



1. INTRODUCCION

Debido a un reducido número poblacional y a una tendencia marcadamente regresiva en los últimos años, el oso pardo (*Ursus arctos* L., 1758) es una de las especies de mamíferos considerada en España en la categoría "En peligro de extinción" (Blanco y González, 1992).

Hoy en día su distribución se limita a dos poblaciones (figura 1). La primera de ellas, prácticamente desaparecida, se localiza en los Pirineos y su área de distribución incluye gran parte de Francia y España. Según los últimos estudios dicha población se compone de cinco ejemplares adultos, cuatro machos y una hembra (Taberlet *et al.*, 1996a).

El segundo núcleo de distribución se localiza en la cordillera Cantábrica cuyo número de individuos se estima entre 63-90 (Clevenger y Purroy, 1991; Naves y Palomero, 1993). Este núcleo está dividido en dos zonas que han sido denominadas población occidental y oriental. La población occidental ocupa 2600 km². Se extiende por tres Comunidades Autónomas, Galicia, Castilla y León y, Asturias y el número de ejemplares que se ha estimado en ella se sitúa entre 50 y 60. La población oriental cubre 2480 km² sobre Castilla y León, Asturias y Cantabria, con un número estimado de 20 a 25 individuos (Palomero *et al.*, 1993).

La principal amenaza para el oso pardo en España es la caza ilegal, pero además la transformación y humanización del hábitat, la construcción de carreteras y pistas, la minería a cielo abierto, los incendios provocados y el aumento del turismo constituyen serios problemas para la viabilidad de una población que tiene un número muy pequeño de individuos.

La depresión por endogamia con pérdida de variabilidad genética, son fenómenos que pueden acelerar la extinción de una población y hacerla inviable. Ello parece ocurrir en la población pirenaica, estudios genéticos realizados en este núcleo sugieren una irreparable pérdida de variabilidad genética, como producto de una fuerte depresión por endogamia (Taberlet *et al.*, 1996b). Esta pérdida de variabilidad hace muy difícil la viabilidad de la población pirenaica con los individuos existentes. Por ello se viene realizando un programa de recuperación de este núcleo (Taberlet y Bouvet 1.994,) en el que se incluye como medida más importante la introducción de ejemplares procedentes de Eslovenia. La población eslovena se seleccionó como la más conveniente para fortalecer la población pirenaica, ya que después de un análisis sobre el ADN mitocondrial de las diferentes poblaciones europeas, resultó ser la más próxima genéticamente que podía soportar la extracción de ejemplares hembras sin peligro para si misma. Para el núcleo cantábrico no se tienen datos genéticos, por lo que desconocemos si la reducción del número de individuos ha provocado una pérdida de diversidad genética. Por otro lado, en el caso de tener que recurrir a la reintroducción de ejemplares de otras poblaciones indígenas, es imprescindible (Convenio de Berna, artículo nº 11, 1979) conocer el acervo genético de nuestras poblaciones cantábricas.

Figura 1.- Localización y distribución geográfica de las dos poblaciones cantábricas de oso pardo (según Naves y Palomero, 1993)

En el núcleo cantábrico, además de la variabilidad genética es necesario conocer el tamaño real de la población, la proporción de sexos y su grado de endogamia para conocer su estado genético y para realizar un adecuado plan de conservación de la especie.

El principal objetivo se centra en como estudiar estos aspectos sin interferir en poblaciones amenazadas, como es el caso de las poblaciones españolas de oso pardo. Las nuevas técnicas moleculares, habitualmente utilizadas en medicina forense, se están mostrando en los últimos años como una herramienta indispensable para la realización de planes de conservación puesto que permiten individualizar y sexar a los diferentes ejemplares.

El primer problema que se nos ha planteado para la realización del presente proyecto ha sido como obtener las muestras de tejido para proceder a la extracción de ADN sin poner en peligro la vida de los osos, ni interferir en su actividad.

