



3.1.- EXTRACCIÓN

El material recogido para poder realizar este estudio está constituido por un total de 541 muestras principalmente del núcleo oriental del oso pardo ibérico (León y Palencia). Sobre este material, se intentó extraer ADN en un total de 199 muestras, 62 de heces y 137 de pelo, que representaban todas las localidades y fechas de recolección. Solamente 68 de estas extracciones resultaron positivas (aproximadamente un 34%); y sólo 50 (25%) han sido efectivas para amplificar el conjunto de microsatélites seleccionados. Esta proporción supera la obtenida hasta ahora (16%) en este tipo de análisis (Taberlet *et al.*, 1996b), éxito conseguido en parte gracias al meticuloso protocolo de recolección (amplificación de microsatélites a partir de pelo y heces, encontradas en las áreas de campeo). Por otro lado, de estos 50 extractos de ADN, 48 han sido extraídos de pelo (48%) y 8 de heces (16%). Es decir, a pesar de haber obtenido positiva la amplificación para el control de la extracción, cuando se procedió a amplificar el conjunto de microsatélites seleccionados no se obtuvieron resultados positivos. Esto puede deberse a dos razones, la primera que el extracto de ADN se haya deteriorado durante el período de conservación porque contenía algún agente no deseado, que no pudo ser limpiado durante el proceso de extracción y que ha actuado durante el tiempo de conservación, o durante los períodos de descongelación. En segundo lugar podemos achacarlo a que el extracto posea agentes contaminantes que bloquean el proceso de amplificación por PCR.

3.2.- MICROSATÉLITES SELECCIONADOS

Para seleccionar los microsatélites que se han utilizado en el presente estudio para la población española de osos, se han probado todos los que han sido publicados en trabajos previos de la misma especie. En conjunto, once publicados por Paetkau (Paetkau y Strobeck, 1994; Paetkau *et al.* 1995) G1A, G1D, G10B, G10C, G10H, G10J, G10L, G10O, G10P y nueve encontrados por Taberlet MU05, MU10, MU26, MU15, MU50, MU51, MU59, MU61, MU64 (no publicados).

De estos 20 microsatélites se encontró polimorfismo en 12 y de entre ellos se seleccionaron nueve, por dos razones principalmente. Primero, aquellos que habían aparecido polimórficos en la población de los Pirineos (Taberlet *et al.*, 1996b) para poderlos comparar con la nuestra. En segundo lugar, se eligieron tres microsatélites más, de entre los que se mostraron más polimórficos, en la población cántabra, y cuyos pesos moleculares no se solapasen (cuando esto ocurría se les asignó diferente color fluorescente), para así poderlos hacer migrar todos juntos (técnica denominada *multiplexing*). Es decir, sobre una misma pista de un gel de poliacrilamida se corría un individuo con todos los *loci* amplificados (los rangos de los pesos moleculares de los 9 microsatélites son diferentes y si se solapan se les adjudica un diferente color de fluorescencia). Esto ha supuesto un ahorro de tiempo y dinero considerable. En la figura 6 se observa un gel de agarosa donde se visualiza la amplificación del microsatélite G10L. Se han seleccionado G1A, G1D, G10B, G10C, G10J, G10L, G10X, MU26, MU64. Craighead *et al.* (1995) determinaron genotipos únicos (el genotipo de un individuo está formado por la combinación de los alelos que presenta para cada *locus*) para la población de osos de Alaska analizando 8 microsatélites (61 alelos sobre una muestra de 30 animales), siete de ellos corresponden con los nuestros G1A, G10D, G10B, G10C, G10J, G10L, G10X. Los otros dos MU26 y MU64 han sido utilizados por Taberlet para los osos del Pirineo, pero aún no han sido publicados.

