actualmente el área de distribución del oso pardo en Grecia tiene dos núcleos de población separados por 200 Km en la parte noroeste (Montes del Pindus) y nordeste. El tamaño poblacional en el núcleo este se estima en 15 a 20 individuos, y en el oeste en 95 a 110. En Bosnia Herzegovina, se estima en 1195 osos la población actual y se encuentran conectados con los de Croacia y Serbia. En este país aún se considera especie cinegética, se cazan entre 83 y 85 osos anualmente. La guerra ha disminuido su hábitat considerablemente. En Croacia quedan 400 osos, se comunican con Bosnia al

oeste y Servia al este. Se cazan, al igual que en Macedonia, donde habitan 90 osos que están conectados con los de Kosovo, Albania y Grecia. En Montenegro y Servia hay 250 osos y 180 respectivamente.

La población de osos en el resto de países del este y norte de Europa se estima en Eslovenia de 350 a 450, en Austria 25, Eslovenia 400, Albania 500, Noruega 20, Suecia 600, Finlandia 400, Polonia 80, Eslovaquia 600, y Bulgaria 700 ejemplares.

La otra línea occidental incluye las poblaciones de la Cordillera Cantábrica, los Pirineos y el sur de Suecia (figura 2).

El estado de conservación de la población del sur de Suecia es muy delicada por la introgresión genética debida al aumento de las poblaciones del norte y centro de Suecia, pertenecientes a la línea oriental. De hecho las poblaciones de oso pardo de Suecia y Noruega se vieron afectadas por una reducción poblacional entre los años 1856 y 1893. En 1890 la población escandinava se dividió en dos, y entre 1920 y 1930 desapareció en todos los condados noruegos excepto en uno, y en toda Suecia excepto en los tres condados más norteños. Desde entonces se puso en marcha una política a favor de la especie con el fin de unir las subpoblaciones en las que se había fragmentado la población original. Así, la población llegó a los 700 individuos aproximadamente en 1994 (Swenson *et al.*, 1995), y alrededor de 1000 en 1997 (Sandegren y Swenson, 1997). En la actualidad se han censado alrededor de 600. Sin embargo, el núcleo meridional de Suecia se ha introgresado genéticamente con las poblaciones de Finlandia y Rusia, con lo cual las características genéticas de esta línea evolutiva se han visto alteradas.

Por tanto, las poblaciones ibéricas son las únicas que conservan el patrón genético de una de las grandes líneas evolutivas que tiene el oso pardo. La conservación de esta línea evolutiva debe ser prioritaria.

Sin embargo, en España la población se ha reducido drásticamente en los últimos años. Existen datos históricos, analizados por Naves y Palomero (1989) y por Nores y Naves (1993), que confirman la presencia de oso pardo en buena parte de la Península, incluso en montes próximos a las costas andaluzas, en torno a los siglos XIV al XVI. Sin embargo en el siglo XVII parece que tiene lugar una regresión importante, y los osos ya sólo aparecen en el norte de la Península Ibérica. A partir del siglo XVIII únicamente sobreviven las poblaciones de los Pirineos y de la Cordillera Cantábrica. A principios del siglo XIX desaparecen los últimos osos del País Vasco.

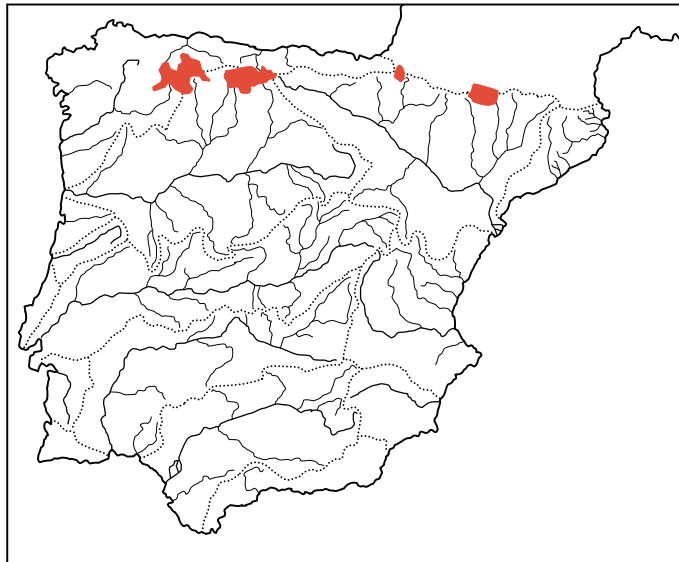


Figura 3.- Distribución del oso pardo en España

En cuanto a la población pirenaica, en 1979 había dos poblaciones aisladas, una en la región central, y la otra en la región occidental de los Pirineos (figura 3). La primera desapareció a finales de los 80, mientras que en la occidental quedaron cinco individuos. En 1993, los gobiernos español y francés decidieron realizar una reintroducción con tres osos adultos (dos hembras y un macho) procedentes de la reserva de Medved (Kocevje, Eslovenia) en los Pirineos centrales, mezclando así dos líneas evolutivas distintas. Estos

individuos han sido monitorizados, y se ha comprobado que en 1997 nacieron 4 individuos, uno de ellos de madre eslovena pero de padre pirenaico.

La población pirenaica occidental esta constituida actualmente por seis individuos (figura 4), siendo uno de ellos (Nere) uno de los descendientes de los osos eslovenos (Ziva), que se instaló en el 2001 en los valles de Ossau y Aspe (Pirineos Atlánticos). En octubre de este año se han realizado fotografías a uno de los machos (Camille) en el valle de Roncal por la Ronda de Ochagavía (Diario de Navarra, 24 Octubre 2003, pág. 20).

En la Cordillera Cantábrica podemos distinguir, en la actualidad, dos Unidades de Manejo: una oriental y otra occidental. La oriental se encuentra situada en su mayor parte en Castilla y León, incluyendo también las comunidades de Asturias y Cantabria. La occidental incluye a Galicia, Castilla y León y Asturias, siendo en esta última en donde se encuentra la mayor parte de la población.

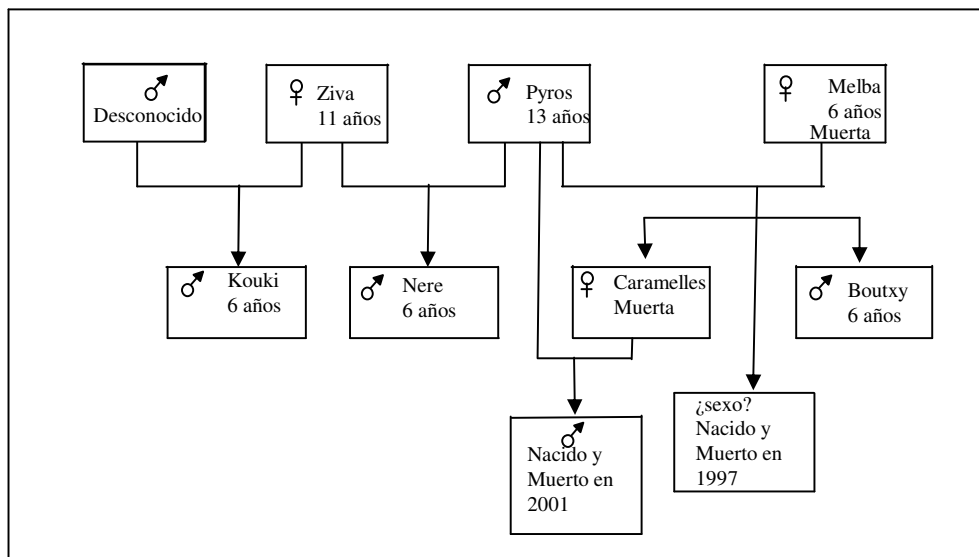


Figura 4.- Genealogía de los osos del pirineo occidental.

Tamaño poblacional

En referencia al número de individuos, desde hace cincuenta años se viene dando diferentes números. El primero censo publicado (Couturier, 1954) realizado en 1952 estimaba la población de oso cantábrico en 40 individuos. Estos primeros censos se realizaban a partir de la información de cazadores, como en el caso de Couturier (1954), o de guardas de caza (Notario 1964, 1970, 1980). En 1979 se realizaron las primeras encuestas a la guardería, a partir de datos obtenidos de observaciones en el campo. Todos los censos coinciden en el desconocimiento del número de individuos en la población oriental y aportaban datos muy diferentes. FAPAS en 1986 realiza el primer censo a partir de observaciones directas y rastros que permitían individualizar los osos. Los resultados de los censos realizados desde 1952 se resumen en la tabla 1.

AUTOR	AÑO CENSO	P. OCCIDENTAL	P. ORIENTAL
COUTURIER (1954)	1952		40
NOTARIO (1964)	1962	77	15-16
NOTARIO (1970)	1969	50	10
BRAÑA <i>et al.</i> (1979)	1977	41-43	12
GARZON <i>et al.</i> (1980)	1978	38	16
GARZON (1979)	1978		100
NOTARIO (1980)	1979	62	17
CAMPO <i>et al.</i> (1984)	1982	82-103	29-41
CAMPO <i>et al.</i> (1984)	1983	88-117	32-47
FAPAS (en CLEVENGER y PURROY 1988)	1986	69-70	13-20
CLEVENGER <i>et al.</i> (1990)	¿?		60-80

Tabla 1.- Censos históricos de la población cantábrica de oso pardo.

Sin embargo, actualmente los censos se realizan mediante el conteo del número de osas vistas con crías. Este método se emplea desde hace tiempo en otras poblaciones de oso pardo. Los primeros censos conocidos empleando el índice de hembras con crías del primer año (hembras COY) se remonta a los años 70 en las poblaciones de América del Norte (Cole, 1974). Su utilización se ha ido extendiendo debido a que las hembras con crías se pueden observar y reconocer fácilmente, lo que permite su individualización, proporcionando una medida del mínimo poblacional (Servheen, 1989) aceptable, estimando que estas son aproximadamente un 10% en poblaciones saludables.

En la Cordillera Cantábrica, el censo de osas con crías se ha llevado a cabo casi ininterrumpidamente, desde 1982 hasta 1993, aunque existen citas anteriores en inventarios realizados por el Instituto para la Conservación de la Naturaleza (ICONA) de recuento de osas con crías. En 1982, el número de osas con crías del año era de 11-12 en la población occidental, y de 3 en la oriental por lo que se estimaba un tamaño entre 110-120 osos en el núcleo occidental y de 30 en la oriental. En 1995 se observaron 7-8 osas con crías en el núcleo occidental y 1 en el oriental. Lo que significaría 70-80 osos en el núcleo occidental y 10 en el oriental (figura 5) (Naves *et al.*, 1999).

Estos datos fueron analizados por distintos autores (Blanco y Palomero, 1994; Naves, 1998; Naves *et al.*, 1999). Todos coinciden en que existe una tendencia negativa en la población occidental a lo largo del tiempo entre los años 1982 y 1993. El último censo provisional de osas con crías (Consejería de Medio Ambiente del Principado de Asturias-Junta de Castilla y León), confirman el avistamiento de 6 hembras en Asturias con 12 crías (Palomero, comunicación personal).

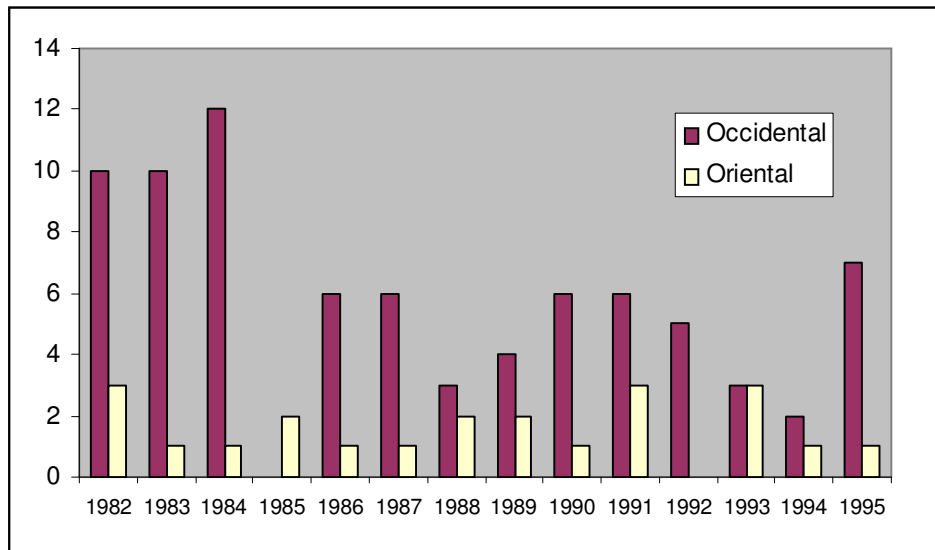


Figura 5.- Número de osas con crías del año entre los años 1982 y 1995.

