

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**DEPARTAMENT DE BIOLOGIA ANIMAL, DE BIOLOGIA VEGETAL I
D'ECOLOGIA**

**GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN:
EL LOBO GRIS (*Canis lupus*)**



TESIS DOCTORAL

**NATALIA SASTRE ALAIZ
MAYO 2011**

El Dr. **Oscar Ramírez Bellido**, Profesor del Departament de Ciències Experimentals i de la Salut de la Universitat Pompeu i Fabra,

y

la Dra. **Olga Francino Martí**, Investigadora del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que Natalia Sastre Alaiz ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado “Genética de la Conservación: El Lobo Gris (*Canis lupus*)” para optar al título de Doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 11 de Abril de 2011



Dr. Oscar Ramírez Bellido



Dra. Olga Francino Martí

A mis padres, Santos y Herminia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y porque sin su persona esta tesis sobre genética del lobo no existiría, quiero agradecer al Dr. Armand Sánchez la inversión de tiempo, dinero y confianza que ha depositado en mi.

De la misma manera quiero agradecer profundamente la brillante dirección de mis directores de tesis, concretamente al Dr. Oscar Ramírez por su paciencia infinita y haber hecho de mi una mejor investigadora con sus excepcionales consejos, y a la Dra. Olga Francino por su apoyo y ánimos constantes, y comprender mi forma de proceder y de escribir, reestructurando a la perfección cualquiera de mis pensamientos.

Y por supuesto una investigación científica de calidad no puede llevarse a cabo sin un equipo de investigación excepcional detrás. Por este motivo quiero agradecer a todo el Departament de Ciència Animal i dels Aliments su compañerismo y su apoyo, concretamente a la Dra. Laura Altet por su sentido del humor y excelente dirección de uno de mis trabajos; a la Dra. María Salinas y el Dr. David Gallardo, con ellos empecé en este mundo genético y con ellos espero seguir disfrutando de la vida y de su amistad; al Dr. Joaquim Casellas por hacerme reír tanto; a la Dra. Anna Castelló y Dra. Anna Mercader que aunque realizan una investigación diferente a la mía es siempre un placer tenerlas como compañeras de despacho; y a los futuros doctores Xavi, Oriol, Ingrid y Verónica por todas las cenas, discusiones musicales y conversaciones más allá de la genética que hemos mantenido fuera del ámbito laboral; en definitiva gracias a todos los becarios, doctores y trabajadores, que han estado y están en el Departamento, porque de todos algo nuevo he aprendido a lo largo de todos estos años.

Y como tengo un pasado etológico que me inició en el mundo del lobo, no puedo dejar de agradecer al Dr. Xavier Espadaler y al Dr. Vicente Urios la confianza que depositaron en mi cuando me iniciaba como investigadora, y a todo el personal de la Reserva Natural de Zapovednik de la Federación Rusa por su hospitalidad y generosidad, especialmente a las familias Bologov y Pazetnov que me acogieron como si fuera una más durante mi estancia en Rusia.

También quiero agradecer la confianza que la Generalitat de Catalunya, concretamente Gabriel Lampreave, la Junta de Castilla y León, concretamente Agustín Noriega y la Junta Foral de Álava, concretamente Joseba Carreras han depositado en el SVGM para analizar las muestras de lobo.

Y ya de forma más personal, quiero darle las gracias a todos mis amigos que me han apoyado durante todos estos años; a ellos, y porque la amistad en definitiva facilita el camino que es la vida les debo parte de esta tesis: de Moral, de siempre, a Elia, Olga, Pili, Nuria, mi primo Richard; de mi vida cotidiana y porque sin ellos los jueves serían más aburridos, a Mónica, Cristina, Julià, Gary, Javi; de mi vida en congresos o persiguiendo a Bruce, a Oriol, Patricia, Cristina; de mi vida en el Cosmocaixa, a todos, pero especialmente porque sin ellos las tardes de un mes de agosto no hubieran sido las mismas, a Guillem, Teresa, Nuria y Alex; de mi vida cuando estudiaba biología, a Roger, Marta, Mónica; de mi vida cuando no era ni estudiante de biología, a María, Carol, Fofí, Manel, Edu, Jordi, Ágata; de mi vida en profundidad, a Nuria y Margarita, asesoras excepcionales de mi mente; a todos gracias por tantos años de amistad!

Y sin el apoyo incondicional de una gran familia difícilmente hubiera conseguido llegar hasta aquí. Por este motivo esta tesis se la dedico a mis hermanos Víctor, Judith y Koldo, pero especialmente a mi hermana, que se implicó de forma muy directa en la redacción de este manuscrito, a mi familia genética Sastre y Alaiz y no genética Viñuela y Reventós, pero especialmente a mis padres, pacientes, constantes y trabajadores y que por encima de todo me quieren tal y como soy; esta tesis es fruto de vuestro trabajo al educarme! Muchas gracias!

Y por último pero no menos importante, a David, para siempre.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 TAXONOMÍA Y BIOLOGÍA DE LA FAMILIA CANIDAE.....	3
1.1.1 Subespecies de lobo gris (<i>Canis lupus</i>).....	6
1.2 DISTRIBUCIÓN DEL LOBO GRIS.....	8
1.2.1 Distribución del lobo gris en América.....	10
1.2.2 Distribución del lobo gris en Eurasia.....	10
1.2.2.1 El lobo ruso (<i>C. l. lupus</i>).....	11
1.2.2.2 El lobo itálico (<i>C. l. italicus</i>).....	13
1.2.2.3 El lobo ibérico (<i>C. l. signatus</i>).....	14
1.3 BIOLOGÍA DEL LOBO GRIS.....	16
1.4 FACTORES DE RIESGO DE EXTINCIÓN DEL LOBO GRIS.....	20
1.4.1 Cuellos de botella.....	21
1.4.2 Fragmentación y/o aislamiento de las poblaciones.....	22
1.4.3 Hibridación.....	22
1.5 GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN.....	23
1.5.1 Muestreo.....	25
1.5.2 Marcadores moleculares.....	26
1.5.2.1 DNA mitocondrial (mtDNA).....	26
1.5.2.2 Marcadores ligados al cromosoma Y.....	27
1.5.2.3 Microsatélites.....	28
1.5.2.4 Single nucleotide polymorphism (SNP).....	32
1.6 GENÓMICA DE LA CONSERVACIÓN.....	32
2 OBJETIVOS	35
3 RESULTADOS	39
3.1 Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations.....	41
3.2 Sex identification of wolf (<i>Canis lupus</i>) using non invasive samples.....	55
3.3 El lobo vuelve a Cataluña.....	61
3.4 Detection of <i>Leishmania infantum</i> in captive wolves from Southwestern Europe.....	73

4 DISCUSIÓN.....	79
4.1 MONITORIZACIÓN GENÉTICA DE TRES POBLACIONES DE LOBO GRIS	81
4.1.1 Caracterización genética.....	81
4.1.2 Estimaciones demográficas	85
4.1.3 Fragmentación	87
4.1.4 Hibridación	89
4.1.5 Cuellos de botella	93
4.1.6 Eficacia de los marcadores moleculares en muestras no invasivas.....	95
4.2 CONTROL PARASITOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN.....	98
4.3 IMPLICACIONES EN GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN	99
5 CONCLUSIONES	101
6 RESUMEN	105
7 REFERENCIAS	109

1 INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

Considerado durante siglos como un animal cruel y despiadado, el lobo, salvaje y social por antonomasia, ha sido el protagonista feroz de numerosos cuentos y leyendas populares (Lecomte y Dumort 2008). Fue la comunidad científica y autores como Murie (1944), Lorenz (1963), Mech (1970) o Rodríguez de la Fuente (1978) que ahondando en el comportamiento del cánido participaron directamente en su conservación. La desmitificación de su cruel figura y su protección legal a finales del siglo pasado impidieron que se extinguiera de gran parte de su territorio, siendo actualmente el Sur de Europa, el Este de Asia y el Norte de América las regiones que albergan el mayor número de lobos del planeta. A partir de los años 90, los estudios genéticos adquieren notoriedad al aportar nueva información sobre la distribución, estado y variabilidad de las poblaciones de lobo gris.

1.1 TAXONOMÍA Y BIOLOGÍA DE LA FAMILIA CANIDAE

Existen dos posibles ancestros para las formas modernas de los lobos y los zorros, el *Leptocyon* (Tedford 1978; Olsen 1985) y el *Tomarctus* (Mech 1970; Fox 1971), dos cánidos extintos y endémicos de Norteamérica que aparecieron hace 24.8 y 23 millones de años respectivamente. Procedentes del Hemisferio Oeste, los cánidos se extendieron por el Viejo Mundo durante el Mioceno, hace 15 millones de años según Olsen (1985) y 12 millones según Wayne y Jenks (1991).

La Familia *Canidae* pertenece a la Infraclase de los Euterios, Orden de los Carnívoros y Suborden de los Fisípedos que pueden clasificarse en función de su apoyo plantar en 5 grupos (Grassé 1982): los Úrsidos que apoyan toda la cara palmar y plantar (plantígrados); los Mustélidos que apoyan una gran superficie palmar y plantar (semiplantígrados); los Vivérridos que apoyan la mitad anterior del pie y de la mano (semidigitígrados); y los Félidos y Cánidos que apoyan únicamente los dedos (digitígrados) y tienen cinco dedos en las patas delanteras y cuatro en las traseras.

Los felinos tienen dedos acabados en garras retráctiles que pueden introducirse en fundas cutáneas, un cráneo globuloso, pupilas verticales y unos arcos zigomáticos salientes que permiten la inserción de potentes músculos masticadores (Grassé 1982). La Familia de los felinos incluye los géneros *Felis* (gatos), *Lynx* (lince) y *Panthera* (panteras, tigres y leones).

Los cánidos son carnívoros terrestres que se caracterizan por tener un encéfalo de gran tamaño, tímpano no tabicado, dentición con grandes colmillos, muelas carniceras, dedos libres y garras cortas no retráctiles ni cortantes (Grassé 1982). La Familia de los cánidos está constituida por 36 especies que se agrupan en cuatro grupos filogenéticos (Figura 1.1; Wayne y Ostrander 2007):

- Los zorros (*Vulpes*) son carnívoros de cuerpo esbelto y pequeño, cabeza triangular, orejas puntiagudas y un color de capa cambiante en función del hábitat que oscila desde el rojo de *Vulpes vulpes* hasta el negro de *Vulpes fulva*. Se distribuyen principalmente por África, Eurasia y Norteamérica y se alimentan esencialmente de pájaros y de pequeños y medianos mamíferos.

- Los “falsos zorros” (*Pseudalopex*) habitan en Sudamérica, su tamaño es generalmente mayor que el de los zorros, tienen un hocico y orejas puntiagudas y un pelaje cambiante en función de la especie que oscila desde el grisáceo de *Pseudalopex griseus* al rojizo de *Pseudalopex culpaeus*.

- Los “zorros grises” (*Urocyon*) tienen un color de capa gris, son de pequeño y mediano tamaño y endémicos de Norteamérica.

- Los lobos, chacales, perros y dingos (*Canis*) son los cánidos de mayor tamaño y se distribuyen ampliamente por todos los continentes. Viven principalmente en hábitats de pastizales abiertos y están ausentes sólo en áreas aisladas como Madagascar o Nueva Zelanda (Clutton-Brock y col. 2001). La diferencia de tamaño corporal permite clasificarlos de forma general en dos grupos:

- Menor o igual a 12 Kg.: el chacal de flancos rayados (*C. adustus*), el chacal dorado (*C. aureus*) y el chacal de lomo negro (*C. mesomelas*) del continente africano.

- Mayor de 12 Kg.: el coyote (*C. latrans*) y el lobo rojo (*C. rufus*) de Norteamérica, el lobo etíope (*C. simensis*) del Este de África, el dingo (*C. dingo*) de Australia y el lobo gris (*C. lupus*), el cánido salvaje de mayor tamaño y área de distribución, y el antepasado del perro doméstico (*C. familiaris*); este último es el más variado en peso (entre 0,5 Kg y 100 Kg) por las múltiples razas existentes.

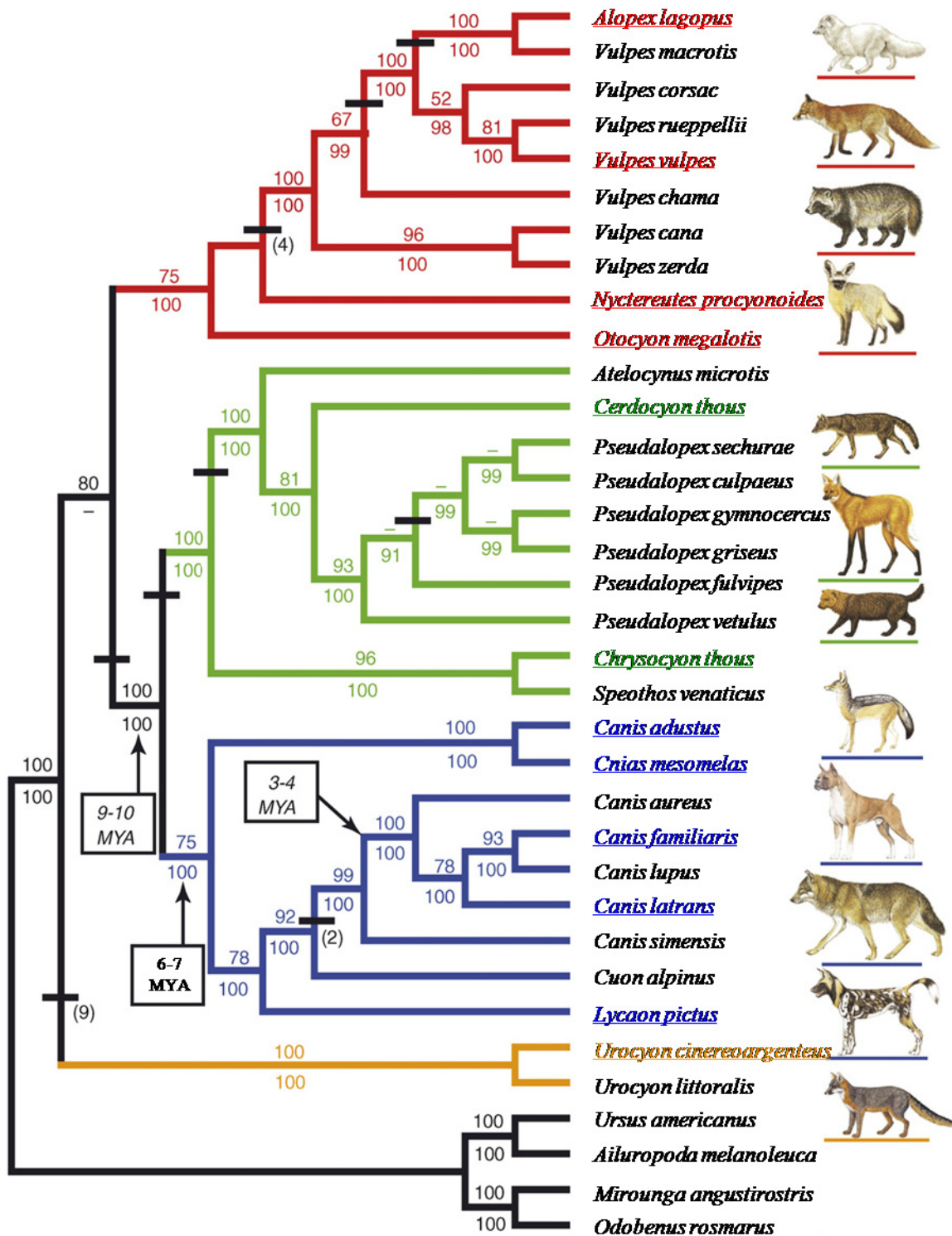


Figura 1.1 Filogenia molecular de la Familia *Canidae* según Wayne y Ostrander (2007). La filogenia está basada en 14.948 pares de bases de DNA localizado en 12 exones y 4 intrones. Los valores por encima y por debajo de las ramas son dos medidas (bootstrapping y probabilidad posterior Bayesiana) usadas para determinar la fiabilidad de las ramas del árbol, siendo muy fiables las agrupaciones cuando son > 90. Los principales grupos filogenéticos se diferencian por colores: en rojo y naranja los zorros (las especies subrayadas están dibujadas), en verde los cánidos de Sudamérica, en azul los lobos y sus parientes y en negro cuatro outgroups. De las 36 especies que forman la familia *Canidae* faltan 5 especies que son *Canis dingo*, *Canis rufus*, *Vulpes bengalensis*, *Vulpes ferrilata* y *Vulpes velox*. (MYA, millones de años).

1.1.1 Subespecies de lobo gris (*Canis lupus*)

El lobo gris está catalogado según la Lista Roja de la IUCN (2009) como Especie Vulnerable y está enumerada en el Apéndice II de CITES (excepto las poblaciones de Bhután, India, Nepal y Pakistán que están incluidas en el Apéndice I). Actualmente están reconocidas 5 subespecies de *Canis lupus* en Norteamérica y 7 en Eurasia (Tabla 1.1) (Hefner y Geffen 1999; Sillero-Zubiri y col. 2004; IUCN 2010). Sin embargo, esta clasificación no está exenta de polémica porque se llegaron a identificar hasta 32 subespecies de *Canis lupus* (Hall y Nelson 1959). Fue Nowak (1996) quien sugirió por primera vez reducir a 5 las 24 subespecies del continente americano. Esta clasificación se basa principalmente en las diferencias genéticas y morfológicas de las poblaciones en respuesta a la adaptación a un clima, latitud o hábitat (Crandall y col. 2000; Carmichael y col. 2001; Geffen y col. 2004; Musiani y col. 2007). Recientemente, estas diferencias deberían otorgar según algunos autores, la categoría de especie al lobo del este o *Canis l. lycaon* (Koblmüller y col. 2009; Fain y col. 2010; Rutledge y col. 2010; Wheeldon y col. 2010).

En Europa Occidental, la diferenciación entre las subespecies *C. l. signatus* de la Península Ibérica y *C. l. italicus* de la Península Itálica responde a un aislamiento geográfico de ambas poblaciones (Lucchini y col. 2004; Ramírez y col. 2006; Pilot y col. 2010). En Eurasia, la subespecie más extendida es *C. l. lupus* y la más septentrional es *C. l. albus* o el lobo de la tundra. De Oriente Medio son *C. l. arabs* o el lobo árabe (Hefner y Geffen 1999) y *C. l. pallipes* o el lobo de la India, una subespecie que también se encuentra en el Sur de Asia (Aggarwal y col. 2007). Y de Asia Central es *C. l. chanco* o el lobo del Himalaya (Aggarwal y col. 2007). No obstante, Aggarwal y col. (2007) proponen por sus diferencias genéticas dos nuevas especies, *C. himalayensis* para la población de *C. l. chanco* de la zona Trans-Himalaya de la India, y *C. indica* para la población *C. l. pallipes* de la India Central.

Vemos, por lo tanto, que determinar el número de subespecies de lobo gris del planeta es un tema controvertido, no exento de dudas y de difícil consenso.

Tabla 1.1. Clasificación de las subespecies de *Canis lupus* pertenecientes al Viejo y Nuevo Mundo (Hefner y Geffen 1999; Sillero-Zubiri y col. 2004; Aggarwal y col. 2007; IUCN 2010). En negrita se muestran las subespecies europeas estudiadas en el presente trabajo.

Norteamérica	Localización	Autor
<i>Canis l. arctos</i>	Zona Ártica de Canadá y Groenlandia	Pockoc 1934
<i>Canis l. baileyi</i>	México; Sudoeste de EEUU	Nelson y Goldman 1929
<i>Canis l. lycaon</i>	Sureste de Canadá	Schreber 1775
<i>Canis l. nubilus</i>	EEUU Central; Este y Centro de Canadá	Say 1823
<i>Canis l. occidentalis</i>	Alaska; Noroeste de Canadá	Richardson 1829
Eurasia	Localización	Autor
<i>Canis l. albus</i>	Extremo septentrional de Europa y Asia	Kerr 1792
<i>Canis l. arabs</i>	Oriente Medio (Península Arábiga, Siria, Jordania, Israel)	Pockoc 1934
<i>Canis l. chanco</i>	Asia Central (Kashmir, Tibet, China, Manchuria, Mongolia)	Gray 1863
<i>Canis l. italicus</i>	Península Itálica, Sur de Suiza, de Francia y de Alemania y Norte de la Península Ibérica	Altobello 1921
<i>Canis l. lupus</i>	Eurasia (Europa del Este y del Norte; Norte y Centro de Asia).	Linnaeus 1758
<i>Canis l. pallipes</i>	Oriente Medio; Suroeste de Asia	Sykes 1831
<i>Canis l. signatus</i>	Europa Occidental (Noroeste Península Ibérica)	Cabrera 1907

1.2 DISTRIBUCIÓN DEL LOBO GRIS

El lobo gris apareció hace aproximadamente unos 700.000 años (Kurtén 1968) y se expandió por toda Europa, Norteamérica y Asia hasta el último siglo, cuando empezó a extinguirse de gran parte de su territorio debido a la caza, la deforestación y la disminución de presas salvajes. A mediados del siglo pasado, la distribución del lobo gris quedó reducida en Europa Occidental a las penínsulas Ibérica, Itálica y Balcánica, y en Norteamérica a Canadá y norte de los EEUU (Mech 1970). Sin embargo, a finales de los años 60, una nueva concienciación ecológica y política permitió la protección legal del lobo, lo que dio a lugar a un aumento del tamaño de la población y del área de distribución, tanto en EEUU como en Europa Occidental (Mech 1995). Por el contrario, en Europa Oriental y en Asia Septentrional el lobo nunca estuvo protegido pero tampoco estuvo nunca en peligro de extinción (Bibikov 1994). En la actualidad, el cánido salvaje habita desde los 75°N hasta los 12°N, siendo la Federación Rusa y Canadá los países que albergan las mayores poblaciones de lobo gris del planeta (Figura 1.2 y 1.3).



Figura 1.2 Distribución mundial de *Canis lupus* según la IUCN 2010 (www.iucnredlist.org). En rojo, población histórica; en verde, población actual.

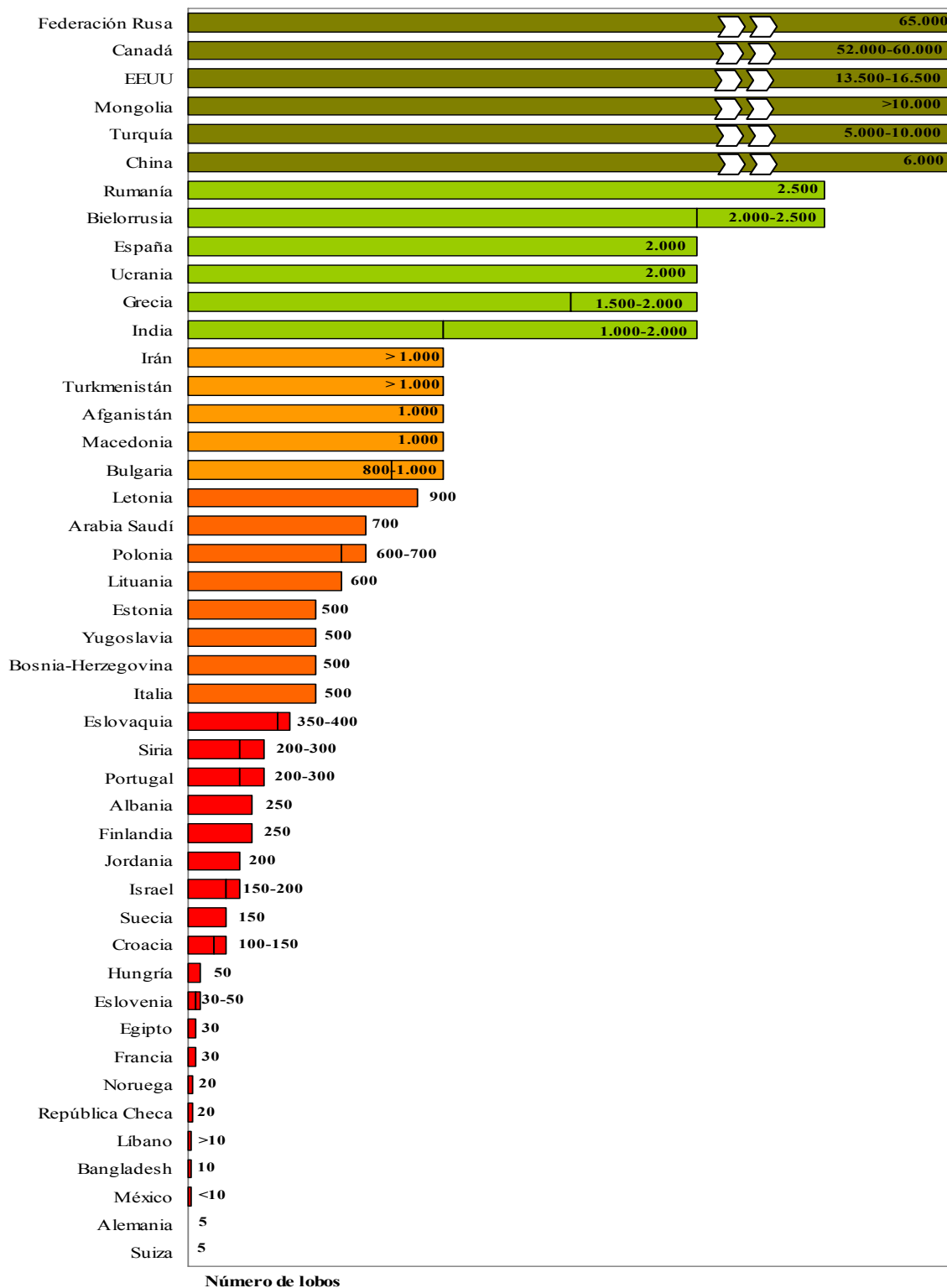


Figura 1.3 Estimación del número de lobos grises en función del país (Actualizado de Boitani 2003; Sillero-Zubiri y col. 2004).

1.2.1 Distribución del lobo gris en América

Con una población que oscila entre los 52.000 y 60.000 individuos, Canadá es el segundo país del mundo con mayor número de lobos, y cuya variabilidad es una de las más elevadas del planeta (Musiani y col. 2007) (Figura 1.3). Sólo en Canadá se localizan cuatro de las doce subespecies de *Canis lupus* (ver Tabla 1.1): el lobo ártico (*C. l. arctos*), el lobo del este (*C. l. lycaon*), el lobo de las grandes llanuras (*C. l. nubilus*) y el lobo del noroeste o de las Montañas Rocosas (*C. l. occidentalis*). Aunque en algunas zonas está protegido, en Canadá, el lobo es mayoritariamente una especie cinegética que se distribuye por todo el territorio, a diferencia de los EEUU, donde el lobo prácticamente se extinguió a mediados del siglo pasado.

En los años 60, el número de lobos en EEUU quedó reducido a 300-700 individuos en el Noreste de Minnesota, 20 individuos en Isle Royale y un millar en Alaska (Honghai 1999). Sin embargo, la prohibición de caza y efectivos programas de reintroducción – e.g. Parque Nacional de Yellowstone (vonHoldt y col. 2008) – favorecieron el aumento de la población y su expansión territorial. Actualmente se estima que 5.500 lobos se distribuyen por el norte del país (Minnesota, Michigan, Montana, Idaho, Wisconsin, y Wyoming) y 8.000-11.000 por Alaska, cuyo inhóspito paisaje y elevado número de ungulados hacen de la región una gran reserva para el cánido salvaje. EEUU alberga las mismas subespecies que Canadá más una quinta, el lobo mexicano (*C. l. baileyi*), una subespecie reintroducida a finales del siglo pasado en Arizona y Nuevo México. *C. l. baileyi* también se distribuye por México aunque allí su situación es muy crítica al no haberse detectado ningún grupo reproductor desde los años 80 (Fredrickson y col. 2007).

1.2.2 Distribución del lobo gris en Eurasia

En Eurasia, el lobo gris se localiza en 14 países asiáticos y 27 europeos (Figura 1.3). El estado legal de las poblaciones euroasiáticas varía en función del país, aunque generalmente en Europa, al ser menor su número, el lobo suele estar legalmente protegido a diferencia de los países asiáticos donde el lobo suele ser una especie cinegética. En Europa se encuentran dos subespecies aisladas, *C. l. signatus* y *C. l. italicus*, y una subespecie no aislada, *C. l. lupus* que se distribuye por Europa del Este, también por Asia Central y recientemente por Europa del Norte; en la Península

Escandinava el lobo gris se extinguió en los años 70 a pesar de su protección legal tanto en Suecia (1966) como en Noruega (1973) (Wabakken y col. 2001). No obstante, a principios de los años 80, el efecto fundador de una pareja reproductora y un tercer ejemplar procedentes de la población vecina ruso-finlandesa dio lugar a una recolonización del territorio. Actualmente, la población en Suecia consta de unos 150 individuos (Sundqvist y col. 2001; Vilà y col. 2003a; <http://skandulv.nina.no/>), y en Finlandia la población ha alcanzado los 250-260 individuos debido a la proximidad con la Federación Rusa, a la caza controlada y al desarrollo de efectivos planes de conservación (Aspi y col. 2009).

En Asia Central se distribuye también *C. l. chanco* cuya población consta de unos 1.500 individuos y se extiende por el Tibet, China, Manchuria y Mongolia (Aggarwal y col. 2007). En Oriente Medio se encuentran dos subespecies fragmentadas y de baja densidad poblacional: *C. l. arabs*, que se distribuye por zonas áridas y montañosas de la Península Arábiga, Siria, Jordania e Israel (Hefner y Geffen 1999), y *C. l. pallipes*, que es el lobo característico de la India y de algunos países de Oriente Medio como Irán o Israel. Diversos estudios arqueológicos y genéticos concluyen que la contribución del lobo al genoma del perro proviene mayoritariamente de lobos de Oriente Medio, y en el caso de algunas razas, de lobos europeos (Dayan 1999; Germonpre y col. 2009; Skoglund y col. 2010; vonHoldt y col. 2010b).

A continuación se detallan las características propias de las tres poblaciones de lobo gris tratadas en este estudio.

1.2.2.1 El lobo ruso (*C. l. lupus*)

El número total de lobos de la Federación Rusa no ha tenido un crecimiento constante y estable durante la última mitad del siglo pasado; se han registrado tres severas fluctuaciones demográficas que no han provocado la extinción del lobo por su gran tamaño poblacional (Figura 1.4).

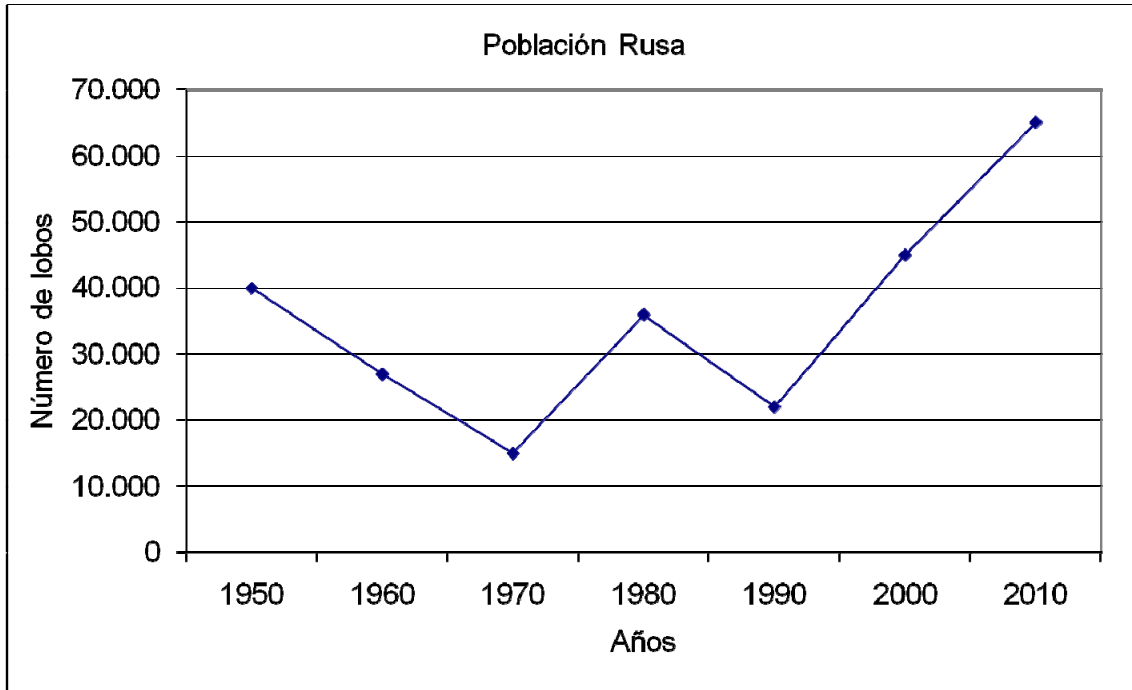


Figura 1.4 Evolución demográfica del lobo gris en la Federación Rusa durante la última mitad del siglo pasado (Bibikov y col. 1983; Gubar1996).

La Federación Rusa, con una extensión de 17,1 millones Km² y dividida en 12 regiones económicas, es el quinto país más poblado del planeta con aproximadamente 150 millones de habitantes. Sin embargo su densidad es una de las más bajas del mundo. Las regiones de Siberia Oriental y Occidental y el Extremo Oriente constituyen el 75% de la superficie rusa, pero la densidad poblacional en estas regiones rara vez supera la media federal (8 hab/Km²); y sucede lo mismo con la densidad del cánido que, según datos oficiales, no suele superar anualmente la densidad media federal (2 lobos/1000 Km² promediados desde 1981 hasta 1999) (Borisov y col. 1992; Lomanov y col. 1995; 2000). En cambio, en la región del Cáucaso (que limita con Georgia) y la región del Noroeste (que incluye San Petersburgo) se encuentra, en promedio, la máxima densidad de lobos por Km². Concretamente, en la región del Noroeste se registró en 1994 la máxima densidad de lobos (12 lobos/1000 Km²) para toda Rusia (Borisov y col. 1992; Lomanov y col. 1995; 2000). Es decir, existe una correlación positiva entre la densidad humana y la densidad del lobo en territorio ruso, aumentando en ambos casos en la zona europea y disminuyendo en la zona asiática. Existe otra diferenciación entre ambos territorios, siendo la subespecie *C. l. lupus* mayoritaria de la zona europea y *Canis l. albus* de la zona asiática. En la Figura 1.5 se muestra la evolución demográfica de la

población de lobos en las cuatro regiones muestreadas en este estudio, y que pertenecen a las Regiones Económicas del Norte y del Centro de la Rusia Europea.