3.3.- POLIMORFISMO DE LOS MICROSATÉLITES

Los nueve microsatélites analizados han sido amplificados como mínimo 7 veces (para que su interpretación fuera fiable) de lo que se desprende que para el presente estudio se han efectuado más de 3000 amplificaciones y aproximadamente 500 experimentos de individualización. Como resultado del trabajo se han obtenido 32 alelos diferentes que se muestran en la tabla 2. La talla de los alelos está definida por el peso molecular en pares de bases (pb) y fue asignada por el programa Genescan, una vez se definieron las categorías o intervalos entre los que se podían encontrar los diferentes *loci*. En estudios anteriores no se determinaba el peso de los fragmentos, sino que se denominaba "0" al alelo más frecuente, los alelos que presentaban más repeticiones que los denominados "0" se les asignaba un número y un signo "+" y a los que tenían menos igualmente un número y un signo "-". La numeración seguida para los alelos es la misma utilizada por Taberlet *et al.*, (1996a). En la tabla 2 se escriben en cursiva y negrita los *loci* analizados en dicho trabajo y los alelos que comparten la población cantábrica con la de los Pirineos.

Figura 6.- Se observa un gel de agarosa en donde se visualizan las amplificaciones repetidas 7 veces del microsatélite G10L para dos ejemplares. En la primera pista se observa el marcador de talla VIII (Boehringer, Mannheim). Los experimentos de amplificación correspondientes a las pistas 5, 6, 7 y 8 no han obtenido amplificación positiva por lo que deberán ser repetidos. El microsatélite G10L es un fragmento de ADN de aproximadamente 154 pb.

El estudio de la población del Pirineo se efectuó con 6 loci, uno de los cuales era MU64 que como se explica posteriormente, ha presentado problemas de análisis para la población cantábrica. La población cántabra comparte 6 alelos de los cinco loci comunes con la población de los Pirineos

Mientras se efectuaba el estudio en el laboratorio de Grenoble, se estaba realizando paralelamente el estudio con microsatélites de las poblaciones escandinavas. Podemos adelantar que estas poblaciones comparten con nuestra población 14 alelos de cuatro loci (G1A, G1D y G10C, G10L). Mientras que con la población del Pirineo sólo comparten 4. Las poblaciones de los Pirineos, cantabras y escandinavas sólo presentan en común dos alelos (L. P. Waits com. per.). Estos valores parecen coincidir con la similitud de dichas poblaciones ya sugerida por los estudios previos de ADN mitocondrial (Taberlet y Bouvet,

1994). La población del Pirineo comparte menos alelos probablemente por la pérdida de heterocigotos por endogamia debido al escaso número de individuos.

Tabla 2.

Alelos obtenidos para los diferentes loci.

En cursiva y negrita se escriben los loci y los alelos estudiados en la población de los Pirineos.

G1A	G1D	G10B	G10C	G10L	G10J	G10X	MU26
185	173	123	101	142	95	123	177
189	175	129	103	150	99	127	179
191	181	131	109	152	103	129	185
				154	109	131	191
					113	133	193
							195
3	3	3	3	4	5	5	6

El microsatélite denominado MU64, se seleccionó porque fue analizado en la población de los Pirineos y porque también era polimórfico en la población cantábrica. Sin embargo y a pesar de haber sido analizado en todos los ejemplares, se ha excluido de los resultados, pues ha presentado un problema, desconocido en la bibliografía, de duplicación de información que aún estamos analizando. Todos los ejemplares aparecían en heterocigosis, pero además en varios ejemplares se han podido leer cuatro alelos por individuo. Las extracciones sólo se hacían sobre un único pelo, por lo que es imposible pensar que los extractos pertenecieran a dos individuos (que podían haber sido amplificados juntos). Podría representar una contaminación pero este problema sólo se presentó en este locus, y también ha sido encontrado en las poblaciones escandinavas (L. P. Waits com. per.). La hipótesis con la que trabajamos es pensar que la aparición de una mutación, en los ejemplares para los que se amplifican cuatro alelos, provoca que los cebadores de ese locus sean complementarios en más de una posición. Por esta razón no se incluye este locus en los resultados hasta que se obtenga más información acerca de él.

Figura 7.- Se observa la amplificación de un locus G10J, a partir de un extracto de un único pelo, en siete independientes experimentos. En la amplificación número 5 se observa un falso alelo etiquetado con 108.93. Repetido cinco veces más nunca volvió a aparecer.