Recientemente también se aplicaron las técnicas genéticas para estimar el tamaño poblacional del núcleo oriental. Esta estima fue realizada con el estudio del ADN contenido en pelos y excrementos y la individualización de los ejemplares por medio del estudio de microsatélites. Mediante esta técnica se individualizaron 20 ejemplares y no fue posible realizar un censo exacto porque se encontraron pocas repeticiones (Rey *et al.*, 2000). Lo más preocupante fue encontrar que existe una desproporción entre los sexos. Rey *et al.*, (2000) encontraron que de los 20 ejemplares individualizados, 14 eran machos y tan sólo 6 hembras. La desproporción en el número de sexos hace poco fiable los censos realizados con el método de hembras con crías ya que estos parten de la premisa de que el sex ratio está equilibrado. Las diferencias entre las estimas realizadas por el censo de osas con crías y los datos genéticos deben interpretarse como consecuencia de este desequilibrio en la proporción de sexos

Variabilidad genética

Una de las principales preguntas que se suele realizar es si con un número poblacional tan bajo la población cantábrica tienen problemas derivados de la falta de variabilidad genética como es la consanguinidad. Para responder a la misma se llevo a cabo un estudio genético en el núcleo oriental durante los años 1997 – 2000 (Rey *et al.*, 2000). Se observó en este estudio que la desproporción de sexos genera una reducción importante de la variabilidad genética, situándose los parámetros de este núcleo entre los más bajos conocidos. La falta de variabilidad genética, causa a corto plazo depresión por consanguinidad, haciendo poco viable el núcleo oriental de la Cordillera Cantábrica. A largo plazo, puede causar problemas por falta de respuesta a cambios ambientales y frente a enfermedades.

Del núcleo occidental se carece prácticamente de información genética y no se conoce si los mismos factores de erosión genética presentes en la población oriental lo están en la población occidental y si la proporción de sexos y la variabilidad genética son adecuadas para garantizar su conservación. Uno de los debates ha sido también si existe comunicación entre ambos núcleos y si existe flujo genético entre ambas poblaciones. La incomunicación entre los dos núcleos es achacable a la gran cantidad de infraestructuras y pérdida de hábitat en el corredor de Pajares que hacen poco probable la comunicación entre ambos (Nores y Naves, 1993). Sin embargo, la distancia entre ambos núcleos no es excesiva (30 kilómetros), y hay indicios para considerar que algunos individuos puedan franquear esta barrera (Delibes y Obeso, 1999). Además, Clevenger y Purroy (1988) encuentran una dispersión elevada en un macho de oso radiomarcado en la población oriental, con un dominio vital de 224 km². Sin embargo, al tener las hembras de oso un comportamiento filopátrico, situándose las pocas hembras del núcleo oriental en el extremo más alejado del núcleo occidental, es muy probable que no exista intercambio genético y que puede originar fenómenos de rápida extinción. Saccheri *et al.* (1998) han

señalado que la fragmentación en poblaciones animales acelera la probabilidad de extinción.

Naves *et al.*, (1999) analizan el futuro de la población de oso pardo en la cordillera cantábrica. En 1995, momento en el que finaliza su estudio, concluyen que “no existe viabilidad para la población, ... de forma determinista **se encuentra condenada a la extinción**”.

Para determinar esta extinción inminente, estimaron el Tamaño de Población Mínima Viable (PMV) que se define como “la población aislada más pequeña posible, que cuenta con, al menos, un 95% de probabilidades de sobrevivir al menos 100 años” (Shaffer, 1983). Considerando que la población de 1995 siguiera la tendencia de la década de los 90, en cuanto a muertes anuales, incremento de la población y tasa de mortalidad de hembras, las 25 hembras independientes que constituían la población en ese momento, no cumplen los criterios de PMV. Para ello sería necesario como mínimo 32 hembras independientes. En este caso, se supera el 5% de probabilidades de extinción en los próximos 100 años. Según las variaciones ambientales de mortalidad que se consideren, este 5% de probabilidad de extinción podría sobrepasarse en sólo 50 años.

Sin embargo, indica que para concluir categóricamente sobre la viabilidad de la población es necesario tener un mayor conocimiento sobre la genética de poblaciones y la ecología de los osos cantábricos.

En las últimas décadas se han realizado numerosos trabajos sobre la genética del oso pardo (variabilidad, conservación, censos...) en todo el mundo. Entre estos destacan los realizados en Escandinavia (Taberlet *et al.*, 1995; Waits *et al.*, 2000) y Norteamérica (Paetkau *et al.*, 1995, Talbot y Shields, 1996; Paetkau *et al.*, 1998). Para la Península Ibérica se han realizado trabajos en Francia (Taberlet *et al.*, 1997) y en el núcleo oriental de la Cordillera Cantábrica (Rey *et al.*, 2000).

Todos ellos se han mostrado útiles para individualizar ejemplares y estimar los problemas de variabilidad genética de las poblaciones. Pero sobre todo la proliferación de los trabajos genéticos se debe no sólo a la información que producen si no a que su obtención se realiza mediante métodos no invasivos que les ha hecho de gran utilidad para poblaciones amenazadas. Entre estos métodos el más exacto para censar las poblaciones es el de Woods *et al.* (1999) que realiza los censos mediante el empleo de trampas de pelo. Sin embargo, en la Cordillera Cantábrica, este sistema de censo tiene problemas derivados de su delicado estado de conservación, ya que las trampas de pelo al utilizar cebos de olor puede fijar ciertas pautas o desplazar artificialmente el área de campeo de los individuos, aumentando las probabilidades de furtivismo. Además, este método requiere un número elevado de personas vigilando las trampas para evitar contaminaciones.

Dadas las condiciones del estudio que nosotros proponemos parece mejor elección el uso de excrementos y pelos dejados en el campo de manera natural para estudiar la variabilidad genética, a pesar de presentar mayores dificultades metodológicas. Sin embargo se interfiere menos en la población y en la conservación, además de proporcionar estimas de las poblaciones precisas.

El propósito de este trabajo es por tanto aplicar técnicas no invasivas que permitan conocer el número de individuos, la variabilidad genética y otros parámetros genéticos de la población de osos para compararlos con los datos de otras poblaciones, y evaluar así las posibilidades de conservación de la población occidental, que no ha sido objeto de estudio siendo la más numerosa de la Península Ibérica.

OBJETIVOS

El presente proyecto pretende complementar los estudios realizados con anterioridad centrándose en la población asturiana de esta especie.

Los objetivos concretos son:

- Estima del número de individuos existentes, utilizando un método repetible que permita realizar posteriores seguimientos de la evolución de la población.
- Proporción de sexos, utilizando como marcador una región del cromosoma Y.
- Variabilidad genética, ya que está relacionada de forma muy directa con el riesgo de extinción de una población pequeña (Shaffer, 1981).
- Grado de parentesco o índice de endogamia, otro de los factores indicadores de la probabilidad de supervivencia (Wright, 1977).
- Genealogía, puesto que el uso de un número elevado de microsatélites puede permitir identificaciones paternas con una probabilidad de error pequeña.
- Movimientos, mediante las recapturas del mismo ejemplar en distintas localizaciones.
- Identificación de los ejemplares causantes de daños a la agricultura y a la ganadería y de los cazados ilegalmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

La recolección del material fue llevado a cabo por la guardería del Principado de Asturias, en todo el área de distribución del oso pardo en Asturias. El número de personal asignado en este trabajo fue de 25 guardas a partir de mayo de 2002 hasta junio de 2003, es decir, un periodo de algo más de un año. Una vez por semana la guardería realizó transectos por áreas distribuidas al azar dentro del área de distribución potencial del oso pardo en Asturias. Cada vez que se encontraba material biológico de oso pardo, normalmente heces o pelos, se indicaba la localización exacta, el tiempo y distancia recorrida y en muchos casos se adjuntó cartografía en la que figuraban los recorridos y zonas dónde se encontró material. Una vez transcurrido seis meses del comienzo del trabajo de campo se revisaron las áreas de muestreo y se procedió a corregir los posibles sesgos provocados por la movilidad de la guardería, intensificando los trabajos de campo en las áreas menos prospectadas previamente. Así mismo, cuando se visualizó una osa con cría se procedió a visitar el lugar de campeo y coger muestras. Del mismo modo se recogió material en los lugares dónde existían daños provocados por el oso pardo.

Para evitar contaminaciones, se proporcionó a los guardas guantes desechables, mascarillas y pinzas estériles. Para la recolección de heces se utilizaron tubos estériles con silicagel (figura 6) que absorbe la humedad y que sirve como método de conservación *in situ*. Para los pelos se emplearon sobres (figura 7).

Una vez en el laboratorio se procedió a la completa deshidratación de las muestras de heces en un horno a 60° C durante 24 horas. Los pelos se conservaron en sobres a temperatura ambiente.



Figura 6.- Recogida de heces en tubos de silicagel.

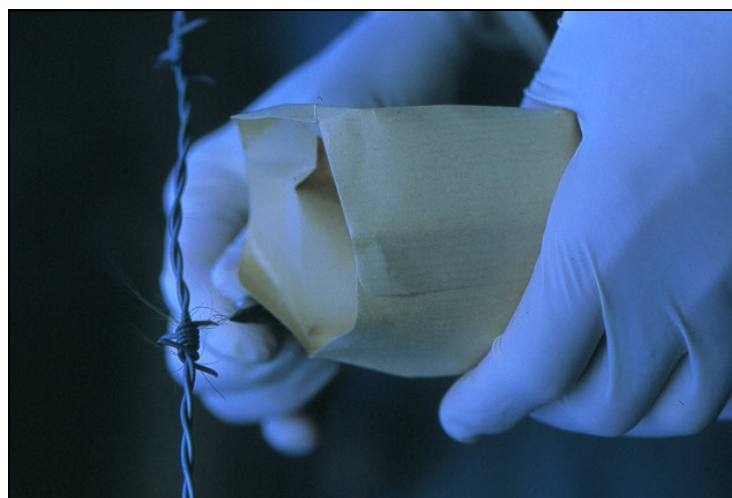


Figura 7.- Recogida de pelos en sobres de papel.

Extracción del ADN

El ADN de las heces se obtiene de las células epiteliales que se desprenden y que quedan adheridas al excremento al pasar este por el intestino.

Para la extracción con las heces se siguió el método de la sílica propuesto por Boom *et al.* (1990). A cada muestra se le añade 1.5 ml de buffer de extracción L6, y se deja toda la noche a 60° C en constante agitación.

Posteriormente se transfiere el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml con 50µl de sílica, añadiendo 1 ml de L6 fresco. Se agita en vortex durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12300 rpm durante 3-4 minutos, se descarta el sobrenadante y se lava el pellet de sílica tres veces con 1 ml buffer L2, centrifugando 1 minuto y eliminando el sobrenadante entre lavado y lavado. Después se lava una vez con 0.5 ml de etanol 100% y otra con 1 ml de acetona. Después de eliminar el sobrenadante se

deja secar a 65° C durante 20 minutos. Posteriormente se añade 200 µl de TE y se mantiene a 65° C durante 10 minutos más. Se centrifuga 10 minutos y se traspasan 160 µl del sobrenadante a un eppendorf nuevo. Para asegurarnos de que no nos lleváramos ninguna partícula de sílica, se centrifuga 5 minutos y se traspasan 140 µl a otro eppendorf nuevo.

Este proceso se realiza por triplicado para cada muestra, con el fin de obtener la suficiente cantidad de ADN (al menos dos de los tres intentos positivos) para poder realizar posteriormente el análisis con todos los microsatélites.

Otro método realizado, modificado de este último, fue la limpieza del extracto obtenido con el protocolo de sílica. Para ello se pasó el volumen total de muestra a través de columnas de purificación de productos de PCR (QIAquick, QIAGEN), con lo que se consigue eliminar una mayor cantidad de inhibidores enzimáticos que impiden la amplificación del ADN.

En el caso de los pelos, el ADN se extrae de las células epiteliales que quedan adheridas a la raíz del pelo al ser este arrancado. Para ello se realizó el método descrito por Walsh *et al.* (1991) del Chelex, una resina por la que el ADN tiene gran afinidad. Una vez que se observaba a la lupa la presencia de raíz, se corta la base del pelo y se introduce en un tubo con Chelex y agua. Este se mantiene a 60° C toda la noche. Posteriormente se calienta a 100° C durante 10 minutos y se conservan a 4° C para ser usados posteriormente.