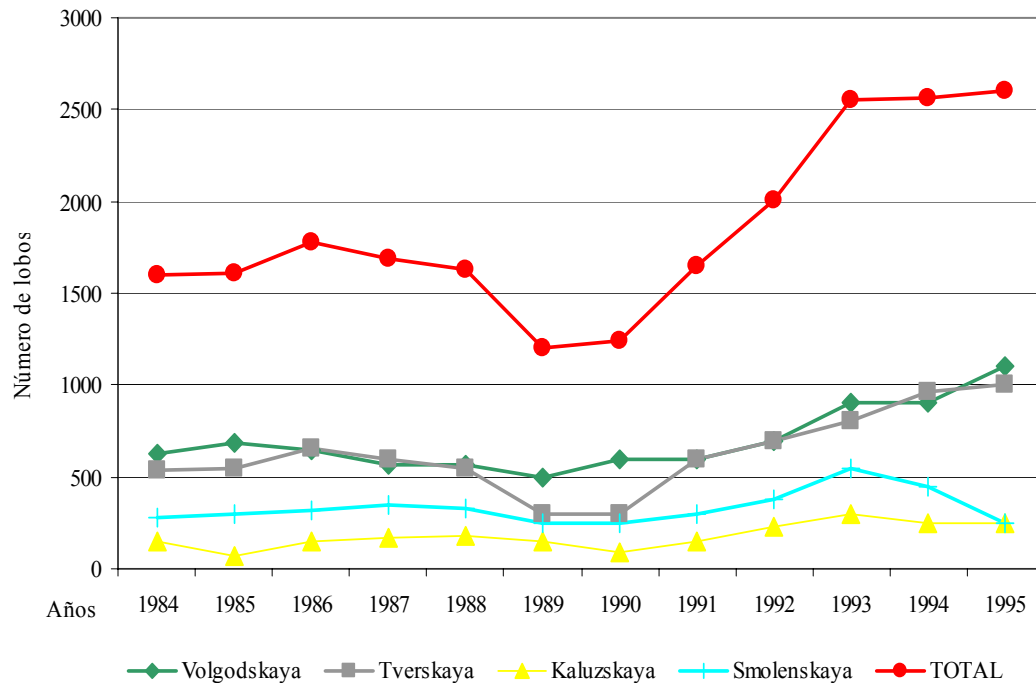


Figura 1.5 Censo demográfico durante una década de *C. l. lupus* en 4 regiones pertenecientes a las Regiones Económicas del Centro y Norte de la Federación Rusa (Nobikov y col. 1992; Lomanov y col. 1995).

1.2.2.2 El lobo itálico (*C. l. italicus*)

En 1970, la población de lobos en Italia sufrió un fuerte declive demográfico que redujo la población a un centenar de individuos localizados en los Apeninos Centrales (Zimen y Boitani 1975). A partir de su protección legal en 1971 (IUCN) la población volvió a crecer duplicando su número y aumentó su área de distribución (Boitani 2003). Durante los años 80, el lobo itálico cruzó el Noroeste de los Apeninos alcanzando en los 90 el Suroeste de los Alpes y el Norte de los Pirineos (Lucchini y col. 2002; Figura 1.6). Por consiguiente, las poblaciones actuales del Sur de Alemania, de Suiza y de Francia son el resultado de un proceso de recolonización del territorio por parte del lobo itálico (Valière y col. 2003; Fabbri y col. 2007).

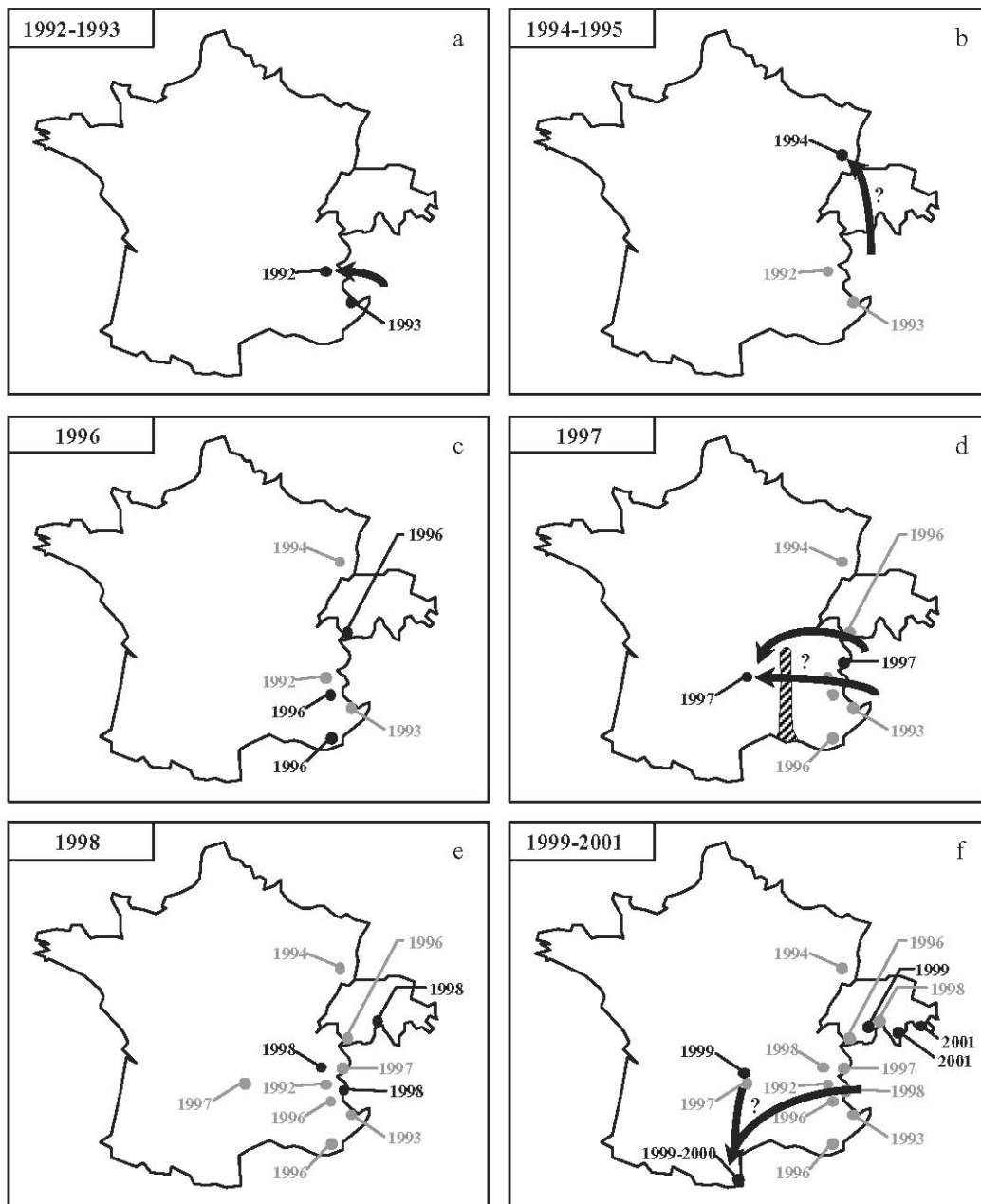


Figura 1.6 Expansión demográfica del lobo gris de la Península Itálica desde 1992 hasta 2001. Los círculos negros representan la primera vez que se detectó genéticamente un linaje en las regiones de Francia y Suiza. Las flechas indican rutas putativas de colonización y los tramos rayados son regiones de elevada densidad humana que podrían formar una barrera para la dispersión del cánido (extraído de Valière y col. 2003).

1.2.2.3 El lobo ibérico (*C. l. signatus*)

El lobo ibérico se distribuía por toda la Península Ibérica hasta principios del siglo XX, cuando empezó a desaparecer de gran parte de su territorio (Figura 1.7).

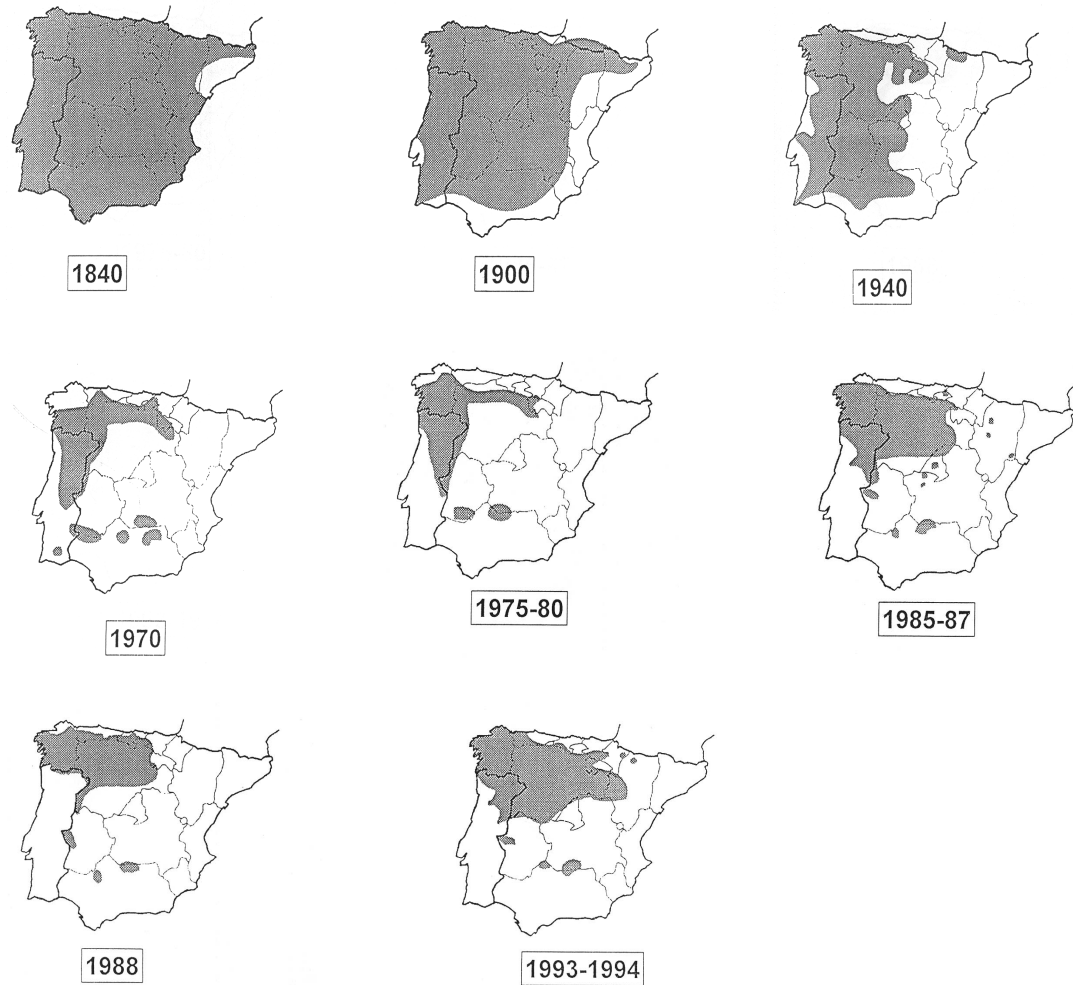


Figura 1.7 Evolución de las poblaciones del lobo en la Península Ibérica desde mediados del siglo XIX hasta finales del siglo XX (Valverde 1971; Enseñat 1996).

Erradicado inicialmente de toda la franja mediterránea, el lobo sufrió un drástico descenso demográfico a principios de los años 70 y quedó aislado en el Noroeste de la Península y en algunas zonas fragmentadas al Sur del Duero (Valverde 1971). La baja densidad humana de la zona, la topografía del terreno y la abundancia de presas salvajes evitaron la extinción del lobo ibérico, a diferencia de lo sucedido en Francia y Centro de Europa, donde el lobo se extinguió a mediados del siglo XX (Valière y col. 2003). A partir de los años 70, las condiciones abióticas unidas a una nueva concienciación ecológica y una política conservacionista favorecieron la recuperación del lobo tras declararse especie protegida en 1973 (Grande del Brío 1984). Actualmente, el lobo crece y se expande por el Noroeste de la Península (Figura 1.7). Sin embargo, la situación del pequeño núcleo fragmentado de Sierra Morena (Andalucía) y Sierra de

San Pedro (Extremadura) al Sur del Duero es muy diferente. Las poblaciones de Extremadura se consideran extintas desde 1990 al no haberse detectado ningún grupo reproductor (Padial y col. 2000), y las poblaciones de Andalucía se hallan en peligro al contabilizarse únicamente 6-10 grupos reproductores (Palacios y col. 2006). La población ibérica actual se estima en 254-322 manadas o sobre unos 2.000 individuos (Álvares y col. 2005), siendo ésta la población de lobos grises más grande de Europa Occidental.

1.3 BIOLOGÍA DEL LOBO GRIS

El lobo gris tiene ojos amarillos y/o marrones (Figura 1.8), orejas y hocico alargados, un apoyo plantar digitígrado que le permite dejar huellas de hasta 14 cm de largo y un cuerpo robusto que varía en función de la subespecie, de la edad y del sexo.



a) Foto: V. Bologov



b) Foto: C. Sanz



c) Foto: V. Bologov



d) Foto: V. Bologov



e) Foto: V. Bologov



f) Foto: N. Sastre



g) Extraído de Anderson y col. 2009.



h) Extraído de Anderson y col. 2009.

Figura 1.8 a) Ojos excepcionalmente dicróicos (amarillo y marrón) de un lobo ruso de 6 meses de edad. **b)** Lobo ibérico adulto. **c)** Lobo ruso adulto. **d)** Ejemplo del carácter adaptativo del color de la capa del

lobo a su medio natural. **e)** Color oscuro de la capa de un lobezno ruso con 2 meses y **f)** el mismo lobo con 6 meses de edad. **g y h)** Pelaje de dos lobos con 10 meses y con 10 años de edad.

Los machos suelen ser mayores que las hembras del mismo modo que los lobos que viven a mayores latitudes son de mayor tamaño, cumpliéndose así la regla de Bergman (los lobos ibéricos no suelen sobrepasar los 70 cm de altura y 50 Kg de peso mientras que los lobos rusos alcanzan fácilmente los 90 cm de altura y 80 Kg de peso (Mech 1970; Valverde 1971).

El color de la capa del lobo varía en función de la edad y de la latitud (Figura 1.8). El pelaje de un lobo ruso adulto es pardogrisáceo mientras que en del lobo ibérico predominan los tonos marrones y rojizos. Los colores de capa más extremos son el blanco del lobo ártico (*C. l. arctos*) y del lobo de la tundra (*C. l. albus*) y el negro del lobo del este (*C. l. lycaon*). Para explicar el origen del color negro, Anderson y col. (2009) analizaron muestras de lobos y coyotes negros demostrando que la mutación del locus K^B del gen receptor de la melanocortina (*Mclr*) es consecuencia de la hibridación con perros domésticos hace aproximadamente 10.000 años (Skoglund y col. 2010), coincidiendo con la llegada de los primeros hombres a América por el estrecho de Bering. Sin embargo, Rutledge y col. (2009) han sugerido que el gen K^B es intrínseco a los lobos negros del Este de Norteamérica (*C. l. lycaon*) y no una introgresión genética de *C. familiaris*. Sea cual sea la explicación más plausible, lo cierto es el color de la capa del lobo suele ser un carácter adaptativo a su medio natural (Figura 1.8). Por ejemplo, Musiani y col. (2007) demostraron que sin barreras físicas importantes, los lobos canadienses que habitaban en la tundra y migraban con el caribú eran más claros (93%) y genéticamente diferentes de los lobos de los bosques de coníferas, cazadores locales y más oscuros (62%).

La fórmula dentaria fundamental del lobo es de I 3/3, C 1/1, Pm 4/4, M 2/3 = 42. Los caninos superiores o colmillos son agudos y los premolares y molares tienen cúspides cortantes que sirven para desgarrar y triturar la carne de la cual se alimenta (Grassé 1982). El tamaño de las presas varía en función del hábitat, siendo también la variable que condicionará el número de lobos por manada. En la Península Ibérica, una manada contiene entre 5 y 10 individuos porque las presas (corzos, zorros, liebres, jabalíes...) no son excesivamente grandes, mientras que en Norteamérica una manada puede contener hasta 23 individuos porque sus presas (bisontes, renos, alces...) pesan entre 6 y 12 veces el peso de un lobo adulto (Mech 2000). La estabilidad y el orden de la manada se mantienen porque existe una jerarquía social muy definida que gira en torno

a la pareja reproductora (Murie 1944; Schenkel, 1947; Crisler 1962; Mech 1999). El lobo alcanza la madurez sexual a los 22 meses de edad y las hembras paren entre 4 y 7 cachorros entre los meses de enero y abril dependiendo de la latitud (Mech 1970). El tiempo medio de generaciones de un lobo es de 3,4 años (Aspi y col. 2006) y su longevidad media de 8 años, pudiendo alcanzar hasta los 13 años de edad en estado salvaje y los 16 en cautividad (Mech 1988). Parásitos y patógenos causan enfermedades como el moquillo, la rabia, la sarna, la triquinosis, la leishmaniosis o la parvovirus (Johnson y col. 1994; Mohebbi y col. 2005; Mörner y col. 2005; Beck y col. 2008; Sobrino y col. 2008; Almberg y col. 2009; Santos y col. 2009; Stronen y col. 2011) que pueden, en muchos casos, ocasionarle la muerte, aunque el principal responsable de la muerte del cánido salvaje es el hombre.

1.4 FACTORES DE RIESGO DE EXTINCIÓN DEL LOBO GRIS

Las principales causas de mortalidad del lobo son consecuencia directa de la acción del hombre. En la región de Tverskaja (Federación Rusa) destacan, por ejemplo, el uso de armas de fuego para cazar al cánido (Figura 1.9) y el alto porcentaje de muerte por envenenamiento con Dieldrin, PCBs o Mercurio (Shore y col. 2001). El veneno es un sistema de caza ilegal pero frecuente en la Federación Rusa. La técnica consiste en envenenar previamente a un perro y abandonar su cadáver cerca de una guarida de lobos.

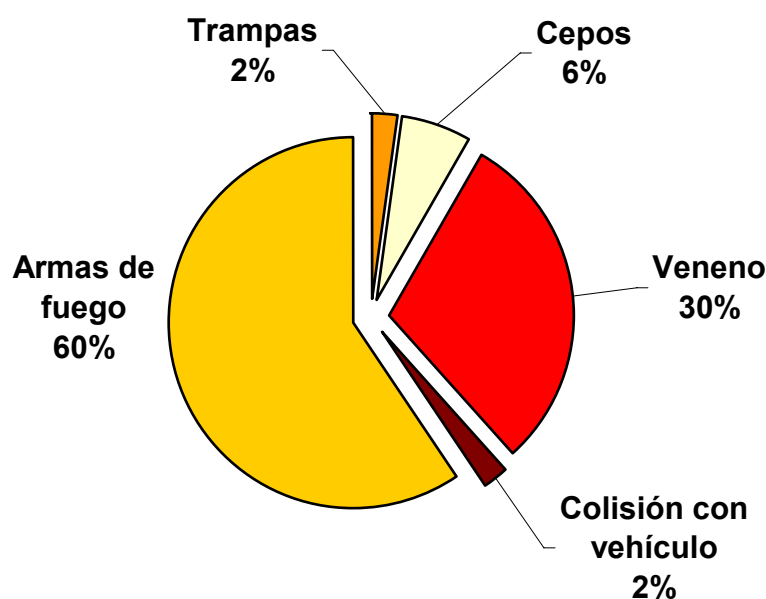


Figura 1.9 Causas de la mortalidad de 133 lobos grises por la acción directa del hombre durante 4 inviernos en Tverskaja (Federación Rusa). Datos actualizados de Casulli (2001).

En la Península Ibérica, el lobo está considerado una especie cinegética en Cantabria, Castilla y León (al Norte del Duero), Galicia, La Rioja y el País Vasco, pero su caza o batida debe estar previamente autorizada por la Administración. En Andalucía, Asturias, Castilla y la Mancha y Castilla y León (al Sur del Duero) queda terminantemente prohibida su caza.

La persecución que sufre el lobo por parte del hombre se debe principalmente a que ambos compiten por los mismos recursos (ganado doméstico y especies cinegéticas). Pero esta persecución, además de reducir drásticamente el número de individuos, también ha desplazado al lobo a zonas marginales, fuera de su zona natural, como desiertos y regiones de alta montaña (Harrington y Paquet 1982). Además de la persecución directa, otro factor que afecta indirectamente a las poblaciones de lobos es la fragmentación del paisaje (*e.g.* construcción de infraestructuras) inducida por el hombre ya que destruye su hábitat.

El hombre ha ocasionado, por lo tanto, la reducción del número de lobos (cuello de botella) y del número de poblaciones (fragmentación y/o aislamiento geográfico). Esto conlleva la pérdida de variabilidad genética y un aumento de la probabilidad de hibridación con perros a causa de la baja densidad de la población y de la imposibilidad de realizar el denominado efecto rescate, esto es, la imposibilidad de las poblaciones aisladas de ser recolonizadas por poblaciones vecinas (Hedrick y Fredrickson 2010).

1.4.1 Cuellos de botella

Un cuello de botella es un proceso demográfico que sufre una especie cuando experimenta una drástica reducción del tamaño efectivo de su población. Las causas suelen ser desastres naturales (terremotos, incendios...), desastres biológicos (pandemias, depredación, competencia...) o características propias de la población (desigualdad de sexos, endogamia...). Las consecuencias de este proceso son pérdida de variabilidad genética y aumento de la consanguinidad, de las mutaciones deletéreas y de la deriva genética, y por lo tanto disminuye la capacidad adaptativa de la población aumentando el riesgo de extinción de la especie. Los efectos genéticos del cuello botella dependen de su intensidad, duración y grado de aislamiento (Busch y col. 2007; Carmichael y col. 2008). En Europa ya hemos comentado que las poblaciones aisladas de lobo gris de la Península Ibérica e Itálica sufrieron un fuerte declive demográfico que

casi provoca su extinción (Valverde 1971; Zimen y Boitani 1975). En la Península Itálica, numerosos estudios describen la situación genética actual del lobo y su recuperación tras demostrarse que pasaron por un cuello de botella (Fabbri y col. 2007; Randi 2008). En cambio, en la población ibérica de lobos y en una gran población como la rusa (ver Figura 1.4) no se han descrito los efectos genéticos que un cuello de botella pudo causar en la población. Por este motivo sería conveniente realizar un estudio que se centrara en la detección genética del cuello de botella y los efectos que éste pudo causar sea cual sea el grado de aislamiento y el tamaño de la población.

1.4.2 Fragmentación y/o aislamiento de las poblaciones

Las poblaciones fragmentadas y/o aisladas, sea por causas abióticas o bióticas, tienen mayor riesgo de extinguirse debido a la falta de migración y a la imposibilidad de realizar el efecto rescate (Tallmon y col. 2004; Edmands 2007). Además, el tamaño efectivo de estas poblaciones suele ser muy bajo, aumentando así el riesgo de endogamia, de acumulación de mutaciones deletéreas y de deriva genética. Un ejemplo de efecto rescate es el que ha experimentado la población de lobos escandinava. En general, las poblaciones de lobos grises del Viejo Mundo como la ibérica y la itálica han sufrido más las consecuencias de la fragmentación que las poblaciones americanas. La falta de flujo genético entre poblaciones y la deriva genética ha provocado una gran diferenciación entre ambas poblaciones (Vilà y col. 1999; Pilot y col. 2010).

1.4.3 Hibridación

La hibridación es un proceso que ocurre con mayor frecuencia en poblaciones aisladas o de baja densidad debido al efecto *Allée* que rompe las barreras reproductivas entre especies iniciándose una introgresión genética (Courchamp 1999). La contribución de los híbridos en la supervivencia de una especie o población suele ser negativa (Hailer y Leonard 2008) porque si la frecuencia de los híbridos aumenta por cruzamientos posteriores, la especie o población original podría, en casos extremos, llegar a ser reemplazada (Konishi y Takata 2004). Los lobos, coyotes, dingos, perros y chacales tienen un cariotipo de 78 cromosomas (Wayne 1993) y pueden cruzarse y tener descendientes fértiles. Por ejemplo, se ha detectado introgresión genética de coyote en el lobo rojo y en lobos de Canadá (Adams y col. 2003; Kays y col. 2010) y de perro en el lobo etíope y en lobos de Italia y Escandinavia (Gotelli y col. 1994; Randi 2008;

Klütsch y col. 2011). También puede ocurrir que la integridad genética de una población esté amenazada por más de una especie o subespecie, como ocurre con la población de lobos *Canis l. nubilus* amenazada por la hibridación con coyotes y con *C. l. lycaon* (Leonard y Wayne 2008). En la Península Ibérica, la hibridación del lobo con perro es posible debido a que la población está aislada, fragmentada y en algunas zonas se encuentra en baja densidad, pero es muy poco frecuente (Vilà y col. 2003b).

Los efectos genéticos de la hibridación, cuellos de botella y/o fragmentación son problemas que conciernen a la genética de la conservación y su detección debería ser una prioridad en cualquier programa o plan de conservación especialmente si la especie se encuentra en peligro de extinción.

1.5 GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN

La especiación y la extinción son procesos biológicos que forman parte de la dinámica de la Tierra. Sin embargo, el hombre está causando un aumento de las extinciones en detrimento de las especiaciones. Las extinciones se producen cuando por causas bióticas o abióticas el número efectivo de una población no es suficiente para asegurar la supervivencia de la especie a corto plazo (Frankham 2010). Actualmente la tasa de extinción de las especies es mayor que la de formación, dando origen a lo que algunos autores han llamado la “sexta extinción” (Leakey y Lewin 1996) o la “extinción del Holoceno” (Pimm y col. 1995).

La biología de la conservación es una disciplina científica aparecida a finales del siglo pasado en respuesta a la acuciante pérdida de biodiversidad en el planeta. Sus principales objetivos son identificar los procesos bióticos y abióticos que amenazan la biodiversidad (genética, específica, ecosistémica) del planeta y minimizar sus efectos (DeSalle y Amato 2004). El prisma que utiliza la biología de la conservación es multidisciplinar. Concretamente, la genética de la conservación utiliza teorías y técnicas genéticas (Frankham y col. 2002; DeSalle y Amato 2004; Primmer 2009; Frankham 2010; Hedrick y Fredrickson 2010) para preservar el primer nivel de la diversidad biológica, ocupándose de:

- Minimizar el coeficiente de consanguinidad (endogamia o *inbreeding*), la pérdida de variabilidad genética y la acumulación de mutaciones deletéreas, tanto en poblaciones *in situ* como *ex situ*.
- Caracterizar poblaciones.
- Estimar censos y detectar procesos demográficos históricos (*e.g.* cuellos de botella).
- Detectar hibridación.
- Resolver dudas taxonómicas.
- Definir unidades de manejo (MUs).
- Monitorizar poblaciones a partir de muestras no invasivas.
- Identificar poblaciones o individuos de interés (*e.g.* parentesco, pedigrí...).
- Seleccionar poblaciones adecuadas para una posible reintroducción.
- Analizar muestras forenses para la identificación de especies protegidas (*e.g.* detectar capturas ilegales, decomisos).
- Identificar parásitos y/o patógenos en poblaciones salvajes y cautivas.
- Ampliar el conocimiento de la biología de la especie.

La pérdida de variabilidad genética en una población comporta una disminución del potencial adaptativo de ésta, y por lo tanto, aumenta la probabilidad de extinción (Awise y Hamrick 1996). El riesgo de extinción de una especie se debe como ya hemos visto a procesos de hibridación, cuellos de botella y/o la fragmentación del paisaje (por pérdida de hábitat, explotación humana y/o cambios ambientales). El resultado es la disminución del tamaño efectivo de la población, disminución de la variabilidad genética, disminución de la tasa de migración, aumento de la deriva genética, aumento de la endogamia, mayor acumulación de mutaciones deletéreas y/o aislamiento geográfico de la especie o población. La genética de la conservación es una disciplina muy reciente - la revista *Conservation Genetics* se empezó a editar en el año 2000 y el primer libro dedicado exclusivamente a esta disciplina data del 2002 (Frankham y col. 2002) – que en definitiva detecta, previene y, en la medida de lo posible, evita que se produzcan tales eventos, ya que si son ignorados se subestima el riesgo de extinción y los planes de gestión se vuelven inapropiados (Frankham 2005).

1.5.1 Muestreo

El análisis genético de una población necesita en cualquier caso un mínimo número de muestras que pueden ser de dos tipos: invasivas (sangre, tejido muscular, dientes...) y no invasivas (heces, orina, pelo, saliva, plumas, cáscaras de huevo...). Las muestras invasivas se caracterizan por tener gran cantidad y calidad de DNA, y obtenerlas implica generalmente la captura del animal, que en el caso de una especie amenazada resulta difícil y costoso por su baja densidad y limitada observación (Dalén y col. 2004). Por el contrario, las muestras no invasivas son tratadas generalmente como muestras forenses por la baja cantidad y calidad de DNA y no implican la captura del animal. Este tipo de muestras se empezaron a usar a principios de los años 90 para estudios de identificación de la especie y de los individuos, determinación de la ratio sexual, estimación del tamaño de la población y su caracterización al poder determinar la estructura, flujo genético, y/o variabilidad (Taberlet y Bouvet 1991; 1992; Höss y col. 1992). Además, el uso de muestras no invasivas históricas (arqueológicas o paleontológicas) permitió mejorar sustancialmente el conocimiento de los procesos demográficos históricos: *e.g.* cuellos de botella, extinciones y/o expansiones de las poblaciones (Wandeler y col. 2007; Valdiosera y col. 2008; Leonard 2008).

Sin embargo, el uso de muestras no invasivas tiene algunas desventajas. Los problemas potenciales ocurren antes, durante y después de su uso en el laboratorio debido a la baja cantidad/calidad del DNA de este tipo de muestras (Taberlet y col. 1996). El primer inconveniente es que aumenta el riesgo de contaminación de la muestra con DNA foráneo, volviéndose inservible si se contaminara. Otro inconveniente es que aumentan los errores de genotipado (*e.g.* que un alelo no amplifique cuando sí existe, produciéndose un *dropout*, o que amplifique cuando realmente no existe, esto es, un falso alelo). Para evitar los problemas asociados a la baja cantidad/calidad de DNA es necesario trabajar con más de una réplica por muestra, se puede aumentar la cantidad de producto amplificado mediante una PCR *nested* o *seminested* y se debe seleccionar previamente el tipo de marcador molecular (en función de su polimorfismo, tamaño, número de copias, abundancia, distribución...) porque ello condicionará el porcentaje de éxito del estudio.

1.5.2 Marcadores moleculares

Los marcadores genéticos están siendo de gran utilidad para evaluar el estado genético de las poblaciones y contribuir al entendimiento de la historia evolutiva, la demografía y la ecología de las especies amenazadas. Un marcador genético es cualquier tipo de variabilidad cuya herencia se puede rastrear. Desde el descubrimiento de las endonucleasas de restricción a finales de los años 60 (Linn y Arber, 1968; Meselson y Yuan 1968) se ha producido un extraordinario y rápido desarrollo de las técnicas moleculares. En 1986, Mullis y col. desarrollaron la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) revolucionando con ello el mundo de la genética. Con el tiempo, surgieron variantes de la técnica inicial que permitieron obtener mayor cantidad de DNA (PCR *nested*) (ver apartado 3.2), economizar el estudio (PCR *multiplex*) (ver apartado 3.1) o cuantificar el material amplificado (PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)) (ver apartado 3.4).

Los proyectos de mapeo tanto del genoma humano como de otros mamíferos y especies modelo han aumentado considerablemente el número de marcadores moleculares descritos. La ventaja de los estudios genéticos del lobo sobre otras especies salvajes es que utilizan marcadores moleculares desarrollados con el genoma de su homólogo doméstico, el perro (Wayne y Ostrander 2007). A continuación presentamos un resumen de los marcadores moleculares más utilizados en genética de la conservación.

1.5.2.1 DNA mitocondrial (mtDNA)

Las mitocondrias son unos orgánulos que se encuentran en cientos o miles de copias en el interior de las células y contienen mtDNA heredado por vía materna. El mtDNA consiste en una cadena doble circular, haploide, no recombinante, sin intrones y que rara vez supera los 20.000 pares de bases (Singer y Berg 1991). La tasa de mutación del mtDNA dependiendo de la región es de 5 a 10 veces mayor respecto al DNA nuclear, y su tamaño efectivo $1/4N_e$ menor, haciendo que sea más sensible al efecto de la deriva genética. Esto conlleva la fijación rápida de caracteres que producirán diferencias significativas (por la elevada tasa de mutación) entre poblaciones, especialmente si éstas están aisladas (Birky y col. 1983; Ballard y Whitlock 2004). Los genes de RNA ribosomal (12S, 16S, 18S) son las secuencias de mtDNA más usadas para establecer relaciones filogenéticas a nivel de orden, familia y género (Sumida y col. 2000). El citocromo *b* (*cyt b*) y la región no codificante o región control *D-loop* se utilizan para

diferenciar especies o poblaciones próximas entre ellas porque tienen mayor tasa de mutación y por lo tanto alto grado de polimorfismo (Aquadro y Greenberg 1983).

Los estudios con mtDNA aplicados al lobo gris han permitido analizar la variabilidad genética de las poblaciones (Ramírez y col. 2006), elaborar filogeografías (Vilà y col. 1999; Pilot y col. 2010), establecer filogenias (Vilà y col. 1997; Agnarsson y col. 2010), determinar el origen y el momento de la domesticación del perro (Vilà y col. 2007; Leonard y col. 2005; Pang y col. 2009) o estudiar la hibridación (Lucchini y col. 2004; Klütsch y col. 2011).

En este trabajo, concretamente se han utilizado las secuencias de mtDNA para analizar posibles fluctuaciones demográficas poblacionales aplicando diferentes tests neutralistas (Ramos-Onsins y Rozas 2002): R_2 , F_u y $Li's F^*$ y $Tajima's D$ que se basan en la distribución de las frecuencias de las mutaciones, $F_u's F_s$ que se basa en la distribución de las frecuencias haplotípicas, y MAE que se basa en el error medio absoluto entre los valores observados y esperados de la distribución *mismatch*. Al analizar un fragmento de la región control de mtDNA asumimos que el marcador es neutro y por lo tanto un resultado significativo > 0 del test indicará un declive poblacional, mientras que un resultado < 0 indicará una expansión. El programa DNASP 4.10 (Rozas y col. 2003) permite la realización de dichos tests además de calcular parámetros generales de variabilidad como la diversidad haplotípica y nucleotídica de las poblaciones.