A lo largo de los análisis hemos encontrado, con una frecuencia de un 8%, la presencia de falsos alelos. Se manifiestan como picos que aparecen en nuestros espectrogramas de forma esporádica, acompañando principalmente a los alelos específicos para loci en heterocigosis. Taberlet *et al* (1996b) lo explican como amplificaciones de trozos de ADN contaminante, externo al individuo analizado. Se reconocen fácilmente utilizando el método de tubos múltiples. En caso de duda se decidió repetir el experimento cinco veces más. En la figura 7 se observa la amplificación de un locus G10J en siete experimentos independientes y la presencia de un

falso alelo en una de las amplificaciones.

Sobre las cincuenta muestras positivas se han encontrado un total de 22 genotipos diferentes que asociamos con diferentes individuos (la combinación de los alelos del conjunto de microsatélites para un individuo es diferente de las demás, al menos en un alelo) y que se muestran en las tablas 3 y 4.

De estos 22 genotipos, 8 de ellos (los números 45, 235, 305, 315, 425, 397, 528 y 446) se repitieron en diferentes muestras, hasta 3 veces. El genotipo del número 45 fue idéntico al que se encontró en los números 46 y 47. El número 235 fue idéntico a 237 y 271. El 305 fue idéntico al 288. El 315 se repitió en el 79 y 314. El 425 fue idéntico al 427 y al 421. El genotipo del número 397 fue idéntico a los encontrados en otras tres muestras 217, 352 y 400. El 528 (Posada de Valdeón) se repitió en los números 541 y 537 (Vegacemeja). El genotipo del número 446 fue idéntico al del 447. (Para más información ver anexo).

Tres de los ejemplares individualizados están muertos, son los identificados con los números 1, 48 y 489. Se incluyeron en el análisis para conocer sus alelos. Dos de estos machos (1 y 48) fueron cazados de forma ilegal por furtivos, eran conocidos como Lázaro (Riaflo) y Rubio (Brañosera), y el tercero es una pequeña cría (Valdelprado) matada por un oso adulto, en junio de 1996.

En las tablas 3 y 4 se observan los genotipos de las dos poblaciones, con un total de 22 ejemplares. En la tabla 3 los genotipos de la población occidental, donde se han localizado un total de 5 ejemplares, uno de los cuales es la cría muerta identificada con el número 489.

Tabla 3.

Muestra todos los genotipos de la población occidental, con un total de 5 genotipos (combinaciones de los diferentes alelos para cada microsatélite) los cuales se asignan a diferentes ejemplares

Nº	sexo	localidad	G10C	G10X	G10L	MU26	G10J	G1D	G10B	G1A
5	M	Somiedo	101/101	123/123	150/152	193/193	103/113	181/181	129/129	
488	M	Valdelprado	101/101	127/127	142/150	195/195	95/103	175/181	129/131	
489	M	Valdelprado	101/103	127/127	152/152	193/193	95/103	175/181	129/129	189/191
501	?	Cangas	103/109	131/131		185/193				
521	?	Villablino	101/101	127/127						191/191

Tabla 4.

Muestra todos los genotipos de la población oriental, con un total de 17 genotipos (combinaciones de los diferentes alelos para cada microsatélite) los cuales se asignan a diferentes ejemplares

Nª	sex		G10C	G10X	G10L	MU26	G10J	G1D	G10B	G1A
304	H	Polentinos	103/103	127/133	152/152		95/95	181/181	131/131	
305	H	Polentinos	103/103	131/131	152/152	179/193	95/103	181/181	131/131	185/191
315	H	Polentinos	103/103	129/131	152/152	193/193	95/103	181/181	131/131	185/191
397	M	Polentinos	103/103	123/131	154/154	179/193	95/103	181/181	129/131	185/191
425	M	Polentinos	103/103	129/131	152/152	191/191	95/195	175/181	131/131	
91	H	Arbejal	103/103	129/131	154/154	193/193	95/103	181/181	131/131	185/191
235	H	Arbejal	103/103	123/129	152/152	193/193	95/103	181/181	131/131	191/191
45	H	Pernía	103/103	129/131	152/152	193/193	95/99	181/181	131/131	191/191
9	M	Pernía	103/103	129/129	152/154	179/193	95/95	181/181	123/131	189/191
8	H	Pesaguero	101/101	1123/1131	152/152	191/193	95/103	181/181	131/131	
446	H	Lores	103/103	129/131	154/154	193/193	95/95	181/181	123/131	