Convencionalmente las muestras que se han usado para este tipo de trabajo han sido sangre, hígado o piel. La extracción de ADN a partir de este tipo de tejidos completos es una técnica ampliamente utilizada, pero su

obtención implica la captura del animal y la necesidad de aplicar un anestésico general para el manejo del mismo. Todo ello impone una agresión y un alto riesgo para la supervivencia del individuo manejado, por lo que no debe realizarse, en una población, como la del oso pardo con un bajo número de ejemplares.

En nuestro estudio se decidió utilizar para la extracción de ADN, los pelos y heces encontrados sobre el terreno de campeo de la población analizada. Este tipo de restos no provocan ningún daño físico del animal, ni molesta su ritmo de vida o su actividad diaria, requisitos muy importantes para la conservación del oso pardo. Para la recolección de estos restos sólo es necesario revisar la zona de campeo, cuando los animales se han retirado de la misma. El mayor inconveniente es que su uso impone un mayor esfuerzo en el análisis de laboratorio, puesto que las condiciones ambientales, hasta la recolección de las muestras, influyen decisivamente en la degradación de las células que contienen y por lo tanto en la cantidad de ADN existente.

La extracción de ADN a partir de pelo es una técnica sencilla y rutinaria desde principio de los años noventa (Taberlet y Bouvet, 1992 y 1994, Morin y Woodruff, 1992; Morin *et al.*, 1995). La extracción a partir de heces es una técnica menos usual, que en la actualidad se está revelando como muy interesante en estudios de especies en peligro de extinción y difícil manejo (Höss *et al.*, 1992; Gerloff *et al.*, 1995)

Para el sexado de los individuos se ha utilizado una técnica consistente en amplificar una secuencia específica de los machos situada sobre el cromosoma Y. En los mamíferos, este cromosoma juega un papel crítico, puesto que provoca el desarrollo testicular (Berta *et al.*, 1990; Jäger *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1990).

Los microsatélites son los marcadores genéticos elegidos para individualizar los osos pardos fundamentalmente por dos razones: son altamente variables a nivel individual (Queller *et al.*, 1993) y son fácilmente amplificables a partir de ADN parcialmente degradado (Rassman *et al.*, 1991). Los microsatélites son secuencias repetidas en tándem, un número de veces no determinado, cuya secuencia de repetición es de uno hasta cinco pares de bases. Además, presentan dos características fundamentales para este tipo de estudios y para la detección de paternidad: son codominantes y se heredan según un modelo estrictamente mendeliano.

La información sobre los microsatélites procede de estudios realizados en poblaciones humanas y su tasa de mutación se estima entre 10^{-2} a 10^{-5} por generación (Edward *et al.*, 1992) y los cambios en el número de repeticiones de las copias se piensa que pueden ser debidos a errores de mal apareamiento. Las mutaciones observadas en el *pedigree* típicamente incluyen la ganancia o la pérdida de una o pocas unidades de repetición (Valdes *et al.*, 1993).

Sin embargo, son pocos los estudios llevados a cabo en otros mamíferos a pesar de que la técnica de los microsatélites parece ser muy adecuada para estudios de conservación de fauna silvestre en peligro. El uso de estos marcadores para el estudio de osos está siendo utilizado en la actualidad fundamentalmente por dos grupos de investigación, el primero de ellos dirigido por el Dr. D. Peatkau en Canadá (Paetkau y Strobeck, 1994; Craighead *et al.*, 1995) y el segundo dirigido por los Drs. J. Bouvet y P. Taberlet en Grenoble, Francia (Taberlet *et al.*, 1996). Este segundo grupo de investigación además es pionero en el uso de estos marcadores sobre cantidades muy pequeñas de ADN obtenidas a partir de heces.

Todos los análisis realizados en esta memoria han sido hechos en el laboratorio de sistemática molecular del Museo Nacional de Ciencias Naturales, (CSIC), Madrid y en el Laboratoire de Biologie de Populations d' Altitude de la Universidad Joseph Fourier de Grenoble.