1.5.2.2 Marcadores ligados al cromosoma Y

A principios de los años 90 se identificó el gen *SRY* ligado al cromosoma Y como el factor determinante de los testículos en mamíferos (Sinclair y col. 1990; Koopman y col. 1991). Desde entonces, los marcadores localizados en el cromosoma Y se han utilizado principalmente para sexar mamíferos (Waters y col. 2007), sin necesidad de capturarlos si se parte de muestras no invasivas: e.g. el lobo (Lucchini y col. 2002; Scandura 2005; Seddon 2005), el coyote (*Canis latrans*) (Kohn y col. 1999), el zorro (*Vulpes vulpes*) (Smith y col. 2006), la nutria (*Lutra lutra*) (Mucci y Randi 2007), el desmán (*Galemys pyrenaicus*) (Vidal y col. 2010), el oso pardo (*Ursus arctos*) (Bellemain y col. 2007), el oso panda (*Ailuropoda melanoleuca*) (Durnin y col. 2007), el leopardo del Amur (*Panthera pardus orientalis*) o el tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*) (Sugimoto y col. 2006).

Además, los estudios con marcadores ligados al cromosoma Y sirven para trazar la línea evolutiva paterna (Sundqvist y col. 2001). El cromosoma Y al ser haploide y no recombinante, aporta una información complementaria a la que aporta el mtDNA, de herencia materna. Combinando esta información se puede determinar el grado de dispersión de cada uno de los sexos o estudiar la hibridación de las poblaciones (Vilà y col. 2003b; Verardi y col. 2006; Musiani y col. 2007; Hailer y Leonard 2008; Randi 2008). En el caso del lobo es importante matizar que los apareamientos interespecíficos son asimétricos, esto es, más lobas se aparean con perros macho que al revés (Andersone y col. 2002; Randi y Lucchini 2002; Vilà y col. 2003b), y por lo tanto los marcadores de herencia materna (mtDNA) no son suficientes para detectar la hibridación. Por este motivo, en este trabajo utilizamos marcadores específicos del cromosoma Y de herencia exclusivamente paterna y microsatélites autosómicos (de herencia paterna y materna) para poder detectar los alelos del cánido doméstico en el genoma del lobo.

1.5.2.3 Microsatélites

Los microsatélites, también denominados STRs (Short Tandem Repeats) o SSRs (Simple Sequence Repeats), son secuencias de DNA que se repiten en unidades de 2 a 6 pares de bases (Tautz 1993). Se estima que aproximadamente el 3% del genoma está formado por secuencias repetitivas de tipo microsatélite (International Human Genome Sequencing Consortium 2001). Están considerados como elementos no codificantes, sin función conocida y que evolucionan de forma neutra. La tasa de mutación de los microsatélites generalmente está comprendida entre 10^{-3} y 10^{-4} mutaciones por generación, siendo muy superior a la tasa de mutación de las secuencias únicas no codificantes (10^{-9}) (Weber y Wong 1993; Ellegren 2000). La longitud y no tanto la secuencia primaria del fragmento determina el alto grado de polimorfismo de los microsatélites (Weber y Wong 1993; Harr y Schlotterer 2000; Xu y col. 2000; Brohede y col. 2002). Se han propuesto tres modelos mutacionales para explicar la dinámica evolutiva de los microsatélites: *Infinite Allele Model* (IAM; Kimura y Crow 1964), *One-Step Mutation Model* (SMM; Kimura y Ohta 1978) y *Two-Phase Mutation Model* (TPM; Di Rienzo y col. 1994). El fundamento que da origen a los diferentes modelos ocurre durante la replicación del DNA. La disociación parcial de las cadenas durante este proceso puede dar lugar a una ganancia o pérdida de unidades de repetición

dependiendo de si el giro o *loop* se produce en la cadena molde o en la de nueva síntesis (Estoup y Cornuet 1999).

El modelo SSM postula que las mutaciones que se producen en un microsatélite son debidas a la pérdida o ganancia de una única unidad de repetición, y por lo tanto los alelos pueden mutar a formas alélicas ya presentes en la población. En contraste, el modelo IAM asume que las mutaciones pueden afectar a cualquier tándem de repeticiones y como resultado aparecen siempre nuevas combinaciones alélicas dentro de la población. El modelo TPM utiliza los principios de los otros dos modelos asumiendo que las mutaciones pueden afectar a X número de unidades de repetición, siendo el modelo SMM si $X = 1$. Se considera que TPM es el modelo mutacional más realista en estudios con microsatélites (Estoup y col. 2002).

La abundancia, la amplia distribución en el genoma y el alto grado de polimorfismo de los microsatélites han hecho que sean uno de los marcadores más utilizados en genética de la conservación para: (i) realizar identificaciones individuales y establecer relaciones de parentesco, (ii) estudiar la diversidad genética de las poblaciones y su evolución y (iii) elaborar mapas genéticos. Sin embargo, existen algunas desventajas al usar microsatélites, por ejemplo, si se usa el modelo IAM el tamaño de los distintos alelos de un microsatélite no puede tomarse como referencia para establecer relaciones evolutivas entre los mismos. Además, existen dos posibles factores que pueden inducir a error al genotipar las poblaciones con microsatélites: los alelos nulos y los homoplásicos. Los alelos nulos son alelos que no pueden ser amplificados a causa de una mutación en la zona de hibridación del cebador, siendo genotipado el individuo como homocigoto para ese locus cuando es heterocigoto (Dawson y col. 1997). Su detección puede llevarse a cabo si se conoce la genealogía de la población o si se observa que un marcador no está en equilibrio Hardy-Weinberg mientras el resto de marcadores para esa población sí lo está (Oosterhout y col. 2004; Chapuis y Estoup 2007). Los alelos homoplásicos son alelos que tienen el mismo tamaño pero no la misma secuencia de bases (Estoup y col. 2002). Es decir, como en el genotipado de los microsatélites se asignan los alelos en función de su tamaño, los alelos homoplásicos son asignados como el mismo alelo cuando en realidad sólo tienen en común la longitud en pares de bases. Luego para poder detectarlos sería necesaria la ulterior secuenciación de los alelos, algo poco viable porque los costes del estudio aumentarían considerablemente.

En estudios con lobos, los microsatélites han sido ampliamente utilizados para caracterizar genéticamente las poblaciones (Pilot y col. 2006; Ramírez y col. 2006; Carmichael y col. 2007; Musiani y col. 2007; Aspi y col. 2009; Koblmüller y col. 2009); estimar el tamaño poblacional (Aspi y col. 2006; Marucco y col. 2009; Cubaynes y col. 2010; Pilot y col. 2010), analizar flujos migratorios (Valière y col. 2003; vonHoldt y col. 2010a), detectar casos de hibridación (Vilà y col. 2003b; Verardi y col. 2006; Randi 2008) y de endogamia (Ellegren 1999; Liberg y col. 2005) y estudiar expansiones, cuellos de botella y/o extinciones de las poblaciones (Flagstad y col. 2003; Lucchini y col. 2004; Fabbri y col. 2007; Carmichael y col. 2008) cumpliendo en definitiva los principales objetivos que persigue la genética de la conservación.

En este estudio, el análisis mediante el uso de microsatélites ha permitido estudiar diferentes aspectos de las poblaciones:

(i) Caracterización, Fragmentación e Hibridación: La oferta de programas para cálculos de variabilidad genética usando microsatélites es muy amplia: GENEPOP 4.0.10 (Raymond y Rousset 1995) no requiere la instalación del programa porque la consulta se puede realizar *online*; GENALEX (Peakall y Smouse 2006) es una aplicación de EXCEL de fácil uso pero con poca potencia estadística, y ARLEQUIN 3.01 (Schneider y col. 2006) y GENETIX 4.05 (Belkhir y col. 1999) son dos programas con buena potencia estadística pero que no resumen la información tan bien como GENALEX o FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2000).

Los estadísticos de Wright se usan para conocer la estructura de la población, y la visualización de los resultados puede realizarse mediante el Análisis Factorial de Correspondencia (FCA) (Benzecri 1973) incorporado en el programa GENETIX y que usa como información el tamaño de los alelos de los diferentes *loci* para medir la diferencia genética entre y dentro de las poblaciones. El programa de inferencia bayesiana STRUCTURE (Falush y col. 2007) puede utilizarse para estudiar la estructura y la hibridación de las poblaciones. También puede ser útil el programa HYBRIDLAB (Nielsen y col. 2001) que simula híbridos de forma aleatoria a partir de la distribución de las frecuencias de los alelos de las poblaciones parentales y asumiendo neutralidad, equilibrio de ligamiento y apareamiento al azar.

(ii) Estimaciones demográficas: Existen dos números que se utilizan como medidas de Población Mínima Viable: 50 y 500 (Soulé 1980). El número 50 se considera el tamaño mínimo poblacional para evitar los efectos deletéreos de la depresión endogámica y la deriva genética a corto plazo. El número 500 corresponde al tamaño mínimo poblacional que asegura la supervivencia de la población a largo plazo. En genética de poblaciones estas dos medidas se refieren a la población efectiva (N_e) y no al censo real (N). Frankham (1995), tras analizar unas 100 especies de animales y plantas observó que la media de la distribución N_e/N era 0,11. Así, para garantizar la supervivencia a largo plazo de una población de lobos, el tamaño real de la población debería de ser $N \geq 4.545$ individuos, un valor muy superior al tamaño poblacional actual de las poblaciones escandinava, itálica o ibérica. En el presente estudio, calculamos el tamaño de la población de lobos ibéricos y rusos usando los programas NEESTIMATOR (Peel y col. 2004) y LDN_e (Waples 2006) que se basan en las frecuencias genotípicas de los marcadores autosómicos.

(iii) Cuellos de botella: Existen tres sencillos métodos que utilizan marcadores de tipo microsatélite para detectar cuellos de botella en las poblaciones y son: (i) *Exceso de heterocigotos*: la diversidad alélica se pierde rápidamente durante un declive demográfico y por lo tanto se espera observar un exceso de heterocigotos en la población (Cornuet y Luikart 1996), (ii) *Mode-shift*: detecta una fluctuación demográfica por la pérdida de los alelos menos frecuentes (Luikart y col. 1998) y (iii) *M-ratio*: mide la relación entre la frecuencia alélica (k) y el tamaño alélico (r), perdiéndose k más rápidamente durante un declive demográfico (Garza y Williamson 2001). El tiempo de detección de los tests abarca generaciones diferentes. *M-ratio* es un test capaz de diferenciar entre poblaciones que han sido pequeñas durante largo tiempo y aquellas que han sufrido cambios de N_e hace más 100 generaciones (Garza and Williamson 2001). En cambio, los tests *Mode-shift* y *Exceso de heterocigotos* detectan cuellos de botella más recientes, desde tan sólo unas docenas de generaciones con el primer modelo (Luikart y col. 1998) hasta mínimo $[0,25 \text{ veces } \times 2 N_e]$ generaciones con el segundo modelo (Cornuet y Luikart 1996).

1.5.2.4 Single nucleotide polymorphism (SNP)

Los SNPs o polimorfismos de base única son mutaciones puntuales que implican la sustitución de un nucleótido por otro. Se consideran marcadores bialélicos (aunque *a priori* podrían tener hasta cuatro alelos) con tendencia a sufrir más transiciones del tipo sustitución purina-purina (G-A) o pirimidina-pirimidina (C-T) que transversiones (sustitución purina-pirimidina y viceversa) (Allendorf y Luikart 2006). La tasa mutacional de los SNPs es baja (aproximadamente 10^{-9} por generación) y por lo tanto son menos polimórficos que los microsatélites (la ratio trabajando con SNPs con una MAF (Frecuencia del Alelo Menor) $\geq 20\%$ *versus* marcadores microsatélites es de 4:1). Sin embargo, el bajo grado de polimorfismo lo compensan siendo los marcadores más abundantes del genoma con una distribución de 1 cada 500 pares de bases aproximadamente (Brumfield y col. 2003; Morin y col. 2004).

El lobo se ha beneficiado ampliamente de los avances con el genoma del perro donde se han descrito hasta el momento más de 2,5 millones de SNPs (<http://www.broadinstitute.org/mammals/dog>) y se han desarrollado chips comerciales con capacidad para genotipar más de 170.000 SNPs simultáneamente (<http://www.illumina.com>; <http://www.affymetrix.com>). Los estudios con SNPs aplicados al lobo se usan principalmente para ahondar en el proceso de la domesticación del perro (Boyko y col. 2009; Gray y col. 2010; vonHoldt y col. 2010b), establecer genealogías (Leblois y Slatkin 2007; vonHoldt y col. 2008), determinar el estado genético de las poblaciones y caracterizarlas (Seddon y col. 2005; Andersen y col. 2006; Gray y col. 2009) o para buscar QTLs relacionados con el tamaño del cuerpo o el color de la capa (Anderson y col. 2009; Hedrick 2009).

1.6 GENÓMICA DE LA CONSERVACIÓN

El futuro para la genética de la conservación es la nueva generación de tecnologías de secuenciación (454 de Roche; Solexa de Illumina y SOLiD e Ion Torrent de Applied Biosystems) que han demostrado su potencial para poder aplicar sus enfoques genómicos en especies no-modelo, incluyendo especies amenazadas (Primmer 2009). Estas nuevas tecnologías permiten salvar la tradicional limitación impuesta por la naturaleza neutral de la variación explorada con los marcadores genéticos tradicionales y ofrecer acceso a la base genética de la variación adaptativa (Allendorf y col. 2010; Ouborg y col. 2010). Esta perspectiva abre una nueva disciplina denominada genómica

de la conservación que tiene como reto la detección de genes y variaciones estructurales responsables de caracteres claves para la eficacia de las especies (incluyendo deletéreos e implicados en adaptaciones locales) (Figura 1.10). Es decir, la genómica de la conservación tiene el potencial para desarrollar nuevas herramientas analíticas y moleculares y bases de datos que permitirán conocer la historia y la adaptabilidad genética de las poblaciones (Kohn y col. 2006, Thompson y col. 2010). Mediante la cuantificación de la variabilidad genética, deletérea y adaptativa y/o la comparación entre poblaciones cercanas - modelo y en peligro de extinción o doméstica y salvaje - se podrá por ejemplo, determinar los niveles adaptativos o perjudiciales de la variación genética de la especie o población (Shearin y Ostrander 2010), establecer el tiempo de divergencia entre especies (O'Brien y col. 2008; Skoglund y col. 2011) o estudiar procesos demográficos de las poblaciones (Hagenblad y col 2009; Locke y col. 2011).

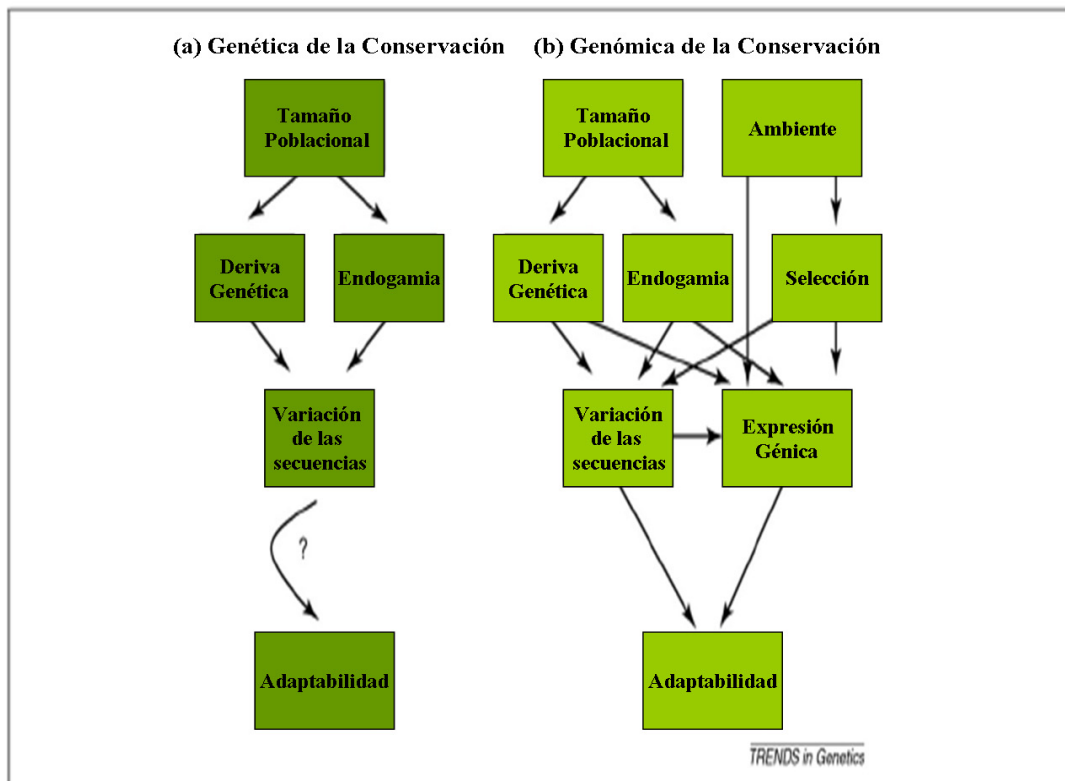


Figura 1.10 Representación esquemática de dos métodos: (a) La genética de la conservación se caracteriza por establecer relaciones entre el tamaño de la población y la variación neutra de las secuencias; en cambio, (b) La conservación genómica establece relaciones entre el tamaño poblacional y la variación neutra y selectiva, es decir incorpora los efectos potenciales de la selección porque tiene en cuenta la influencia medioambiental en la variabilidad de las secuencias (vía selección) y de la expresión génica (Extraído de Ouborg y col. 2010).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis ha sido ampliar el conocimiento genético del lobo con la finalidad última de intervenir en su conservación. Para ello, se han monitorizado cuatro poblaciones de lobo gris que se diferencian por su estado de conservación:

1. Una población grande, no aislada y que ha sufrido severas fluctuaciones demográficas.
2. Una población pequeña, aislada y que sufrió un fuerte declive demográfico.
3. Una pre-población en proceso de recolonización de un territorio.
4. Una población cautiva que habita en una zona endémica para la enfermedad leishmaniosis.

Para realizar el seguimiento genético de las cuatro poblaciones se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Optimización de técnicas de extracción de DNA a partir de muestras no invasivas.
2. Desarrollo de marcadores moleculares para la determinación del sexo de los individuos a partir de muestras no invasivas.
3. Optimización del uso de marcadores moleculares de tipo microsatélite y mitocondrial para la identificación de la especie y de los individuos a partir de muestras no invasivas.
4. Monitorización genética de tres poblaciones (censo, ratio sexual, estructura, variabilidad genética, cuellos de botella, hibridación, fragmentación).
5. Determinación de la prevalencia de infección por *Leishmania infantum* en una población cautiva de lobos.

3 RESULTADOS

3.1 Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations

Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations

Natalia Sastre · Carles Vilà · María Salinas ·
Vladimir V. Bologov · Vicente Urios ·
Armand Sánchez · Olga Francino · Oscar Ramírez

Received: 4 April 2010 / Accepted: 14 December 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Monitoring the loss of genetic diversity in wild populations after a bottleneck event is a priority in conservation and management plans. Here, we used diverse molecular markers to search for signatures of demographic bottlenecks in two wolf populations; an isolated population from the Iberian Peninsula and a non-isolated population from European Russia. Autosomal, mtDNA and Y-chromosomal diversity and the effective population size (N_e) were significantly lower in the Iberian population. Neutrality tests using mtDNA sequences, such as R_2 , F_u and L_i 's F^* , Tajima's D and F_u 's F_s , were positively significant in the Iberian population, suggesting a population decline, but were not significant for the Russian population, likely due to its larger effective population size. However, three tests using autosomal data confirmed the occurrence of the genetic

bottleneck in both populations. The M -ratio test was the only one providing significant results for both populations. Given the lack of consistency among the different tests, we recommend using multiple approaches to investigate possible past bottlenecks. The small effective population size (about 50) in the Iberian Peninsula compared to the presumed extant population size could indicate that the bottleneck was more powerful than initially suspected or an overestimation of the current population. The risks associated with small effective population sizes suggest that the genetic change in this population should be closely monitored in the future. On the other hand, the relatively small effective population size for Russian wolves (a few hundred individuals) could indicate some fragmentation, contrary to what is commonly assumed.

Keywords *Canis lupus* · mtDNA · Neutrality · Y-chromosome · Autosomal microsatellites · Effective population size · European wolf

N. Sastre (✉) · M. Salinas · A. Sánchez · O. Francino ·
O. Ramírez

Servei Veterinari de Genètica Molecular. Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain
e-mail: natalia.sastre@uab.cat

C. Vilà
Estación Biológica de Doñana-CSIC, Avd Américo Vespucio
s/n, 41092 Sevilla, Spain

V. V. Bologov
Central Forest State Natural Biosphere Reserve, P/o Zapovednik,
Nelidovskij rajon, 172513 Tverskaja Oblast, Russia

V. Urios
Centro Iberoamericano de la Biodiversidad (CIBIO),
Universidad de Alicante, 03080 Alicante, Spain

O. Ramírez
Institut de Biologia Evolutiva, UPF-CSIC, Parc de Recerca
Biomedica de Barcelona, 08003 Barcelona, Spain

Introduction

The decline of free ranging wildlife populations is frequently attributable to human persecution, degradation of habitat, disappearance of resources and/or disease, leading to endangerment or even to extinction. In a population that has gone through a demographic bottleneck, the risk of extinction is related to the reduction in genetic diversity and subsequent increase in the detrimental effects of inbreeding, decreasing the potential for adaptation (Saccheri et al. 1999; Reed et al. 2002). Therefore, the detection of bottlenecked populations is important for the implementation of suitable conservation and management plans.

Using molecular markers such as microsatellites, three simple methods are commonly applied to detect past

bottleneck events; heterozygosity excess, mode-shift and M -ratio tests (Cornuet and Luikart 1996; Luikart and Cornuet 1997; Garza and Williamson 2001). The heterozygosity excess approach is based on the expectation that in a bottlenecked population, as allele numbers are reduced faster than gene diversity, the observed heterozygosity will be higher than expected for a population at mutation-drift equilibrium (Cornuet and Luikart 1996). Note that this heterozygosity excess should not be confused with the excess of heterozygotes resulting from deviations from Hardy–Weinberg equilibrium expectations. The mode-shift indicator approach is based on detecting changes in allele frequency distributions considering that in a bottlenecked population, alleles with intermediate frequency will be most abundant because of rare allele loss (Luikart et al. 1998). Finally, the M -ratio test, relates the total number of alleles (k) and the overall range in allele sizes (r). Assuming that k is reduced more quickly than r during a bottleneck event, the ratio $M = k/r$ will be smaller in populations that have suffered a decline than in populations that are in mutation-drift equilibrium (Garza and Williamson 2001). The M -ratio test can distinguish between bottlenecked populations and those which have been small for a long time (Garza and Williamson 2001). Furthermore, M -ratio test detects changes in N_e up to 100 generations ago whereas the heterozygosity excess and mode-shift tests detect recent bottlenecks.

However, demographic bottlenecks do not always leave a genetic signature that can be detected using autosomally inherited markers because migration and/or mutation may erase bottleneck signatures in just a few generations (Keller et al. 2001; Busch et al. 2007). Moreover, in a bottleneck affecting each sex in a different way, an unequal reduction might be expected in effective population size N_e depending on the marker used (Fay and Wu 1999). For this reason, maternally (mitochondrial) and/or paternally (Y-chromosome) inherited genetic markers should be analyzed simultaneously to gain a better understanding of the population history and/or diversity. Here, we have used mitochondrial DNA (mtDNA) sequences to detect demographic fluctuations applying several neutrality tests, such as R_2 , F_u and L_i 's F^* , Tajima's D , F_u 's F_s and MAE. These tests are based on the assumption that most mutations that contribute to the genetic variation in natural populations are neutral (Kimura 1983). Y-chromosome markers were used to compare paternal and maternal genetic diversity in the surveyed populations.

In this study we compared the performance of different analytical methods to detect the existence of past demographic bottlenecks in two European grey wolf (*Canis lupus*) populations. The two populations selected were from the Iberian Peninsula (Spain and Portugal) and European Russia. Ecologically different, the Iberian wolf

population is isolated and has suffered a single main demographic bottleneck in the second half of the twentieth century, whereas the European Russia wolf population has never been isolated and has experienced several demographic fluctuations during the last century (Aspi et al. 2009). We quantified and compared the levels of genetic variability of both populations using microsatellite, mitochondrial and Y-chromosome molecular markers and check the performance and consistency of bottleneck tests. Both bottleneck events may have been similar in relative intensity but since the Iberian population has a lower effective population size and is more isolated, we expected stronger evidence for the population decline.

Historic context of the wolf populations

The largest wolf population in Western Europe is located in the Iberian Peninsula (Boitani 2003), and it has been isolated from other European wolf populations at least since the end of the nineteenth century, when wolves from France and Central Europe disappeared (Valière et al. 2003). At the beginning of the twentieth century, Iberian wolves were distributed throughout the Peninsula. However, in the middle of the century, after wolf eradication campaigns using mainly poison, the population disappeared over most of its former range (Valverde 1971). In the early 1970s, the population was reduced to an all-time low, roughly estimated to be about 700 individuals (Grande del Brío 1984). Nevertheless, new popular awareness and conservation policies in the 1970s brought legal protection for the wolves in Spain (IUCN 1973), increasing their range and population size. The Iberian wolves, confined mainly to the Northwest of the Peninsula in the 1980s, expanded over more than 100,000 km² reaching, at the beginning of the twenty-first century, 254–322 packs and over 2,000 individuals (Álvarez et al. 2005).

On the other hand, the wolf is an abundant predator in the Russian Federation (Bibikov et al. 1983). Wolves were never protected but neither were they endangered in this region (Bibikov 1994). Their occurrence was continuous over an enormous area, likely due to high density of natural prey and wide and dense boreal coniferous forests. Also, economic and political disorders coupled with weak wolf control programs (mainly due to the size of the wolf range) facilitated their prevalence (Bibikov 1994). During the twentieth century, three demographic peaks have been reported for wolves in the previous Soviet Union. The first peak was recorded in 1946, with an estimate of more than 40,000 individuals (Gubar 1996). After World War II an efficient wolf eradication campaign started and between 1960 and 1970 the population of wolves decreased to an all-time low (Bibikov et al. 1983). The second peak occurred in the 1980s, reaching approximately the same

Fig. 1 Wolf range distribution in Eurasia according to the IUCN (www.iucnredlist.org), and sampling regions



number as in the 1940s (Gubar 1996). However, at the beginning of the 1990s the number of wolves decreased to 22,000 individuals due to a new centralized extermination campaign (Ovsyanikov et al. 1998). From that point the number of wolves rose steadily, reaching more than 45,000 individuals at the end of the 1990s. Today, the largest wolf populations are distributed throughout the Northwestern and North-Caucasian regions of European Russia (Lomanov et al. 2000). In fact, European Russia contains a larger number of wolves than Asian Russia (Bibikov 1994; Lomanov et al. 2000). In this study, we have chosen four neighboring regions from European Russia, where the number of wolves at the time of sampling was about 1,843 individuals (Borisov et al. 1992; Lomanov et al. 1995, 2000).

Materials and methods

Samples

We analyzed 47 wolf samples from four geographical connected autonomous regions in Northwestern Spain, adding up to about 139,723 Km² (Asturias: 6 samples; Cantabria: 4;

Galicia: 2 and Castilla y León: 35), and 47 from four geographical connected regions in Northern European Russia, covering about 308,281 km² (Kaluzshkaya: 2; Smolenskaya: 12; Volgodskaya: 5 and Tverskaya: 28) (Fig. 1). Assuming that the mean generation time for wolves is 3.4 years (Aspi et al. 2006), the Iberian wolf samples were collected about 7–11 generations after the main bottleneck event (from 1994 to 2008) whereas Russian samples were collected approximately 4–8 generations after the main event (from 1984 to 1996). The Iberian samples were obtained from carcasses sampled by local government personnel. The Russian samples corresponded to teeth from skulls deposited at the scientific collection of the Central Forest National Reserve (Zapovednik, Tverskaya region). While the Iberian samples represent an isolated population, the Russian samples represent a portion of a much larger wolf population range. However, here we have considered wolves from Russia as a unique population compared to the Iberian one (see below).

Laboratory procedures

DNA was extracted from tissue and tooth samples in separate rooms and on different days according to Sastre et al.

(2009). Blank DNA extractions and negative PCR controls were used throughout the study in order to detect exogenous DNA contamination. All PCR reactions were prepared under a laminar flow hood. A 333 base pairs (bp) DNA fragment of the 5' end of the mitochondrial control region was amplified using primers LoboMit-F 5'-CTCCACCATCAGCACCCAAAG-3' and LoboMit-R 5'-GTAACCCCCACGTTAGTATG-3' as described by Ramírez et al. (2006). PCR products were sequenced with BIG Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Sequences were purified using the Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore, MA, USA) and separated on an ABI PRISM 3730 automated sequencer (Applied Biosystems) according to the protocol provided by the manufacturer. All sequences were examined with SEQSCAPE 2.1.1 (Applied Biosystems).

Five canine primer pairs, MS34A, MS34B, MS41A, MS41B, 990 (Sundqvist et al. 2001; Bannasch et al. 2005), were used to amplify Y chromosome microsatellites from male wolf samples. The sex of the wolves was registered from all carcasses by field personnel. DNA from tooth samples was amplified in a PCR mixture containing 30–40 ng of DNA, PCR buffer (1×), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 μM of each primer and 1 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems). In order to avoid typing errors in tooth DNA samples—with DNA of low quality and quantity—each sample was amplified four times (Sastre et al. 2009). DNA from blood samples was amplified in two multiplex PCR reactions with three (MS34A, MS41A and 990) and two markers (MS34B, MS41B). One primer from each pair was fluorescently labeled with 6-FAM, TET or HEX. All amplifications were carried out in 25-μl reactions. The thermal cycling profile included 10 min at 94°C followed by 40 cycles of 94°C (30 s), 55°C (or 58°C for MS34A, MS34B) (30 s) and 72°C (30 s), and completed with 10 min at 72°C. For the multiplex PCR reactions the annealing temperature was 57°C. Two microliters of PCR amplification product were added to a 10 μl mix of Formamide and ROX 70-500 (10:0.4) (BioVentures, Murfreesboro, TN, USA) and were run on an ABI PRISM 3730 and automatically sized according to the internal size standard. Microsatellite patterns were examined with GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).

We genotyped 13 unlinked autosomal microsatellite loci including eight dinucleotide (CPH5, CPH9 CXX366, CXX403, CXX410, CXX442, CXX459, CXX474) and five tetranucleotide markers (CXX2001, CXX2010, CXX2130, CXX2054, CXX2158) (Fredholm and Wintero 1995; Ostrander et al. 1995; Francisco et al. 1996). Multiplex PCR reactions for DNA from blood and tissue samples

were performed as described elsewhere (Ramírez et al. 2006). Conditions for PCR reactions for tooth samples were the same as for blood samples but without multiplexing and repeating each amplification four times. As for Y-chromosome markers, 2 μl of PCR amplification product were added to a 10 μl mix of Formamide and ROX 70-500 (10:0.4) and genotyped on an ABI PRISM 3730. The determination of allele lengths was performed with GENEMAPPER 4.0.

Data analysis

Genetic diversity statistics for mtDNA sequences, such as number of haplotypes (H), haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (π) and average number of nucleotide differences (K), as well as genetic differentiation (F_{ST}) (Hudson et al. 1992), were estimated using DNASP 4.10 (Rozas et al. 2003). Several neutrality statistics, often used to investigate demographic changes, were estimated by using a coalescent-based approach in DNASP (Ramos-Onsins and Rozas 2002). These neutrality tests were based on the distribution of mutation frequencies (Class I; R_2 , Fu and Li's F^* and Tajima's D), on the distribution of haplotype frequencies (Class II; Fu's F_s test statistic) and on the mean absolute error between the observed and the theoretical mismatch distribution (Class III; MAE) (Ramos-Onsins and Rozas 2002).

Genetic diversity for Y-chromosome microsatellites was estimated using GENALEX 6.1 (Peakall and Smouse 2006). Phylogenetic relationships between mitochondrial and Y-chromosome haplotypes were assessed by median-joining networks as implemented in NETWORK 4.5 (Bandelt et al. 1999). A maximum parsimony post-processing criterium was applied setting equal weight to each locus (Koblmüller et al. 2009).

Genotyping errors for autosomal microsatellites due to allelic dropout, false alleles and null alleles, were checked using MICRO-CHECKER 2.2 (van Oosterhout et al. 2004). Genetic variability statistics, such as number of alleles (A), allelic richness (R_s) and observed (H_o) and expected (H_E) heterozygosities, were estimated per locus and per population using FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2000). Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) were estimated from the inbreeding estimator F_{IS} (Guo and Thompson 1992) for each locus and population using ARLEQUIN 3.01 (Schneider et al. 2006), with Markov chains of 100,000 steps following 10,000 dememorization steps. Confidence interval values (95% CI) for F_{IS} were calculated using GENETIX 4.05.2 (Belkhir et al. 1999). Differences in genetic variability between the two populations were evaluated using Wilcoxon W signed-rank tests. To test for genetic differentiation between and within populations, pairwise F_{ST} values (Weir and Cockerham 1984)

were estimated using GENETIX. To visualize the distribution of genetic variation across individuals, we carried out a factorial correspondence analysis (FCA) (Benzecri 1973) as implemented in GENETIX, and a Bayesian model-based clustering approach in STRUCTURE 2.2 (Falush et al. 2007). Ignoring prior population information and using an admixture model with independent allele frequencies, STRUCTURE assigns individuals to populations. To assess the partition in a varying number of genetic clusters K , we run 100,000 Markov chain Monte Carlo repetitions and a burn-in period of 10,000 iterations for $K = 1-5$, repeated 20 times. Following Evanno et al. (2005), we chose the optimal K based on the rate of change of the log likelihood [$\ln \text{Pr}(X/K)$] and its variance for $K = 1-5$. To estimate the effective population size (N_e) for the two populations we used a linkage approach, as implemented in the programs NEESTIMATOR (Peel et al. 2004) and LDN_e (Waples 2006).

Three common methods were applied to detect bottlenecks in the microsatellite data. The tests heterozygosity excess and mode-shift indicator were performed using BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996). Three mutation models (IAM, TPM and SMM) could be applied to simulate the distribution of alleles and from this estimate expected heterozygosity, being the two-phase mutation model (TPM) the most appropriate for microsatellite data provided that one-step mutations (SMM) predominate over multi-step changes (IAM) (Luikart et al. 1998). We tested for bottleneck signatures under the TPM model assuming p_g (proportion of multi-step mutations) = 0.10, σ^2 (variance) = 12, and using the one-tailed Wilcoxon's and sign tests to check for significance of the heterozygosity excess (Luikart and Cornuet 1997). The third method, M -ratio, was assessed using the software M_P_Val for each locus and averaging the value of M over loci (Garza and Williamson 2001). The significance of M was determined by comparing to a critical value (Mc), calculated from hypothetical populations in mutation-drift equilibrium. The statistic M suggests that a population has suffered a reduction in size when $M < Mc$. The Mc thresholds were generated using CRITICAL_M (Garza and Williamson 2001). We used the parameterization suggested by Garza and Williamson (2001) for the TPM model, where $p_g = 0.10$, Δ_g (average size of multi-step mutations) = 3.5, and μ (microsatellite mutation rate) = 5.0×10^{-4} /locus/generation. The threshold values are also dependent on θ , which depends on N_e according to the expression $\theta = 4 N_e \mu$. As N_e per population was initially unknown, we calculated the Mc for different values of θ resulting from varying N_e from 50 to 3000 (minimum and maximum N_e expected per population; see estimates below) and obtained a range for θ of 0.1–6.