También se realizaron extracciones de pelos siguiendo el método tradicional de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989).

Tanto en la extracción de heces como en la de pelos se realiza un control negativo, es decir, un tubo con todos los reactivos empleados pero sin la muestra, con el fin de cerciorarse de que ningún resultado positivo sea debido a una contaminación en los productos empleados en la extracción.

Para comprobar que las extracciones han sido positivas, se realiza una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con el microsatélite UarMU64, específico de oso. El producto de la PCR se hace migrar en geles de agarosa al 1.5%.

Amplificación del ADN

Se estudiaron 8 microsatélites descritos por Taberlet (1997) y analizados por Rey *et al.* (2000), (tabla 2).

Locus	Nº de Acceso		Forward		Reverse
G10C-	U22085	F	CAACAAAAGGTTGAAGGGAG	Rpet	AAACACCGAGACAGCAGG
G1A	U22095	Fned	TCCAGTGCCTCCCTTTCT	R	GCACTGCCTTGCGTAGAAGTGAC
MU26	Y09646	F	GCCTCAAATGACAAGATTTC	Rpet	TCAATTTAAATAGGAAGCAGC
G10L	U22088	Fifam	ACTGATTTTATTACATTTCCC	R	CAGAAACCTACCCATGCG
G10B	U22084	Fined	TGCTAATATTTTCTTGAGGACT	R	AGGACAAATCACAGAAACCT
G10X	U22093	Fivic	CCCTGGTAACCACAAATCTC	R	ATCTGTGAAATCAAAACAAACA
G10J	U22087	Ffam	GCTTTTGTGTGTGTTTTTGC	R	TACTGGGAAAATCACTCACC
G1D	U22094	F	ATCTGTGGGTTTATAGGTTACA	Rivic	CTACTCTTCTACTCTTTAAGAG

Tabla 2.- Secuencias de los primers utilizados para la amplificación los microsatélites y fluorocromos empleados (FAM, NED, PET y VIC).

El número de microsatélites analizados es directamente proporcional a la precisión con la que se puede identificar un individuo. Este juego de marcadores es el mismo utilizado por Taberlet *et al.* (1997) para rastrear e identificar los osos de la población del Pirineo. Con estos microsatélites encontraron una variabilidad suficiente para identificar inequívocamente a cinco de los seis osos que componen esta población. El polimorfismo hallado es ligeramente inferior al encontrado para los mismos marcadores en los osos de las islas Kodiak, una población también de muy baja variabilidad genética. Por tanto, para el estudio de una población con más número de ejemplares y mayor variabilidad genética,

que la pirenaica, consideramos que 8 microsatélites es un número suficiente de marcadores para la individualización de las muestras, y sus correspondientes análisis.

Con las extracciones positivas se realizaron pruebas con 10 microsatélites distintos (tabla 3) de los 8 microsatélites usados en los estudios anteriores realizados en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (Rey *et al.*, 2000). Estos microsatélites nuevos ya han sido empleados en otros trabajos de características similares a este con buenos resultados (Paetkau *et al.*, 1998). Como ya se ha indicado esta ampliación en el número de microsatélites pretende aumentar la probabilidad de que la asignación de los padres de un individuo concreto sea correcta. Para ver la diferencia entre los alelos de unos y otros, se ha utilizado el microsatélite G10L usado en Rey *et al.* (2000).

Locus	Nº de Acceso	Forward	Reverse
G1A	U22095	ACCCTGCATACTCTCCTCTGATG	GCACTGTCCTTGCCTAGAGAAGTGAC
MU26	Y09646	GCCTCAAATGACAAGATTTC	TCAATTTAAAATAGGAAGCAGC <i>fam</i>
G10LT	U22088	ACTGATTTTATTACATTTCCC <i>fam</i>	CAGAAACCTACCCATGCG
G10LP	U22088	GTACTGATTTTATTACATTTCCC <i>fam</i>	GCATGGGTAGGTTTCTGTATCTTC
G10B	U22084	GCCTTTTAATGTTCTGTTGAATTTG	GGATGGAGGTTTCTGTGATTTGTC
G10J	U22087	GATCAGATATTTTCAGCTTT	GAAGTGGAGTGTGAGGGGTT
G10H	U22086	CAACAAGAAGMCCACTGTAA	TATCCTACTTGGTGGTCTCT
G10M	U22089	TTCCCCTCATCGTAGGTTGTA	CCTGGGATGCATTTAAATTATT
G10O	U22090	TGGTTATGAATCAGGATATTGA	CATCTTTGGATTGTTCTGTTG
G10P	U22091	ATCAGAGTTTTACATAGGAGGAAGAAA	TTCAGAGTATTTNCC
G10U	U22092	CTSCAGTGTCAGTTGTTAGGAA	ATCACTTAGGGCATTGGAAATA

Tabla 3.- Primers utilizados inicialmente para las pruebas de polimorfismo.

Las reacciones de PCRs se realizaron en un volumen final de 25µl. (1X buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,3µM de cada primer, 0,1mg/ml de BSA, 0,625 unidades de Taq Polimerasa) con 5µl del extracto de ADN.

Marcadores moleculares para determinar el sexo

Para poder determinar el sexo se utilizaron dos genes, uno específico de mamíferos machos denominado SRY (*Sex-determining Region* del cromosoma Y) y uno nuclear, específico de osos, MU64. El gen SRY es el responsable de la iniciación de una cascada de expresiones en el tejido gonadal del feto que hace que se comiencen a formar los testículos (Koopman *et al.*, 1990). Los cebadores utilizados para esta amplificación se definieron a partir del alineamiento de las secuencias publicadas de hombre, ratón y conejo (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990). El gen SRY es una secuencia altamente conservada (Coriat *et al.*, 1993) en mamíferos.

Los cebadores utilizados para amplificar el sexo son los publicados por Taberlet *et al.*, (1993).

Se ha aplicado un tipo de PCR especial denominado “PCR *booster*” según el protocolo de Ruano *et al.*, (1989), debido a que el ADN extraído es muy escaso. Esta técnica propone el uso de dos fases: una primera fase en la que los productos de amplificación se añaden con concentraciones muy diluidas y una segunda fase en el mismo tubo en el que los cebadores se incorporan con una concentración normal. Con este método se consigue aumentar la eficacia evitando la aparición de artefactos originados por el solapamiento de los cebadores y se obtiene mayor rendimiento de ADN amplificado.

La identificación del sexo en un gel de agarosa es relativamente sencilla; si aparecen dos bandas, correspondientes a los genes MU64 y SRY, significa que el individuo es un macho. Si sólo aparece la banda correspondiente al gen MU64, estaremos en presencia de una hembra, pudiendo así distinguir a las hembras de las muestras en las que la PCR no haya funcionado correctamente, en cuyo caso no aparecerían bandas.

Controles de confianza

Existen principalmente dos tipos de errores asociados a esta clase de estudios al realizar el genotipado de las muestras: la no detección de uno de los alelos en un individuo heterocigoto (drop out), y la aparición de falsos alelos.

Dado que la cantidad y calidad del ADN con el que trabajamos son muy bajas, cabe la posibilidad de que, a la hora de pipetear, solamente se coja uno de los alelos de un individuo heterocigoto. Al realizar la PCR sólo se amplificaría ese alelo, lo que supondría la asignación incorrecta de un homocigoto para ese microsatélite. Este tipo de error ha sido ampliamente estudiado por Taberlet *et al.* (1996), que realizó una simulación matemática para averiguar el número de repeticiones necesarias de un experimento para realizar una identificación genética fiable (tubos múltiples). Según su estudio y bajo las condiciones en las que trabajamos (figura 8), es necesario realizar siete experimentos independientes para identificar a un individuo homocigoto con el 99% de confianza.

Para evitar la formación de “falsos alelos”, así como para poder realizar 60 ciclos sin pérdida de eficacia de la PCR, se ha empleado una Taq polimerasa especial, la AmpliTaq Gold (Applied Biosystem), que está asociada a una sustancia química que impide su actividad. Cuando se alcanzan los 95° C, el inhibidor se disocia, dejando la polimerasa funcional. La cantidad de polimerasa que se activa es proporcional al tiempo que permanezca a la temperatura de activación, lo que permite un mayor rendimiento de la PCR al haber polimerasa aún activándose en los últimos ciclos.

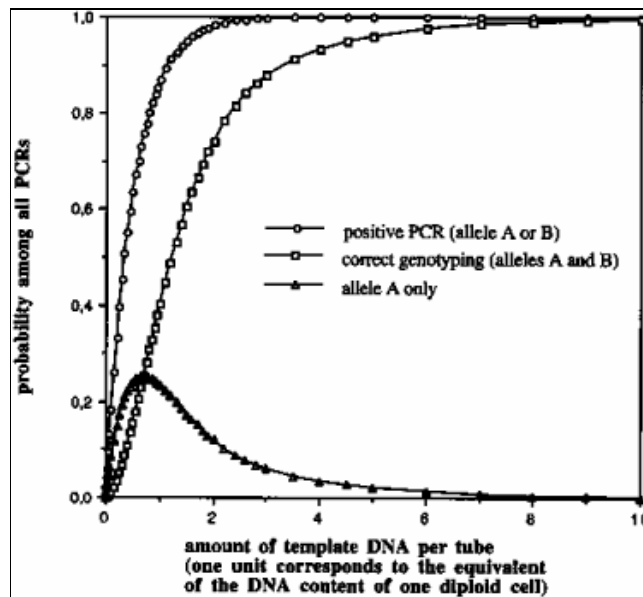


Figura 8.- Relación de la cantidad de ADN molde en la PCR frente a la probabilidad de obtener un genotipo correcto.

También se ha realizado una estimación *a priori* del número de muestras necesarias para lograr individualizar a todos los ejemplares de una población teórica compuesta por 100 individuos. Mediante una curva cuyos puntos se ajustan a una función logarítmica que llega a su asíntota en 100 individuos. El resultado es que, todos los individuos genotipados a partir de las 180 primeras muestras analizadas, serán repetidos. Es decir, no aparecerá ningún nuevo individuo.

Genotipado

El genotipado de las muestras se realizó en un secuenciador capilar automático ABI PRISM-377 (Applied Biosystems). Se emplearon cuatro fluorocromos diferentes para marcar un primer de cada locus (tabla 2). Según los tamaños de los productos amplificados se asignaron los colores de manera que pudieran ser combinados sin que se solapen dos loci con un mismo color y rango de tamaños. De esta manera se pueden analizar todos los loci de un mismo individuo en una sola carrera del capilar.

Los resultados fueron analizados con el programa GeneScan Analysis 3.5.1 (Applied Biosystems, 2000).

Análisis de datos

Los principales factores que afectan a la supervivencia de poblaciones pequeñas y aisladas pueden ser la pérdida de variabilidad genética (Shaffer, 1981), y el incremento de la endogamia debido a efectos de cuello de botella en la población y la disminución del flujo genético (Wright, 1977).

La variabilidad genética se estimó usando los parámetros usados normalmente en este tipo de estudios: número medio de alelos por locus (A), heterozigosis media observada (H_o) y heterozigosis media esperada (H_e) según la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los valores de H_e y H_o se emplea el test de Chi cuadrado. Las diferencias entre las heterozigosis pueden deberse a estructuración de la población, endogamia o procesos de hibridación. El cálculo de todos estos parámetros y test de significación se realizaron con el programa Gimlet v. 1.3.2 (Valière, 2002).

Algunos estadísticos analizados han sido:

F_{st} , o índice de fijación, determina la diferenciación genética entre pares de poblaciones. Valores significativamente diferentes de 0 indican escaso flujo génico o interrupción del mismo conforme se acerca a 1.

F_{is} , determina el grado de endogamia de la población. Valores positivos indican déficit de heterocigotos y valores negativos un exceso.

También fue calculado el número de migrantes (N_m) según el método de “alelos propios” (Barton y Slatkin, 1986).

Para comprobar si existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas, para cada locus, entre el núcleo occidental y oriental se ha empleado GENEPOP-3.2.1c (Raymond y Rousset, 1995) online (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>).

A su vez se utilizó el programa ARLEQUÍN ver.2.000 (Schneider *et al.* 2000) para realizar una AMOVA y ver si existen diferencias significativas en la variabilidad genética dentro de la población occidental.

