



#### 4.- CONCLUSIONES

1.- La identificación genética y el sexado de los individuos de una población, a partir del ADN procedente de muestras de pelo y heces encontradas en las áreas de campeo, debe considerarse como el método más adecuado para estudios de conservación de especies en peligro de extinción. Este método se ha mostrado eficaz para el estudio de la población española de oso pardo, pero por el momento, requiere un importante aporte económico y una gran meticulosidad en las técnicas de laboratorio, impuesta por trabajar con cantidades muy pequeñas de ADN.

2.- Se ha obtenido un 25% de extracciones positivas para amplificar el conjunto de microsatélites seleccionados (50 de los 63 extractos con amplificación control positiva). Esta proporción supera la obtenida hasta ahora (16%) en este tipo de análisis (Taberlet et al., 1996b), este éxito se ha conseguido gracias al meticuloso protocolo de recolección. Por otro lado, de estos 50 extractos de ADN, 42 han sido extraídos de pelo (84%) y 8 de heces (16%). Se ha obtenido mayor rendimiento de ADN en las extracciones de pelo que en las de excrementos. De todas las amplificaciones positivas, (63 sobre 199), el 12% fue extraído a partir de heces, y todas ellas pudieron ser amplificadas para el conjunto de microsatélites seleccionados. Es decir, el 100% de las muestras de heces que resultaron positivas pudieron ser amplificadas, mientras que sólo el 72% de las muestras de ADN extraídas de pelo y con amplificación control positiva pudieron ser amplificadas para el conjunto de microsatélites seleccionados. Pensamos que este resultado puede ser mejorado, para reducir el tiempo empleado en el laboratorio y por ello se propone testar modificaciones al protocolo de recogida y conservación de las muestras, en especial de las heces. Los excrementos se vislumbran como muestras excelentes puesto que no están sometidas a ningún sesgo y son muy fáciles de recoger.

3.- Debido a las pequeñas cantidades obtenidas de ADN, téngase en cuenta que la mayor de las muestras procede de la raíz de un único pelo, hemos encontrado problemas en el sexado de los individuos, siendo al 100% fiables los datos referentes a los machos pero persisten algunas dudas en las hembras, puesto que para ser consideradas como tales con un nivel de confianza del 99% han de ser repetidas 91 veces lo que ha supuesto en varios casos el agotamiento del extracto de ADN y de la muestra, para sexar dicho individuo debemos encontrar nuevos extractos de ADN con el mismo patrón genético de individualización. De nuestros resultados se desprende una proporción equilibrada de sexos pero pudiera estar sesgada a favor de los machos puesto que cinco de las hembras que aparecen en la población oriental, sólo fueron repetidas 6 veces (los números 45, 235, 304, 305y 315). De este resultado se desprende que, para el sexado, debe ser mejorada la extracción de ADN (es necesario que se obtenga más volumen de extracto) con lo que se reduciría el tiempo de análisis en el laboratorio. Además, se reduciría el número de extracciones individuales para obtener el sexo y así se podría evaluar de forma rápida la proporción de sexos.

4.- El análisis de los 8 microsatélites seleccionados, permite identificar los individuos de oso existentes en España. La fiabilidad de los resultados depende de la cantidad de ADN que pueda extraerse y de la meticulosidad con que las muestras sean tratadas en el laboratorio. Es necesario repetir cada análisis un mínimo de 7 veces para tener la certeza en la identificación de cada individuo por los problemas de contaminación y mínima cantidad de ADN ya expuestos anteriormente.

5.- Los *loci* G10X y MU26 se han mostrado como los más polimórficos y su combinación caracteriza a la mayoría de los individuos.

6.- El *locus* MU64 aparece polimórfico para la población española de osos, pero ha presentado un problema desconocido en la bibliografía, de duplicación de información. Todos los ejemplares aparecían en heterocigosis pero además en varios ejemplares se han podido leer cuatro alelos por individuo. En la actualidad nos proponemos obtener más información sobre sus posibles causas. Como hipótesis de partida, se piensa 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.