392	M	San Salvador	103/103	131/131	154/154	193/193	95/95	181/181	123/131	
48	M	Brañosera	103/103	129/131	152/154		95/95	173/181	123/131	
51	?	Redondos	103/103	129/131	152/154	179/179	95/103	181/181	123/131	
1	M	Riaño	101/101	127/127	152/154		95/113	181/181	129/129	
2	?	Riaño	101/101	131/131	154/154	177/177	109/109	181/181	131/131	189/191
528	M	Valdeón	103/103	129/131	152/154	193/193	95/95	173/181	131/131	185/191

La población occidental presenta alelos propios, que por el momento no se han encontrado en la población oriental, el 109 de G10C, los alelos 142 y 150 de G10L y por último los alelos 185 y 195 de MU26. La población oriental también presenta alelos propios, el 177, 179 y el 191 de MU26, el 99 y el 109 de G10J y el 123 de G10B y el 134 de G10X. Todo ello se puede observar de forma más gráfica en la figura 8, donde se representan las frecuencias alélicas de los diferentes *loci* y para las dos poblaciones cantábricas.

Figura 8.- Frecuencias de los diferentes alelos para cada uno de los loci analizados. En abcisas se muestran los alelos y en ordenadas sus frecuencias.

Población oriental

Población occidental

Como se puede ver en la tabla 4, los genotipos de la población oriental muestran gran número de alelos compartidos sobre todo en los individuos de un mismo municipio o municipios cercanos, estando algunos alelos en homocigosis para determinados individuos y en heterocigosis en otros, lo que supone una relación a nivel familiar bastante cercana que no se observa de modo semejante en la población occidental, aunque para esta población los resultados son sólo iniciales ya que no se ha realizado una campaña de muestreo exhaustiva en esta población teóricamente más numerosa. Por el momento hemos detectado una mayor proporción de alelos propios en la zona occidental 5/5 frente a los 7/17 que presenta la zona oriental. Probablemente, un análisis de un mayor número de individuos de la población occidental haga decrecer aun más el número de alelos propios encontrados en la oriental. El número mínimo de osos vivos en el momento del análisis, para el núcleo oriental es de 15 aunque esta cifra debe ser mayor, puesto que es difícil pensar que se hayan recogido restos del 100% de los individuos que viven en este núcleo, cuando, además sólo el 25% de las extracciones resultaron positivas.

El valor de F_{ST} entre las dos poblaciones ha sido 0.074, lo que nos indica que existe flujo génico entre ambas, o lo que es lo mismo, no existe una importante diferenciación entre ellas. A partir de este parámetro se estima la tasa de migración de aproximadamente 3 individuos por generación. Teóricamente, es suficiente con un migrante por generación para que la divergencia genética entre poblaciones no esté producida por deriva genética (Slatkin, 1987).

El valor de F_{IS} obtenido para la población oriental es de 0.217, al ser un valor positivo nos está indicando una deficiencia de heterocigotos. Este parámetro estima qué porcentaje de emparejamiento no se produce al azar. Teóricamente para que los cruces no se produzcan al azar se alude a dos causas, que exista endogamia (el parámetro F_{IS} también ha sido definido como coeficiente de endogamia) o que la población analizada esté subdividida. El F_{IS} obtenido para la población de los Pirineos, a partir de los alelos encontrados en ella (Taberlet *et al*, 1996a), es de 0.273, este valor es un poco mayor que el que se ha obtenido para la población oriental. En los dos casos parece indicar un importante grado de endogamia.