El número de ejemplares existentes se estimó mediante el cálculo de la asíntota de la ecuación de una curva de rarefacción, método desarrollado por Kohn *et al.* (1999) y revisado por Chessel y por Eggert *et al.* (2003). Este tipo de estimas se basan en la cantidad de muestras analizadas y el número de genotipos que aparecen repetidos a lo largo del periodo de recolección. De las tres posibles ecuaciones, hemos elegido la ecuación de Chessel, debido a los problemas de amplificación de los microsatélites tenidos, lo que ha originado la existencia de numerosos *missing data*. Esta falta de información propicia que los programas sobreestimen el número poblacional. Es por ello que nos hemos decantado por adoptar la ecuación más conservadora.

RESULTADOS

Muestreo

En el presente proyecto se han obtenido un total de 878 muestras, 229 de pelos y 649 de excrementos que cubren todo el área asturiana de distribución del oso pardo (figura 9 y 10).

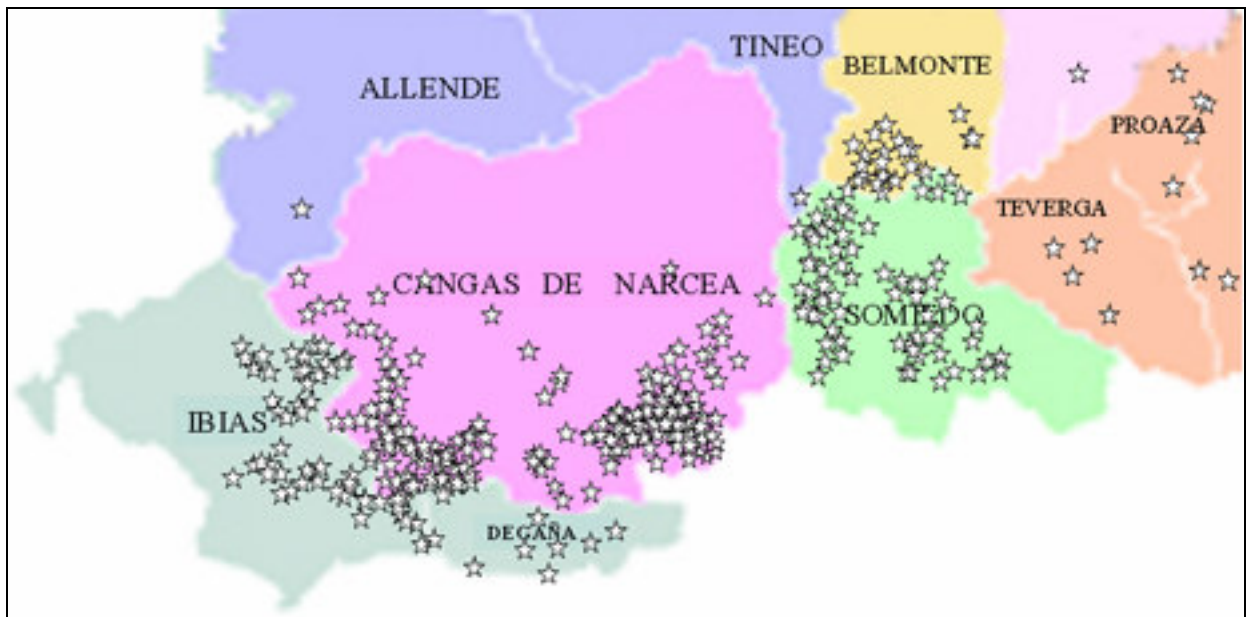


Figura 9.- Mapa representativo de los puntos de muestreo realizados desde mayo de 2002 hasta junio de 2003 en el núcleo occidental.

Del núcleo oriental se obtuvieron un menor número de muestras que del núcleo occidental (figura 10), localizadas estas en los concejos de Morcín (3), de Lena (6), de Quirós (7) y de Amieva (11).

Extracciones positivas

Para el material de pelos los dos métodos de extracción tuvieron resultados muy similares. Para el método de Chelex se obtuvo un el 40% de resultados positivos. Para el método de fenol- cloroformo se obtuvo un rendimiento del 37.5 %. En total con ambos métodos se intentó la extracción de 53 muestras (23,14% de las muestras de pelos

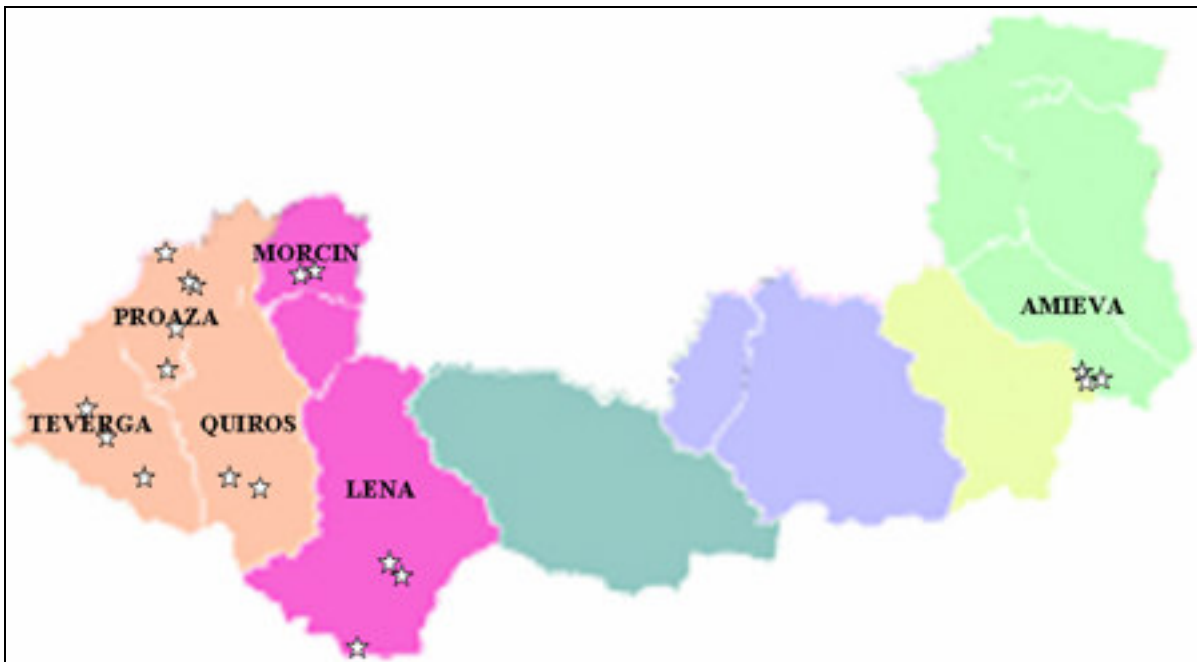


Figura 10.- Mapa representativo de los puntos de muestreo realizados desde mayo de 2002 hasta junio de 2003 en el núcleo oriental.

recibidas). La presencia de mucho material en el que se recogió un sólo pelo y la dificultad que esto entraña para obtener cantidad de ADN suficiente para el estudio de los microsatélites fue la causa de que no se intentaran más extracciones. De las 53 muestras 20 fueron positivas lo que supone un 37.7% del total.

Para el material de heces, se ha intentado extraer ADN de 333 muestras (51.23% de las muestras de heces recibidas). Se obtuvieron resultados positivos en 137 casos (figura 11), lo que supone el 41.14%.

Todos los resultados positivos, tanto para heces como para pelos, se obtuvieron en los municipios de Ibias, Degaña, Cangas de Narcea, Somiedo y Belmonte en el núcleo occidental (figura 11) y en Amieva y Ponga en el núcleo oriental (figura 12). El positivo de Ponga no aparece en el mapa por no disponer de la localización exacta de la muestra.



Figura 11.- Mapa con la localización de las muestras en el núcleo occidental en las que la extracción de ADN ha resultado positiva. En verde las muestras en las que sólo se ha logrado una extracción positiva; en rojo, dos o más extracciones positivas.



Figura 12.- Mapa con la localización de las muestras del núcleo oriental en las que la extracción de ADN ha resultado positiva. En verde las muestras en las que sólo se ha logrado una extracción positiva; en rojo, dos o más extracciones positivas.

También se recibieron muestras de los concejos de Morcín, y Quirós pero no se obtuvieron extracciones positivas.

Microsatélites amplificados

En las poblaciones cantábricas encontramos polimorfismo para 12 de los 20 microsatélites analizados inicialmente, de ellos se seleccionaron 8 con los que se ha

trabajado de forma rutinaria (*G1A*, *G1D*, *G10B*, *G10C*, *G10J*, *G10L*, *G10X*, *MU26*). Craighead *et al.* (1995) determinaron genotipos únicos para la población de osos de Alaska analizando 8 microsatélites (61 alelos sobre una muestra de 30 animales) de ellos 7 son idénticos a los utilizados por nosotros: *G1A*, *G1D*, *G10B*, *G10C*, *G10J*, *G10L*, *G10X*. El otro *MU26* ha sido utilizado por Taberlet *et al.* (1996) para los osos del Pirineo. De la combinación de estos ocho microsatélites se debe obtener un genotipo único para cada animal, tal como ocurre en otras poblaciones de osos. La probabilidad de que dos individuos tengan un mismo genotipo para estos 8 microsatélites es muy baja. Se analizaron además un mayor número de microsatélites que están publicados en el Gene Bank incluyendo los utilizados para identificar los individuos introducidos desde Eslovenia en el Pirineo (Taberlet, inf. ined.) que no resultaron ser polimórficos para las poblaciones cantábricas.

No se logró ninguna amplificación del locus *G10X* en ninguna muestra, por lo que no se ha incluido en los análisis.

El locus *MU26* en las muestras occidentales analizadas aparece como monomórfico para el alelo 191. Ya que este locus no aporta ningún tipo de información, se ha decidido retirarlo de los análisis.

No se obtuvieron resultados positivos para todos los microsatélites en todos los individuos analizados debido a que no hubo amplificación del locus o el extracto de ADN se agotó, aunque ello no afectó a la individualización de los mismos. Como se ha dicho anteriormente para comprobar si las extracciones eran positivas se ha amplificado el microsatélite *MU64*, pero como se puede observar no se refleja en las tablas y esto se debe a que sus cebadores pueden colocarse en dos lugares de la secuencia y en ocasiones se han obtenido cuatro alelos para un único locus.

Identificación de ejemplares

En las tablas 4 y 5 se especifican los ejemplares individualizados. El resultado de prospectar todo el área de distribución en Asturias fue la identificación de 51 ejemplares diferentes en el núcleo occidental y 3 del núcleo oriental durante el periodo comprendido entre mayo de 2002 y junio de 2003, que corresponden con la primera y la última extracción positiva.