Results

mtDNA sequences

We identified a total of 6 haplotypes in the Russian population, all of them described in previous studies; W6, W14 (Vilà et al. 1999), W11 (Valière et al. 2003), W2, W5 and W21 (Pilot et al. 2006). We also found three (lu1, lu2, lu4) out of four haplotypes previously reported in Iberian wolves (Vilà et al. 1999) (Fig. 2a). Only haplotype lu3, identified by Vilà et al. (1999) in one individual from Portugal was not found among our samples.

Haplotype diversity and number of polymorphic sites were larger in Russian wolves than in their Iberian counterparts. Despite this, just one haplotype was predominant in each population, W6 in Russia (present in 45% of the samples) and lu1 in Spain (55%) (Table 1; Fig. 2a). Genetic differentiation between populations was highly significant ($F_{ST} = 0.396$; $P < 0.001$) due to the fact that they did not share haplotypes. However, the minimum spanning network showed low level of sequence divergence between populations and the haplotypes observed in each population did not form separate clusters (Fig. 2a).

The mismatch distribution of pairwise differences showed similar distribution patterns in both populations, failing to indicate population expansion (data not shown). Neutrality tests were not significant for the Russian population ($P > 0.05$ in all cases) failing to indicate a population reduction. In contrast, in the Iberian population, class I and II neutrality tests were significant ($P < 0.05$), suggesting a decline in population size due to their positive value, while the test based on the mismatch distribution was not significant (MAE; $P > 0.05$) (Table 1).

Y-chromosome microsatellites

We identified 10 haplotypes among Russian wolves and 4 haplotypes among Iberian wolves (Table 2). No haplotypes were shared between the populations. Haplotype YIW02 was present in half (50%) of the individuals tested in the Iberian Peninsula. As for mtDNA data, Y-chromosomal diversity was higher in Russian wolves than in Iberian ones (Table 2), and, as for the mtDNA, the minimum median-joining network did not reveal a separation between populations (Fig. 2b).

Autosomal microsatellites: preliminary analyses

The program MICRO-CHECKER identified 3 loci with heterozygosity deficiency ($P < 0.01$) in the Russian (CXX366, CXX2130 and CXX2158) and Iberian (CXX2001,

Fig. 2 Median-Joining network of (a) mtDNA and (b) Y-chromosome haplotypes in Russian (*black circles*) and Iberian (*white circles*) wolves. The size of the *circles* is proportional to the haplotype frequency, and branch length is proportional to the number of nucleotides differences

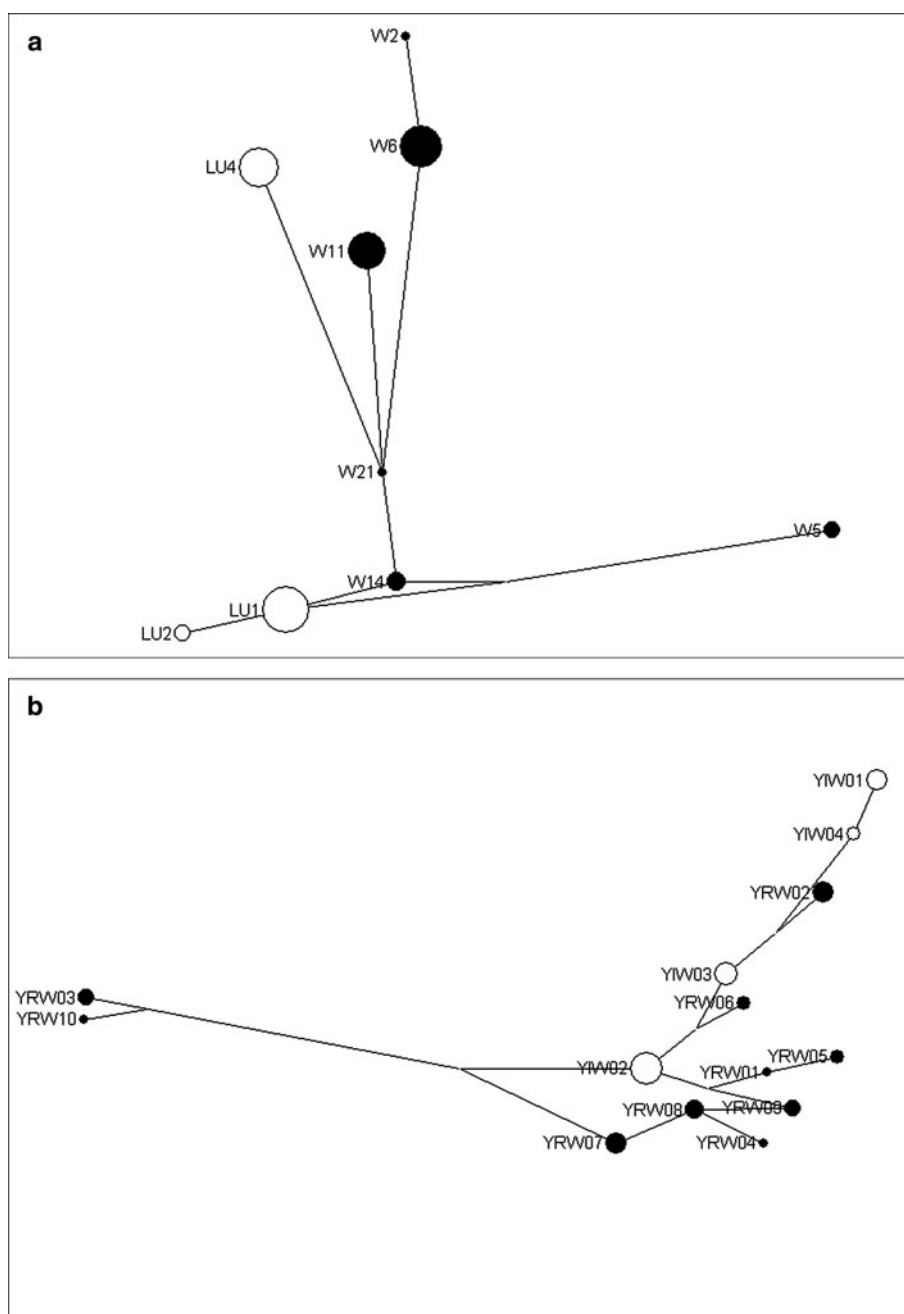


Table 1 Mitochondrial diversity and neutrality tests for two European wolf populations

	Mitochondrial DNA sequences						Class I			Class II	Class III
	N	H	Hd	π	S	R_2	F^*	D	F_s	MAE	
Russian wolf	47	6	0.672 ± 0.043	0.016	10	0.157	1.073	1.151	2.932	0.905	
Iberian wolf	47	3	0.555 ± 0.041	0.010	6	0.211*	1.770*	2.236*	6.061*	1.083	

N sample size, H haplotype number, Hd haplotype diversity, π nucleotide diversity, S number of polymorphic sites

* $P < 0.05$

Table 2 Y chromosome haplotypes and diversity in Russian and Iberian wolves for five microsatellite loci

Haplotype	MS34A	MS34B	MS41A	MS41B	990	Frequency (%)
Russian wolves						
YRW01	181	179	207	222	126	3.7
YRW02	175	179	207	228	126	18.5
YRW03	173	183	207	216	130	11.1
YRW04	181	177	207	218	124	3.7
YRW05	181	179	209	222	126	7.4
YRW06	177	179	209	224	126	7.4
YRW07	179	177	207	216	124	18.5
YRW08	179	177	207	218	124	14.9
YRW09	179	177	207	220	124	11.1
YRW10	173	181	207	214	130	3.7
Where $N = 27$; $N_a = 12$; $H = 10$; $Hd = 0.602 \pm 0.095$						
Iberian wolves						
YIW01	175	177	207	224	124	19.2
YIW02	177	179	207	222	126	50.0
YIW03	177	179	207	226	126	23.1
YIW04	175	177	207	226	124	7.7
Where $N = 26$; $N_a = 1$; $H = 4$; $Hd = 0.360 \pm 0.100$						

N sample size, N_a number of unique alleles per population, H haplotype number, Hd haplotype diversity

Alleles are represented by their sizes

CXX403 and CXX2158) populations, suggesting the presence of null alleles in these loci. Null alleles can be detected as an excess of homozygotes leading loci to deviations from HWE (Carlsson 2008). The heterozygosity excess test requires molecular markers to be in HWE (Busch et al. 2007). For that reason, we discarded the locus CXX2158 from further analyses because it deviated significantly from HWE in both populations ($P < 0.001$). Moreover, to evaluate the impact of including the markers that show significant deviation from equilibrium per population, bottleneck tests were repeated including and excluding these markers (see Table 4).

Population structure and effective population size

F_{ST} showed significant differentiation between the two wolf populations ($F_{ST} = 0.131$; $P < 0.05$). The factorial correspondence analysis also indicated that the Iberian wolves were distinct from Russian wolves on the first factorial axis, FA-I, explaining 7.86% of the total genetic diversity (Figure not shown). In the same way, the Bayesian model-based clustering method showed a peak in ΔK (Fig. 3a, b; Evanno et al. 2005) for $K = 2$, which separated in two clear clusters Russian and Iberian wolves (Fig. 3c). F_{ST} values among the four Iberian ($F_{ST} = 0.049$) and Russian regions ($F_{ST} = 0.037$) were very low indicating

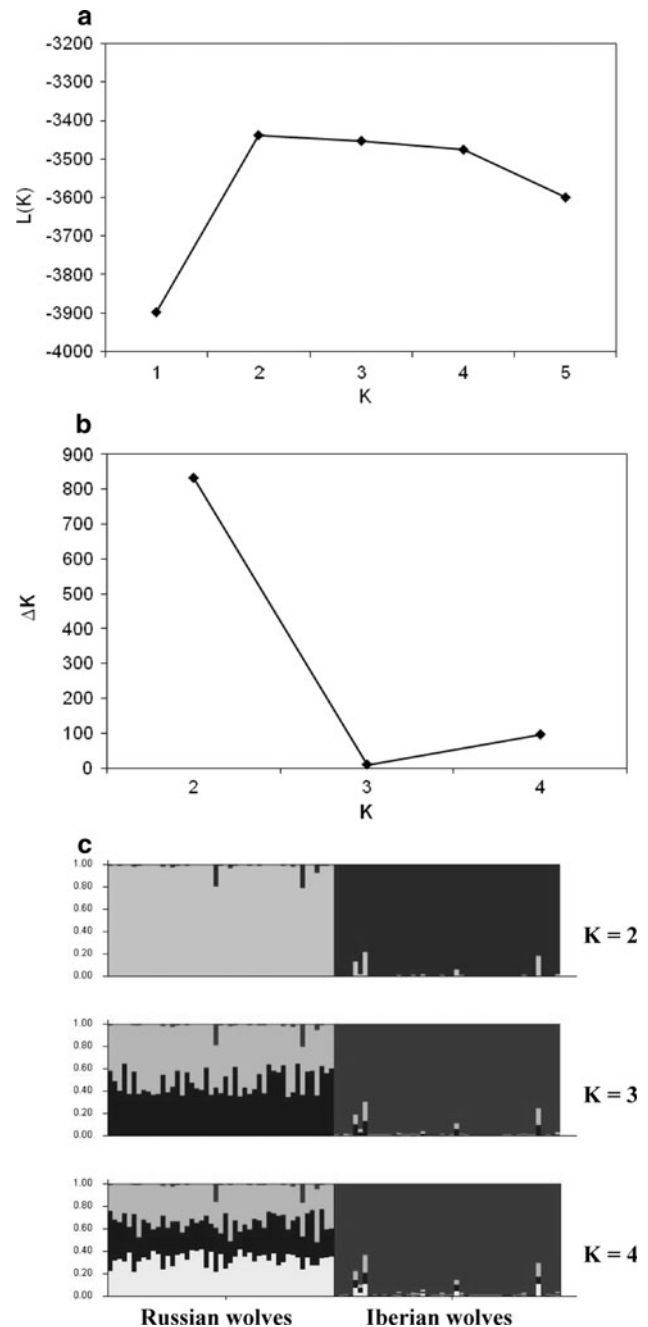


Fig. 3 Bayesian clustering approach for two wolf populations. **a** Mean likelihood $L(K)$ over 20 runs assuming K clusters ($K = 1-5$). **b** ΔK following Evanno et al. 2005, where the modal value of the distribution is the highest level of structuring. **c** Individual assignment using $K = 2$, $K = 3$ and $K = 4$ clusters. Each individual is represented as a vertical bar sectioned into K colored segments, whose length is proportional to the likelihood of assignment to the K cluster

very weak and not significant substructure within populations.

Genetic diversity was significantly higher in Russian wolves than in Iberian wolves (A , R_s , H_E ; W tests, $P < 0.05$ in all cases). Both populations showed $H_E > H_O$ at almost

Table 3 Genetic diversity for each microsatellite in two wolf populations

Locus	Russian wolf ($n = 47$)						Iberian wolf ($n = 47$)					
	A	N_a	R_s	H_O	H_E	F_{IS} (95% CI)	A	N_a	R_s	H_O	H_E	F_{IS} (95% CI)
CXX2001	7	2	6.936	0.702	0.749	0.051	6	1	6.000	0.468	0.784	0.401***
CXX2010	8	5	7.745	0.745	0.729	-0.034	3	0	2.997	0.574	0.512	-0.124
CXX2054	14	8	13.992	0.638	0.819	0.222***	7	1	6.936	0.447	0.552	0.166
CXX403	10	5	9.809	0.702	0.864	0.179*	5	0	4.997	0.277	0.630	0.549***
CXX410	9	4	8.809	0.787	0.820	0.034	5	0	5.000	0.489	0.747	0.341***
CXX442	4	2	4.000	0.511	0.664	0.225	3	1	3.000	0.467	0.407	-0.148
CPH5	6	2	5.872	0.553	0.658	0.161	7	3	7.000	0.689	0.747	0.078**
CXX366	7	4	6.933	0.468	0.755	0.372***	4	1	4.000	0.477	0.539	0.116
CPH9	13	7	13.000	0.841	0.870	0.033***	6	0	6.000	0.636	0.766	0.156*
CXX2130	12	6	11.910	0.717	0.875	0.180	8	2	7.913	0.652	0.754	0.132*
CXX474	8	5	7.929	0.617	0.786	0.215*	4	1	3.936	0.468	0.488	0.011
CXX459	9	2	8.954	0.674	0.793	0.138	8	1	7.933	0.660	0.810	0.182***
Total	8.9	52	8.824	0.663	0.782	0.147 (0.07–0.20)*	5.5	11	5.476	0.525	0.645	0.177 (0.10–0.23)*

Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were assessed from the fixation index F_{IS} for each locus

A allele number, N_a number of unique alleles per locus and population, R_s allelic richness ($n = 44$), H_O observed heterozygosity, H_E expected heterozygosity

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

all loci, and positive F_{IS} values (Table 3), not significantly different between populations (W test, $P > 0.05$). Finally, the two programs based on the linkage disequilibrium among the 12 microsatellite loci gave similar estimates of N_e for the Iberian population (NEESTIMATOR, $N_e = 53.8$ [95% confidence interval: 41.4–73.8]; LDN $_e$, $N_e = 43.2$ [29.9–68.5]) but less similar for the Russian population (NEESTIMATOR, $N_e = 312.5$ [167.1–1741.6]; LDN $_e$, $N_e = 138.0$ [75.9–490.4]).

Bottleneck tests

The Wilcoxon's test for heterozygosity excess was significant for the Russian population ($P = 0.026$) (Table 4). The Iberian wolves also showed heterozygosity excess at the majority of loci but the sign and Wilcoxon tests were not significant ($P > 0.05$) (Table 4). However, population contraction in Spain was supported by the mode-shift indicator (Table 4; Fig. 4). A loss of rare alleles was detected because the proportion of rare alleles ($q < 0.05$) was 24.4% while the proportion of the third allele class ($0.1 < q < 0.2$) was 26.8% (also higher than the frequency of alleles of the class [$0.05 < q < 0.1$]). Thus, we inferred that the Iberian population was not at mutation-drift equilibrium. By contrast, the allelic frequency distribution for the Russian population was more L-shaped, as expected for populations that have not gone through recent bottlenecks (Fig. 4).

The M -ratio for Iberian samples was 0.615, indicating that numerous alleles were absent from the population relative to the total number expected under the TPM model

(Table 4). M was significantly below M_c over a wide range of N_e values (from $N_e = 50$ to 3,000), consistently indicating the occurrence of a bottleneck. The M -ratio for Russian samples was 0.715, always slightly below M_c -critical values although above the threshold of 0.68 suggested by (Garza and Williamson 2001) to safely infer past bottlenecks.

To assess if the results were influenced by having included two loci that are not in HW equilibrium within each population, the analyses were repeated just including 10 microsatellites that did not appear to have significant deviations from HWE. The results using 10 or 12 microsatellite loci were similar (Table 4). Therefore, we agree with Carlsson (2008) that the presence of null alleles seems not affect the tests performed.

Discussion

Mitochondrial and Y-chromosome variation were higher in the non-isolated Russian population than in the isolated Iberian population (Tables 1, 2). However, the variability found in Iberian wolves was about two-fold compared to isolated and genetically depauperate populations described in previous studies. Pilot et al. (2006) found that wolf populations from Eastern Europe had multiple mtDNA haplotypes which were widely distributed, whereas wolves from Italy, isolated like Iberian wolves, had a unique haplotype (Randi et al. 2000). We observed three haplotypes in the Iberian Peninsula, lu1 and lu2 haplotypes not

Table 4 Bottleneck detection tests in two wolf populations using a mutation rate of 5.0×10^{-4}

Test (12 microsatellite loci)	Parameters		Russian wolves ($n = 47$)	Iberian wolves ($n = 47$)
Heterozygosity excess	$\sigma^2 = 12$ $p_g = 0.10$	Sign test	10:2 ($P = 0.06$) ^a	9:3 ($P = 0.163$)
		Wilcoxon	$P = 0.026$	$P = 0.088$
M-ratio	$\Delta_g = 3.5$ $p_g = 0.10$ $\theta = 0.1, N_e = 50$ $\theta = 0.6, N_e = 300$ $\theta = 1.0, N_e = 500$ $\theta = 6.0, N_e = 3000$	$M_c = 0.85$	$M = 0.715$	$M = 0.615$
		$M_c = 0.81$	$P = 0.0000$ ^b	$P = 0.0000$
		$M_c = 0.81$	$P = 0.0026$	$P = 0.0000$
		$M_c = 0.79$	$P = 0.0029$	$P = 0.0000$
Mode-shift			Normal L-shaped distribution	Shifted mode
Test (10 microsatellite loci) ^c				
Heterozygosity excess	$\sigma^2 = 12$ $p_g = 0.10$	Sign test	9:1 ($P = 0.032$)	7:3 ($P = 0.294$)
		Wilcoxon	$P = 0.042$	$P = 0.161$
M-ratio	$\Delta_g = 3.5$ $p_g = 0.10$ $\theta = 0.1, N_e = 50$ $\theta = 0.6, N_e = 300$ $\theta = 1.0, N_e = 500$	$M_c = 0.84$	$M = 0.710$	$M = 0.594$
		$M_c = 0.84$	$P = 0.0004$	$P = 0.0000$
		$M_c = 0.80$	$P = 0.0023$	$P = 0.0000$
		$M_c = 0.78$	$P = 0.0049$	$P = 0.0000$
Mode-shift			Normal L-shaped distribution	Shifted mode

σ^2 Variance, p_g proportion of multi-step mutation (IAM), Δ_g average size of multi-step mutations, M_c critical value

^a Heterozygosity excess versus heterozygosity deficit loci

^b $P =$ probability values for a greater M ratio

^c CPH9 and CXX366 loci and CXX2001 and CXX403 loci deviated significantly from HWE in the Russian and Iberian populations respectively and were discarded from the second part of the analysis

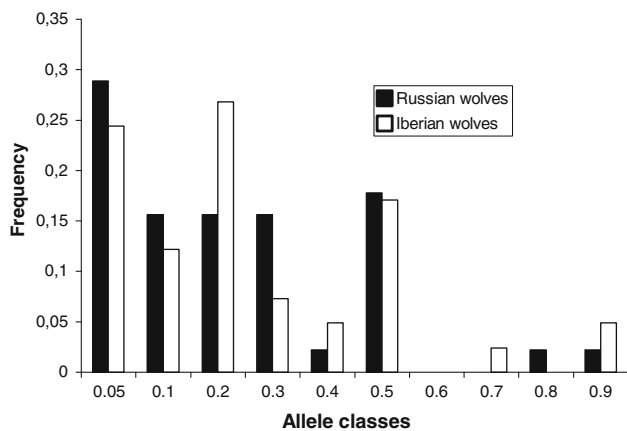


Fig. 4 Frequency distribution of allele classes for Iberian and Russian wolves

being observed elsewhere in Europe (Valière et al. 2003). In the same way, Sundqvist et al. (2001) reported 9–10 Y-chromosome haplotypes among Eastern wolf populations and only 2 haplotypes in Scandinavian wolves, which derived from a founding event involving just two males (see also Vilà et al. 2003). For the Iberian wolf population, the number of Y chromosome haplotypes was intermediate (four haplotypes).

As for uniparental markers, autosomal microsatellite variability measures such as allelic diversity (A) and

expected heterozygosity (H_E) were higher in Russian wolves ($A = 8.9$; $H_E = 0.78$) than in Iberian wolves ($A = 5.5$; $H_E = 0.65$), but both were close to values found in non-isolated wolf populations from North America ($A = 5.9$, $H_E = 0.74$, Carmichael et al. 2007; $A = 7.9$, $H_E = 0.67$, Musiani et al. 2007; $A = 7.0$, $H_E = 0.72$, Kobmüller et al. 2009) or northwestern Russia ($A = 5.7$, $H_E = 0.71$; $A = 4.7$, $H_E = 0.64$, Aspi et al. 2009), and higher than observed for isolated populations from Italy ($A = 4.4$, $H_E = 0.49$, Lucchini et al. 2004) or Scandinavia ($A = 3.1$, $H_E = 0.52$, Flagstad et al. 2003). Therefore, even though the genetic variability was lower in the isolated Iberian population, it does not seem extremely depleted of diversity. However, comparisons of diversity measures derived from different sets of markers can only be taken as a rough approximation.

The genetic evidence that a bottleneck occurred in the Iberian population was provided by both maternal and biparental markers: positive neutrality tests for mtDNA sequences and significant M -ratio and mode-shift tests for autosomal microsatellites. Only two tests failed to evidence the demographic decline in this isolated population; the neutrality test based on the mismatch distribution (MAE), likely because it is very conservative (Ramos-Onsins and Rozas 2002), and the heterozygosity excess test which compares observed heterozygosity with the expected value under the assumption that the population is at mutation-

drift equilibrium (Cornuet and Luikart 1996). As the allelic diversity is rapidly reduced, a heterozygosity excess can be observed following a bottleneck event. Several reasons could contribute to the lack of significance: presence of null alleles, inbreeding, population substructuring (Wahlund's effect) and low statistical power. Null alleles do not seem to explain the result since the same results were observed after excluding two loci that were not in HWE in each population (Table 4). With regard to inbreeding, this does not seem to be the reason for the results either: we found values of FIS that were high in both populations (0.147 and 0.177) and not significantly different (W test, $P > 0.05$), but the test was only significant for the Russian population. Fragmentation does not seem to explain the results either because the samples were collected over a relatively smaller (and continuous) area than for the Russian population. In the same way, lack of statistical power does not seem to be the reason since the number of samples typed falls within the range recommended by Luikart et al. (1998) to achieve high power in the test (between 15–40 individuals and between 10–15 microsatellites). However, it is possible that the lower number of alleles in the Iberian population (see Table 3) has reduced the power of the test in this population, or that the bottleneck is too recent to produce a detectable heterozygosity excess in this population (see Cornuet and Luikart 1996).

In the Russian population, we have detected the genetic signature of the bottleneck using autosomal data and despite the fact that migration and/or mutation could erase bottleneck signatures in few generations (Keller et al. 2001; Busch et al. 2007), but we failed to detect such signature using mtDNA. The four Russian regions sampled have ecological and physical continuity, the landscape not being fragmented by noticeable topographical barriers and thus apparently allowing high rates of gene flow. Since the sampling locations are within a much wider distribution, gene flow is also possible with neighbouring areas. We found excess of heterozygosity in the population regardless of using 10 or 12 microsatellite loci (Table 4). Furthermore, even though M (0.72) $>$ 0.68, and thus a reduction in size cannot be confidently assumed (Garza and Williamson 2001), loss of alleles was evident because $M < M_c$ (Table 4). However, the distribution of allele frequencies was biased towards rare alleles (L-shaped), failing to show a large loss of rare alleles or indicating some recovery due to mutation or migration. In the same way, no genetic decline was evidenced using maternal inherited markers. Perhaps the effective population size in Russia is large enough to make difficult the identification of the bottleneck by using short mtDNA sequences as the ones used here.

Finally, official data showed that, from 1984 to 1995, the total number of wolves in Kaluzskaya (178), Smolenskaya (347), Volgodskaia (708) and Tverskaya

(635) was about 1,843 individuals (Borisov et al. 1992; Lomanov et al. 1995, 2000). Frankham et al. (2002) estimated that, on average and across a very wide range of species, the mean value for N_e/N was 0.11. With this estimate, and considering the size of the wolf population in the studied region, we could expect N_e values around 203, similar to the values that we estimated (312.5 and 138.0). However, this is the value that should be expected if the wolf population was isolated from the population in the rest of Russia. If the region was widely connected by gene flow with the rest of the Russian population, with a total population estimated to be close to 40,000 wolves, we would expect a much larger effective population size. Consequently, our relatively low effective population size estimates are consistent with fragmentation (England et al. 2010). Similarly, the large value observed for F_{IS} indicates the existence of some degree of fragmentation within the study area. More detailed population genetic studies including samples from the entire range of wolves in Russia would allow identifying discontinuities and proper units for management.

In the case of the Iberian population, the estimated effective population size is about 50 (two estimates, 53.8 and 43.2), which is about 2.5% of the mentioned estimate of 2,000 individuals, well below the 11% ($N_e/N = 0.11$) estimated by Frankham et al. (2002). In this case, our sample can be considered to represent the entire distribution range of the wolf in the Spain (except for two very small and isolated nuclei in the South and in the North East; Álvares et al. 2005, Sastre et al. 2007) and the small effective population size cannot be interpreted as a result of a biased distribution of the samples (not representing the entire population). This could indicate that the population size has been overestimated (for example, by including juveniles; Vilà 2010) and/or the genetic diversity has been more dramatically reduced by the bottleneck than initially suspected.

To summarize, we have detected demographic bottlenecks in both populations regardless of the high growth rate of the wolf populations (the Iberian population could have experienced a two-to three-fold increase in 30 years). Maternal markers such as mtDNA sequences were effective detecting the demographic decline in the small isolated population but not in the large one. In contrast, biparental markers were effective showing the effects of the bottleneck in both populations, the M -ratio test being useful for both of them. However, due to the different results obtained with the tests, we recommend carrying out multiple approaches, also using different kinds of genetic markers, in order to detect bottlenecks. Furthermore, given the small effective population size estimated for the Iberian population, we suggest continuous surveillance because its isolation can lead to a fast loss of genetic diversity and

adaptive potential. Any fragmentation within this population would further accelerate this loss. On the other hand, the effective population size for Russian wolves could indicate that some fragmentation exists indicating that the entire Russian wolf population should not be seen as a unique management unit.

Acknowledgments Samples were moved from the Russian Federation to Spain according to CITES and VETER requirements. Animals were not killed for the purpose of this manuscript. We are grateful to the personnel from the Central Forest National Reserve (Zapovednik, Russia), especially to Pavel Koravlov, for supplying wolf tooth samples. We thank all the personnel from the “Consejería de Medio Ambiente, Junta de Castilla y León”, especially to Agustín Noriega, for supplying wolf tissue samples. Thanks are due also to Sebastian Ramos-Onsins and Joaquim Casellas for valuable comments on the analyses, to Miki Monguilod for IT support, to Gary Walker for linguistic revision and two anonymous reviewers for helpful comments on the manuscript. Carles Vilà work was supported by the “Programa para la Captación del Conocimiento para Andalucía” (Andalusian Government, Spain). Financial support was provided by the “Servei Veterinari de Genètica Molecular” (SVGM).

References

- Álvarez FI, Barroso JC, Blanco J et al. (2005) Wolf status and conservation in the Iberian Peninsula. International Congress Frontiers of Wolf Recovery. Colorado Springs, Colorado, October 2005
- Aspi J, Roininen M, Ruokonen M, Kojola I, Vilà C (2006) Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Mol Ecol* 15:1561–1579
- Aspi J, Roininen M, Kiiskilä J, Ruokonen M, Kojola I, Blijudnik L, Danilov P, Heikkinen S, Pulliainen E (2009) Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. *Conserv Genet* 10:815–826
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48
- Bannasch DL, Bannasch MJ, Ryun JR, Famula TR, Pedersen NC (2005) Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mamm Genome* 16:273–280
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (1999) GENETIX, Logiciel sous Windows TM pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060. Université de Montpellier II, Montpellier, France
- Benzecri J (1973) L'Analyse des Données. Tome I: la Taxinomie; Tome II: l'Analyse des Correspondances. Dunod Press, Paris
- Bibikov DI (1994) Wolf problem in Russia. *Lutroloa* 3:10–14
- Bibikov DI, Ovsyannikov NG, Filimonov AN (1983) The status and management of the wolf population in the USSR. *Acta Zoologica Fennica* 174:269–271
- Boitani L (2003) Wolf conservation and recovery. In: Mech LD, Boitani L (eds) *Wolves. Behavior, ecology and conservation*. University of Chicago Press, Chicago, pp 317–340
- Borisov BP, Gibet LA, Gubar JP et al. (1992) Senior management of the hunting facilities economy at RSFSR. The central research laboratory of the hunting facilities economy and reserves. Moscow (in Russian)
- Busch JD, Waser PM, DeWoody JA (2007) Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Mol Ecol* 16:2450–2462
- Carlsson J (2008) Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *J Hered* 99:616–623
- Carmichael LE, Krizan J, Nagy JA, Fuglei E, Dumond M, Johnson D, Veitch A, Berteaux D, Strobeck C (2007) Historical and ecological determinants of genetic structure in arctic canids. *Mol Ecol* 16:3466–3483
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014
- England PR, Luikart G, Waples RS (2010) Early detection of population fragmentation using linkage disequilibrium estimation of effective population size. *Conserv Genet* 11:2425–2430
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes* 7:574–578
- Fay JC, Wu CI (1999) A human population bottleneck can account for the discordance between patterns of mitochondrial versus nuclear DNA variation. *Mol Biol Evol* 16:1003–1005
- Flagstad Ø, Walker CW, Vilà C, Sundqvist AK, Fernholm B, Hufthammer AK, Wiig Ø, Koyola I, Ellegren H (2003) Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Mol Ecol* 12:869–880
- Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, Neal CL, Ostrander EA (1996) A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for the canine genetic mapping. *Mamm Genome* 7:359–362
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge
- Fredholm M, Wintero AK (1995) Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mamm Genome* 6:11–18
- Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* 10:305–318
- Goudet J (2000) FSTAT version 2.9.3.2. Computer package for PCs. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland
- Grande del Brío R (1984) El lobo Ibérico Biología y mitología. Editorial Hermann Blume, Madrid
- Gubar JP (1996) The wolf in Russia caught between hunters and environmentalists. *Russ Conserv News* 8:19–20
- Guo S, Thompson E (1992) Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372
- Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132(2):583–589
- International Union for Conservation of Nature (IUCN) (1973) Red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org/>
- Keller LF, Jeffery KJ, Arcese P et al (2001) Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proc R Soc Lond* 268:1387–1394
- Kimura M (1983) The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Koblmüller S, Nord M, Wayne RK, Leonard JA (2009) Origin and status of the Great Lakes wolf. *Mol Ecol* 18:2313–2326
- Lomanov IK, Borisov BP, Bolodnina OA et al (1995) The hunting animals of Russia. Department on protection and rational use. State service of the account of the hunting resources, Moscow (in Russian)
- Lomanov IK, Borisov BP, Bolodnina OA et al (2000) The hunting animals of Russia. State service of the account of the hunting resources. Ministry of agriculture of the Russian Federation, Moscow (in Russian)
- Lucchini V, Galov A, Randi E (2004) Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Mol Ecol* 13:523–536

- Luikart G, Cornuet JM (1997) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv Biol* 12:228–237
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89:238–247
- Musiani M, Leonard JA, Cluff HD, Gates CC, Mariani S, Paquet PC, Vilà C, Wayne RK (2007) Differentiation of tundra/taiga and boreal coniferous forest wolves: genetics, coat colour and association with migratory caribou. *Mol Ecol* 16:4149–4170
- Ostrander EA, Mapa FA, Yee M, Rine J (1995) One hundred and one simple sequence repeats-based markers for the canine genome. *Mamm Genome* 6:192–195
- Ovsyanikov N, Bibikov DI, Bologov VV (1998) Battling with wolves: Russia's decades-old struggle to manage its fluctuating wolf population. *Int Wolf Center Publ* 8(1):16–19
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295
- Peel D, Ovenden JR, Peel SL (2004) NeEstimator: software for estimating effective population size, version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries, Australia
- Pilot M, Jedrzejewski W, Branicki W et al (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Mol Ecol* 15:4533–4553
- Ramírez O, Altet L, Enseñat C, Vilà C, Sánchez A, Ruiz A (2006) Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conserv Genet* 7:861–878
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol* 19(12):2092–2100
- Randi E, Lucchini V, Christensen MF et al (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conserv Biol* 14:464–473
- Reed DH, Briscoe DA, Frankham R (2002) Inbreeding and extinction: the effect of environmental stress and lineage. *Conserv Genet* 3:301–307
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496–2497
- Saccheri IJ, Wilson IJ, Nichols RA, Bruford MW, Brakefield PM (1999) Inbreeding of bottlenecked butterfly populations: estimation using the likelihood of changes in marker allele frequencies. *Genetics* 151:1053–1063
- Sastre N, Francino O, Lampreave G et al. (2007) Seguimiento del lobo (*Canis lupus*) en Cataluña mediante el análisis genético de muestras no invasivas. In: XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Genética. SEG 2007, León, p 127
- Sastre N, Francino O, Lampreave G et al (2009) Sex identification of wolf (*Canis lupus*) using non-invasive samples. *Conserv Genet* 10:555–558
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2006) Arlequin ver 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab, University of Berne, Switzerland
- Sundqvist AK, Ellegren H, Olivier M, Vilà C (2001) Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Mol Ecol* 10:1959–1966
- Valière N, Fumagalli L, Gielly L et al (2003) Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Anim Conserv* 6:83–92
- Valverde JA (1971) El lobo español. *Montes* 159:228–241
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Vilà C (2010) Viabilidad de las poblaciones ibéricas de lobos. Enseñanzas de la genética para la conservación. In: Fernández-Gil A, Álvares F, Vilà C, Ordiz A (eds) Los lobos de la Península Ibérica. Propuestas para el diagnóstico de sus poblaciones. ASCEL, Palencia, Spain, pp 157–171
- Vilà C, Amorim IR, Leonard JA et al (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Mol Ecol* 8:2089–2103
- Vilà C, Sundqvist AK, Flagstad Ø et al (2003) Rescue of a severely bottlenecked wolf *Canis lupus* population by a single immigrant. *Proc R Soc* 270:91–97
- Waples R (2006) A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conserv Genet* 7:167–184
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370

3.2 Sex identification of wolf (*Canis lupus*) using non invasive samples

Sex identification of wolf (*Canis lupus*) using non-invasive samples

Natalia Sastre · Olga Francino · Gabriel Lampreave ·
Vladimir V. Bologov · José María López-Martín ·
Armand Sánchez · Oscar Ramírez

Received: 15 January 2008 / Accepted: 11 March 2008 / Published online: 21 March 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract We have developed new specific primers for sex determination from forensic samples of wolves (*Canis lupus*), such as hair, saliva, faecal, tooth and urine samples. In order to improve molecular sexing, we performed a multiplex semi-nested polymerase chain reaction (PCR) and several replicated amplifications per sample to avoid errors in low quantity DNA samples, such as allelic dropout and false alleles. The sex of individuals is automatically determined by capillary electrophoresis with a fluorescently labelled internal sex-specific primer from each pair. Our method yielded sex identification on 100% of invasive samples and 93% of forensic samples, being one of the highest success rates obtained from wild animals.