3.4.- DIVERSIDAD GENÉTICA

Con los genotipos individuales obtenidos para la población oriental, se han calculados los parámetros de variabilidad genética intrapoblacional, con el programa BIOSYS-1 v. 1.7 (Swofford y Selander, 1989). El número medio de individuos analizados *por locus* (N) ha sido de 14.5 (error estándar, e.s.=0.9), el número medio de alelos *por locus* (A) ha sido de 3.4 (3-6), la heterocigosis esperada (H_e) ha sido de 0.479 (e.s.=0.059) y la observada (H_o) de 0.361 (e.s.=0.087). De manera orientativa, también se analizaron estos parámetros para la muestra de la población occidental. El número medio de individuos analizados *por locus* (N) ha sido de 4.1 (e.s.=0.4), el número medio de alelos *por locus* (A) ha sido de 3.1 (e.s.=0.4), la $H_e=0.667$ (e.s.=0.041) y la $H_o=0.538$ (e.s. 0.110).

La heterocigosis que presentan los *loci* microsatélites, no debe ser comparada con la presentada por otros marcadores moleculares (aloenzimas) puesto que los mecanismos que causan la evolución de éstos y su efecto en la

distribución de los alelos son diferentes y mucho más rápidos (Bruford y Wayne, 1993). Pero sí puede serlo con la obtenida para los microsatélites de *Ursus arctos* en América del Norte. En Canadá la $H_o=0.76$ y corresponde a poblaciones con censos de miles de individuos, y que podemos considerar en muy buen estado de conservación. La población del Parque Yellowstone, con una población calificada en peligro y censos que no superan los 200 ejemplares presentan una $H_o=0.559$ y la población de las Islas Kodiak resultó poseer una $H_o=0.260$.

3.5.- SEXADO

La figura 9 muestra la amplificación de los genes que se han usado para identificar el sexo. La técnica del sexado se ha aplicado después de amplificar el conjunto de microsatélites, incluso en aquellos individuos que presentaban genotipos repetidos. De los 22 ejemplares individualizados 9 resultaron ser machos, 8 hembras y el resto con sexo aún desconocido. De los nueve individuos machos, tres de ellos son ejemplares muertos, uno de ellos una cría resultó haberlo sido por un adulto que también resultó ser macho.

El porcentaje de individuos que aún no se les ha podido adjudicar sexo; se debe a que la cantidad de ADN extraído de este tipo de muestras es muy poca y se agota con las repeticiones de los distintos microsatélites. Esto provoca que se deba proceder a extraer ADN de nuevo para dichas muestras; además se debe comprobar que los alelos que identifican al nuevo extracto coinciden con los amplificados anteriormente para el ejemplar identificado en esa muestra. Las muestras de pelo pueden contener muestras de varios ejemplares, por ejemplo en el caso de hembras con crías. Aunque la probabilidad es menor, los excrementos no están a salvo de contaminaciones con ADN de otro oso, en algunas ocasiones las heces contienen también pelos, no se puede asegurar que, por puro azar, no haya caído un pelo de otro oso, por ejemplo de un oseño siguiendo a su madre. Esta comprobación es una norma de seguridad más que se ha incluido para obtener la mayor confianza en el seguimiento genético de las poblaciones de los Pirineos y cantábrica.

Figura 9.- Se muestra la amplificación de los genes para el sexado, sobre un gel de agarosa. En la primera pista se observa un marcador de talla (Boehringer n° VIII). Las pistas n° 6, 10, 11, 12, 13,14, 15 y 17 muestran los fragmentos correspondientes a los machos. Las pistas 5, 7, 8, 9 y 16 no presentan amplificación ninguna. Las pistas 2, 3 y 4 sólo muestran el fragmento correspondiente al locus microsatélite de MU64. Deberá aparecer esta misma situación 8 veces más, en dichas muestras, para que las podamos considerarlas como hembras. Los fragmentos más bajos (menos pesados) corresponden a los cebadores. Las bandas más altas corresponden al gen MU64 y las intermedias al gen SRY.