Número	Localidad	UTM	Sexo	G10J	G10L	G10B	G1A	G10C	G1D
2000	Belmonte	?							
2193	Belmonte	29TQH717437 4786182	♀	101/111	150/150	125/125	227/229	145/145	177/177
2319	Somiedo	29TQH716763 4780787							
2034	Belmonte	29TQH7214 47867	♂	111/111	150/150	123/125	-	-	-
2479	Belmonte	29TQH721243 4786205		93/103	150/172	125/125	-	-	-
2022	C. Narcea	29TPH6928 47616	♂	91/111	150/152	125/127	227/227	145/145	
2025	C. Narcea	29TPH6933 47606		111/111	150/150	-	-	145/145	-
2053	C. Narcea	29TPH688 4765		111/111	144/144	125/127	227/229	145/147	177/177
2160	Ibias	29TPH6896 47586							
2056	C. Narcea	29TPH688 4762	♀	101/111	150/152	125/127	227/227	145/145	-
2063	C. Narcea	29TPH699 4760		91/101	150/150	-	227/227	145/145	-
2064	C. Narcea	29TPH699 4760	♂	89/101	150/150	125/127	227/229	-	-
2081	C. Narcea	29TQH7083 47643	♀	101/101	150/152	127/127	227/229	-	-
2089	C. Narcea	29TQH707 4765		101/101	150/150	129/129	-	-	-
2104	C. Narcea	29TPH688 4767	♂	101/101	150/150	125/125	227/227	145/15	-
2109	C. Narcea	29TQH707 4765		93/101	-	135/135	-	153/153	-
2127	C. Narcea	29TPH686 4764		101/109	-	-	-	-	-
2146	C. Narcea	29TQH707 4770	♀	91/101	152/152	125/125	227/229	-	-
2172	C. Narcea	29TQH708918 4764688							
2264	C. Narcea	29TQH708317 4764831	♂	111/111	150/150	125/125	227/229	145/147	-
2266	C. Narcea	29TQH708317 4764831							
2173	C. Narcea	29TPH690843 4760618	♂	91/91	-	125/125	-	-	-
2180	C. Narcea	29TQH707535 4770576		91/101	152/152	125/125	229/229	145/147	171/177
2201	C. Narcea	29TPH697852 4767167	♂	101/101	150/150	125/125	227/229	145/145	177/177
2231	Belmonte	29TQH718461 4786401							
2208	C. Narcea	29TQH704135 4766351		101/111	148/150	125/125	227/227	-	-
2246	C. Narcea	29TQH708022 4765550		111/111	144/150	125/125	-	145/147	177/177
2392	C. Narcea	29TQH707252 4766590							
2269	C. Narcea	29TQH708317 4764831		111/111	144/150	125/125	225/227	-	175/177
2399	C. Narcea	29TQH707377 4766738	♂	101/111	-	125/125	229/229	-	-
2423	C. Narcea	29TQH703373 4763999	♀	91/111	152/152	127/129	-	-	-
2428	C. Narcea	29TQH702755 4763982	♀	91/111	150/152	127/129	-	-	-
2429	C. Narcea	29TQH702746 4763972	♀	101/101	150/152	127/127	227/227	145/145	-
2481	C. Narcea	29TQH702705 4764284	♀	101/101	144/144	127/127	227/229	145/145	-
2503	C. Narcea	29TQH701774 4763185		91/111	150/152	125/127	227/229	145/145	177/177
2689	Somiedo	29TQH717766 477185							
2002	Degaña	29TPH6926 47609	♂	91/101	150/152	125/125	227/227	145/147	-
2049	Degaña	29TPH6978 47561							
2262	C. Narcea	29TQH708645 4764644	♂	111/111	150/150	125/125	227/227	147/147	173/177
2393	C. Narcea	29TQH705428 4767101							
2050	Degaña	29TPH6978 47561		111/111	148/150	-	-	-	-
2083	Degaña	29TPH6896 47591		91/101	144/152	123/127	227/229	145/147	-
2094	Degaña	29TQH7035 47568	♀	91/101	152/152	127/127	227/227	143/145	-
2008	Ibias	29TPH6857 47686	♂	91/111	138/150	125/125	225/227	-	-
2038	Ibias	29TPH6792 47684		101/111	150/150	123/125	-	145/145	-
2059	Ibias	29TPH6789 47683	♂	101/111	150/150	127/127	227/227	145/145	-
2060	Ibias	29TPH6894 47587							
2113	C. Narcea	29TPH687 4764	♂	91/101	144/152	123/125	-	145/147	-

2093	Ibias	29TPH6871 47583		125/131	-	-	-	-	-
2178	Ibias	29TPH683524 4768199	♀	91/111	138/150	125/125	225/229	-	-
2241	Ibias	29TPH681856 4763071	♂	91/111	138/150	125/125	227/229	145/147	177/177
2085	Somiedo	29TQH7243 47711							
2123	Somiedo	29TQH7227 47735		101/111	150/152	125/125	227/229	145/145	177/177
2291	Somiedo	29TQH726850 4772550							
2106	Somiedo	29TQH7173 47724		101/101	152/152	127/127	-	-	-
2135	Somiedo	29TQH7283 47715		89/101	138/152	127/127	229/229	-	-
2137	Somiedo	29TQH7273 4773	♂	91/101	138/152	127/127	227/227	145/147	-
2154	Somiedo	29TQH7173 47786							
2214	Somiedo	29TQH717817 4783682	♂	101/111	150/150	125/125	227/229	145/147	177/177
2355	Somiedo	29TQH725468 4783404							
2157	Somiedo	29TQH717789 4771842	♂	101/111	-	123/125	227/227	-	-
2168	Somiedo	29TQH717736 4777235	♂	101/111	150/150	127/127	229/229	-	-
2223	Somiedo	29TQH719143 4779459		-	150/150	125/125	227/227	-	-
2539	Somiedo	29TQH722686 4774775		-	152/152	123/125	229/229	-	-
2564	Somiedo	29TQH702769 4763919		101/101	144/152	-	227/229	-	-
2759	Somiedo	29TQH722 4775619		101/111	150/152	127/127	227/229	145/145	177/177

Tabla 4.- Individualización de osos en el núcleo occidental.

Número	Localidad	UTM	Sexo	G10J	G10L	G10B	G1A	G10C
2463	Leon	30TUN333468 4776523	♂	93/93	152/152	127/129	223/229	147/147
2061	Amieva			93/93	-	149/149	-	-
2164	Amieva	30TUN332076 4786129		91/91	-	-	-	-
2021	Ponga			85/85	-	-	-	-

Tabla 5.- Individualización de osos en el núcleo oriental.

Existen algunos ejemplares en los que la amplificación de ciertos microsatélites ha sido positiva, pero sin embargo no ha sido posible su individualización o su asignación a un individuo concreto por la falta de alelos categóricos. Estos datos no han sido tenidos en cuenta por el posible ruido que podrían introducir en los análisis.

El número de repeticiones, es decir de osos que aparecieron más de una vez en los resultados, que se encontraron para un mínimo de cinco microsatélites analizados, en el núcleo occidental fue de 15. Realizando una aproximación con el método de capturas acumuladas, para 10000 iteraciones, el número mínimo de osos que debieran de existir en el núcleo occidental es de 81, según la ecuación de Chessel ($y = a - a [1 - (1/a)]^x$).

Niter	Min	Median	Mean	Max	Sd
10000	81.527	117.012	118.503	185.531	14.5969

Tabla 6.- Resultados de la estima poblacional para el núcleo occidental utilizando la ecuación de Chessel.

Para la zona donde mayor número de recapturas obtuvimos que fue en el concejo de Somiedo se realizó también una estima que es simplemente aproximada ya que no se trata de una población cerrada con el fin de valorar el número estimado para el total de la población ya que este es muy dependiente del número de recapturas. La estima fue de un número mínimo de 12 y aproximado de 21 individuos

Niter	Min	Median	Mean	Max	Sd
1000	12.1927	20.2496	21.0390	38.3085	4.79673

Tabla 7.- Resultados de la estima poblacional para el concejo de Somiedo utilizando la ecuación de Chessel.

Determinación del sexo

El sexo de los 28 ejemplares previamente individualizados en los que se logró obtener el sexo fue de 10 hembras y 18 machos. No hemos tenido en cuenta en este análisis los ejemplares que no han podido ser individualizados pero que sin embargo sí que han sido sexados. Incluyendo estos últimos, tendríamos 16 (42%) hembras y 22 (58%) machos, similares a los porcentajes encontrados por Doadrio *et al.*(ined.) para esta misma población (41% hembras y 59% machos).

Parámetros de variabilidad genética

Sólo se realizaron análisis para el núcleo occidental debido a que los datos para el núcleo oriental fueron muy escasos.

Para el conjunto del núcleo occidental de Asturias el número medio de alelos por locus (A) fue 5.17. En cuanto al polimorfismo (P), a pesar de que en el estudio que nos ocupa se seleccionaron aquellos microsatélites polimórficos empleados en otros estudios, se observó la presencia de un locus monomórfico (MU26).

	Número medio de alelos por locus	Porcentaje de loci polimórficos	Heterozigosis media observada	Heterozigosis media esperada
OCCIDENTAL	5.17	85.71	0.32	0.51

Tabla 8: Parámetros de variabilidad genética

En cuanto a la heterozigosidad observada (H_o), fue baja 0.32. La heterozigosidad esperada (H_e) fue más alta 0.51. En el análisis de *Chi cuadrado*, para determinar si los loci se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, aparecen diferencias significativas en los loci G10B ($p < 0.0001$, $s.d. < 0.0001$) y G10C ($p = 0.0476$, $s.d. = 0.00057$), entre la heterozigosis esperada y observada. Estas diferencias se debieron siempre a un déficit de heterocigotos.

En la figura 13 se presentan los gráficos de las frecuencias de los alelos de los distintos loci.

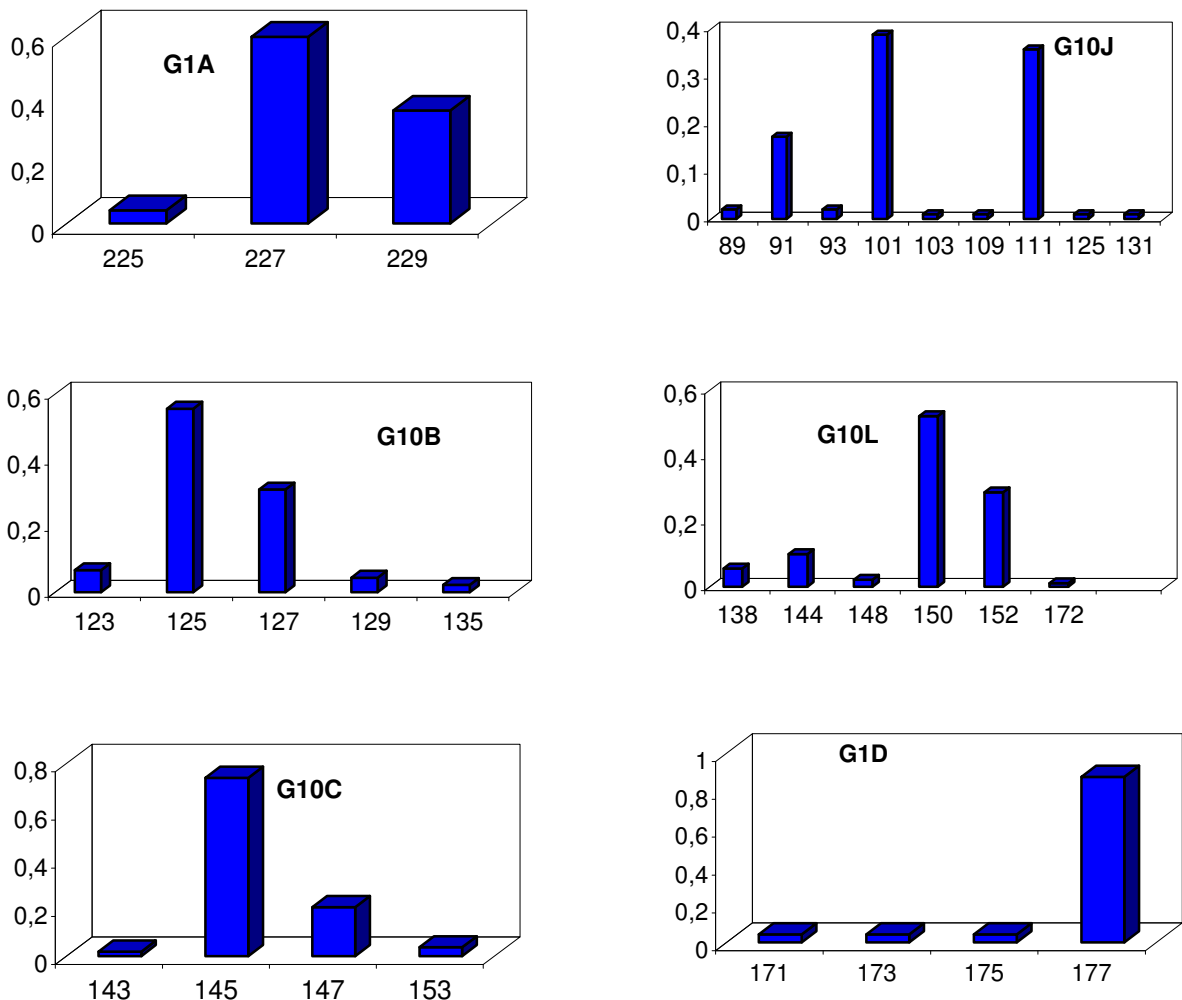


Figura 13.- Frecuencias alélicas de los distintos loci aparecidos en la población occidental.

En la población analizada, se puede observar como el único microsatélite realmente polimórfico es el G10J, puesto que las frecuencias de sus alelos no superan en

ningún momento el 50%, siendo el alelo 101 y el 111 los más frecuentes, con unas frecuencias del 38.8% y de 35.7% respectivamente.

Sin embargo, en el resto de loci se aprecia la existencia de un alelo predominante cuya frecuencia supera el 50%. Así, en el locus G10L, el alelo 150 tiene una frecuencia de aparición del 52.2%; en el G10B, el alelo 125 aparece en el 55.6% de los casos, y en el G1A, el alelo 227 es el más frecuente, con un 59.7% de frecuencia. Es en el caso de los loci G10C y G1D donde se obtienen las frecuencias más altas para un solo alelo (74.1% para el alelo 145 del locus G10C y 87.5% para el 177 en el locus G1D), indicando que estos loci son muy poco polimórficos.

Debido al escaso número de muestras analizadas del núcleo oriental, no se pueden establecer comparaciones concluyentes entre ambas poblaciones. Se observa la presencia de alelos propios que no aparecen en la población occidental.