Keywords *Canis lupus* · Wolf · Non-invasive samples · Sex-specific primers · Sex identification

The knowledge of population size, sex ratio, kinship or distribution of free-ranging wildlife is critical to achieve effective conservation strategies. Sex determination using

non-invasive samples has increased during the last decade due to the fact that individuals are not disturbed and samples are easily recollected (Kohn et al. 1999; Lucchini et al. 2002; Dallas et al. 2003; Bellemain et al. 2007). However, the use of non-invasive samples increases the risk of sample contamination and amplification failure due to the low quality and quantity of DNA (Taberlet et al. 1996). For that reason we have used a new technique to improve molecular sexing from non-invasive samples of wolf which uses specific redesigned sex-primers that amplify short products located both on the X- (ChrX) and Y- (ChrY) chromosomes. In contrast to previous methods of sexing wolves, we have used a nuclear locus as a positive control instead of a mtDNA cytochrome b region (Scandura 2005) and a fragment of the *DBY* (DEAD box polypeptide, Y) gene (Seddon 2005) that is shorter than the *ZFY* fragment (Lucchini et al. 2002). Furthermore, a combination of a semi-nested PCR (Ulrich et al. 1993) with a multiplex preamplification method (Bellemain and Taberlet 2004) and several replicated amplifications per sample (multi-tubes approach; Taberlet et al. 1996) have been applied to increase amplified DNA quantities and to decrease scoring errors in low copy-number DNA samples (Dewoody et al. 2006; Scandura et al. 2006; Valière et al. 2007). Finally, redesigned sex-primers have been tested not only in faeces (Seddon 2005) but in other non-invasive wolf tissues.

In order to develop sex-primers and to optimize PCR conditions, DNA was isolated from invasive wolf samples of known sex, as blood and muscular tissue. Once optimized, we analysed the sex of 84 forensic samples of known sex and 69 of unknown sex. The wolf samples such as teeth, hair, urine on snow and faeces were found in the Pyrenees Mountains (Spain) or collected from skulls of a Russian Wolf Collection, and saliva and urine samples

N. Sastre (✉) · O. Francino · A. Sánchez · O. Ramírez
Servei Veterinari de Genètica Molecular, Departament de
Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària,
Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra,
08193 Barcelona, Spain
e-mail: nj.sastre@gmail.com

G. Lampreave · J. M. López-Martín
Direcció General del Medi Natural, Departament de Medi
Ambient i Habitatge, Generalitat de Catalunya, Dr Roux 80,
08017 Barcelona, Spain

V. V. Bologov
Central Forest State Natural Biosphere Reserve, P/o Zapovednik,
Nelidovskij rajon, 172513 Tverskaja Oblast, Russia

were taken from dogs. Table 1 shows DNA extraction methods from the different tissues. Negative controls were included in all extractions in order to detect exogenous DNA contamination. Sample extractions were performed on different days for each type of tissue, and carried out in a room dedicated to genomic samples. All the PCR reactions were prepared under a laminar flow.

To redesign sex-primers we used the primer pair DBY5 (Hellborg and Ellegren 2003), that amplify the intron 5 of *DBY* gene in wolf, and the primer pair AHTx40 (dog ChrX) (Spriggs et al. 2003). PCR products were sequenced by capillary electrophoresis in an ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Foster city, CA). Sequences were aligned and compared to design ChrY and ChrX specific primers. The preamplification step was performed with four external primers multiplexed in the same PCR: DBY-Fext (5'-GC AAATTTGGTTTGTAGTCACA-3')/DBY-R (5'-CCATCT CAACATCGCTGAAC-3')—AHTx40-F (Spriggs et al. 2003) /AHTx40-Rex (5'-AAAACCTGGACAGCCACATGC-3'). For the reamplification step, DBY-R and AHTx40-F were multiplexed in the same PCR with two fluorescent primers labelled with 6-FAM and HEX respectively: DBY-F (5'-T TGGGGGTGGTTTTATTGTC-3') and AHTx40-R (Spriggs et al. 2003). The ChrX fragment was employed as a positive control to detect females and possible amplification errors. The amplified ChrY fragment was shorter than the ChrX one to reduce false negatives due to the length of the product (Bérubé and Palsbøll 1996; Seddon 2005; Durmin et al. 2007), (154 vs. 230 bp for external primers, 112 vs. 190 bp for internal primers, respectively).

The preamplification PCR was prepared in a 25 µl final volume reaction containing 20 ng or 2 µl of DNA obtained from forensic samples, PCR buffer (10×), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM DBY external primers,

0.7 µM AHTx40 external primers and 1 U of AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems). PCR for the reamplification was prepared in a 25 µl reaction containing 3 µl of preamplified product or 2 µl of DNA extraction from invasive samples, and the same conditions of the preamplification step but using DBY and AHTx40 internal primers. Thermocycling profiles for external and internal PCR were 10 min at 94°C followed by 40 cycles of 94°C (30 s), 55°C (30 s) and 72°C (30 s), followed by a final extension of 10 min at 72°C. Two microlitres of PCR preamplification product were added to a 10 µl mix of Formamide and ROX 70–500 (10:0.4) (BioVentures, Murfreesboro, TN). The labelled PCR products were analyzed in an ABI PRISM 3730 and sized according to the internal size standard. Microsatellite patterns were examined with GENEMAPPER version 4.0 (Applied Biosystems). Primers were tested in a PCR containing genomic DNA from possible prey of wolves such as hen (*Gallus gallus*), wild boar (*Sus scrofa*), cow (*Bos Taurus*), sheep (*Ovis aries*) or rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Amplification products were obtained in wolf (*Canis lupus*) and dog (*Canis familiaris*) but in no other sample, being our sex-primers canid-specific.

Two PCRs without the preamplification step were performed in tooth and saliva, which are samples with *a priori* sufficient amount of DNA to determine sex (Murakami et al. 2000; Pang and Cheung 2007). The success rate identifying sex in saliva samples was 100% (Table 2). Nevertheless, genotyping errors such as DBY false alleles were observed in tooth samples using a PCR without the multiplex preamplification step, likely due to their origin (old skull collection). In order to compare the results between PCR and semi-nested PCRs, we carried out two semi-nested PCRs using tooth and hair samples of known sex. The success rate identifying sex in hair samples was

Table 1 Extraction methods depending on the tissue

Tissue	Conservation	Sample preparation	Protocol extraction	Final volume
Teeth	−20°C	Wash tooth surface in dilute bleach with sterile distilled water for 15 min. Cut transversally the tooth with an electric dental micromotor to extract dental pulp tissue.	Iudica et al. (2001)	60 µl
Faeces	−20°C or ethanol−96°	Dry fresh samples 2 h at 56°C.	QIAamp DNA Stool® kit (Qiagen, Hilden, Germany)	60 µl
Hair follicles	−20°C or ethanol−96°	–	Pfeiffer et al. (2004)	60 µl
Saliva (on swabs)	−20°C	–	BuccalAmp DNA extraction kit (Epicentre, Madison, Wisconsin)	60 µl
Urine (on snow)	−20°C	–	High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland)	60 µl
Blood	−20°C	–	Amills et al. (2005)	–
Muscle	−20°C or ethanol−96°	–	Sambrook et al. (1989)	–

Table 2 Results of sex genotyping with invasive and non invasive samples from wolves

	Sex known						Sex unknown			
	n	CI-F	CI-M	AS-AHTx40 (%)	DBY-ADO (%)	FA (%)	n	CI-F	CI-M	AS-AHTx40 (%)
<i>Two steps PCR (semi-nested)</i>										
Faeces	8	2/2	6/6	86.25	14.17	0	39	0	37	75.94
Hairs	19 ^a	11/11	8/8	94.74	0	0	2	0	2	100
Urine	10 ^b	2/5	5/5	60	0	0	2	0	1	50
Teeth	20/31	7/7	12/13	87.50	12.5 ^c	0	16/26	6	8	81.25
Total	57	88%	97%	82%			59			75%
<i>One step PCR</i>										
Teeth	31	9/12	19/19	85.48	2.63 ^c	9.09	26	9	14	75
Saliva	16 ^b	7/7	9/9	100	0	0				
Blood	19	12/12	7/7	100	0	0				
Muscle	19	8/8	11/11	100	0	0				

n, Number of samples; CI, Correct female (F) and male (M) identifications; AS, Amplification success sexing by AHTx40 (n° successful PCR amplifications/n° of performed PCR amplifications); DBY-ADO, allelic dropout (n° of detected DBY dropout with 4–6 replicates/n° of males); FA, False allele (n° of detected DBY allele/n° of females). Samples from ^a captive wolves and ^b domestic dogs. ^c Two semi-nested PCRs were performed using tooth samples

100%. In tooth samples, no false alleles were obtained but DBY allelic dropout was still observed (Table 2).

The way to decrease the rate of allelic dropout is to increase the number of replicates per sample. For that reason, between four and six replicates of the semi-nested PCRs were performed for each faecal, urine and (unknown sex) hair samples. The rate of false negative was estimated as the proportion of PCR performed in which a DBY fragment was undetected in male samples (AHTx40 dropout in male samples was detected but not taken into account because this error did not interfere with the results). The rate of false positive was estimated as the proportion of PCR assays in which a DBY fragment was detected in female samples. We scored sex as male when the DBY fragment was detected at least twice and as female when only the AHTx40 fragment was detected at least three times, otherwise, sexing was considered as unsuccessful (Sugimoto et al. 2006).

After the analysis of the results, we recommend doing a semi-nested PCR to avoid false alleles and four replicates per non-invasive samples since this number was enough to achieve adequate sexing in urine and faecal samples. Our success rate identifying sex was 93%, being one of the highest obtained from wild animals using low quantity DNA samples. In Otters, the success rate varies between 20% (Dallas et al. 2003) and 79% (Mucci and Randi 2007). In the Coyote, Siberian Tiger, Amur Leopard or Wolverine this percentage is lower than 50% (Kohn et al. 1999; Valière and Taberlet 2000; Sugimoto et al. 2006) and approximately 90% in Giant Panda and Fox (Zhan et al. 2006; Smith et al. 2006). In Wolves, percentages vary between 64% and 88% (Lucchini et al. 2002; Scandura 2005; Seddon 2005).

Our newly developed protocol is an efficient and simple method for determining sex of wild wolves. Thus, this essential non-invasive genetic data could be used to achieve effective conservation strategies with samples easily collected and without disturbing wild individuals.

Acknowledgements We are grateful to the personnel from the Central Forest National Reserve (Zapovednik, Russia) for supplying tissue and tooth samples from wolves. We thank “Servei de Protecció de la Fauna, Flora i Animals de Companyia”, “Area d’ Activitats Cinegètiques”, “Guardes de Reserva de Fauna”, “Parc Natural del Cadí-Moixeró” “Forestal Catalana S.A” and “Servei de Diagnòstic Serològic de Leishmania - Servei d’Anàlisi de Fàrmacs, UAB” for making available faecal, urine and hair samples from wolves and dogs. Thanks are due also to Gary Walker for linguistic revision.

References

Amills M, Vidal O, Varona L, Tomàs A, Gil M, Sánchez A, Noguera JL (2005) Polymorphism of the pig 2,4-dienoyl CoA reductase 1 gene (*DECRI*) and its association with carcass and meat quality traits. *J Anim Sci* 83:493–498

Bellemain E, Taberlet P (2004) Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Mol Ecol* 4:519–522

Bellemain E, Nawaz MA, Valentini A, Swenson JE, Taberlet P (2007) Genetic tracking of the brown bear in northern Pakistan and implications for conservation. *Biol Conserv* 134:537–547

Bérubé M, Palsbøll PJ (1996) Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Mol Ecol* 5:283–287

Dallas JF, Coxon KE, Sykes T, Chanin PRF, Marshall F, Carss DN, Bacon PJ, Piertney SB, Racey PA (2003) Similar estimates of population genetic composition and sex ratio derived from carcasses and faeces of Eurasian otter *Lutra lutra*. *Mol Ecol* 12:275–282

Dewoody J, Nason JD, Hipkins VD (2006) Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Mol Ecol* 6:951–957

- Durnin ME, Palsbøll PJ, Ryder OA, McCullough DR (2007) A reliable genetic technique for sex determination of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) from non-invasively collected hair samples. *Conserv Genet* 8:715–720
- Hellborg L, Ellegren H (2003) Y chromosome conserved anchored tagged sequences (YCATS) for the analysis of mammalian male-specific DNA. *Mol Ecol* 12:289–291
- Iudica CA, Whitten WM, Williams NH (2001) Small bones from dried mammal museum specimens as a reliable source of DNA. *Biotechniques* 30:732–736
- Kohn MH, York EC, Kamradt DA, Haught G, Sauvajot RM, Wayne RK (1999) Estimating population size by genotyping faeces. *Proc R Soc Lond* 266:657–663
- Lucchini E, Fabbri E, Marucco F, Ricci S, Boitani L, Randi E (2002) Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Mol Ecol* 11:857–868
- Mucci N, Randi E (2007) Sex identification of Eurasian otter (*Lutra lutra*) non-invasive DNA samples using ZFX/ZFY sequences. *Conserv Genet* 8:1479–1482
- Murakami H, Yakamoto Y, Yoshimote K, Toshiaki O, Okamoto O, Shigeta Y, Doi Y, Miyaishi S, Ishizu H (2000) Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. *Acta Med Okayama* 54(1):21–32
- Pang BCM, Cheung BKK (2007) Double swab technique for collecting touched evidence. *Legal Med* 9:181–184
- Pfeiffer I, Völkel I, Täubert H, Brenig B (2004) Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Sci Int* 141:149–151
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Scandura M (2005) Individual sexing and genotyping from blood spots on the snow: a reliable source of DNA for non-invasive genetic surveys. *Conserv Genet* 6:871–874
- Scandura M, Capitani C, Iacolina L, Marco A (2006) An empirical approach for reliable microsatellite genotyping of wolf DNA from multiple non-invasive sources. *Conserv Genet* 7:813–823
- Seddon JM (2005) Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conserv Genet* 6:147–149
- Smith DA, Ralls K, Hurt A, Adams B, Parker M, Maldonados E (2006) Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. *Mol Ecol* 15:387–406
- Spriggs HF, Holmes NG, Breen M, Deloukas P, Langford CF, Ross MT, Carter NP, Davis ME, Knights C, Smith A, Farr CJ, McCarthy LC, Binns MM (2003) Construction and integration of radiation-hybrid and cytogenetic maps of dog Chromosome X. *Mamm Genome* 14:214–221
- Sugimoto T, Nagata J, Aramilev VV, Belozor A, Higashi S, McCullough DR (2006) Species and sex identification from faecal samples of sympatric carnivores, Amur leopard and Siberian tiger, in the Russian Far East. *Conserv Genet* 7:799–802
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 24:3189–3194
- Ulrich PP, Romeo JM, Daniel LJ, Vyas GN (1993) An improved method for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma utilizing heminested primers and internal control RNA. *PCR Methods Appl* 2:241–249
- Valière N, Taberlet P (2000) Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Mol Ecol Notes* 9:2150–2152
- Valière N, Bonenfant C, Toïgo C, Luikart G, Gaillard JM, Klein F (2007) Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling: genotyping errors and population size estimation in red deer. *Conserv Genet* 8:69–78
- Zhan X, Li M, Zhang Z, Goossens B, Chen Y, Wang H, Bruford MW, Wei F (2006) Molecular censusing doubles giant panda population estimate in a key nature reserve. *Curr Biol* 16:R451–R452

3.3 El lobo vuelve a Cataluña

EL LOBO VUELVE A CATALUÑA: historia del regreso y medidas de conservación



Como en la mayor parte de Europa, el lobo fue antaño común en Cataluña. Pero se extinguió entre finales del siglo XIX y principios del XX. Durante cerca de cien años no volvió a haber lobos. Finalmente, ha reaparecido en las montañas pirenaicas y, de forma sorprendente, hemos constatado que no proviene del núcleo ibérico, sino de las poblaciones en expansión de Italia y el sureste de Francia.

por Gabriel Lampreave, Jordi Ruiz-Olmo, Jordi García-Petit, Josep María López-Martín,
Alain Bataille, Olga Francino, Natalia Sastre y Oscar Ramírez



Pirineo de Lleida hasta 1940. Los datos seguros más evidentes se sitúan en los Puertos de Tortosa en 1928, ya que se conservan las pieles de dos ejemplares en el Museo de Ciencias Naturales de Barcelona. Diversas razones explican su desaparición, ya que se prolongó durante unos ochenta años, entre ellas la disminución de sus presas salvajes y la extensión del uso de veneno y armas de fuego después de las guerras de la Independencia y Civil.

Son muy ilustrativas las detalladas estadísticas de lobos capturados en los antiguos Corregimiento y Partido de Girona, así como en el municipio de Lleida, que antaño era mucho más amplio que el actual (1). Se estima la captura de un mínimo de 0'6-0'8 lobos al año por cada 100 kilómetros cuadrados en los periodos 1722-1739 y 1788-1799. Estos valores —que incluyen tanto ejemplares adultos como una gran cantidad de subadultos y lobatos— eran elevados si tenemos en cuenta que la densidad media de lobos adultos en poblaciones saludables actuales se sitúa en torno a los dos individuos por la misma unidad de superficie. Sin embargo, en 1788-1852 el promedio anual ya había descendido a 0'2 lobos en el Partido de Girona. Si nos atenemos únicamente a los adultos, en Cataluña se capturaron anualmente unos 0'1-0'35 lobos durante el siglo XVIII y unos 0'05 entre finales del siglo XVIII y mediados del siglo XIX.

Los lobos estaban bien repartidos y su abundancia era comparable a la de los lugares donde hoy en día son comunes. Pero dejaron de existir en Cataluña durante décadas y la especie cayó en el olvido. Durante este lapso de tiempo el paisaje fue modificado y también cambiaron las actividades en el medio rural. Sorprendentemente, en 2004 se confirmó su reaparición en Cataluña después de que algunos sospecharan su presencia desde el año 2000: teníamos excrementos congelados cuyo análisis arrojó resultado positivo. En el Pirineo francés ya se sabía de su retorno en 1999.

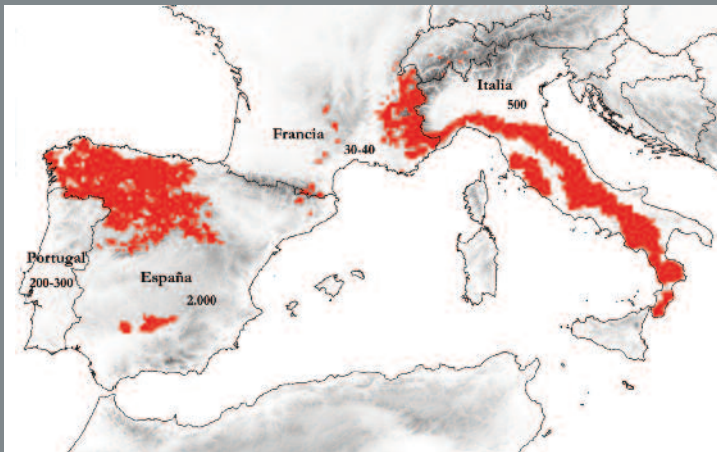
Zona frecuentada por el lobo en Cataluña (foto: Jordi Ruiz-Olmo).

Lobo avistado en la sierra del Cadí (foto: Gabriel Lampreave).

El lobo (*Canis lupus*) habitó en todo el territorio de Cataluña y llegó a sobrevivir en algunas zonas hasta principios del siglo XX. Ya en el siglo XVIII Francisco de Zamora comentaba que es "... la especie de la gran fauna más citada en las respuestas a los cuestionarios y con una distribución territorial más amplia" (1, 2). Durante el siglo XIX aún vivía en los alrededores de la ciudad de Barcelona y aparece citado por Manent en varias zonas de Tarragona y Girona hasta 1900-1920 (1). Es más, tenemos constancia de algún ejemplar aislado en el

Cuadro 1

Distribución del lobo en el suroeste de Europa



Mapa de distribución de las poblaciones de lobo en el suroeste de Europa, incluidos los datos correspondientes a Cataluña que se analizan en el presente artículo. Los datos sobre distribución están representados en cuadrículas UTM de 10 kilómetros de lado y proceden de diversas fuentes (9, 10, 11).

¿De dónde proceden?

Una vez conocida su presencia, la principal duda que nos asaltó fue: ¿de dónde vienen? Evidentemente pensamos en los lobos ibéricos. Llevábamos décadas mirando hacia el sistema Ibérico y los Pirineos occidentales esperando que la entrada procediese de allí. Pero los análisis genéticos de pelos, excrementos, orina y otras muestras han sido una potentísima herramienta para comprobar que, en biología de la conservación, lo esperable, lo lógico e inmediato, lo aparente, a menudo no es cierto. La ocasión permitió poner en contacto al equipo de la Generalitat de Ca-

Rastro de lobo en una ladera nevada de Cataluña (foto: Gabriel Lampreave).



taluña y al Servicio Veterinario de Genética Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. En primer lugar, hacía falta confirmar que se trataba de lobos. Dado que el perro tiene su origen en la domesticación del lobo hace entre 15.000 y 100.000 años, necesitábamos utilizar un marcador genético muy informativo para diferenciarlos.

En todos los animales encontramos dos tipos de ADN: el nuclear (ADNn) y el mitocondrial (ADNm), mucho más pequeño y de origen materno. Los análisis de ADNm (3) han demostrado que en Europa occidental los haplotipos son exclusivos de perro o de lobo. Hasta hoy, hemos analizado 151 muestras recogidas en los Pirineos catalanes entre 2000 y 2009, con el siguiente resultado: el 45% correspondieron a lobo, el 47% a perro, el 6% a otras especies y el 2% restante no se pudo establecer. Todas las muestras de lobo incluían el haplotipo W4, exclusivo de las poblaciones de lobo de la estirpe italo-francesa (*C.l. italicus*) y diferente de los cuatro haplotipos presentes en la población ibérica (*C.l. signatus*).

A diferencia de las interpretaciones que hizo la prensa a partir de una nota nuestra, los lobos no eran nacidos en Italia. Su origen es, en efecto, la población italiana, pero sus ancestros



de pelaje más típico de lobos más boreales, nos planteamos si eran en verdad lobos y si habían llegado de forma natural o ayudados por el hombre (reintroducidos ilegalmente o escapados de algún núcleo zoológico). El ADN_m se transmite de abuelas y madres a hijas y nietas, de manera que no podíamos descartar totalmente que fueran híbridos con lobas como abuelas o tatarabuelas.

Pese a que nuestra estrategia de comunicación ha mantenido siempre un canal abierto con los medios informativos y los ganaderos sobre las novedades que iban surgiendo, esta duda postergó toda nuestra difusión científica y divulgativa, a pesar de que teníamos preparado el artículo desde hace casi dos años. Por esta razón, podemos entender que a veces se produjeran imprecisiones. En el cuaderno 291 de *Quercus*, Andrés Requejo y Jorge Echegaray lanzaban la primicia de que el lobo había reaparecido en Cataluña tras un siglo de ausencia, aunque en la misma nota reconocen que el hecho ya había sido divulgado por la Generalitat anualmente desde 2004 (5). La nota reproduce parte de la información que ofrecimos a la prensa y propone una serie de medidas que ya se han iniciado, como se verá más adelante. El rigor científico nos obligaba a confirmar, en primer lugar, que no sólo las madres o las abuelas eran lobas, sino que los ejemplares presentes en los Pirineos pertenecían a dicha especie y no eran híbridos. Y, en segundo lugar, a confirmar mediante el ADN_n que eran lobos procedentes de la población franco-italiana.

Se estableció el genotipo de la misma secuencia de microsatélites (6) utilizada para individualizar tanto a los lobos catalanes como a 48 razas de perros, a los lobos de la estirpe italiana (15 ejemplares escogidos para que representasen la máxima variabilidad genética, procedentes de Suiza, Italia y Francia), a los lobos ibéricos (22 ejemplares) y a algunos representantes de la población septentrional (25 lobos rusos). Los resultados confirmaron que eran efectivamente lobos, que procedían de la estirpe italo-francesa y que no habían sufrido ningún proceso de hibridación.

Lobo ante un grupo de rebecos en la zona del Carlit, perteneciente al departamento francés de los Pirineos Orientales (foto: Christophe Laubier / ONCFS).

más cercanos son los lobos franceses de la zona de los Alpes Marítimos o de Suiza y otros que se fueron dispersando hasta alcanzar el Macizo Central francés y los Pirineos orientales (4). En el mapa del Cuadro 1 se comprueba que, si bien una visión limitada a las fronteras podría hacernos pensar sólo en los lobos ibéricos como posibles recolonizadores de los Pirineos, un enfoque más biogeográfico muestra que ambas zonas son igualmente probables si nos atenemos a la distancia que las separa. El rápido paso del lobo por Francia seguramente se ha visto favorecido por su catalogación legal como especie protegida.

Una duda razonable: ¿son realmente lobos?

El seguimiento del lobo a ambos lados de la frontera ha permitido obtener fotos de ejemplares con un aspecto (fenotipo) típico del sur de Europa. Sin embargo, las fotos y las observaciones de dos de los ejemplares de la sierra del Cadí mostraban un patrón de pelaje poco mediterráneo, lo que disparó las dudas sobre si eran lobos o híbridos. Además, uno de ellos vivió unos meses en compañía de una perra abandonada que fue sacrificada para evitar que hibridaran. Viendo que tenían un patrón



Recogida de excrementos de lobo para su posterior análisis genético (foto: Joan Alàs).

Cuadro 2

El lobo en los Pirineos franceses

El lobo reapareció en el sureste de Francia en 1992, concretamente en los Alpes, tras la llegada de ejemplares procedentes de la población italiana. Desde allí ha recolonizado todos los departamentos del arco alpino.

La tendencia actual sigue siendo positiva, con un aumento medio anual del área de distribución del 27%. El seguimiento de la especie corresponde a la Oficina Nacional de Caza y Fauna Salvaje (ONCFS), estamento público que depende de los ministerios de Medio Ambiente y Agricultura. Sus principales objetivos son intentar determinar la ocupación del territorio y el crecimiento numérico (censo de manadas, reproducción) y, a su vez, comprobar y cuantificar los daños a la ganadería para su posterior indemnización.

Para acometer estas tareas se ha creado la Red Lobo, que agrupa a personas de sectores muy diversos, como técnicos de la Administración ambiental, naturalistas, ganaderos y cazadores. Dicha red recoge todos los indicios posibles sobre la presencia de lobos, ya sea de forma oportunista o a través de un protocolo estricto (rastreo en nieve, sesiones de aullidos provocados) en las “zonas de presencia permanente” de la especie. Los criterios para definir estas zonas son la presencia de lobos durante dos inviernos consecutivos y su confirmación mediante análisis genéticos.

A partir de 1997 y 1998 empezaron a detectarse lobos en el Macizo Central y finalmente llegaron a la parte oriental del Pirineo en 1999. Como en Cataluña, todos esos lobos tienen el mismo origen: la población lobera italiana. En los Pirineos (la mayor parte de los datos proceden del Departamento de los Pirineos Orientales), el lobo ha estado presente desde 1998 hasta 2001 en el macizo de Madres. Más tarde fue detectado en los macizos de Carlit-Peric y Canigó. Hasta la fecha, se han recogido veinte muestras genéticas positivas y se han identificado cuatro individuos diferentes, tres machos y una hembra.

De Italia a los Pirineos

Un macho detectado el año 2003 en el macizo de Carlit había sido identificado genéticamente en 2002 en el Queras (Alpes centrales). Otro macho identificado en 2007 también en Carlit, había sido identificado en 2006 en Haute Tinée (Alpes meridionales). Finalmente, un ejemplar detectado en el 1997 en Vesubie-Tinée (Alpes meridionales) fue el lobo identificado en el Cadí (Pirineo catalán) en el año 2000. Todos estos datos explican perfectamente su origen y los desplazamientos Alpes-Pirineos (como también ha ocurrido en el Macizo Central francés), aunque no el modo en que lo hacen.

Al igual que en la vertiente sur de los Pirineos, hasta la fecha no se ha detectado ninguna manada, situación que parece confirmarse por los escasos daños causados a la cabaña ganadera. Entre 2005 y 2009 se han realizado ocho peritajes, cinco de los cuales se saldaron con indemnizaciones a daños causados por el lobo.

A partir de la reaparición de la especie, todo el seguimiento se ha hecho de forma conjunta entre la ONCFS y la Generalitat de Cataluña. A partir de 2004 se ha establecido una colaboración más formal a través de reuniones periódicas para intercambiar información y acordar todo lo referente al seguimiento. Actualmente se utilizan los mismos protocolos, se recogen los datos en las mismas fichas, se ponen en común en una única base de datos, se intentan organizar de forma simultánea las salidas al campo y se ha conseguido unificar la metodología de los laboratorios que hacen los análisis genéticos de las muestras; aspecto que incluye también a nuestros colegas italianos y suizos.



Si nos fijamos en el pelaje de los dos ejemplares con apariencia más boreal (ambos tienen máscara), veremos que no hay duda de que son fenotípicamente lobos. Incluso tienen la mancha negra longitudinal en las patas anteriores que se ha venido utilizando como rasgo diagnóstico del lobo ibérico (*C.l. signatus*). Es decir, estos dos ejemplares (no todos los detectados en los Pirineos orientales) tienen algún carácter compartido con los lobos de la taiga o de la tundra norteamericana o siberiana. Y este fue el motivo de las dudas, que ahora sabemos que eran injustificadas. Nuestros lobos han pasado por diversos cuellos de botella genéticos y la población italiana estuvo al borde de la extinción. Su escaso número, sumado al aislamiento geográfico, ha causado una pérdida de variabilidad por deriva genética. Ello explicaría por qué todos los lobos de origen italiano tienen un único haplotipo (W4). La deriva genética es un proceso azaroso que actúa sobre las poblaciones alterando la frecuencia de alelos y produciendo cambios que no son necesariamente adaptativos. La máscara del lobo podría ser uno de estos rasgos.

Pero hay más datos que confirman los resultados anteriores. Como mínimo tres de los lobos ya habían sido detectados en los Alpes Marítimos y en los Pirineos, dos en la vertiente francesa y uno en la catalana. Lo que también demuestra el movimiento de los animales entre ambos macizos montañosos (Cuadro 2).

Situación actual

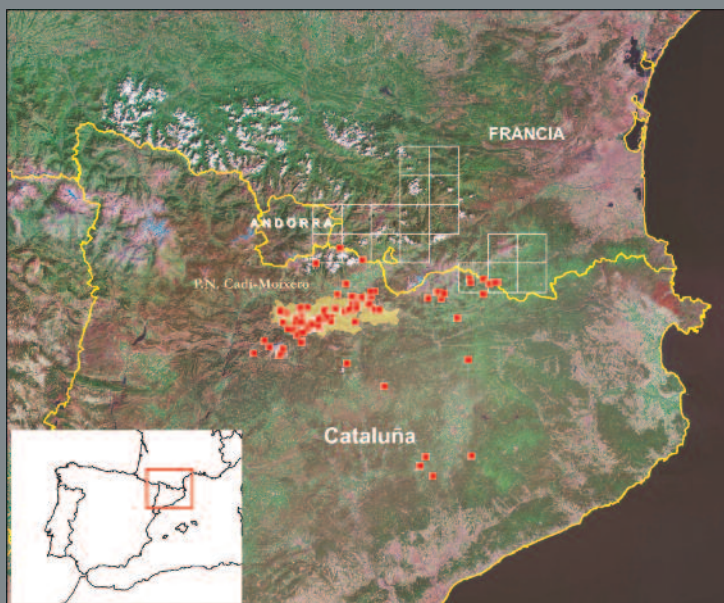
El lobo ha estado presente en Cataluña de forma regular desde el año 2000 hasta la actualidad. Tras confirmar genéticamente su presencia en 2004 se inició un seguimiento mediante diferentes métodos, como la búsqueda y comprobación de indicios, observaciones y daños al ganado y depredaciones sobre ungulados salvajes. También se emprendieron itinerarios invernales (en busca de rastros), esperas, trampeos fotográficos, sesiones de aullidos provocados para comprobar posibles

Las cumbres gemelas de Pedraforca (2.497 y 2.491 m), punto culminante del Parque Natural de Cadi-Moixeró (foto: José Luis Gómez de Francisco).



Cuadro 3

Presencia de lobos en Cataluña desde el año 2004



Los cuadrados rojos indican las localizaciones de los datos que confirman la presencia de lobos en Cataluña. También aparecen reflejadas del mismo modo las dos incursiones hacia el Moianés en 2003 y 2004, y hacia Osona en 2007-2008. Las cuadrículas blancas de mayor tamaño muestran la distribución del lobo en la vertiente francesa del Pirineo.

reproducciones (sin éxito hasta la fecha) y análisis genéticos de las muestras recogidas.