7.- Se han realizado muestreos sólo en la población cantábrica ya que son conocidos los datos para el Pirineo. El mayor esfuerzo de muestreo se realizó en el núcleo oriental y sólo de forma orientativa en el occidental. Se pudieron identificar 22 osos en la población distribuida por la Cordillera Cantábrica de los cuales 17 corresponden al núcleo oriental y 5 al occidental. De los 17 osos del núcleo oriental, 2 fueron abatidos por cazadores furtivos, esta

ha sido considerada como su principal amenaza. En el núcleo occidental, un oseño macho fue muerto por otro oso macho adulto lo cual es otra frecuente causa de mortalidad en otras poblaciones pero hasta ahora no había sido observado en la población española (G. Palomero, com. per.).

8.- Los microsatélites utilizados en este trabajo como marcadores moleculares también son adecuados como identificadores de las diferentes poblaciones de oso de Europa. Los estudios realizados con anterioridad para esta especie, en base a otros caracteres moleculares (ADN mitocondrial) no eran capaces de proporcionar una identificación geográfica de una población, a través de una muestra de tejido cualquiera. Hasta hoy en día, el ADN mitocondrial sólo había separado dos grandes líneas genéticas sobre las poblaciones europeas de *Ursus arctos*. Con los microsatélites podremos llegar a describir, con alto grado de probabilidad, una población con una región geográfica; lo que hace que sean una herramienta imprescindible para reforzar el cumplimiento de la legislación referente a vida salvaje y más concretamente a especies en peligro de extinción.

9.-El valor de  $F_{ST}$  entre las dos poblaciones ha sido de  $F_{ST} = 0.074$ , ello indica que no existe una importante diferenciación entre ellas. A partir de este parámetro se estimó una tasa de migración de 3 individuos por generación. La mayor parte de los autores indican que, es suficiente con un migrante por generación para que la divergencia genética entre poblaciones no esté producida por deriva genética (Slatkin, 1987). Sin embargo, este dato debe considerarse con precaución ya que no indica que actualmente exista este flujo. Estos métodos indirectos calculan el flujo genético que ha existido, no el existente.

10.- Los valores de heterocigosidad observada ( $H_o = 0.361$ ) en la población oriental son menores que los observados en poblaciones consideradas en peligro de extinción ( $H_o = 0.559$  de Yellowstone) e incluso menor que el encontrado para la población occidental usando sólo cinco individuos ( $H_o = 0.538$ ). Los valores de heterocigosidad son similares a los encontrados en la población pirenaica ( $H_o = 0.389$ ). Ello indica una pérdida de variabilidad genética muy importante en la población oriental. El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) es también alto y positivo ( $F_{IS} = 0.217$ ) lo que también indica un déficit de heterocigotos. Este parámetro estima qué porcentaje de emparejamiento no se produce al azar debido a la endogamia. El  $F_{IS}$  obtenido para la población de los Pirineos, a partir de los alelos encontrados en ella (Taberlet *et al.*, 1996a), es de  $F_{IS} = 0.273$ , este valor es un poco mayor que el que se ha obtenido para la población oriental. Todo ello sugiere que la población oriental se encuentra seriamente amenazada por un alto grado de consanguinidad. Ello se basa en la baja variabilidad genética, déficit de heterocigotos con respecto a los esperados y alto coeficiente de endogamia. Nuestros valores se acercan en gran medida a los obtenidos para la población del Pirineo, aunque en esta sólo se analizan los cinco individuos existentes. El estudio de un mayor número de individuos en el núcleo oriental hacía presuponer una variabilidad para este último más elevada que la que proporcionan nuestros resultados. Nosotros sugerimos a partir de nuestros resultados que esta pérdida de variabilidad genética puede hacer inviable el núcleo oriental, aunque los factores externos sean favorables. El núcleo occidental parece estar menos afectado por esta pérdida de variabilidad genética, aunque los datos son provisionales. Con el fin de reforzar la variabilidad genética del núcleo oriental se debería favorecer el flujo genético entre los dos núcleos, es decir facilitar el paso de los machos del núcleo occidental hacia el núcleo oriental.