Se ha realizado un análisis AMOVA para comprobar si se ha producido algún tipo de estructuración de la población occidental dentro de los distintos concejos. El resultado fue que no existe ninguna estructura dentro de los distintos municipios.

Grado de parentesco o índice de endogamia

Se ha calculado para el núcleo occidental el índice Fis para ver el grado de fijación de los alelos en los distintos loci.

Locus	F(IS)	F(ST)	F(IT)
<i>G10J</i>	0.0353	-0.0107	0.0250
<i>G10L</i>	0.2348	-0.0139	0.2241
<i>G10B</i>	0.5167	-0.0171	0.5084
<i>G1A</i>	0.0360	-0.0146	0.0219
<i>G10C</i>	0.1111	-0.0210	0.0924
<i>G1D</i>	-0.0476	-0.0413	-0.0909
Media	0.1728	-0.0187	0.1573

Tabla 9.- Estadístico de F para cada uno de los loci y la media de todos ellos del núcleo occidental.

Los valores de Fis (tabla 9) fueron negativos para el locus *G1D*, indicando un exceso de homocigotos. En los demás loci se aprecia un déficit de éstos.

Se puede ver que los valores de Fit son bajos para todos los loci a excepción del G10B, lo que indica que, menos este locus, la variabilidad de los marcadores es pequeña.

Se ha efectuado un análisis entre los dos núcleos usando para la población oriental los datos obtenidos en el informe del proyecto previo realizado entre los años 1997 – 2000 para la Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Se hicieron las modificaciones oportunas para que fueran comparables los diferentes alelos.

También se calculó el número de migrantes entre las dos poblaciones, mediante el uso de alelos exclusivos, tal y como recomiendan Barton y Slatkin (1986), implementado en el programa Genepop Web v. 3.1c. Se obtuvo como resultado un Nm de 0.105.

Para el conjunto de las poblaciones occidental y oriental se calcularon las Fst que dieron un valor medio no muy alto Fst= 0.48 (tabla 10).

Locus	F(ST)
<i>G10J</i>	0.3442
<i>G10L</i>	0.3001
<i>G10B</i>	0.4877
<i>MU26</i>	0.5164
<i>G10C</i>	0.5679
<i>G1D</i>	0.8178
Media	0.5125

Tabla 10.- Valores de Fst para cada uno de los loci y la media de todos ellos para los dos núcleos de oso pardo cantábrico.

Genealogía

Por el análisis de algunos microsatélites es fácil excluir a un individuo como potencial padre (test de exclusión) en cambio es mucho más difícil obtener la filiación (test de inclusión). Para obtener un alto grado de confianza a la hora de establecer la paternidad de un individuo en poblaciones con baja variabilidad genética, como es el caso de las poblaciones ibéricas, se necesita un mayor número de loci de los analizados.

Esta probabilidad puede ser estimada de manera extremadamente precisa a condición de conocer las frecuencias alélicas de la población de origen. Estas

frecuencias alélicas pueden ser estimadas a partir del análisis de al menos una treintena de individuos no emparentados.

Con estas premisas a lo largo del estudio no se ha podido comprobar ningún caso de correspondencia genética entre madres e hijos, puesto que el número de microsatélites polimórficos amplificados no permite realizar un test de exclusión.

Se han calculado también las Probabilidades de Identidad (PI) de los loci que permiten saber la probabilidad de que un individuo escogido al azar posea un genotipo idéntico a otro ya genotipado con los loci empleados. Los resultados están expresados en la tabla 11.

LOCUS	unbias./loc.	sibs/locus
G10J	1,407e-01	4,425e-01
G10L	1,789e-01	4,830e-01
G10B	2,225e-01	5,150e-01
G1A	3,243e-01	5,778e-01
G10C	3,812e-01	6,454e-01
G1D	5,852e-01	7,860e-01

Tabla 11.- Parámetros de probabilidades de identidad para cada locus.

Movimientos

A lo largo del estudio se han producido 15 recapturas, es decir, que se ha encontrado el mismo genotipo de un ejemplar individualizado con anterioridad. Estas recapturas pertenecen a 10 individuos, y se han producido en fechas y lugares distintos. Esto permite realizar un seguimiento de una parte del área de campeo del individuo.

Así, la hembra cuyo número de catálogo es el 2000 y que fue capturada por primera vez en Belmonte, fue localizada posteriormente en Belmonte nuevamente (27/6/02) y en Somiedo (14/8/02).

También se obtuvo el genotipo del individuo 2053 (9/3/02) en Cangas de Narcea por primera vez, y en mayo del 2002 nuevamente en Ibias (muestra 2160).

El 2172 fue hallado por primera vez en Cangas de Narcea en junio del 2002, y se volvió a encontrar en la misma zona un mes después (2264 y 2266).

En el caso del macho individualizado como 2201 (junio del 2002), localizado por primera vez en Cangas de Narcea, se volvió a encontrar su genotipo en Belmonte un mes después (2231).

En general, no hay mucha distancia geográfica en las distintas relocalizaciones de un mismo individuo, ni tampoco existe una gran distancia temporal entre ellas, pasando como media uno o dos meses entre localización y relocalización (anexo I), con excepciones como el individuo catalogado como 2503, capturado por primera vez el 30 de octubre del 2002 en Cangas de Narcea y recapturado a mediados de abril del 2003 en Somiedo (2689).

Si observamos el sexo de las muestras en las que se han producido relocalizaciones, vemos que han sido localizados de nuevo 5 machos, frente a una sola hembra y 4 individuos sin sexar.

Todos los movimientos realizados por los distintos ejemplares cuyo genotipo ha vuelto a ser encontrado con posterioridad, pueden verse en los mapas del anexo I.

DISCUSIÓN

Aspectos metodológicos

El empleo de técnicas no invasivas, para caracterizar los individuos de una población, estimar el censo de las misma y conocer la variabilidad genética, ha aumentado enormemente en los últimos años debido al desarrollo de técnicas cada vez más eficientes para la extracción de ADN a partir de muestras muy pequeñas y la utilización de microsátélites. Este tipo de técnicas se muestra a veces como la única alternativa posible en especies muy amenazadas. Sin embargo, el método a partir de excrementos y pelos no es fácil, debido a que el ADN obtenido suele ser escaso y muy fragmentado.

Por este motivo, a veces un individuo heterocigoto no se detecta, ya que uno de los alelos se puede perder debido a la poca concentración de ADN. Para solucionar este problema se realizan múltiples replicas de cada análisis (Taberlet *et al.*, 1996; Taberlet *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1998). Sin embargo, puede ocurrir que la cantidad de ADN sea tan pequeña que sea imposible realizar todas las replicas necesarias, cuyo óptimo ha sido establecido en siete repeticiones (Taberlet *et al.*, 1997). Algunos autores como Woods *et al.* (1999) solucionan este problema incorporando muestras con alta cantidad de ADN, es decir, muestras recientes recogidas de trampas de pelo en las que se emplean varias raíces.

Nosotros no hemos utilizado el método de trampas de pelo por necesidades de conservación de una población como la cantábrica con bajo número de individuos. Las trampas con pelo pueden alterar los hábitos alimenticios del oso pardo y fijar individuos a un área determinada y por tanto ser objeto de caza ilegal.

El método empleado de transectos se muestra igual de efectivo que el sistema de trampas para conocer el tamaño de la población y su estructura genética. Esto es debido a que fueron realizados en un periodo de un año, recogidos regularmente y aleatoriamente por un territorio, y en una población prácticamente cerrada, ya que se estima que son pocos los individuos que realizan todo su ciclo vital fuera del área de estudio (si exceptuamos el núcleo oriental).

El número de muestras recogidas ha sido mayor que en cualquier estudio previo realizado para el oso pardo cantábrico y sólo ha podido ser estudiada, en el periodo de duración de este proyecto, una parte de las mismas.

La existencia de varias muestras recogidas en diversos puntos del territorio y pertenecientes a un mismo individuo validan los resultados de este proyecto.

Dentro de los métodos de extracción realizados el rendimiento obtenido fue muy parecido. Para pelos se utilizaron dos métodos: Chelex y fenol-cloroformo. El método de Chelex es ampliamente utilizado en la bibliografía (Taberlet y Bouvet, 1994; Gagneux *et al.*, 1997; Taberlet, 1997; Marshall y Ritland, 2002) porque el ADN muestra una preferencia para pegarse al mismo, y por tanto parece en principio más eficiente para muestras con baja calidad de ADN. El tiempo requerido para realizar la extracción del ADN con el método de Chelex es relativamente corto. Sin embargo este método tiene la desventaja de que, una vez extraído, el ADN se conserva mal en el medio y se degrada más rápidamente que en otros tampones (aproximadamente un año de duración a -20° C).

El método fenol-cloroformo, el más común utilizado en trabajos con buena calidad de ADN, mostró en este estudio resultados muy similares (37.5% frente al 40% del Chelex) y se muestra mucho más estable conservándose el ADN durante periodos más largos de tiempo. Como conclusiones de este trabajo se valora este método como más adecuado por su mayor estabilidad con rendimientos similares.

También se ha comprobado que la limpieza del ADN de inhibidores de la PCR mediante columnas produce una mejora sustancial en el rendimiento de la amplificación de los microsatélites, permitiendo genotipar muestras sobre las que no se habían obtenido resultado alguno. Además, la aparición de extra-bandas inespecíficas permite ver la

cantidad y calidad de ADN contaminante existente en este tipo de muestras, además de poder discriminar el ADN perteneciente a oso pardo del resto.

También se ha comprobado que el método de la sílica para extraer ADN a partir de las heces es muy efectivo, obteniéndose porcentajes algo mayores de lo esperado (41.14%) si tenemos en cuenta trabajos similares como el de Taberlet *et al.* (1997) con un 16.2%, Frantzen *et al.* (1998) con un 64%, Rey *et al.* (2000) con un 24.8% o Marshall y Ritland (2002) con un 44.3%. En la actualidad, ciertas casas comerciales están desarrollando nuevos sistemas de extracción de ADN a partir de muestras de mala calidad, como heces y tejidos muy degradados.

El número de extracciones positivas ha sido aceptable teniendo en cuenta el tipo de material empleado como fuente de ADN. Pero más importante es el hecho de haber obtenido positivos de prácticamente toda la zona de muestreo, lo que permite un análisis más completo.

De las muestras pertenecientes al núcleo oriental se lograron muy pocos positivos. Las posibles causas de estos resultados son la gran diferencia genética existente entre los dos núcleos (como se verá más adelante) y la existencia de pocas muestras a causa de la escasa presencia de osos por esas zonas.

El hecho de que de una muestra no se obtenga ADN de oso no supone, en algunos casos, un fracaso. Es el caso de las muestras catalogadas con los números 2194-2196, de la que se dudaba si su procedencia era o no de oso. Tras 14 intentos de extraer ADN, se puede asegurar que el ADN encontrado en esa muestra no pertenece a oso pardo.

Individualización y tamaño poblacional

La individualización de los ejemplares ha permitido identificar en el núcleo occidental 51 ejemplares y tres en el núcleo oriental entre mayo de 2002 y junio de 2003. La estima del tamaño poblacional para el núcleo occidental, realizada a través de la curva de rarefacción, proporciona un número mínimo de 81 individuos y un tamaño medio estimado para esta población de 118 individuos. Estos valores son similares a los valores

estimados a principios de los años ochenta (Campo *et al.*, 1984), pero superior a las estimas mediante el método de osas con crías realizado en los últimos diez años. El método de osas con crías para estimar un censo parte de dos premisas que difícilmente cumple el núcleo occidental. La primera de ellas es una proporción de sexos equilibrada, que no es soportada en principio por nuestros datos, ya que la población parece estar desplazada a favor de los machos, aunque en menor medida que en el núcleo oriental (Rey *et al.*, 2000). La segunda es que todas las osas con crías son identificadas, que parece poco probable.

Además, el último censo de osas con crías establecería un número mínimo de 70 osos en el núcleo occidental, lo que no es muy diferente de los 81 estimados en este trabajo si tenemos en cuenta el desplazamiento del sex-ratio a favor de los machos. La diferencia estriba en que con el método de osas con crías no se infiere el error de muestreo y por tanto no es posible estimar un número medio probable. El método de recapturas en una población cerrada y al azar llevado por nosotros sí puede estimar un número probable. Sin embargo, todavía el número de extracciones positivas (137) no es muy alto y la varianza por este motivo es grande. El análisis de un mayor número de muestras a lo largo de los próximos meses sin duda hará mucho más fiable el número aquí estimado.