El lobo ocupa unos 1.400 kilómetros cuadrados en el macizo del Cadí y otras sierras limítrofes repartidas por las comarcas del Alt Urgell, la Cerdaña, el alto Solsonès, el alto Berguedà y el alto Ripollès (Cuadro 3). Toda esta zona mantiene una continuidad geográfica con el área de presencia de lobo en los departamentos franceses de la Cataluña norte. En general, se trata de espacios naturales protegidos incluidos en el Parque Natural del Cadí-Moixeró, en la red europea Natura 2000, en el *Plan de espacios de interés natural* y en las reservas nacionales de caza de Cadí, Cerdaña-Alt Urgell y Freser-Setcases. En estos territorios son abundantes el rebeco, el corzo, el jabalí y la liebre, con puntos donde también se registran altas densidades de muflón y ciervo. Además, muchos de estos parajes mantienen asimismo una importante cabaña ganadera, estante y trashumante.

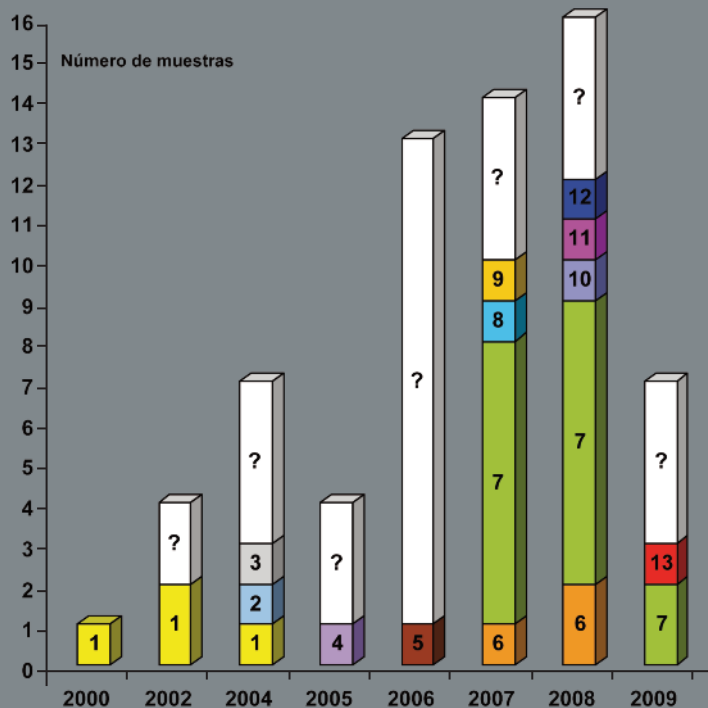
Sin embargo, disponemos de unos pocos datos en otras comarcas de Cataluña que demuestran incursiones de muy corta duración (unas semanas) siguiendo las sierras que discurren hacia el sur. Entre ellas destacan dos zonas: una hacia el Moianés, comarcas del Bages y del Vallès Oriental, en 2002, 2003 y 2010, en una zona muy ganadera donde los lobos llegaron a matar al menos un ternero y algunas cabezas de ovino (confirmado); y otra en el invierno de 2007-2008, hacia otra zona con ganadería al sur de las Guilleries, en la comarca de Osona. Son trayectos de 70 y 86 kilómetros en línea recta desde la zona de máxima frecuencia de datos confirmados.

Hasta trece lobos distintos

Hemos utilizado nueve microsátélites muy polimórficos en el ADNn, de un banco de más de veinte seleccionados en la literatura científica para otras poblaciones de lobo y razas de perro (7, 8). Pues bien, hasta la fecha se han individualizado genéticamente 13 lobos distintos (Cuadro 4). Algunos animales sólo se

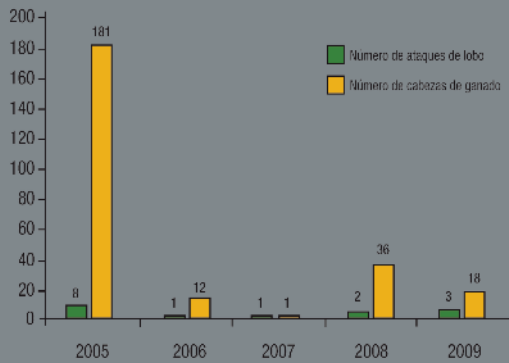
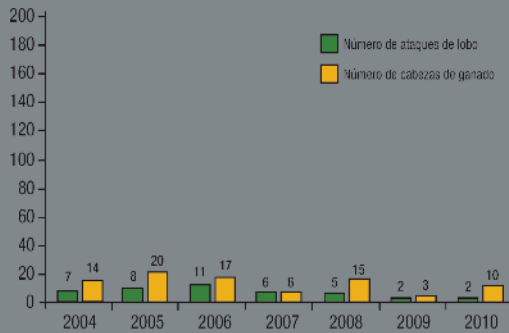
Cuadro 4

Trece lobos identificados genéticamente



Resultados de la identificación individual de las muestras de lobo, mediante análisis del ADN nuclear (microsátélites), desde el año 2000 hasta principios del 2010. Destacan los ejemplares CL01 encontrado entre 2000 y 2004, CL06 en 2007 y 2008, y CL07 entre 2007 y 2010.

Cuadro 5
Daños de lobos y perros
al ganado en Cataluña



Número de cabezas de ganado muertas por lobos y perros en Cataluña desde la detección de la especie salvaje.

Bajo estas líneas, detalle de la cabeza del primer lobo encontrado muerto en Cataluña en tiempos recientes. A la derecha, oveja devorada por un lobo en la comarca catalana del Berguedà (fotos: Cuerpo de Agentes Rurales y Gabriel Lampreave).

han detectado una vez, mientras que otros aparecen y desaparecen en diferentes años. Recordemos que los lobos se desplazan al sur de Francia y a veces llegan cerca de Andorra, fuera de nuestra zona de estudio. El número máximo de lobos distintos dentro de un mismo año se registró en 2008, con cinco ejemplares. En 2010 hemos localizado genéticamente a dos lobos diferentes como mínimo. Todos los animales son machos, a excepción de una hembra encontrada también en 2008, lo que es un patrón habitual, ya que suelen ser machos jóvenes los que se dispersan en primer lugar. Estos datos explican en par-

te por qué hasta la fecha no hay evidencias de reproducción en Cataluña.

El 5 de mayo de 2010 encontramos el cadáver de un lobo en el Cadí. Unos excursionistas vieron su cuerpo en avanzado estado de descomposición cerca de un sendero. Los análisis del pelo, el cráneo y la muela carnífera confirmaron los resultados genéticos: sin duda, se trataba de un lobo. Comenzó entonces el protocolo para casos de envenenamiento por parte del Cuerpo de Agentes Rurales y se practicó una necropsia en el Centro de Recuperación de Torreferrussa (Barcelona). No se apreciaron perdigones o fragmentos de proyectiles, ni fracturas en ninguno de los huesos. La abundante fauna necrófaga presente y el análisis toxicológico descartaron el envenenamiento. El animal no estaba desnutrido. El análisis del ADN permitió identificar al cadáver como el macho CL7, que había sido individualizado por primera vez el 10 de enero de 2007 (Cuadro 4). En estos cuatro años ocupó al menos un área de campeo de 146 kilómetros cuadrados. Además, a este lobo ya lo habíamos observado en cuatro ocasiones y fotografiado en tres.

Otro lobo parecido nos enseñó aún más cosas. Como ya se ha comentado, detectamos un lobo que vivió seis meses junto a una perra. La primera noticia la tuvimos al comprobar un ataque a un rebaño de ovejas, con indicios de consumo por lobo y perro. Hicimos varios aguardos los días siguientes y pudimos observar a un lobo macho acompañado de una perra de caza cruzada. Había un vínculo fuerte: les vimos descansar juntos, uno al lado del otro, compartir la comida, caminar en pareja, llamarse (aullando) y acudir a las llamadas, reconocerse por el olfato y lamerse la cara. A partir de ahí la guardería se las ingenió para capturar a la perra. La tarea no fue fácil y durante ese tiempo se acumularon veinte observaciones de los dos animales juntos e incluso se constataron algunos ataques a rebaños de ovejas a plena luz del día. Finalmente, una vez capturada la perra, se comprobó que no estaba preñada y que nunca había criado.

Estos datos son de interés para las poblaciones de lobo en regresión o, como es el caso, para individuos colonizadores, ya que la ausencia de lobas puede facilitar el emparejamiento y la posible hibridación con perros. Además, nos obliga a ser aún más cautos en los peritajes de daños.



Daños al ganado

El retorno del lobo resucitó el conflicto con los ganaderos. De hecho, los daños al ganado fueron las primeras señales que hicieron sospechar su presencia. En una fase inicial, entre 1997 y 2004, los datos se obtuvieron dialogando directamente con los ganaderos, pero ni son oficiales ni están comprobados. Todos ellos proceden del Parque Natural del Cadí-Moixeró y, según los pastores, se produjo la pérdida de hasta 557 cabezas de ovino y caprino. Aunque el promedio anual fue de unas 80 cabezas, en algún año se superaron las 200. Durante este periodo aún no se habían adoptado las medidas preventivas para evitar daños que hoy en día ya se vienen aplicando. Esta falta de aceptación no hizo más que encender los ánimos de los ganaderos afectados. La comprobación genética marcó un punto de inflexión. Con un pequeño equipo especializado y en contacto permanente, se empezó a trabajar con los ganaderos, comprobando e indemnizando los ataques e impulsando diversas medidas de prevención. Gracias a tal esfuerzo, ese año sólo se contabilizaron 7 ataques de lobo, con un balance de 14 cabezas de ganado afectadas. La tendencia ha ido reduciéndose en estos últimos años hasta cifrarse en sólo 3 cabezas en 2009 y 10 en 2010 (Cuadro 5).

Esta última pérdida no se produjo en la zona de presencia del lobo en los Pirineos, sino a consecuencia de su incursión en el Vallès Oriental, donde no se le esperaba. En total, gracias a las medidas de protección adoptadas, los lobos sólo han sido responsables de la muerte de 81 reses en los Pirineos durante estos siete años, todas de ovino y caprino, a excepción de un ternero.

Un resultado muy interesante de nuestros peritajes se produjo en 2005. En la zona del Cadí y sus sierras limítrofes (con gran disponibilidad de rebeco, corzo, jabalí y liebre) se produjeron 15 ataques (Cuadro 5). Ocho fueron protagonizados por perros (181 ovejas muertas, heridas o desaparecidas) y siete por lobos (14 reses). Sin nuestra inspección, todas las víctimas se habrían endosado al lobo. En esta zona, los perros han matado entre 2 y 18 veces más cabezas de ganado que los lobos: 1'9 cabezas por ataque de lobo y 16'5 por ataque de perro. No obstante, también es cierto que aún no puede hablarse de una población estable de lobos. Hay que destacar asimismo que los ataques de perros al ganado han ido disminuyendo a lo largo del tiempo, hecho congruente con la presencia de más ejemplares de lobo y de forma continuada. Un detalle a destacar es que los ganaderos ya no reclaman los daños producidos por los perros cuando saben con certeza que han sido éstos los culpables.

En realidad, el éxito del control de daños radica en aplicar las medidas de prevención clásicas, como la vigilancia con mastines y la protección de los rebaños en vallados. Es-



tas medidas ya funcionan en otros lugares, pero las aplicamos con una atención especial en las zonas afectadas. Hasta la fecha se han entregado 22 perros de protección de la raza Montaña de los Pirineos (a través de la Asociación del Perro de Protección de Rebaños, que pertenece al Club Español del Perro de Montaña de los Pirineos) y se han instalado cuatro vallados temporales, cuatro móviles y uno fijo.

Mastín cedido a un ganadero dentro del programa de prevención de ataques del lobo (foto: Gabriel Lampreave).

Otras actuaciones en apoyo de la ganadería

Pero el programa de medidas no termina aquí. Si hay un sector que padece la convivencia con el lobo, ese es sin duda el ganadero. Entre lobos y ganado siempre habrá conflicto y esta premisa hay que tenerla muy presente en la gestión de la especie. Nuestra atención se ha dedicado sobre todo a mantener una estrecha relación con los ganaderos a través de canales de comunicación abiertos. Se han establecido reuniones periódicas (con un mínimo de dos al año, en primavera y en otoño) con los ganaderos que han sufrido ata-

Reunión regular con ganaderos afectados por los ataques del lobo a sus rebaños (foto: Joan Alàs).





Caseta para pastores instalada de forma provisional dentro del programa de prevención de ataques del lobo (foto: Gabriel Lampreave).

ques, donde se discuten necesidades y medidas para mejorar y facilitar su actividad, así como para reducir y tramitar los daños.

En estas reuniones también se proporciona a los ganaderos toda la información disponible sobre la especie y los daños producidos, con una total claridad. Para nosotros la transparencia es la base de la confianza y una forma de que no se originen distorsiones de la realidad. Entre estas medidas cabe destacar las siguientes: adecuación de pistas forestales para mejorar el acceso a las zonas de pasto, recuperación de fuentes, instalación de abrevaderos, mejora de infraestructuras ganaderas, instalación de dos casetas-refugio de madera, cesión temporal de emisoras de radio, reconstrucción de un corral, ayuda en la localización de animales perdidos y soporte y asesoramiento en la tramitación de los documentos.

Educación, formación y participación

La presencia del lobo en el Parque Natural del Cadí-Moixeró nos llevó a plantear la necesidad de promover una campaña de divulgación y sensibilización. Durante el curso 2007-08 se elaboró un innovador material didáctico, *L' Udol* ("El Aullido"), encargado a la Asocia-

Cercado construido para proteger al ganado de los ataques del lobo (foto: Gabriel Lampreave).



ción Sours. Los objetivos que persigue son conocer mejor al lobo y su papel biológico, desmitificarlo, relacionarlo con el patrimonio cultural y tomar conciencia de su estado de conservación y su problemática social. Una monitora especializada ha trabajado en las escuelas del parque natural y su entorno, con tres sesiones en clase y una cuarta en los alrededores para desarrollar conceptos como territorialidad o interacción de grupos. Hasta 2009 han participado 1.174 alumnos, desde el primer ciclo hasta la ESO, pertenecientes a 44 centros educativos. Las encuestas realizadas demuestran un elevado grado de satisfacción.

Por otro lado, desde hace dos años el Parque Natural del Cadí-Moixeró, conjuntamente con el Consorcio Turístico de l'Alt Berguedà, algunos ayuntamientos del parque (Saldes, Gósol y Gisclareny), el Consejo Comarcal del Berguedà y la Diputación de Barcelona, organiza actividades didácticas para niños y adultos que acuden a hacer turismo en la zona, aprovechando el mismo material de *L' Udol*. Habría que remarcar asimismo que en el año 2010 se diseñó un juego de ordenador sobre el lobo.

En noviembre de 2009 organizamos (Generalitat de Catalunya, Consorcio Turístico de l'Alt Berguedà, Consejo Comarcal del Berguedà y Ayuntamiento de Saldes) unas jornadas técnicas sobre la coexistencia entre gran fauna, ganadería y turismo. Además de reunir a 92 personas de los diferentes ámbitos (científico, ganadero, turístico, conservacionista y vecinal), uno de sus aciertos fue convocarlas en el corazón de una de las zonas más utilizadas por el lobo. Estas jornadas favorecieron un acercamiento entre los diferentes sectores y colectivos que convergen en la montaña.

Sólo una información actualizada y transparente sobre la presencia del lobo, sus conflictos y sus beneficios, puede contribuir a que sea posible su convivencia con los humanos. Este trabajo pedagógico, junto al que debe desarrollarse en el futuro, es una de las apuestas más claras para lograrlo. Por ello, nos hemos desdoblado para dar charlas e impartir cursos en entidades municipales, universidades, asociaciones de ganaderos, escuelas de pastores, escuelas verdes, jornadas y congresos. También hemos colaborado con entidades privadas en la redacción y difusión de trípticos sobre el lobo (Grupo FER) y hemos asesorado a los autores de una guía (9) y de un libro aún por aparecer (Josep María Massip).

En cuanto a la formación interna, se han organizado jornadas para los agentes rurales, que actualmente participan en la red de seguimiento, y se mantiene una estrecha relación y colaboración con Castilla y León y con Francia.

El lobo en el Catálogo de fauna amenazada

La aparición del lobo en Cataluña suscitó otro problema: su clasificación legal. Especie cinegética al norte del Duero y protegida al sur de este río, Cataluña no está ni al norte ni al sur, sino bastante más al este de su nacimiento. El lobo cuenta con un número muy bajo de ejemplares y eso hace que dependa mucho de las fluctuaciones. Además, hay amenazas que ponen a la especie en peligro. Y, por supuesto, ya se extinguió una vez en Cataluña. Pero sólo debe incluirse en el *Catálogo de fauna amenazada* si cumple los correspondientes criterios técnicos y de rigor cien-

tífico. Al cumplir tales criterios, en el proyecto de decreto del nuevo *Catálogo de fauna amenazada de Cataluña* (que superó el trámite de exposición y audiencia pública a mediados de junio de 2010) se ha incluido al lobo en la categoría de “En peligro de extinción”. La tramitación continúa y esperamos que en breve el decreto sea publicado.

El futuro del lobo en Cataluña

Los lobos aparecieron cuando nadie los esperaba y por el sitio más insospechado. Uno ya ha muerto aquí. Nos gusta pensar en ese lobo muerto como en un espíritu viajero que había nacido en algún lugar de los Alpes y llegó hasta los Pirineos para quedarse. El día en que lo recogimos, observando su cuerpo sin vida, no pudimos resistirnos a reparar en sus desgastadas almohadillas plantares, que tantas veces habíamos visto impresas en la nieve o el barro, e imaginar todos los lugares por donde habían pisado. Si los lobos pudiesen contárnoslo, seguramente aclararíamos una de las grandes dudas que aún nos asaltan: ¿por dónde llegan?

El lobo ha vuelto a los Pirineos catalanes un siglo después de que mantuviera poblaciones viables y lo ha hecho de forma espontánea, al abrigo de los cambios sociales y económicos que han transformado el sur de Europa. Estos lobos son la cabeza de puente de una importante población que se extiende ya desde el sur de Italia hasta Alemania, está conectada con los lobos balcánicos y llega por el sureste francés hasta el Macizo Central y los Pirineos. Son pocos, están a ambos lados de la frontera y no tienen asegurado su futuro. Podrían desaparecer por motivos muy diversos, entre ellos los de tipo azaroso. Pero no debemos olvidar que son los primeros en llegar desde esa gran población lobera del sur de Europa. Tampoco conviene ignorar a la gran población ibérica que, lentamente y no sin dificultades, también expande sus dominios. Por supuesto, cabe la posibilidad de un reencuentro entre ambas poblaciones.

Como está ocurriendo en otros muchos lugares de Europa, el lobo también acabará estableciéndose y reproduciéndose en la cadena pirenaica. No es buen momento, pues, para girar la cabeza y mirar hacia otro lado. Adquirimos una gran responsabilidad, ya que el retorno del lobo debe ser compatible con las personas que ya viven allí y pueden padecerlo. El lobo trae consigo muchas cosas buenas: turismo de naturaleza, curiosos y observadores y nueva actividad económica que, de hecho, ya exploran algunos municipios. Pero su futuro sólo podrá entenderse si trabajamos con los ganaderos codo con codo y conseguimos una coexistencia sin problemas. ☘

Bibliografía

- (1) Ruiz-Olmo, J.; Grau, J.M. y Puig, R. (1995). Llop *Canis lupus* L., 1758. En *Atlas dels grans mamífers de Catalunya i Andorra*, 136-139. J. Ruiz-Olmo y A. Aguilar (eds.). Lynx. Barcelona.
- (2) Manent, A. (2004). *El llop a Catalunya. Memòria, llegenda i història*. Pagès. Lleida.
- (3) Vià, C. y otros autores (1997). Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276: 1.687-1.689.
- (4) Valière, N. y otros autores (2003). Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation*, 6: 83-92.
- (5) Requejo, A. y Echegaray, J. (2010). El lobo aparece en Cataluña casi un siglo después de extinguirse. *Quercus*, 291: 60-61.
- (6) Falush, D.; Stephens, M. y Pritchard, J.K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7: 574-578.

- (7) Altet, L.; Francino, O. y Sánchez, A. (2001). Microsatellite polymorphism in closely related dogs. *Journal of Heredity*, 92: 276-279.
- (8) Ramírez, O. y otros autores (2006). Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conservation Genetics*, 7: 861-878.
- (9) Castellví, G. (2008). *El rastro del lobo*. Equipo Sirius. Madrid.
- (10) Blanco, J.C.; Sáenz de Buruaga, M. y Llaneza, L. (2007). *Canis lupus* Linnaeus, 1758. En *Atlas y Libro Rojo de los mamíferos terrestres de España*, 272-274. L.J. Palomo, J. Gisbert y J.C. Blanco (eds.). SECEM. Málaga.
- (11) Salvatori, V. y Linnell, J. (2005). *Report on the conservation status and threats for wolf (Canis lupus) in Europe*. Consejo de Europa. Estrasburgo.



Gabriel Lampreave Altarriga es agente rural de la Generalitat de Cataluña y coordina las actuaciones sobre el lobo, el oso y los buitres que causan daños al ganado. También coordina el seguimiento y la gestión del lobo. Trabaja en conservación de especies y gestión cinegética desde hace más de veinte años, dedicado en particular al lobo, las rapaces rupícolas, la cabra montés y el jabalí.

Jordi Ruiz Olmo es doctor en Biología y jefe del Servicio de Protección de la Fauna, Flora y Animales de Compañía de la Generalitat de Cataluña, donde se ocupa de la gestión y la conservación de la biodiversidad. Comenzó su trayectoria profesional investigando a los mamíferos, especialmente los carnívoros, y de allí saltó a la conservación y la gestión de flora y fauna.

Jordi García Petit es biólogo y director del Parque Natural del Cadí-Moixeró, donde dirige todos los aspectos relacionados con su conservación y uso público, entre ellos la presencia del lobo.

José María López Martín es doctor en Biología y técnico del Área de Actividades Cinegéticas de la Generalitat de Cataluña, donde coordina los proyectos de ordenación y seguimiento de especies cinegéticas. Fue el responsable técnico del seguimiento del lobo en Cataluña durante los primeros años.

Alain Bataille es agente técnico en la Oficina Nacional de Caza y Fauna Salvaje del Gobierno francés, donde está encargado de censar y vigilar la fauna salvaje. También coordina el seguimiento del lobo en los Pirineos franceses.

Natalia Sastre Alaiz cursa el doctorado en Biología (Universidad Autónoma de Barcelona) y es la responsable de los proyectos relacionados con la fauna salvaje en el Servicio Veterinario de Genética Molecular de dicho centro universitario.

Olga Francino Martí es doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Barcelona, experta en genética animal y responsable del desarrollo de los proyectos del Servicio Veterinario de Genética Molecular.

Oscar Ramírez Bellido es doctor en Biología, investigador del Instituto de Biología Evolutiva y profesor de Zoología de la Universidad Pompeu Fabra. Colabora con el Servicio Veterinario de Genética Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona en el seguimiento genético de las poblaciones salvajes.

Dirección de contacto: Jordi Ruiz-Olmo · Servicio de Protección de Fauna, Flora y Animales de Compañía · Dirección General de Medio Natural · Departamento de Medio Ambiente y Vivienda · Generalitat de Cataluña · c/ Doctor Roux, 80 · 08017 Barcelona · Correo electrónico: ajruil@gencat.cat

Agradecimientos

Un trabajo como este no puede realizarse sin el apoyo de un importante número de instituciones y personas: Dirección General del Medi Natural (Toni Batet, Ignasi Rodríguez Gálindo, Ricard Casanovas, Jordi Padrós, Santiago Palazón, David Camps, Quim Bach), Forestal Catalana S.A. (Miquel Macías, Jordi Fàbrega, Francisco Fernández, Elena Rafart, Carles Malo, Joan Allás, Angel Such, Diego Martínez), Oficina Nacional de Caza y Fauna Salvaje del Gobierno francés (Cristophe Duchamp y Eric Arbutin), los guardas de las reservas de fauna del Cadí, Cerdaña-Alt Urgell y Freser-Selcasses, el Cuerpo de Agentes Rurales que participa en el seguimiento de las nueve comarcas pirenaicas y la Patrulla de Lucha Contra el Veneno, el personal del Parque Natural del Cadí-Moixeró (Ramón Martínez, las brigadas del parque, técnicos, administrativos), las reservas nacionales de caza del Cadí, Freser-Selcasses y Cerdaña-Alt Urgell (Jordi Xifra, Luis Mataix), el Centro de fauna de Torreferrussa (Joan Mayné, Elena Obón y Rafel Molina), y el Servicio Veterinario de Genética Molecular de la Facultad de Veterinaria (Universidad Autónoma de Barcelona). También nos han dado su apoyo o han participado en la conservación del lobo los ayuntamientos de Saldes, Gósol y Tuixén, el Consejo Comarcal del Berguedà, el Consorcio de Turismo del Alto Berguedà (Rosa Colomé), la Asociación de Perros de Protección de Rebaños (Meri Icardo, Andreu Camota y Teresa Verdagué), el Grupo Fer (Eloi Bautista, Deli Saavedra), la asociación SOURS (Carme Ruset y Cristina Fortuny), la Fundación Territori i Paisatge (Rafael Marín), Mauro Fernández (Laboratorio Forense de Vida Silvestre), Aurora Pavía, Jordi Calaf, Maribel Merchán, José Luis Jiménez, Raimon Marín, David Guibé, Albert Roura y Jordi Bauells. Queremos agradecer muy especialmente la colaboración, comprensión y paciencia de los ganaderos del alto Berguedà, Alt Urgell y del Solsonès, especialmente a Quim Grabulosa, Joan Gulleumas, Ramon Pons, Francesc Roca, Josep Castanyé, Domingo Pons, Pius Muntanyà y Antonio Soler.

Hemeroteca

Quercus 291 (mayo 2010)
Ref. 5301291 / 3'90 €
· El lobo aparece en Cataluña casi un siglo después de extinguirse. Andrés Requejo y Jorge Echegaray.

Quercus 157 (marzo 1999)
Ref. 5301157 / 3'90 €
· Últimas citas de lobo en la comarca gerundense del Ripollès. Salvador Filella.

Insertamos un boletín de pedidos en la página 77.

Siete de los ocho autores de este artículo en sus diferentes ocupaciones. De izquierda a derecha y de arriba abajo: Gabriel Lampreave (primer término) durante una espera de lobo en la sierra del Cadí; Jordi Ruiz-Olmo con su hijo ante el rastro dejado por un lobo en la sierra del Cadí; Jordi García en una zona lobera del Parque Natural de Cadí-Moixeró; José María López durante su participación en un proyecto de conservación del gato montés; Olga Francino y Natalia Sastre en el laboratorio del Servicio Veterinario de Genética Molecular (Universidad Autónoma de Barcelona); y Oscar Ramírez en el mismo laboratorio.

3.4 Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe

Short communication

Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe

Natalia Sastre^{a,*}, Olga Francino^a, Oscar Ramírez^a, Conrad Enseñat^b,
Armand Sánchez^a, Laura Altet^a

^a Servei Veterinari de Genètica Molecular, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

^b Parc Zoològic de Barcelona, Parc de la Ciutadella s/n, 8003 Barcelona, Spain

Received 8 May 2008; received in revised form 2 August 2008; accepted 18 August 2008

Abstract

The aim of the present study was to determine the prevalence of *Leishmania infantum* infection in a wild reservoir host (*Canis lupus*) throughout an endemic area for the disease (Southern Europe). For that reason, the serum and peripheral blood samples of 33 captive wolves from the European Breeding of Endangered Species Programme (EEP) were analyzed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time quantitative PCR (qPCR). *L. infantum* was detected in three samples from Central Portugal and Central and Northern Spain. Even though *L. infantum* infection in positive samples was low, surveillance of zoonotic leishmaniosis in this population is recommended as the parasite load could be higher in other tissues due to parasite tropism and most of the EEP institutions studied are located in endemic areas for canine leishmaniosis in Europe.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Canis lupus*; Wolf; *Leishmania infantum*; Canine leishmaniosis; Real-time quantitative PCR; ELISA

1. Introduction

Leishmania infantum (syn. *Leishmania chagasi*) is the protozoan parasite responsible for canine leishmaniosis. Transmitted by sand flies to humans, domestic and wild animals, *L. infantum* is distributed throughout the Mediterranean basin, Middle East, Central Asia, China and Central and South America (Gramiccia and Gradoni, 2005). Nevertheless, climatic alterations associated with global warming and human activities are changing the distribution and seasonality of the vector species, and *L. infantum* is now being detected in

northward areas such as North America or Central and Northern Europe (Enserink, 2000; Lindsay et al., 2002; Koehler et al., 2002; Capelli et al., 2004). Even though the principal reservoir host for *L. infantum* is the dog (*Canis familiaris*), canine leishmaniosis has been detected in wild canids such as jackals (*Canis aureus*), red foxes (*Vulpes vulpes*), wolves (*Canis lupus*) and maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) (Baneth et al., 1998; Criado-Fornelio et al., 2000; Mohebbi et al., 2005; Curi et al., 2006). However, no studies have reported the prevalence of *L. infantum* in captive wolves from Europe which are living in endemic areas for the disease. In 1994, the European Breeding of Endangered Species Programme (EEP) started a conservation program by founding and managing captive endangered fauna as a source for future reintroductions or reinforcement of existing populations such as the

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5814260; fax: +34 93 5812106.

E-mail address: nj.sastre@gmail.com (N. Sastre).

Table 1
Detection and quantification of *Leishmania infantum* in European captive wolves

Sampling			Wolf		<i>Leishmania</i> qPCR		ELISA	
Number	Localization	Year	Age ^a	Sex	Parasites/mL	Level	EU	Level
L1	Lisboa (previously Lleida-Spain)	2006	14	Female	5.3E–02	Low	3	Negative
L2	Lisboa	2006	7	Male	0	Negative	1	Negative
L3	Montpellier	2006	4	Female	0	Negative	4	Negative
L4	Montpellier	2006	4	Male	0	Negative	4	Negative
L5	Montpellier	2006	3	Male	0	Negative	1	Negative
L6	Montpellier	2006	3	Female	0	Negative	3	Negative
L7	Montpellier (previously Cáceres-Spain)	2006	3	Female	0	Negative	9	Borderline
L8	Madrid	2000	8	Female	1.9E–01	Low	4	Negative
L9	Lisboa	2000	8	Male	0	Negative	8	Negative
L10	Jerez	2000	6	Male	0	Negative	1	Negative
L11	Vergel	2000	4	Male	0	Negative	6	Negative
L12	Vergel	2000	4	Male	0	Negative	3	Negative
L13	Vergel	2000	4	Male	0	Negative	4	Negative
L14	Madrid	2000	2	Female	0	Negative	0	Negative
L15	Barcelona	2000	1	Female	0	Negative	1	Negative
L16	Bizkaia	2000	1	Female	0	Negative	4	Negative
L17	Bizkaia	2000	1	Female	0	Negative	5	Negative
L18	Santillana	2000	7	Male	0	Negative	4	Negative
L19	Santillana	2000	7	Female	0	Negative	2	Negative
L20	Barcelona (previously Jerez)	2000	4	Female	1.4E–01	Low	10	Borderline
L21	Cabárceno	2006	1	Male	0	Negative	3	Negative
L22	Guadalajara	2006	2	Female	0	Negative	1	Negative
L23	Barcelona	2000	4	Female	0	Negative	7	Negative
L24	Cabárceno	2006	1	Female	0	Negative	5	Negative
L25 ^b	Madrid	2006	5	Female	0	Negative	8	Negative
L26 ^b	Madrid	2006	5	Male	0	Negative	1	Negative
L27	Madrid	2000	7	Male	0	Negative	1	Negative
L28	Madrid	2000	2	Male	0	Negative	4	Negative
L29	Bizkaia	2000	6	Female	0	Negative	1	Negative
L30 ^b	Santillana	2000	3	Female	0	Negative	4	Negative
L31 ^b	Santillana	2000	3	Male	0	Negative	0	Negative
L32 ^b	Madrid	2006	5	Female	0	Negative	2	Negative
L33	Cabárceno	2006	3	Female	0	Negative	0	Negative

Results in bold are discussed in the text. EU: ELISA units.

^a Wolf ages when samples were collected.

^b Wild born.

Iberian wolf (*Canis lupus*) (Ramírez et al., 2006). In order to elucidate the status of *L. infantum* infection in European EEP wolves living in endemic areas for the disease, we have analyzed blood and serum samples from 33 individuals. The EEP institutions studied are localized in Spain, Portugal and Southern France where the sero-prevalence of the parasite reaches values of 20% in domestic dogs and wolves (Jambou et al., 1986; Nieto et al., 1992; Acedo Sánchez et al., 1996; Fisa et al., 1999; Cardoso et al., 2004; Sobrino et al., 2008).

2. Materials and methods

Most of the European EEP wolves were born in captivity and were from Barcelona, Madrid, Jerez, Vergel, Bizkaia, Santillana, Cabárceno, Guadalajara

(Spain), Lisboa (Portugal) and Montpellier (France) (Table 1). Peripheral whole blood samples were taken by venipuncture from wolves under chemical immobilization and were centrifuged 20 min at 2000 × g for 10 µL serum extraction. DNA from 0.5 mL of EDTA blood was obtained according to Roura et al. (1999). Blood samples from dogs, previously diagnosed as PCR negative for *L. infantum*, were included in all extractions in order to detect exogenous DNA contamination.

The serological survey on blood serum samples was performed by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) optimized in dogs and according to Riera et al. (1999) by the “Servei de Diagnòstic Serològic de *Leishmania*—Servei d’Anàlisi de Fàrmacs, Universitat Autònoma de Barcelona (Spain)”. The serological

concentrations were expressed in ELISA units (EU) related to a positive serum (used as calibrator and arbitrarily set at 100 EU), and the following criterion related to the infection level, was considered: <9 EU = negative response; 9–14 EU = borderline response; 14–80 EU = low positive response; 80–150 EU = middle positive response, >150 EU = high positive response.

L. infantum quantification from peripheral blood samples was performed by real-time quantitative PCR (qPCR) as previously described (Francino et al., 2006). Briefly, TaqMan-MGB probe and PCR primers were designed to target the kinetoplast DNA minicircle from *L. infantum*. The eukaryotic 18S RNA Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used as internal reference of genomic DNA samples. A spiked sample with a known number of parasites was used as calibrator to extrapolate the number of parasites per each sample. The detection of *Leishmania* DNA was established in seven logs, with a correlation of 0.99 (Francino et al., 2006). The limit of detection was 0.001 parasites per qPCR reaction. Positive and negative controls were included in each run. qPCR positive control was obtained from dogs previously diagnosed with canine leishmaniosis, and milli-Q water was used as a qPCR negative control.

3. Results and discussion

We have performed a retrospective study for detection of *L. infantum* in blood samples from European captive wolves. Three samples (9%) were positive for *L. infantum* by qPCR, whereas two were doubtful for serology (6%) (Table 1). *L. infantum* infection in positive samples was low, although a higher parasite load could be detected testing other tissues due to parasitism tropism (Solano-Gallego et al., 2001). Due to the divergence of the results (only one was detected by qPCR and serology), performing the two assays in parallel is recommended. The three positive samples were from Central Portugal and Central and Northern Spain, but it is unknown where the wolves became infected as they had been exchanged between institutions before the infection was discovered (Table 1). For that reason, surveillance of zoonotic leishmaniosis in this population is recommended to avoid the spread of the infection and due to the fact that it is fatal for wolf if it goes untreated (Beck et al., 2008). Furthermore, the lifestyle of captive wolves could increase their exposure to parasites if they spend the night outside. Zaffaroni et al. (1999) reported higher prevalence rates of leishmaniosis in dogs that spend the night outdoors

or living in a rural environment. A measure to prevent the parasitaemia in captive wolves could be to keep them indoors at night, especially during the seasonality of *L. infantum* vector. Additionally, insecticide-based preparations which include deltamethrin impregnated collars (Gramiccia and Gradoni, 2005) could be applied.

Our results support previous studies that detected *L. infantum* infection using invasive samples from wolves throughout an endemic area such as Southern Europe (Macri et al., 1997; Beck et al., 2008; Sobrino et al., 2008). Nevertheless, the challenge for conservation programs is to evaluate the disease trends without harming the wild species. In fact, the first record of *L. infantum* infection in a wolf around Ahar city (Iran) was not possible without shooting the individual (Mohebbali et al., 2005). For that reason, new studies should focus on the detection of *L. infantum* using non-invasive samples from canids such as faeces. In this way, surveillance and control of zoonotic leishmaniosis in remote endemic areas may be achieved without disturbing free ranging wild animals.

Therefore, determining *L. infantum* infection in captive wolves is necessary to protect them and thus conserving this valuable wolf population.

Acknowledgements

We are grateful to the “Zoo Aquarium de la Casa de Campo”, “Parc Zoològic de Barcelona”, “Parque Ecológico Bizcaia”, “Jardim Zoológico de Lisboa”, “Parque Zoológico de Jerez”, “Zoológico Municipal de Guadalajara”, “Zoológico de Santillana del Mar”, “Safari Park Vergel”, and “Parc Zoologique de Montpellier” for supplying blood samples from wolves. Thanks are due also to Gary Walker for linguistic revision.

References

- Acedo Sánchez, C., Martín Sánchez, J., Vélez Bernal, I.D., Sanchís Marín, M., Louassini, M., Maldonado, J.A., Morillas Márquez, F., 1996. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). *Int. J. Parasitol.* 25, 303–310.
- Baneth, G., Dank, G., Keren-Kornblatt, E., Sekeles, E., Adini, I., Eisenberger, C.L., Schnur, L.F., King, R., Jaffe, C.L., 1998. Emergence of visceral leishmaniasis in Central Israel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59 (5), 722–725.
- Beck, A., Beck, R., Kusak, J., Gudan, A., Martinkovic, F., Artukovic, B., Hohsteter, M., Huber, D., Marinculic, A., Grabarevic, Z., 2008. A case of visceral leishmaniosis in a Gray Wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *J. Wildl. Dis.* 44 (2), 451–456.
- Capelli, G., Baldelli, R., Ferroglio, E., Genchi, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., Maroli, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Rossi,

- L., Ruggiero, M., 2004. Monitoring of canine leishmaniasis in Northern Italy: an update from a scientific network. *Parasitologia* 46, 193–197.
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G.J., Carreta, P., Varejao, E., van Benthem, B., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Semiao-Santos, S.J., Rodrigues, J., Schallig, H.D.F.H., 2004. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet. Parasitol.* 121, 21–32.
- Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, F., Reus-Garcia, E., Roldan-Soriano, M.A., Diaz-Sanchez, M.A., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.* 92, 245–251.
- Curi, N.H., Miranda, I., Talamoni, S.A., 2006. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park, Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (1), 99–101.
- Enserink, M., 2000. Infectious diseases. Has Leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 290, 1881–1883.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87–97.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169–1180.
- Jambou, D., Marty, P., Jambou, R., Le Fichoux, P., Haas, P., Jourdain, N., Bayada, M., 1986. Preliminary serological study on canine leishmaniasis in the Alpes Maritimes Department, France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 666–667.
- Koehler, K., Stechele, M., Hetzel, U., Domingo, M., Schönian, G., Zahner, H., Burkhardt, E., 2002. Cutaneous leishmaniasis in a horse in Southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 109, 9–17.
- Lindsay, D.S., Zajac, A.M., Barr, S.C., 2002. Canine leishmaniasis in the American Foxhounds: an emerging zoonosis? *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 24, 304–312.
- Macri, B., Galofaro, V., Mazzullo, G., Gurnari, M., Mazzacuva, N., Borrelli, G.M., 1997. First report in Italy of *Leishmania* infection in a wolf. *Prax. Vet. Milano* 18 (3), 25–28.
- Mohebbi, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Manouchehri Naeini, K., Avizeh, R., Fakhar, M., 2005. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet. Parasitol.* 129, 243–251.
- Nieto, C.G., Navarrete, I., Habela, M., Hernández-Rodríguez, S., 1992. Seroprevalence of canine leishmaniasis around Cáceres, Spain. *Prev. Vet. Med.* 13, 173–178.
- Ramírez, O., Altet, L., Enseñat, C., Vilà, C., Sánchez, A., Ruiz, A., 2006. Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conserv. Genet.* 7, 861–878.
- Riera, C., Valladares, J.E., Gallego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J., Arboix, M., 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84, 33–47.
- Roura, X., Sánchez, A., Ferrer, L., 1999. Diagnosis of canine leishmaniasis using a PCR technique. *Vet. Rec.* 144, 262–264.
- Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A., Gortázar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 198–203.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560–563.
- Zaffaroni, E., Rubaudo, L., Lanfranchi, P., Mignone, W., 1999. Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy). *Vet. Parasitol.* 81, 11–19.

4 DISCUSIÓN

4 DISCUSIÓN

A pesar de que el lobo gris (*C. lupus*) está catalogado como Especie Vulnerable según la Lista Roja de la IUCN (2009) existen grandes diferencias en el estado de conservación de las distintas poblaciones: mientras algunas están al borde de la extinción, otras nunca han estado amenazadas. Estas diferencias poblacionales hacen del lobo una especie modelo en estudios de genética de la conservación porque permite comparar los efectos de la variabilidad genética en función de la viabilidad poblacional a corto, medio y largo plazo. En este trabajo comparamos genéticamente tres poblaciones de lobo gris claramente diferenciadas:

(1) Una población de lobos no amenazada, grande y no aislada de la Federación Rusa que ha sufrido fuertes fluctuaciones poblacionales durante el siglo XX.

(2) Una población del Noroeste de la Península Ibérica, pequeña, aislada y que ha estado amenazada como consecuencia de un fuerte declive demográfico en los años 70, pero que actualmente se encuentra en expansión.

(3) Una pre-población del Noreste de la Península Ibérica que ha recolonizado recientemente un territorio (Cataluña) donde la especie llevaba décadas desaparecida.

Todas las muestras para caracterizar esta población fueron del tipo no invasivo.

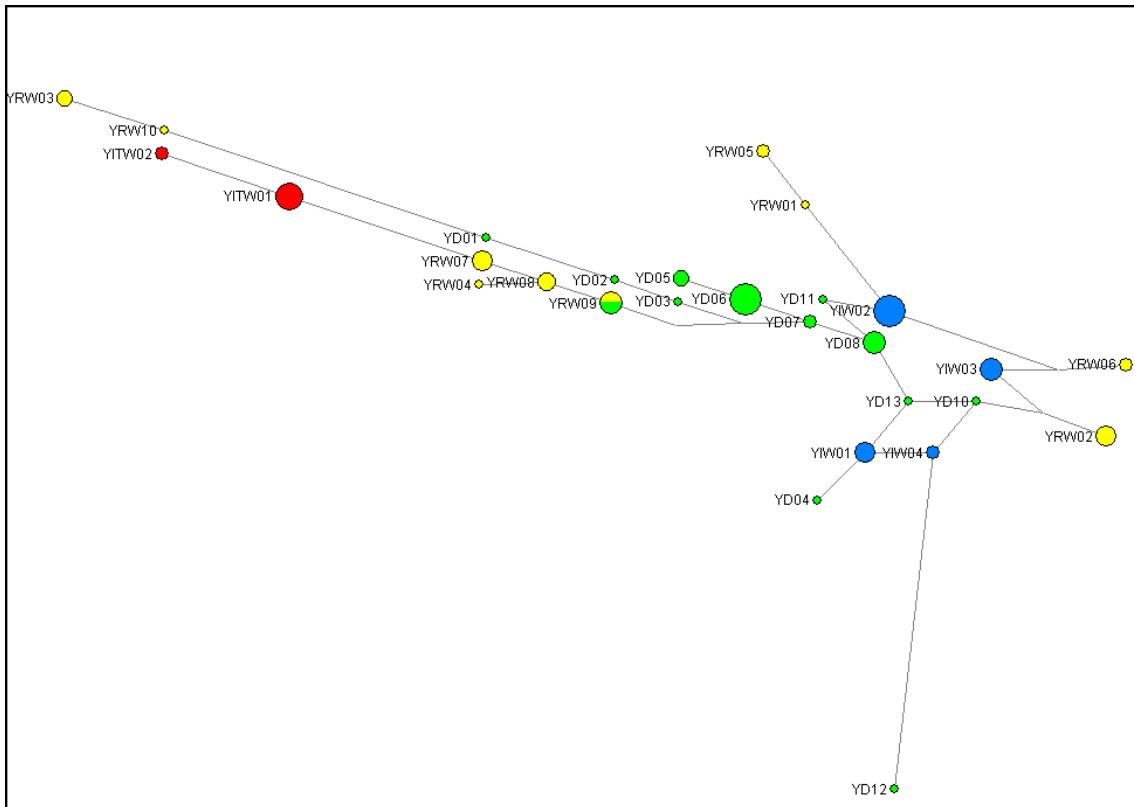
Además, realizamos un estudio para comprobar la prevalencia de infección por *Leishmania infantum* en lobos ibéricos cautivos que habitan en zonas endémicas para la leishmaniosis canina. El uso de animales cautivos también tiene como objetivo optimizar la técnica para aplicarla posteriormente en poblaciones salvajes de lobo.

4.1 MONITORIZACIÓN GENÉTICA DE TRES POBLACIONES DE LOBO GRIS

4.1.1 Caracterización genética

Las tres poblaciones de lobo gris fueron caracterizadas genéticamente mediante marcadores de herencia materna (mtDNA), marcadores nucleares (microsatélites) y por primera vez, mediante marcadores de herencia paterna (cromosoma Y) (Figura 4.1).

a) ● lobo ruso, ● lobo ibérico, ● lobo itálico y ● perro (34 razas).



b) ● lobo ruso, ● lobo ibérico, ● lobo itálico y ● perro (34 razas).

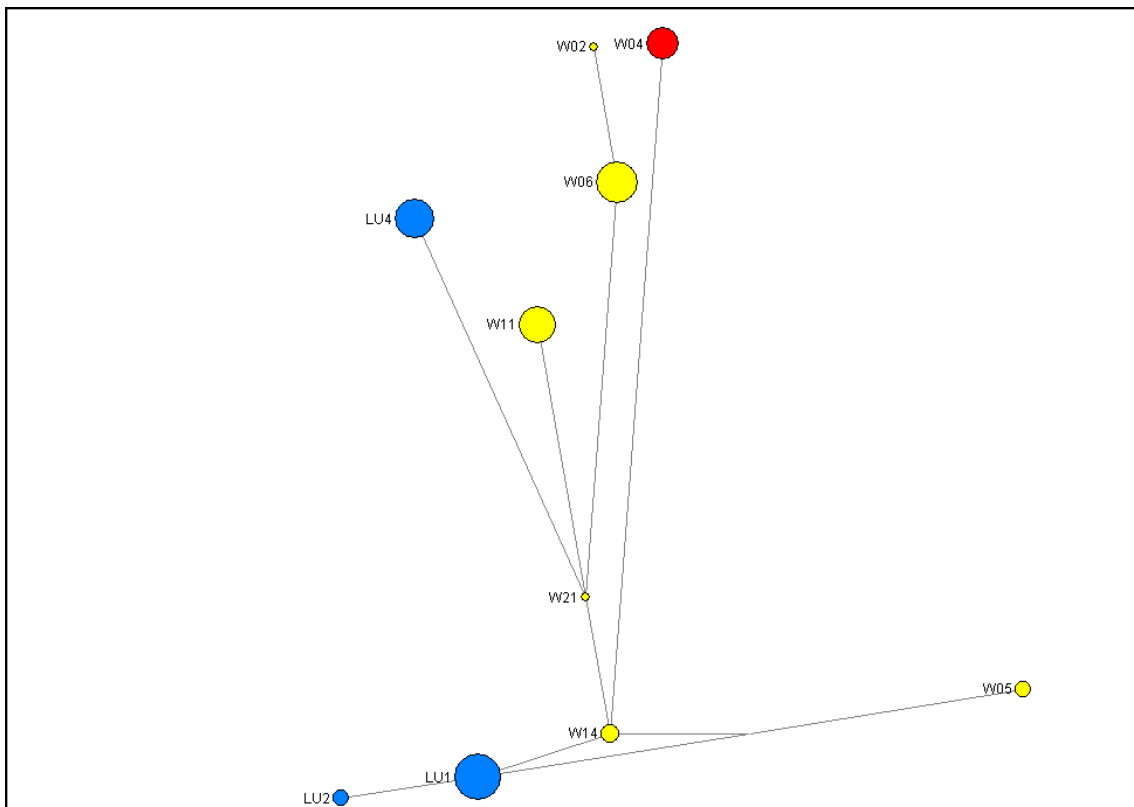


Figura 4.1 Median-Joining Network de los haplotipos (a) del cromosoma Y y (b) de mtDNA en distintas poblaciones de lobo gris. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia haplotípica y el tamaño de las ramas es proporcional a la diferencia del número de nucleótidos.

En la población rusa encontramos el mayor número de haplotipos tanto para el cromosoma Y (10 haplotipos) como para el mtDNA (6 haplotipos), siendo la variabilidad haplotípica en ambos casos elevada y comparable al de otras poblaciones del Este de Europa (Sundqvist y col. 2001; Pilot y col. 2006).

En la población ibérica encontramos 4 haplotipos para el cromosoma Y (que son el doble de los hallados por Sundqvist y col. (2001) en la población escandinava) y 3 de los 4 haplotipos de mtDNA descritos en la Península Ibérica por Vilà y col. (1999). El haplotipo ibérico lu3 no ha sido hallado en nuestras muestras probablemente por su baja presencia dentro de la población (únicamente ha sido descrito por Vilà y col. (1999) en un individuo de Portugal).

En el caso de la pre-población de Cataluña fue la que presentó menor diversidad haplotípica con 2 haplotipos para el cromosoma Y, y para el mtDNA, un único haplotipo (W4) exclusivo de la Península Itálica (Vilà y col. 1997). Luego, teniendo en cuenta que el lobo se extinguió en Cataluña en el año 1935 (Manent 2004), nuestros resultados ratifican la presencia del lobo de origen italiano en territorio catalán desde el año 2000.

Es decir, actualmente en la Península Ibérica existen dos poblaciones diferenciadas y no conectadas (por el momento) de lobo gris: el lobo ibérico y el lobo itálico. Durante el siglo pasado, las poblaciones de lobo de la Península Ibérica e Itálica fueron perseguidas por el hombre hasta casi provocar su exterminio. Ambas poblaciones quedaron aisladas geográficamente y sufrieron durante décadas falta de migración y fuerte deriva genética (Lucchini y col. 2004; Ramírez y col. 2006). La diferencia del tamaño poblacional después del cuello de botella de los años 70, donde $N_{Italia} \approx 100$ individuos (Valière y col. 2003) y $N_{España} \approx 700$ (Grande del Brío 1984) explicaría por qué en la población itálica sólo se fijó 1 haplotipo de mtDNA y 2 del cromosoma Y *versus* los 4 y 4 respectivamente de la población ibérica.

En cuanto a la variabilidad genética autosómica, en la población rusa fue elevada y comparable a la descrita por otros autores en poblaciones no aisladas y de gran tamaño de Asia y Norteamérica (Tabla 4.1). De la misma manera, la variabilidad en la población ibérica resultó ser muy parecida a la descrita por otros autores en las poblaciones aisladas de España, Italia y Escandinavia (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Resultados de la variabilidad genética de diferentes poblaciones de lobo gris mediante el uso de marcadores moleculares de tipo microsatélite.

Población	M	N	A	H_O	H_E	F_{IS}	Referencia
Arabia Saudí	18	7	2,4	0,48	0,42	-0,14	Lucchini y col. 2004
Canadá	14	67	6,64	0,62	0,68	-	Musiani y col. 2007
Canadá-Islas Costeras	14	36	4,19	-	0,61	0,18	Carmichael y col. 2008
Croacia	18	24	5,4	0,63	0,69	0,09*	Lucchini y col. 2004
Escandinavia	29	13	3,1	-	0,52	-	Ellegren 1999
Escandinavia	15	9	3,1	0,45	0,52	-	Flagstad y col. 2003
España	18	32	4,7	0,50	0,60	0,17*	Lucchini y col. 2004
España	13	17	4,7	0,53	0,65	-	Ramírez y col. 2006
España – Noroeste	12	47	5,5	0,53	0,65	0,18*	Presente estudio
España – (Cataluña)	9	13	3,7	0,73	0,56	-0,32*	Presente estudio
Federación Rusa	12	47	8,9	0,66	0,78	0,15*	Presente estudio
Federación Rusa	10	14	4,7	0,63	0,64	0,05	Aspi y col. 2009
Finlandia	18	13	5,5	0,69	0,73	0,06	Lucchini y col. 2004
Finlandia	10	48	5,4	0,68	0,69	0,03	Aspi y col. 2006
Grecia y Bulgaria	18	39	6,8	0,69	0,73	0,06*	Lucchini y col. 2004
Italia	18	103	4,4	0,44	0,49	0,10*	Lucchini y col. 2004
Italia	20	220	11,7	0,46	0,52	0,13	Verardi y col. 2006
Italia - Alpes	12	141	3,5	0,57	0,56	-0,03	Fabbri y col. 2007
Norte América	26	58	7,0	0,69	0,72	-	Kobmüller y col. 2009
Norte América	26	550	7,0-10,3	0,64-0,72	-	< 0,03	vonHoldt y col. 2010a
República de Karelia	10	29	5,7	0,66	0,71	0,09*	Aspi y col. 2009
República de Latvia	18	38	6,8	0,71	0,73	0,03	Lucchini y col. 2004
Turquía e Israel	18	7	3,7	0,66	0,67	0,00	Lucchini y col. 2004

M: Número de marcadores; N: número de muestras; A: Número de Alelos; H_O: Heterocigosidad observada; H_E: Heterocigosidad esperada; F_{IS}: coeficiente de endogamia. * $P < 0.05$

No obstante, la comparación entre estudios que no han usado la misma metodología es meramente orientativa. Por este motivo, en este estudio usamos el mismo número de marcadores, una amplia zona de muestreo e incluso el mismo número de muestras para comparar las poblaciones rusa e ibérica. En ambos casos observamos (como en la mayoría de los estudios) un déficit de heterocigotos no significativo ($H_o < H_E$), una F_{IS} positiva que no es significativamente diferente entre poblaciones (W test, $P > 0.05$) y una diversidad genética significativamente mayor en la población rusa (A , R_s , H_E ; W tests, $P < 0.05$ en todos los casos) porque se trata de una gran población no aislada.

En el caso de las muestras recogidas en los Pirineos y Pre-Pirineos Catalanes observamos una alta variabilidad genética con exceso de heterocigotos ($H_o > H_E$). Esto puede ser debido a que los lobos de Cataluña no forman una población panmíctica: hay carencia de hembras, de unidades reproductoras independientes y/o presencia de individuos que no pertenecen a la misma población. Es decir, los individuos llegados a Cataluña tienen un origen itálico (haplotipo W4) pero no constituyen una verdadera población, siendo el valor de su variabilidad genética no representativo.

4.1.2 Estimaciones demográficas

Se ha estimado mediante el censo demográfico que la población de lobos de la Península Ibérica es $N \approx 2.000$ individuos (Álvares y col. 2005). Si asumimos que el tamaño efectivo de la población es $N_e/N \approx 0,11$ (Frankham y col. 2002), entonces $N_e \approx 220$ individuos. Este valor es superior a los valores que hemos estimado usando dos programas que se basan en las frecuencias genotípicas de los marcadores microsatélites, y que son NEESTIMATOR (Peel y col. 2004) donde $N_e = 54$ y LDNe (Waples 2006), donde $N_e = 43$. Tres causas pueden explicar la incongruencia de los resultados en función de si el censo tiene una base ecológica o genética: (1) Las muestras analizadas no representan toda la población; (2) una sobreestimación del censo demográfico de la población actual (que puede ocurrir si se cuentan individuos jóvenes (Vilà 2010)) y/o (3) los efectos del cuello de botella fueron más drásticos de lo que inicialmente se pensó. La primera causa es poco probable porque nuestro muestreo abarca prácticamente toda el área de distribución del lobo gris de la Península Ibérica. Además, no hemos detectado fragmentación dentro de la población analizada (Figura 4.2 y 4.3). La segunda causa no se puede descartar porque el último censo demográfico a nivel estatal fue realizado entre 1987 y 1988 por Blanco y col. (1990). Entonces se estimó que

la población ibérica en otoño constaba de unos 2.000 individuos. Posteriormente, en 2005, se comunica mediante un resumen en un congreso internacional (Alvares y col. 2005) que la población Ibérica de lobos en España y Portugal consta de unos 2.000 individuos. Es decir, no hay ningún estudio reciente que determine el número de lobos en la Península Ibérica y por este motivo la población actual de lobos bien podría estar sobreestimada. Sea cual sea la causa, lo cierto es que nuestros resultados indican que la población ibérica actual puede ser tratada como una Unidad de Manejo Independiente (MU, Moritz 1994).

En el caso de la población rusa, el tamaño efectivo de la población usando NEESTIMATOR y LDN_e fue $N_e = 313$ y $N_e = 138$, respectivamente. Estos valores se aproximan al censo oficial para las regiones muestreadas (Kaluzshkaya, Smolenskaya, Vologodskaya y Tverskaya) donde en promedio $N_e = 203$ (Borisov y col. 1992; Lomanov y col. 1995; 2000). Asimismo, tampoco detectamos fragmentación dentro de la población (Figura 4.2 y 4.3). Por lo tanto, nuestra población puede ser tratada como una MU. Sin embargo, siendo el número total de lobos en Rusia $N \geq 40.000$ y teniendo en cuenta que nuestra población no está aislada esperaríamos un valor mayor de N_e . Luego es probable que haya más de una MU en territorio ruso como también lo indica el hecho de que en la Federación Rusa co-habitan más de una subespecie de *Canis lupus* (ver Tabla 1.1). En el futuro sería recomendable realizar el estudio genético con muestras que abarcaran más territorio para establecer el número de MUs y de este modo aplicar planes de conservación de acuerdo con las poblaciones locales y no globales de la Federación Rusa.

En el caso de la pre-población catalana, los marcadores nucleares sirvieron para identificar a los individuos y así establecer el número mínimo de individuos en territorio catalán desde el año 2000, esto es, $N = 13$ individuos. Además fue posible determinar otro parámetro esencial cuando no hay captura: la ratio sexual. Los trece individuos fueron sexados mediante dos marcadores ligados al cromosoma Y y X (este último como control positivo). El resultado fue la identificación de 12 machos y 1 hembra. Este patrón se corresponde con el de otras pre-poblaciones en fase de colonización (e.g. Suiza, Luca Fumagalli, comunicación personal). Debido al bajo número de individuos y a la escasez de hembras, esta pre-población no puede ser tratada como estable y viable a corto plazo y por lo tanto se recomienda continuar con las medidas de protección para favorecer su asentamiento y futura expansión territorial.

4.1.3 Fragmentación

Los estadísticos de Wright fueron utilizados para analizar la estructura de las poblaciones. La diferenciación genética entre las dos poblaciones ibérica y rusa fue significativa ($F_{ST} = 0,131$; $P < 0,05$), siendo éste un valor esperado dada la separación geográfica e histórica de las dos poblaciones. No se han incluido las muestras de Cataluña en la comparación por no ser una verdadera población. El coeficiente de endogamia de las poblaciones rusa ($F_{IS} = 0,147$) e ibérica ($F_{IS} = 0,177$) fue significativamente positivo y moderado. Estos valores son superiores a los descritos en poblaciones de lobo gris no aisladas de EEUU o Asia y comparables al de otras poblaciones aisladas de Italia o Escandinavia (Tabla 4.1). El valor moderado de F_{IS} indica por lo tanto un cierto apareamiento preferencial dentro de las poblaciones como causa de un aislamiento geográfico (en el caso de la población ibérica) o barreras geográficas y/o ecológicas que impedirían el flujo genético entre poblaciones (en el caso de la población rusa).

Para estudiar la estructura entre y dentro de las poblaciones realizamos un análisis factorial de correspondencia (FCA). En el análisis fue incorporado un grupo formado por $N = 62$ perros pertenecientes a 48 razas y una población itálica de referencia ($N = 15$). En la Figura 4.2 se observa que no hay solapamiento entre perros y lobos, y más concretamente, entre lobos ibéricos e itálicos. La “pre-población catalana” se agrupa con la población italiana de referencia y por lo tanto, se confirma de nuevo el origen italiano del lobo presente en Cataluña mediante el uso de marcadores autosómicos. La baja variabilidad explicada en los ejes (Figura 4.2) descarta la fragmentación dentro de las poblaciones.

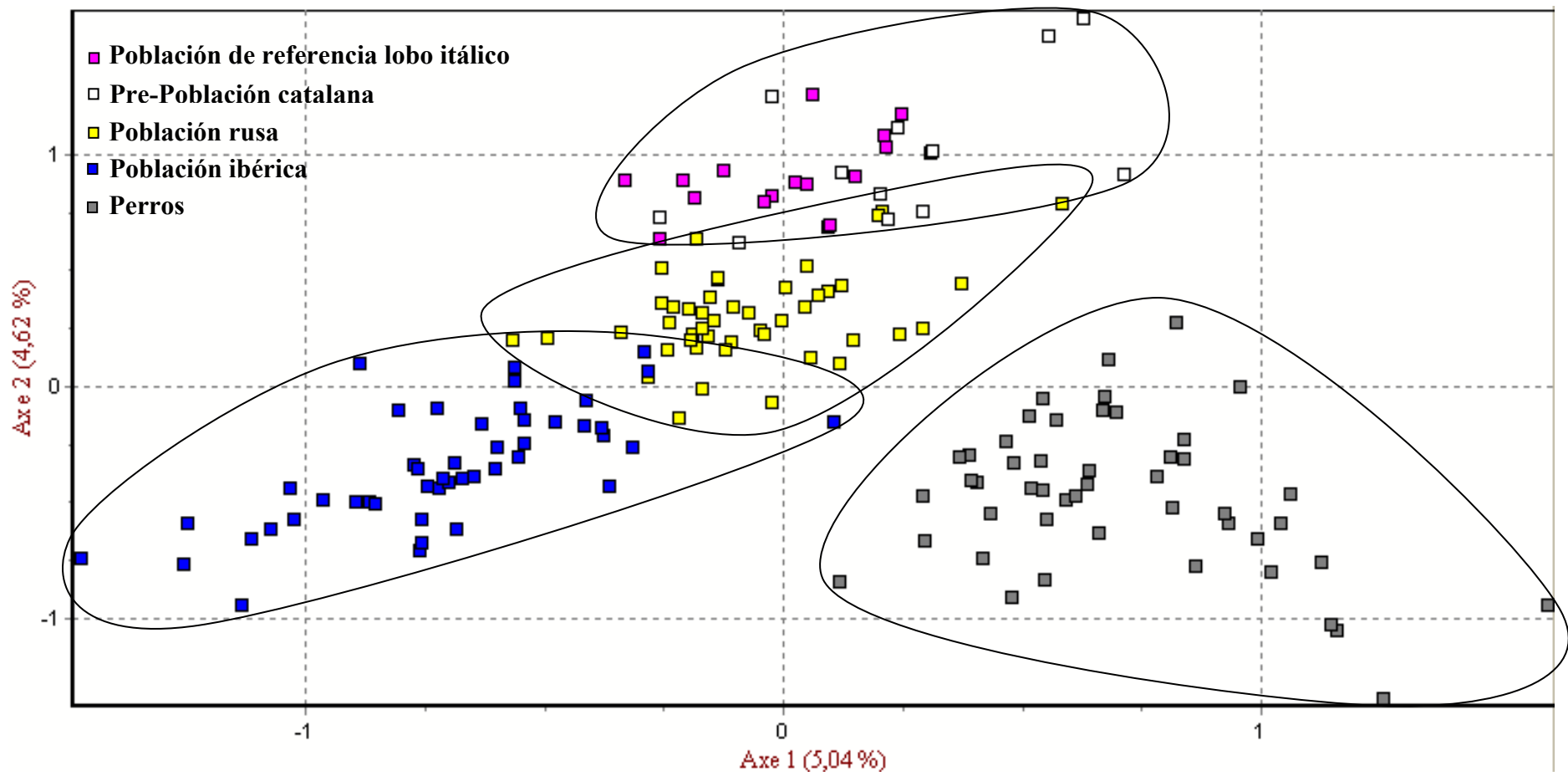


Figura 4.2 FCA usando 9 microsatélites para tres poblaciones de lobo gris. La proporción de la variación total explicada está indicada en los ejes. En esta figura se observa la no solapación entre perros y lobos y entre lobos itálicos e ibéricos, esto último como resultado de su aislamiento geográfico.

4.1.4 Hibridación

La población ibérica es y ha sido durante casi un siglo una población aislada del resto de Europa del mismo modo que lo ha sido la población itálica de lobos. La fragmentación del paisaje debido principalmente a la construcción de infraestructuras (autopistas, carreteras, vías de ferrocarril...) ha potenciado dicho aislamiento. Sin embargo, el éxodo rural hacia las grandes ciudades y el abandono de campos de cultivo y carreteras ha permitido que el lobo ibérico se extienda desde el extremo Noroeste de la Península Ibérica hasta el País Vasco (Echegaray y Vilà 2009). Es decir, al lobo ibérico tan sólo le faltan unos cientos de kilómetros para alcanzar los Pirineos Catalanes, donde se encuentra el lobo de origen itálico. Si las condiciones abióticas se mantienen y las leyes que protegen al cánido no cambian, podría ocurrir que de forma natural las dos subespecies aisladas de Europa Occidental se encontraran y se cruzaran (*outbreeding*), favoreciendo así el aumento de la variabilidad genética de las dos poblaciones (Frankham 2005). Sin embargo, hay autores que no son favorables al *outbreeding* para disminuir la tasa de *inbreeding* porque puede perderse la condición genética que caracteriza a una población (Frankham 2010). Sea como sea, el tiempo y el control de las dos poblaciones permitirán determinar si se cruzan entre ellas. En nuestro estudio, el hecho de haber caracterizado las tres poblaciones con los mismos marcadores nos permite estudiar casos de introgresión genética, especialmente entre el lobo itálico y el lobo ibérico.

Para estudiar la hibridación dentro de las poblaciones utilizamos el programa de inferencia bayesiana STRUCTURE (Falush y col. 2007). Como la hibridación en lobos también puede estar causada por la introgresión genética del perro incorporamos en el análisis el grupo de $N = 62$ perros pertenecientes a 48 razas y la población italiana de referencia ($N = 15$) al ser el origen de la pre-población catalana. Para cada individuo, el programa estima la proporción de ancestro de cada uno de los grupos o *clusters* (K) (Figura 4.3). También permite asignar *a priori* cada muestra a una población. Sólo en el caso de las muestras catalanas no hubo previa asignación a una población. Cuando agrupamos todos los individuos en tres grupos ($K = 3$), los perros y los lobos ibéricos se agrupan en dos *clusters* diferentes al resto. En $K = 4$, se diferencian las tres poblaciones de lobo, donde los lobos en Cataluña quedan incluidos en la población itálica de referencia. En $K = 5$ no se observa ningún *cluster* nuevo. Por lo tanto, las tres poblaciones quedarían diferenciadas en $K = 4$ y con probabilidades de asignación,

excepto para algunos casos, superior a $P \geq 0,90$. Solamente una muestra de lobo ibérico mostró introgresión genética por parte del perro. Sin embargo, este resultado no es significativo porque no hubo introgresión genética cuando se analizó por separado la población ibérica y la de perros (resultados no mostrados). En el resto de los casos, la introgresión genética se produce a partir de otras poblaciones de lobo pero no se observa ningún híbrido entre el lobo ibérico y el lobo itálico ni tampoco introgresión genética del perro en los lobos distribuidos por Cataluña, que tienen mayor riesgo de hibridación al ser su número poblacional muy bajo.