El cálculo del tamaño efectivo para que una población sea viable ha dado lugar a numerosos debates y puede depender del organismo. Para los osos pardos se han dado estimas de poblaciones mínimas viables entre 50 y 125 (Shaffer y Samson 1985; Suchy *et al.*, 1985), unos valores próximos al número estimado por nosotros para el núcleo occidental. Una población mínima viable fue definida por Shaffer (1983) como: la que cuenta al menos con un 95% de probabilidades de sobrevivir al menos 100 años. Siguiendo este concepto, Naves *et al.* (1999) encuentran que con 25 hembras de más de un año y en diferentes escenarios ambientales, la población occidental cantábrica no es viable. Para que sea viable se estima un número mínimo de 32 hembras independientes (Naves *et al.*, 1999). Aunque, no se conocen las edades de los individuos aquí censados,

esta cifra seguramente se alcanzaría con una proporción de sexos equilibrada. Por este motivo serán esenciales los resultados de identificación de sexos que se realicen en los próximos meses.

Sexado

La determinación del porcentaje de sexos (1.8 a favor de los machos o 1.37 si tenemos en cuenta aquellos individuos en los que todavía no se han determinado todos los microsatélites) es menor a la hallada por Rey *et al.* (2000) para la población oriental. En un estudio previo de unos pocos osos del núcleo occidental, la proporción de sexos fue más equilibrada (Doadrio *et al.*, ined.). Un posible error en la determinación del sexo masculino es debido a contaminaciones de las muestras si las personas encargadas de su recogida son varones. Sin embargo, en nuestro caso debemos considerar que todo el personal encargado de recoger material fue cuidadosamente instruido y equipado para evitar dicho problema, utilizando mascarillas y frascos especialmente diseñados para este fin. También es cierto que el número de ejemplares sexados es bajo en relación con el número de ejemplares analizados, lo que puede haber sesgado los resultados a favor de un sexo. De ahí que no podamos ser concluyentes al analizar la proporción de sexos y que probablemente la desproporción observada no sea tan acentuada. Si la desproporción de sexos, aunque menos acentuada, queda confirmada en los análisis posteriores, puede ser un problema para la recuperación por diversos motivos. Entre estos cabe destacar la presencia de pautas de infanticidio (Swenson *et al.* 1997).

Esta misma desproporción a favor de los machos fue observada en el oso pardo en el Pirineo (Taberlet *et al.* 1997). En otras poblaciones de oso pardo tanto de Europa como de Norteamérica y en diferentes ecosistemas, el sex ratio al nacer esta equilibrado, cuando las muestras estudiadas son grandes (Couturier, 1954; Le Franc *et al.*, 1987).

Variabilidad Genética

El hecho de que uno de los microsátélites analizado (MU26) haya resultado monomórfico para esta población, hace pensar que se están dando lugar procesos de fijación de alelos, lo que supondría una importante disminución en la variabilidad genética del núcleo occidental. Ya en el estudio realizado entre 1997 y 2000 se podía observar que este locus presentaba una variabilidad y un número de alelos muy bajos (tres alelos para la población oriental y sólo dos para la occidental; Doadrio *et al.*, ined.). La fijación de alelos es un fenómeno indicativo de pérdida de variabilidad, debida a la falta de flujo génico que aporte nuevos alelos y a un elevado nivel de endogamia.

La falta de flujo entre el núcleo occidental y el oriental queda demostrada por el valor de Nm obtenido, 0.105. Esto significa que el número de migrantes por año es de 0.105 individuos y se interpreta como una interrupción del flujo génico entre estos núcleos.

El número medio de alelos por locus en la población occidental ($A= 5.2$) es mayor que el encontrado en el núcleo oriental ($A= 3.4$; Rey *et al.*, 2000). Si los dos núcleos constituyeran una única población, el número medio de alelos por locus sería $A= 7.16$, debido a que existen alelos que no están compartidos por las dos poblaciones. Se puede observar por tanto una pérdida de variabilidad en las dos poblaciones cantábricas especialmente en la población oriental.

El valor en el número medio de alelos por locus es muy alto, a nivel global, y está dentro de los valores máximos encontrados en la literatura (tabla 11). Estos altos valores pueden estar relacionados con fenómenos históricos, como son los procesos de colonización y la existencia de refugios en determinados periodos. La existencia de un número alto de alelos ($A= 7.16$) si consideramos todas las poblaciones, a pesar del bajo número de ejemplares, podrían confirmar la hipótesis de que la Península Ibérica fue un refugio para la especie en la última glaciación. Si esta hipótesis fuera cierta la existencia de una mayor variabilidad en los centros de dispersión con respecto a las áreas de recolonización es un fenómeno bien conocido en las poblaciones animales.

Hay que tener en cuenta que la heterozigosidad esperada según la ley de Hardy-Weinberg puede estar supervalorada, ya que parte de la asunción de que las poblaciones son panmícticas. En la población cantábrica de osos, con una proporción de sexos (1.8 o 1.37) desplazada a favor de los machos y en el que no todos los individuos tienen la misma oportunidad de reproducirse y por tanto contribuir con su genotipo a la variabilidad total de la población, no se cumplen las condiciones de una población panmíctica y parece más correcto analizar el valor de la heterozigosidad observada.

Por tanto, tenemos que tener en cuenta que la pérdida de variabilidad en las poblaciones cantábricas puede ser más acusada de lo que se desprende al comparar los valores en la literatura, ya que puede estar enmascarada por la existencia de una alta variabilidad inicial, es decir, antes de que se produjera el declive actual.

En cuanto a la heterozigosis observada tanto en el núcleo occidental ($H_o = 0.32$), como en el oriental cantábrico ($H_o = 0.39$) y en el Pirineo ($H_o = 0.39$) son muy bajas, si las comparamos con las obtenidas para los microsatélites de oso pardo, en poblaciones europeas y americanas (Tabla 11) que se consideran en buen estado de conservación, como son la de Alaska $H_o = 0.780$ (Paetkau *et al.* 1998) o de diferentes regiones de Canadá y Estados Unidos $H_o = 0.763-0.656$ (Waits *et al.* 1998). Hay que resaltar que estos datos son comparables ya que se utiliza una misma base de datos, es decir un número similar de microsatélites y la misma metodología de análisis.

Población	N	A(se)	H_o	H_e(se)
Kluane	50	7.38 (0.56)	0.788	0.761 (0.025)
Richardson Mts.	119	7.50 (0.63)	0.766	0.755 (0.030)
Brooks Rge.	148	7.63 (0.50)	0.774	0.749 (0.019)
Escandinavia NS	108	6.20 (0.17)	0.660	0.700 (0.17)
Escandinavia NN	29	5.50 (1.87)	0.660	0.690 (0.16)
Flathead R.	40	6.50 (0.71)	0.694	0.694 (0.027)
Escandinavia S	156	5.40 (1.42)	0.760	0.680 (0.11)
Kuskokwim Mts.	55	6.13 (0.44)	0.700	0.682 (0.026)

Escandinavia M	88	5.80 (1.70)	0.650	0.670 (0.12)
W. Slope	41	6.38 (0.56)	0.668	0.678 (0.036)
E. Slope	45	7.00 (0.82)	0.644	0.670 (0.062)
Paulatuk	58	5.75 (0.88)	0.657	0.650 (0.058)
Coppermine	36	5.75 (1.03)	0.611	0.605 (0.073)
Yellowstone	57	4.38 (0.60)	0.553	0.554 (0.081)
Kodiak I.	34	2.13 (0.35)	0.298	0.265 (0.098)
España oriental	25	3.4 (0.3)	0.394	0.438 (0.071)
España pirineo	6	2 (0.0)	0.389	0.333(0.075)

Tabla 12.- Población y número (N) de muestras analizadas, número medio de alelos por locus (A), Heterozigosis media observada por locus (H_o), Heterozigosis media esperada por locus (H_e). Datos obtenidos de Paetkau *et al.*, 1998, Rey *et al.*, 2000 y Wait *et al.*, 2000.

La población del Parque Yellowstone, calificada en peligro y con censos que no superan los 200 ejemplares, presenta una $H_o = 0.55$ (Paetkau y Strobeck, 1998) mayor también que la encontrada en las poblaciones españolas. La única población conocida con valores de heterozigosis más bajos es la población de las islas Kodiak, que presenta una variabilidad genética (H_o) de 0.265 (Waits *et al.*, 1998).

Por tanto hay que resaltar que la variabilidad genética de las poblaciones españolas de oso pardo, en términos de heterozigosis, es la menor de cualquier población conocida si exceptuamos las islas Kodiak. En Yellowstone se recomienda como medida de gestión imprescindible el aumento de la población para restablecer el flujo genético si los corredores de migración de esta población con las restantes no pueden ser restablecidos (Waits *et al.*, 1998).

La pérdida de variabilidad genética afecta de manera muy similar a las poblaciones cantábricas y en todas ellas se aprecia una sensible erosión genética.

Generalmente se acepta que la variación genética juega un papel muy importante en la capacidad de respuesta de las poblaciones frente a los cambios del entorno (Soulé, 1980). En animales domésticos y en poblaciones de zoológico la pérdida de variabilidad genética tiene unos efectos bien conocidos: disminuye la fertilidad, la resistencia a las

enfermedades, la productividad y la supervivencia (Wright, 1977). En el caso concreto del oso pardo existen referencias acerca de la disminución del número de crías por consanguinidad en poblaciones mantenidas en cautividad (Laikre *et al.*, 1996).

En la actualidad no hay muchos estudios donde se hayan observado sus efectos sobre poblaciones naturales aunque se asume que impide la recuperación de las especies amenazadas y acelera su extinción (Lacy, 1993).

Recientemente algunos autores han demostrado en poblaciones animales que los riesgos indeseables de una baja variabilidad genética se manifiestan drásticamente cuando el número poblacional disminuye debido a una fragmentación de la metapoblación. Así, Saccheri *et al.* (1998) establece una relación directa entre extinción de una población natural y la pérdida de variabilidad genética por endogamia en las poblaciones de la mariposa *Bicyclus anynana*. Similares son las conclusiones obtenidas en el ave *Tympanuchus cupido* (Westemeier *et al.*, 1998)

Las poblaciones cantábricas parecen haber seguido un patrón de regresión por fragmentación en su distribución que ha conducido a la situación actual de dos únicas poblaciones con un bajo número de individuos cada una de ellas. Este modelo es muy parecido al que describen Saccheri *et al.* (1998) y Westmeier *et al.* (1998). En este modelo, un factor determinante es el número poblacional, lo cual parece concordar con la situación actual de las poblaciones cantábricas y se aleja del modelo presente en Kodiak, con un área de distribución continua y con un alto número poblacional. Por tanto la baja variabilidad genética en las poblaciones cantábricas constituye un riesgo real para su viabilidad.

Los efectos nocivos de la pérdida de variabilidad genética parece que pueden ser corregidos en poblaciones cerradas con la introducción de ejemplares externos que contribuyan de forma efectiva en la reproducción. En una población cautiva de peces del género *Aphanius*, establecida para programas de cría en cautividad, se observó a lo largo del tiempo una erosión de la variabilidad genética que fue rápidamente restaurada con la

reintroducción de individuos procedentes del stock salvaje (Schönhuth *et al.*, en prensa). Esta misma recuperación de la variabilidad genética fue comprobada en la población de lobos de Escandinavia que durante más de diez años estuvo formada por una única manada, con bajos valores de variabilidad genética y depresión por consanguinidad. La llegada de un solo lobo macho procedente de otra población mejoró su variabilidad y en apenas una década se incrementó la población en 10-11 manadas (Vilà, 2003).

Por todo ello, aunque el número de osos en la población cantábrica occidental parece suficiente para su recuperación, sobretodo si en posteriores estudios la proporción de sexos se equilibra, la pérdida de variabilidad genética es acusada. La unión de los dos núcleos contribuiría a recuperar la variabilidad genética debido a la presencia de alelos muy diferentes en ambos núcleos. De la misma forma que la fragmentación acelera los procesos de extinción, la unión de núcleos poblacionales acelera de forma considerable la recuperación de una especie. Está fue la medida principal tomada para la recuperación del oso pardo en Suecia y que se mostró extraordinariamente efectiva (Swenson, 1995).

Por todo ello se recomienda trabajar en el corredor de separación entre ambos núcleos de forma urgente para que se establezca el flujo genético entre poblaciones.

MOVIMIENTOS

Se ha podido observar que los machos se recapturan en mayor proporción que las hembras (5:1), posiblemente debido a que las hembras presentan un comportamiento filopátrico y no se alejan demasiado del lugar donde nacieron (Canfield y Harting, 1987), lo que hace que sus áreas de campeo sean menores. También parece que los osos tienen un comportamiento recurrente en cuanto a las zonas en las que suelen estar, siendo estas, zonas ya visitadas anteriormente por el animal (Quenette *et al.*, 2000).

Este hecho puede producir ciertos sesgos a la hora de calcular la proporción de sexos, haciendo que se sobreestime el sexo más fácilmente localizable, en nuestro caso el masculino. Y serán más sesgados los resultados cuanto menor sea el número de ejemplares individualizados del total de la población.

Clevenger y Purroy (1988) observaron que ciertos ejemplares del núcleo oriental recorrían grandes distancias. En este estudio hemos comprobado que la distancia existente entre las recapturas de un mismo individuo no es excesivamente grande (ver anexo I).

CONCLUSIONES

La guardería realizó un muestreo al azar por todo el territorio asturiano ocupado por el oso cantábrico entre mayo de 2002 y junio de 2003.

Se ha intentado extraer ADN de 333 muestras de heces (51.23% recibidas) y 53 muestras de pelos (23,14% de las muestras recibidas). Se obtuvieron resultados positivos en 137 casos para las heces (41.14%) y en 20 casos para los pelos (37.7%)

El número de ejemplares individualizados en el núcleo occidental de oso pardo cantábrico entre mayo de 2002 y junio de 2003 fue de 51, de estos se sexaron 28 individuos de los cuales 10 fueron hembras y 18 machos. Si se estiman que las muestras para las que no se han estudiado todos los microsátélites pertenecen a individuos diferentes, encontraríamos 22 machos y 16 hembras. El número de individuos sexados es todavía pequeño y existen algunos datos para pensar que esta desproporción no es tan grande como la previamente observada.

Se ha estimado por el método de capturas acumuladas que el número mínimo de osos en el núcleo occidental es de 81 y el número medio estimado para la población de 118. Son valores ligeramente más altos que los dados para el núcleo occidental en los últimos años mediante el censo de osas con crías.

La aparición de individuos en muestras con localidades y fechas diferentes, implica que se pueden conocer las pautas de dispersión.

Los osos machos recorren mayores distancias que las hembras, siendo por ello más probable la recolección de muestras de este sexo. Sin embargo, las distancias recorridas no son excesivamente grandes.

La variabilidad genética de la población occidental fue de $H_o = 0.32$ y $H_e = 0.51$. Esta variabilidad fue pequeña si la comparamos con otras poblaciones de oso pardo conocidas.

Entre los dos núcleos se observaron diferencias importantes en los alelos presentes, así como una interrupción del flujo genético entre los núcleos, medido a través del parámetro Nm . Si se recuperara el flujo, se favorecería la recuperación de la variabilidad genética y la probabilidad de supervivencia aumentaría considerablemente.

Se hace necesario, que exista el intercambio genético inmediato entre ambos núcleos para ello debe realizarse la mejora del hábitat y eliminar las barreras artificiales existentes en la zona situada entre ambos núcleos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer el trabajo realizado por la Guardería del Principado de Asturias que recolectaron, durante el periodo de estudio, una enorme cantidad de material, la mayor recogida hasta el momento en este tipo de estudios. El trabajo se inició por el interés de Víctor Vázquez, al que agradecemos su confianza y aliento durante la realización del proyecto. Teresa Sánchez Corominas peleó con todos los trámites burocráticos y con la organización de la recogida de muestras; para ella nuestro profundo reconocimiento. A Cristino Ruano, por seguir confiando en la viabilidad de este tipo de estudios y por su constante apoyo. A Guillermo Palomero por la gran cantidad de información proporcionada, tanto de datos de campo como de su propia experiencia. A Eva Bellemein, a Christian Miquel y a Pierre Taberlet, del Laboratoire d'Ecologie Alpine en Grenoble, por el tiempo y los conocimientos que han puesto a nuestra disposición. A Fernando Alda, Lourdes Alcaraz, Silvia Perea, Eva Albert, Patricia García, Diego San Mauro, Elena Guacimara González, Paloma Caudevilla, Annie Marchordom, Antonia Montilla, Silvia Peñate, Isabel Bermúdez de Castro y al resto de la gente del Museo de Ciencias Naturales.

RELACIÓN DE GUARDAS RURALES PARTICIPANTES EN LA RECOGIDA DE
MUESTRAS

Miguel Fernández Otero
Antonio Ramos Fernandez
Antonio González Fernández
Santiago Traviesa de Dios
José Luis López Cueto
José Ángel López Cueto
Rafael González
José Manuel Peláez Velasco
Serrano Aladro Poli
Francisco Quilos Fernández
Indalecio González Fernández
Guillermo Barroso Díaz
Tomás Rodríguez García
Pedro González Álvarez
Iñigo Fernández Martínez
Damián Ramos Fernández
Fernando Rodríguez Pérez
Fernando Pérez Santiago
Eduardo Grande Menéndez
Francisco Rodríguez Álvarez
Jesús Sánchez Fuster
Ramón Cueto Díaz

BIBLIOGRAFÍA

- Barton, N. H.; y Slatkin, M. 1986. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, 56: 409-415.
- Blanco, J.C.; Palomero, G. 1994. Censo de osas con crías 1993. Consejería de Medio Ambiente y Urbanismo, Principado de Asturias.
- Boom, R.; Sol, C. J.; Salimans, M. M.; Jansen, C. L.; Wertheim-van Dillen, P. M.; van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3): 495-503.
- Braña, F.; Campo, J.C.; Lastra, C. 1979. Sobre el oso pardo en la Cordillera Cantábrica. Actes des 1^o et 2^o colloques sur la grande faune pyreneenne. Université de Pau et des Pays de l'adoure. Pau. 91-101.
- Campo, J.C.; Marquínez, J.; Naves, J.; Paomero, G. 1984. Distribución y aspectos poblacionales del oso pardo (*Ursus arctos*) en la Cordillera Cantábrica. *Acta Biol. Mont.*, 4: 371-381.
- Canfield J. and Harting, A. L. 1987. Home range and movements. En *Grizzly Bear Compendium* (eds LeFranc MN, Moss MB, Patnode KA, Sugg WC), pp. 27-35. National Wildlife Federation, Washington, DC.
- Cole, G.F. 1974. Management involving grizzly bear and humans in Yellowstone national Park, 1970-1973. *BioScience* 24(6): 335-338.
- Clevenger. A.P. y Purroy, F.J. 1988. El oso en León. Editorial Universidad de León. León.

- Clevenger, A.P.; Purroy, F.J.; Pelton, M.R. 1990. Movement and activity patterns of an European brown bear in the Cantabrian Mountains, Spain. *Int. Conf. Bear Res. and Management*. 8: 205-211.
- Couturier, M. 1954. *L'Ours brun*, Grenoble.
- Coriat, A., Müller, U., Harry, J. 1993. PCR amplification of SRY-related gene sequences reveals evolutionary conservation of SRY-Box motif. *PCR Methods and Applications*, 2: 218-222.
- Craighead, L; Paetkau, D; Reynolds, H. V; Vyse, E. R; Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Artic grizzly bears. *J. Heredity* 86:255-261.
- Delibes, M.; Obeso, R. (Directores). 1999. Programa de investigación sobre osos pardo 1997-1999. Informe final. Consejería de Medio Ambiente, Principado de Asturias.
- Eggert, L.S.; Eggert, J.A.; Woodruff, D.S. 2003. Estimating population sizes for elusive animals: for the forest elephants of Kalum National Park, Guana. *Molecular Ecology*, 12: 1389-1402.
- Frantzen MA, Silk JB, Ferguson JW, Wayne RK, Kohn MH. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol. Ecol.* Oct;7(10): 1423-8.
- Gagneux P, Boesch C, Woodruff DS. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Mol. Ecol.* Sep;6(9): 861-8.
- Garzón, J. 1979. Cien osos en la Cordillera Cantábrica. *Trofeo*, 105: 5-7.

- Garzón, P.; Palacios, F.; Garzón, J. 1980. Situación del oso pardo ibérico (*Ursus arctos pyrenaicus* Fischer, 1989) 1 reunión iberoamericana de zoología. La Rábida. Huelva. 681-683.
- Gubbay, J.; Collignon, J.; Koopman, P.; Capel, B.; Economou, A.; Munsterberg, A.; Vivian, N.; Goodfellow, P., and Lovel-badge, R. A gene mapping to the sex-determining region of mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 1990; 346: 245-250.
- Hänni, C; Laudet, V; Stehelin, D; Taberlet, P. 1994. Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12336-12340.
- Kohn, M.H. ; York, E. Kamradt, D.A. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London, Serie B*, 266: 657-663.
- Koopman, P.; Munsterberg, A.; Capel, B. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348: 450-452.
- Lacy, R. C. 1993. Vortex: a computer simulation model for population viability analysis. *Wildlife Research.*, 20: 45-65.
- Laikre, R.; Andren, H.; Larsson, O.; Ryman, N. 1996. Inbreeding depression in brown bear (*Ursus arctos*). *Biological Conservation*, 76: 69-72.
- Le Franc, M.N. ; Moss, M.B. ; Patnode, K.A. ; Sugg, W,C. eds., 1987. Grizzly Bear Compendium. Interragency Grizzly Bear Comitee, Missoula. Montana, 540 p).
- Marshall, H. D. y Ritland, K.; 2002. Genetic diversity and differentiation of Kermode bear populations. *Mol. Ecol.* 11: 685-697.
- Naves, J y Palomero ,G.1989. The brown bear in the Cantabrian Mountains: a case study. *Environmental Encounters Series, Council of Europe*, 6: 47-51.

- Naves, J. 1998. Demografía y viabilidad de la población occidental de osos pardos *Ursus arctos* de la Cordillera Cantábrica. Tesis doctoral. DBOS. Facultad de Biología, Universidad de Oviedo.
- Naves, J.; Wiegand, T.; Fernández, A.; Stephan, T. 1999. Riesgo de extinción del oso pardo cantábrico. La población occidental. Fundación oso de Asturias. Oviedo.
- Nores, C., Naves, J. 1993. Distribución histórica del oso pardo en la península ibérica.. En Naves, J. y Palomero, G. (ed.), El oso pardo (*Ursus arctos*) en España. Pags:13-33. ICONA, Serie Técnica.
- Notario, R. 1964 El oso pardo en España. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Notario, R., 1970. El oso pardo en España 2ª Ed. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Notario, R. 1980 Informe de la situación actual en España del oso pardo. Caza y Pesca, 445: 26-39.
- Paetkau, D and Strobeck, C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear population. Mol. Ecol. 3:489-495.
- Paetkau, D; Calvert, W; Stirling, I; Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Mol. Ecol. 4: 347-354.
- Paetkau, D.; Shields, G. F.; Strobeck, C. 1998. Gene flow between insular, coastal and interior populations of brown bears in Alaska, Mol. Ecol., 7: 1283-1292.
- Quenette, P. Y.; Alonso, M.; Chayron, L.; Cluzel, P.; Dubarry, E.; Dubreuil, D.; Palazon, S; Pomarol, M. 2000. Monitoring of three brown bears translocated to the central Pyrenees. En La conservación del oso pardo en Europa: un reto de cara al siglo XXI. Ed. Fundación Biodiversidad.

- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. GENEPOP version 1.2 : population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86 : 248-249.
- Rey, I.; Doadrio, I.; Palomero, G.; Taberlet, P.; Waits, L. 2000. Individualización, determinación del sexo y variabilidad genética del núcleo oriental de oso pardo de la Cordillera Cantábrica. En *La conservación del oso pardo en Europa: un reto de cara al siglo XXI*. Ed. Fundación Biodiversidad.
- Ruano, G.; Fenton, W.; Kidd, K. K. 1989. Biphasic amplification of very dilute DNA samples via “booster” PCR. *Nucleic Acids Research*, 17: 5407.
- Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1(1): 9-10.
- Saccheri, L.; Kuussaari, M.; Kaukare, M.; Vikman, P.; Fortelius, W.; Hanski, L. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494.
- Sambrook, K.V.; Fritsh, E.F.; Maniatis, T. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Sandegren, F.; y Swenson, J.E. 1997. *Björnen-viltet, ekologin och människan*. Svenska ägareförbundet, Stockholm, Sweden. 70pp.
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. 2000. Arlquin ver.2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Lanoratory, University of Genev, Switzerland.
- Schönhuth, S., Luikart, G. y Doadrio, I. En prensa. Effects of a founder event and supplementary introductions on genetic variation in a captive breeding population of the endangered Spanish killifish (*Aphanius iberus*). *Journal of fish biology*.