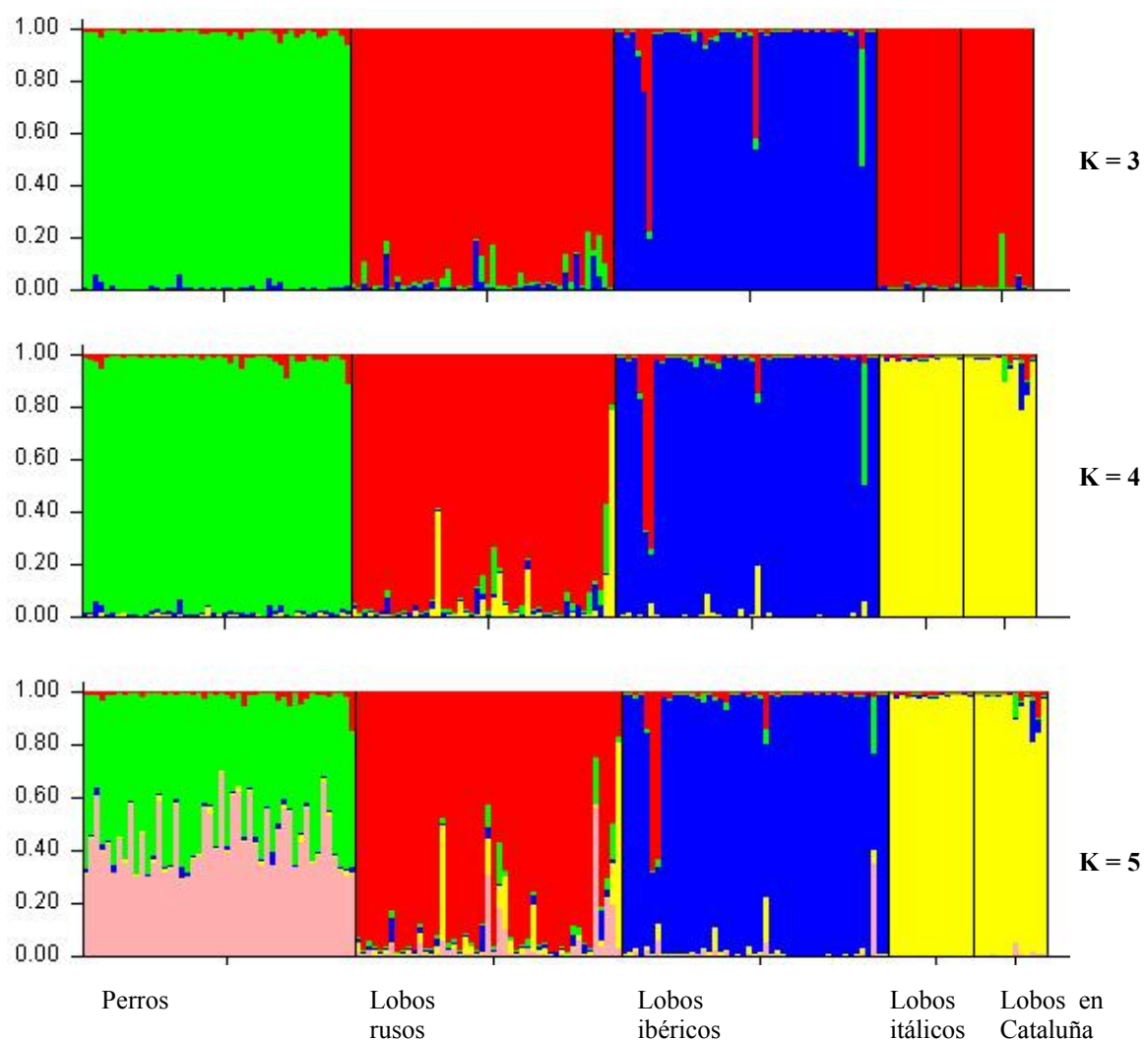


Figura 4.3 Método Bayesiano de agrupamiento para el lobo itálico, ibérico y ruso y el perro. La asignación individual se realizó para $K = 3$, $K = 4$ y $K = 5$ grupos o *clusters*. Cada individuo está representado en forma de barra vertical seccionada en K segmentos coloreados cuya longitud es proporcional a la probabilidad de pertenecer a K *cluster*.

Para completar el estudio también caracterizamos las poblaciones usando marcadores del cromosoma Y que son complementarios y no substitutivos de los marcadores autosómicos porque sólo informan de los machos (herencia paterna), y al ser unialélicos, a igualdad de marcadores, informan menos que los autosómicos (dialélicos). En estudios de hibridación, los alelos más útiles son aquellos no compartidos y únicos de la población porque permiten asignar de forma directa el origen de una muestra. Los alelos que se muestran en negrita en la Tabla 4.2 son alelos únicos en función de la población, siendo el alelo 210 del microsatélite MS41B característico de la población italiana. Los lobos de origen itálico (Italia, Francia y Cataluña) a su vez presentan 2 haplotipos que se diferencian únicamente por una repetición de dos pares de bases. Cabe destacar que el haplotipo YITW02 sólo se ha observado en lobos distribuidos en territorio catalán. Esta diferenciación podría estar causada probablemente porque las muestras de referencia analizadas (N = 7; Italia) no representan la totalidad de la variabilidad haplotípica de la población itálica y por este motivo sólo se ha detectado en Cataluña. Sería conveniente ampliar el área de muestreo incluyendo muestras de Italia, Suiza, Alemania y Francia para corroborar este hecho. En la Tabla 4.2 también se observa que los lobos con mayor exclusividad alélica son de origen ruso, y que el único haplotipo del cromosoma Y compartido entre perros y lobos lo presentan los lobos rusos. Este hecho también fue observado por Vilà y col. (1997) con el mtDNA; los lobos de Rusia y Rumania fueron los únicos que compartían un haplotipo con el perro (W6).

Tabla 4.2 Haplotipos del cromosoma Y hallados en lobos de origen ruso (*Canis lupus lupus*), ibérico (*Canis lupus signatus*) e itálico (*Canis lupus italicus*), y en perros (*Canis familiaris*) usando 5 microsatélites. Los alelos están representados en función de su tamaño.

Haplotipo/Raza	MS34A	MS34B	MS41A	MS41B	990	Frecuencia (%)
Canis lupus lupus (N=27)						
YRW01	181	179	207	222	126	4
YRW02	175	179	207	228	126	18
YRW03	173	183	207	216	130	11
YRW04	181	177	207	218	124	4
YRW05	181	179	209	222	126	7
YRW06	177	179	209	224	126	7
YRW07	179	177	207	216	124	19
YRW08	179	177	207	218	124	15
YRW09*	179	177	207	220	124	11
YRW10	173	181	207	214	130	4
Canis lupus signatus (N=26)						
YIW01	175	177	207	224	124	19
YIW02	177	179	207	222	126	50
YIW03	177	179	207	226	126	23
YIW04	175	177	207	226	124	8
Canis lupus italicus (N=11)						
YITW01 (Italia; N=7+Francia; N=2)	179	177	209	210	124	100
YITW02 (Cataluña; N=2)	179	179	209	210	124	100
Canis familiaris (N=34 razas)						
YD01 Briard	175	177	207	214	126	3
YD02 Chow-Chow	175	177	207	218	126	3
YD03 Gran Perro Japonés	175	177	207	220	126	3
YD04 American Staffordshire Terrier	175	177	207	224	126	3
YD05 Bullmastiff	175	179	207	216	124	9
YD06 Mastín del Pirineo	175	179	207	218	124	35
YD07 Golden Retriever	175	179	207	220	124	6
YD08 Beagle	175	179	207	222	124	17
YD09* Boxer	179	177	207	220	124	9
YD10 Alaskan Malamute	175	179	207	226	124	3
YD11 Cocker Spaniel Americano	177	179	207	222	124	3
YD12 Bulldog	181	175	207	228	124	3
YD13 Basset Hound	175	179	207	224	124	3

En negrita, alelos exclusivos de la población; *, Haplotipo compartido perro/lobo ruso

YD05: Dogo Burdeos; Siberian Husky

YD06: Bobtail; Irish Wolfhound; Carlino; Dogo Alemán; Fila Brasileiro; Galgo; Schnauzer Gigante; San Bernardo; Pastor Belga Groenendael; Pastor Malinois; Pastor Tervueren

YD07: Terranova

YD08: Caniche; Pastor Alemán; Rottweiler; West Highland White Terrier; Yorkshire Terrier

YD09: Lhasa Apso; Shar-Pei

4.1.5 Cuellos de botella

Las poblaciones de lobos no aisladas y de gran tamaño poblacional no están exentas de sufrir fuertes fluctuaciones demográficas (ver Figura 1.4) que pueden afectar a su variabilidad genética. Los efectos genéticos de un cuello de botella en una población no aislada son menos drásticos que en una población aislada porque el flujo genético entre poblaciones es mayor y el efecto de deriva genética menor. Sin embargo, su detección es más difícil precisamente porque la migración y/o mutación pueden borrar sus efectos en pocas generaciones (Keller *y col.* 2001; Busch *y col.* 2007).

Como no existían estudios previos que detectaran y cuantificaran los efectos de un cuello de botella en grandes poblaciones de lobo como la rusa, ni tampoco en la población ibérica de lobos, realizamos el estudio que se detalla en el apartado 3.1. Mediante secuencias de mtDNA y marcadores microsatélites detectamos la existencia del cuello de botella en ambas poblaciones, es decir, independientemente del grado de aislamiento y de la tasa de crecimiento de las poblaciones de lobo (*e.g.* la población ibérica ha duplicado, incluso triplicado su tamaño en 30 años).

En el caso de la pre-población catalana no pudimos realizar el estudio porque no constituyen una verdadera población. No obstante, la situación del lobo italiano ha sido ampliamente estudiada por otros autores (Lucchini *y col.* 2002; Valière *y col.* 2003; Fabbri *y col.* 2007; Randi 2008; Marucco *y col.* 2009; Cubaynes *y col.* 2010). Como ya hemos mencionado, la población itálica sufrió un severo cuello de botella en los años 70 y quedó reducida a $N \approx 100$ individuos. A partir de entonces, la población aumentó de tamaño y se expandió recolonizando el Sur de Francia, Suiza y Alemania. Esto ha permitido que a principios del 2000, el lobo de origen italiano llegue a los Pirineos y Pre-Pirineos Catalanes procedente de Francia.

Los tests neutralistas que usamos para detectar expansiones o declives poblacionales en función de los cambios mutacionales acumulados en las secuencias de DNA mitocondrial fueron: R_2 , F_u y $Li's F^*$, $Tajima's D$, $F_u's F_s$ y MAE . En el caso de la población ibérica de lobos, los 333 pb analizados fueron suficientes para detectar por primera vez los efectos del cuello de botella en la población. De los tests utilizados, tan sólo uno (MAE) no fue significativo probablemente porque es el estadístico menos robusto (Ramos-Onsins *y Rozas* 2002). El resto de estadísticos probaron la existencia de un declive poblacional al ser significativos y de valor positivo. En cambio, ninguna prueba fue significativa en la población rusa de lobos. Esto puede ser debido a que el

tamaño de la secuencia de mtDNA (333 pb) no es suficiente para detectar declives demográficos en poblaciones grandes no aisladas.

En contraste, los marcadores biparentales (microsatélites) mostraron los efectos genéticos del cuello de botella en ambas poblaciones. Los test usados fueron *M-ratio*, *Exceso de heterocigotos* y *Mode-shift*. El test *M-ratio* que se basa en las frecuencias del tamaño de los alelos para encontrar la pérdida alélica de la población detectó el cuello de botella en ambas poblaciones, es decir, independientemente del grado de aislamiento. Las dos pruebas restantes fueron significativas pero no en ambas poblaciones: El *exceso de heterocigotos* fue detectado en la población rusa mientras que la pérdida de alelos raros (*Mode-shift*) fue detectado en la población ibérica.

Las poblaciones que han sufrido un cuello de botella suelen tener un exceso de heterocigotos porque la diversidad alélica se reduce con rapidez (Cornuet y Luikart 1996). El programa BOTTLENECK (Cornuet y Luikart 1996) permite detectar dicho exceso. Contrariamente a lo esperado, en la población aislada ibérica no hubo significación pero sí la hubo en la población no aislada rusa. Existen varias razones que explican la falta de significación del test en la población ibérica: presencia de alelos nulos, endogamia, subestructuración poblacional (efecto Wahlund), bajo poder estadístico o que el cuello de botella es demasiado reciente.

La presencia de alelos nulos no parece explicar la falta de significación del test porque obtuvimos el mismo resultado después de excluir del análisis dos marcadores que no estaban en HWE en la población. El efecto de la endogamia tampoco parece ser la explicación porque los altos valores de F_{IS} en ambas poblaciones (0.147 and 0.177) no fueron significativamente diferentes entre poblaciones (W test, $P > 0.05$) pero el test sí fue significativo en la población rusa. La fragmentación tampoco parece ser el motivo si tenemos en cuenta que el área de muestreo de las muestras ibéricas ($\approx 139.723 \text{ Km}^2$) fue menor que el de las muestras rusas ($\approx 308.281 \text{ km}^2$). De la misma manera, la falta de poder estadístico del test no parece ser la causa debido a que el número de muestras y marcadores utilizados fueron los mismos en ambas poblaciones y están dentro de los parámetros recomendados por Luikart y col. (1998) para alcanzar alto poder estadístico del test (entre 15-40 individuos y 10-15 microsatélites). Sin embargo, es posible que el menor número de alelos hallados en la población ibérica (ver tabla 4.1) haya reducido el poder estadístico del test para detectar un exceso de heterocigotos, o más probablemente, que el cuello de botella ocurriera hace menos de $[0,25 \text{ veces } \times 2N_e]$

generaciones - esto es aproximadamente 85 años, donde $N_e = 50$ individuos y 1 generación = 3,4 años - y por este motivo el test no es significativo en esta población (Cornuet y Luikart 1996). Esto último concuerda con los datos demográficos que sitúan el cuello de botella de la población ibérica entorno a los años 70 (Grande del Brío 1984).

Después de un fuerte declive demográfico también se espera que la pérdida alélica afecte más a los alelos raros o poco frecuentes de la población ya que tienen mayor probabilidad de perderse. La prueba *Mode-Shift* incorporada en el programa BOTTLENECK detectó la pérdida alélica en la población ibérica porque se trata de un cuello de botella de pocas docenas de generaciones (Luikart y col. 1998), pero no en la rusa, probablemente debido al potencial migratorio de las poblaciones no aisladas que permite la incorporación rápida de alelos poco frecuentes en la población de origen y/o que el cuello de botella no es reciente.

Por lo tanto, se recomienda el uso de diferentes aproximaciones y marcadores moleculares para detectar cuellos de botella porque los resultados varían en función de las características de cada población.

4.1.6 Eficacia de los marcadores moleculares en muestras no invasivas

En las muestras no invasivas, donde el DNA es de baja calidad y cantidad, la secuenciación de mtDNA fue muy útil porque su gran número de copias por célula y los pequeños fragmentos secuenciados nos permitieron identificar el 98% de las muestras analizadas. En este estudio usamos dos tipos de secuencias localizadas en la región control del DNA mitocondrial. La primera es una secuencia de 333 pb que permite la diferenciación entre perro y lobo e incluso en algunos casos, subespecies de lobo (Vilà y col. 1997). Esta secuencia y el uso de muestras no invasivas fueron fundamentales para monitorizar genéticamente al lobo en Cataluña sin necesidad de capturarlo. Además, hay otra ventaja administrativa de poder discernir genéticamente entre heces de perro/lobo: si el rastro está cerca del cadáver de un animal doméstico tendremos un indicio del causante del ataque que por sistema suele ser atribuido al lobo (hecho que conlleva el pago correspondiente por parte de la Administración).

En el caso de no obtener la primera secuencia, realizamos la secuenciación de un segundo fragmento de menor tamaño y más conservado que posibilita la identificación de una gran variedad de mamíferos, entre ellos, el zorro (Protocolo desarrollado por el

SVGM). De esta forma también descartamos que la primera secuencia falle por la baja calidad/cantidad de DNA extraído.

En cuanto a la determinación del sexo a partir de muestras no invasivas de lobo, siguiendo nuestra metodología (ver apartado 3.2) obtuvimos un 90% de éxito, un buen porcentaje si se compara con otros estudios que se sitúan entorno al 64% y 88% en el caso del lobo (Lucchini y col. 2002; Scandura 2005; Seddon 2005), entre el 20% y 79% en el caso de las nutrias (Dallas y col. 2003; Mucci y Randi, 2007) y menos del 50% en el caso de los coyotes (Kohn y col. 1999) y tigres (Sugimoto y col. 2006).

Por último, para la identificación individual usamos marcadores moleculares de tipo microsatélite. Los estudios con muestras no invasivas tienen un mayor coste económico en comparación con los que usan muestras invasivas (sangre, tejido) porque el número de réplicas por muestra como mínimo se cuadruplica. El DNA de las muestras no invasivas suele estar muy degradado provocando un incremento de los errores de genotipado (Taberlet y col. 1996). Luego es recomendable realizar mínimo 4 réplicas (Figura 4.4) para detectar los *dropouts* (o la no amplificación de uno de los marcadores) y/o la presencia de falsos alelos (la amplificación de una banda que no corresponde a un alelo real del marcador) (Beja-Pereira y col. 2009). Para estudiar la pre-población catalana descartamos 4 marcadores poco polimórficos (no informativos) y de gran tamaño (mayor riesgo de no amplificación) de la batería de 13 microsatélites posibles (Altet y col. 2001; Ramírez y col. 2006). De esta manera conseguimos un 52% de éxito en la identificación de los lobos llegados a Cataluña, que es un resultado comparable al de otros estudios que usaron muestras no invasivas de lobo, oso y coyote (Kohn y col. 1999; Lucchini y col. 2002; Smith y col. 2006; Bellemain y col. 2007).

La gran desventaja de utilizar marcadores microsatélites es la imposibilidad de comparar resultados entre laboratorios si no se estandarizan previamente las medidas alélicas (Morin y col. 2004). Por este motivo, en el año 2008 unificamos los protocolos para el seguimiento del lobo entre laboratorios genéticos de distintos países, esto es, la utilización del mismo juego de marcadores y la secuenciación de los microsatélites más representativos de la población para su estandarización. El objetivo de la colaboración entre laboratorios es la posibilidad de identificar cualquier lobo sea cual sea su área de distribución. Este sistema de identificación individual usando microsatélites está reconocido a nivel europeo y por la ISAG (International Society of Animal Genetics) y

en definitiva permite controlar la población de lobos sin telemetría y sin captura en por ahora, cuatro países distintos como son España, Francia, Italia y Suiza.

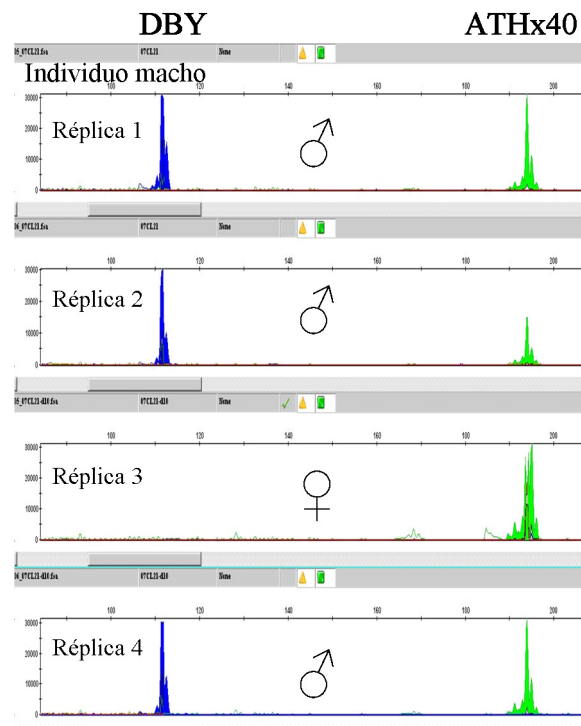


Figura 4.4 Técnica de sexado repetida 4 veces para la misma muestra. En la réplica 3 se muestra un *dropout* (el marcador del cromosoma Y no amplifica) produciéndose un error en el sexado y asignando un individuo como hembra cuando es un macho como indican las réplicas 1, 2 y 4.

Otro sistema para identificar individuos es usando SNPs (Millar y col. 2008; Morin y Mccarthy 2007; vonHoldt y col. 2010b), menos polimórficos que los microsatélites pero que permiten la comparación directa de resultados entre laboratorios que hayan utilizado el mismo juego de marcadores. La mayoría de estos trabajos parten de muestras invasivas porque trabajan con chips que necesitan DNA de alta calidad. El gran reto por lo tanto sería desarrollar sistemas de genotipado de SNPs robustos que permitiesen el análisis de muestras no invasivas de baja calidad de DNA (*e.g.* heces o pelos caídos en trampas). Entre las ventajas de esta nueva técnica destacaríamos la comparación directa de los resultados entre laboratorios, la posibilidad de establecer relaciones filogenéticas y la rapidez para obtener resultados porque se reduce el error de

genotipado asociado a los microsátélites y por lo tanto el número de réplicas por muestra.

4.2 CONTROL PARASITOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN

Leishmania infantum es un protozoo transmitido por los mosquitos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* y causante de la enfermedad leishmaniosis endémica en toda la franja mediterránea (Gramiccia y Gradoni 2005). Las muertes por leishmaniosis en humanos son poco frecuentes contrariamente a lo que ocurre en perros, que además de actuar como reservorio para el parásito, mueren si no se detecta y se trata la enfermedad. En lobos, fue Moheballi y col. (2005) quien detectó el primer caso en Ahar (Irán) donde un animal fue abatido y posteriormente diagnosticado de leishmaniosis. Sin embargo, no se ha evidenciado la presencia del parásito en el lobo ibérico y es por este motivo que realizamos un estudio (ver apartado 3.4) en lobos cautivos que habitan en parques zoológicos localizados en España, Portugal y el Sur de Francia, donde la tasa media de infección en perro es del 20% (Jambou y col. 1986; Nieto y col. 1992; Acedo Sánchez y col. 1996; Fisa y col. 1999; Cardoso y col. 2004, Sobrino y col. 2008). En nuestro estudio encontramos una prevalencia de infección en sangre periférica del 9% (3 de 33 muestras dieron positivas para *L. infantum*).

La detección del parásito se realizó usando dos técnicas independientes y complementarias, la técnica por inmunoabsorbancia o ELISA y la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La técnica de ELISA detecta anticuerpos específicos en el suero del cánido ante la presencia del parásito (Riera y col. 1999). La PCR en tiempo real cuantifica la presencia del parásito por mililitro de sangre (Francino y col. 2006). Aunque el parásito se localiza principalmente en la médula ósea o en el torrente sanguíneo, no se descarta que pueda localizarse en otros tejidos debido al tropismo parasitario (Solano-Gallego y col. 2001).

Actualmente no existe una vacuna para la enfermedad pero se puede tratar y prevenir mediante el uso de collares anti-parasitarios o evitando la exposición nocturna al aire libre del lobo cautivo durante la época más prolifera del mosquito, esto es, entre los meses de abril y mayo. Es decir, los estudios parasitológicos en poblaciones cautivas son fáciles de controlar y permiten optimizar la técnica para ser aplicada, en última instancia, en poblaciones salvajes. El análisis rutinario de cadáveres de lobo por atropello o envenenamiento permitiría determinar el estado sanitario de la población

salvaje si se establece un programa de detección de parásitos habituales en el perro para las muestras invasivas de lobo que se consigan: se ha demostrado que existen lobos cautivos infectados por *Leishmania infantum*, sería interesante determinar si también la población salvaje está infectada y en riesgo de desarrollar la enfermedad, especialmente en zonas endémicas para la leishmaniosis canina como es el Sur de Europa (Gramiccia y Gradoni 2005).

4.3 IMPLICACIONES EN GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN

El trabajo realizado en el contexto de la presente tesis ha contribuido a conocer mejor el estado de las principales poblaciones europeas de lobo, y por tanto, aporta más información para definir los programas de conservación de cada una de las poblaciones. Además, el hecho de haber caracterizado todas las poblaciones con los mismos marcadores, nos permite comparar resultados y establecer una visión global de la situación del lobo europeo.

A nivel local, proponemos:

En la población rusa, detectamos por primera vez los efectos genéticos del cuello de botella y un valor moderado de F_{IS} que indica una tendencia al apareamiento preferencial dentro de las poblaciones como causa de posibles barreras geográficas y/o ecológicas que impedirían el flujo genético entre poblaciones. Por lo tanto, sería conveniente ampliar la zona de muestreo para definir adecuadamente las MUs de la Federación Rusa y de este modo gestionar las poblaciones de acuerdo con sus características locales y no globales.

En la población ibérica detectamos niveles de variabilidad genética comparables al de algunas poblaciones no aisladas. Sin embargo, aunque su tamaño poblacional es ligeramente superior al tamaño mínimo viable a corto plazo ($N_e = 50$), no es viable a largo plazo ($N_e = 500$) (Soulé 1980; Vilà 2010). Por lo tanto, sugerimos tratar a la población ibérica como una MU, evitar la fragmentación y favorecer la conexión entre la población del Noreste con los núcleos aislados del Sur.

En el caso de la pre-población catalana, hemos determinado el número mínimo de individuos durante 10 años (13 individuos), la ratio sexual (12M:1H) y el origen itálico. Sugerimos ampliar el seguimiento genético con el fin de obtener la mayor información posible y continuar con las medidas de protección para favorecer su asentamiento y futura expansión territorial. La expansión de las poblaciones empieza por los machos

pero debe ser seguida por las hembras si se pretende formar unidades reproductoras estables. Sin éstas, una población no puede consolidarse y por lo tanto está muy expuesta a desaparecer. Por lo tanto, recomendamos favorecer la formación de unidades reproductoras y evitar cualquier tipo de fragmentación, ya sea del territorio, ya sea de la población original, para favorecer el flujo genético entre individuos y/o entre poblaciones.

A nivel global, al haber definido las MUs y al haber estudiado las poblaciones con los mismos marcadores hemos podido descartar la hibridación perro/lobo, pero más importante podremos analizar el efecto del *outbreeding* si de forma natural (sin translocación) se cruzan el lobo ibérico y el lobo itálico, ya que el *outbreeding* puede reducir el éxito reproductivo de la especie (*fitness*) originándose una depresión exogámica, aunque también puede favorecerlo, reduciendo el coeficiente de endogamia de la población (Frankham 2005).

Además, el trabajo realizado en esta tesis ha contribuido al desarrollo de protocolos útiles para la conservación: hemos desarrollado una técnica eficiente de sexado que no requiere la captura del lobo salvaje. Del mismo modo, el uso de muestras no invasivas nos ha permitido monitorizar una población sin captura ni telemetría. El uso de lobos cautivos también ha permitido optimizar una técnica que puede ser aplicada al lobo salvaje, como es la detección del parásito *Leishmania infantum* causante de la enfermedad Leishamiosis canina. En esta línea, sugerimos realizar un protocolo de actuación para prevenir enfermedades caninas de transmisión vectorial (CVBD) en lobos cautivos y salvajes que habitan en zonas endémicas para una enfermedad (Otranto y col. 2010).

5 CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

1. Se ha detectado genéticamente el cuello de botella ocurrido en las poblaciones de lobo gris de la Península Ibérica y de la Federación Rusa.
2. Las poblaciones ibérica y rusa tienen un nivel actual moderado-alto de variabilidad genética. La estimación del tamaño poblacional en ambas poblaciones es igual o superior al mínimo viable poblacional a corto plazo ($N_e = 50$), pero inferior a largo plazo ($N_e = 500$).
3. La población ibérica de lobos, con la excepción del núcleo aislado de Sierra Morena, puede considerarse como una Unidad de Manejo Independiente de la misma manera que la población rusa de lobos. Sin embargo, mientras las muestras ibéricas representan prácticamente la totalidad de la población, esto es, sólo hay una MU en la Península Ibérica, las muestras rusas no representan la totalidad de la población (≥ 40.000 individuos) y por lo tanto esperaríamos encontrar más de una MU en territorio ruso.
4. Todos los lobos localizados en Cataluña tienen un origen italiano (*Canis lupus italicus*) (haplotipo W4) y no ibérico (*Canis lupus signatus*).
5. Se ha confirmado genéticamente la presencia de mínimo 12 lobos macho y 1 hembra en los Pirineos y Pre-Pirineos Catalanes desde el año 2000 hasta el 2010.
6. No se ha encontrado ningún individuo híbrido entre lobo ibérico/italico en la Península Ibérica.
7. Los resultados obtenidos con las técnicas moleculares desarrolladas y optimizadas para muestras no invasivas de lobo han sido de un 98% para la identificación de la especie, un 90% para el sexado y un 52% para la identificación individual.
8. El sistema estandarizado a nivel europeo y utilizado en este trabajo para identificar cualquier lobo gris permite actualmente seguir un ejemplar por España, Francia, Italia y Suiza sin capturarlo y sin telemetría.
9. Por primera vez se ha detectado la presencia del parásito (*Leishmania infantum*) causante de la leishmaniosis canina en lobos ibéricos cautivos.

6 RESUMEN

6 RESUMEN

Preservar la diversidad genética es tarea de la biología de la conservación, y más concretamente de la genética de la conservación. Y es dentro de este marco de actuación que se ha desarrollado esta tesis, cuyo objetivo ha sido estudiar, desde un punto de vista genético, los factores de riesgo de extinción del lobo gris como son los cuellos de botella, la hibridación, la fragmentación y/o el aislamiento de las poblaciones.

Para ello seleccionamos cuatro poblaciones de lobos que se diferencian por su estado de conservación: una población extensa y no aislada en la Federación Rusa, una población pequeña y aislada en la Península Ibérica, una pre-población de lobos que ha recolonizado recientemente un territorio (Cataluña), y un grupo de lobos cautivos de diferentes zoológicos del Sur de Europa y que habitan en una región endémica para la enfermedad leishmaniosis.

Las muestras utilizadas fueron de dos tipos, invasivas (*e.g.* sangre, tejido) y no invasivas (*e.g.* heces, pelos); éstas últimas con la ventaja de que no requieren la captura del animal salvaje. La caracterización genética de las muestras se realizó mediante marcadores moleculares de herencia materna, paterna y biparental.

En las poblaciones ibérica y rusa de lobos detectamos genéticamente el cuello de botella ocurrido durante el siglo pasado y analizamos sus efectos. La variabilidad genética actual de ambas poblaciones es moderada-alta. Sin embargo, el tamaño poblacional de ambas poblaciones es inferior al mínimo viable poblacional a largo plazo ($N_e > 500$). También concluimos que la población de lobos de la Península Ibérica (con la excepción del núcleo aislado de Sierra Morena) puede ser tratada como una Unidad de Manejo Independiente (MU). En contraste, en territorio ruso es probable que haya más de una MU. Por lo tanto, recomendamos evitar la fragmentación, tanto de la población como del territorio, para facilitar el flujo genético dentro de las poblaciones, especialmente en la población ibérica, que al estar aislada tiene mayor riesgo de desaparecer.

En cuanto a la pre-población catalana, el seguimiento genético a partir de muestras no invasivas nos ha permitido concluir que todos los individuos llegados a Cataluña tienen un origen itálico y no han sufrido hibridación con perros o lobos ibéricos. También nos ha permitido establecer el número mínimo de individuos (13) y la ratio sexual (12:1) durante 10 años (2000-2010). Esta pre-población no es viable a corto plazo ($N_e = 50$) y

por lo tanto, se recomienda favorecer su expansión territorial y la formación de unidades reproductoras.

Por último, en lobos cautivos, la prevalencia del parásito causante de la leishmaniosis canina fue del 9%. Se recomienda, por lo tanto, desarrollar un protocolo de actuación que permita controlar enfermedades caninas de transmisión vectorial (CVBD) en poblaciones salvajes de lobo en el sur de Europa (*C. l. signatus* y *C. l. italicus*) expuestas en este caso concreto al parásito *Leishmania infantum*.

Los resultados aportados en esta tesis permiten adecuar los planes de gestión y de manejo a las características propias de la población y no de la especie, siendo estos planes más efectivos porque garantizan la supervivencia de la población y consecuentemente de la especie, en este caso, el lobo gris.

7 REFERENCIAS

7 REFERENCIAS

Acedo Sánchez C, Martín Sánchez J, Vélez Bernal ID *et al.* (1996) Leishmaniasis Eco-epidemiology in the Alpujarra Region (Granada province, southern Spain). *International Journal for Parasitology*, 25: 303-310.

Adams JR, Kelly BT, Waits LP (2003) Using faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*). *Molecular Ecology*, 12: 2175-2186.

Aggarwal RK, Kivisild T, Ramadevi J, Singh L (2007) Mitochondrial DNA coding region sequences support the phylogenetic distinction of two Indian wolf species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45: 163–72.

Agnarsson I, Kuntner M, May-Collado LJ (2010) Dogs, cats, and kin: A molecular species-level phylogeny of Carnivora. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 726-745.

Allendorf FW, Luikart G (2006) *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing. Oxford.

Allendorf FW, Hohenlohe PA, Luikart G (2010) Genomics and the future of conservation genetics. *Nature reviews*, 11: 697-709

Almberg E, Mech LD, Smith DW, Sheldon JW, Crabtree RL (2009) A Serological Survey of Infectious Disease in Yellowstone National Park's Canid Community. *Plos One*, 4 (9).

Altet L, Francino O, Sánchez A (2001) Microsatellite polymorphism in closely related dogs. *J. Hered.*, 92: 276-279.

Álvares FI, Barroso JC, Blanco J *et al.* (2005) Wolf status and conservation in the Iberian Peninsula. *International Congress Frontiers of Wolf Recovery*. Colorado Springs, Colorado, October 2005.

Andersen DH, Fabbri E, Santini A *et al.* (2006) Characterization of 59 canine single nucleotide polymorphisms in the Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology Notes*, 6: 1184-1187.

Andersone Z, Lucchini V, Randi E, Ozolins J (2002) Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mamm. Biol.*, 67: 79-90.

Anderson M, vonHoldt BM, Candille SI *et al.* (2009) Molecular and Evolutionary History of Melanism in North American Gray Wolves. *Science*, 323: 1339-1343.

Aquadro CF, Greenberg DB (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution; analysis of nucleotide sequence from seven individuals. *Genetics*, 103: 211-220.

Aspi J, Roininen M, Ruokonen M, Kojola I, Vilà C (2006) Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Molecular Ecology*, 15: 1561-1579.

Aspi J, Roininen M, Kiiskilä J *et al.* (2009) Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. *Conservation Genetics* 10: 815-826.

Avise JC, Hamrick JL (1996) *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York.

Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13: 729-744.

Beck A, Beck R, Kusak J *et al.* (2008) A Case of Visceral Leishmaniosis in a Gray Wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(2): 451-456.

- Beja-Pereira A, Oliveira R, Alves PC, Schwartz MK, Luikart G (2009) Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1279-1301.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (1999) GENETIX, Logiciel sous Windows TM pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génôme et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bellemain E, Nawaz MA, Valentini A, Swenson JE, Taberlet P (2007) Genetic tracking of the brown bear in northern Pakistan and implications for conservation. *Biological conservation*, 134: 537-547.
- Benzecri J (1973) L'Analyse des Données. Tome I: la Taxinomie; Tome II: l'Analyse des Correspondances. Dunod Press, Paris.
- Bibikov DI (1994) Wolf problem in Russia. *Lutreola*, 3: 10-14.
- Bibikov DI, Ovsyannikov NG, Filimonov AN (1983) The status and management of the wolf population in the USSR. *Acta Zoologica Fennica*, 174: 269-271.
- Birky CW, Maruyama T, Fuerst P (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplast, and some results. *Genetics*, 103: 513-527.
- Blanco JC, Cuesta L, Reig S (1990). El lobo (*Canis lupus*) en España. Situación, problemática y apuntes sobre su ecología. ICONA, Madrid, 118pp.
- Boitani L (2003) Wolf conservation and recovery. Pp. 317-344 in: Mech LD, Boitani L (eds.), *Wolves. Behavior, ecology, and conservation*. The University of Chicago Press, Chicago.

Borisov BP, Gibet LA, Gubar JP *et al.* (1992) Senior management of the hunting facilities economy at RSFSR. The central research laboratory of the hunting facilities economy and reserves. Moscow (in Russian).

Boyko AR, Boyko RH, Boyko CM *et al.* (2009) Complex population structure in African village dogs and its implication for inferring dog domestication history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106: 13903–13908.

Brohede J, Primmer CR, Moller A, Ellengren H (2002) Heterogeneity in the rate and pattern of germline mutation at individual microsatellite loci. *Nucleic Acids Research*, 30: 1997-2003.

Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV (2003) The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of populations history. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 249-256.

Busch JD, Waser PM, DeWoody JA (2007) Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Molecular Ecology*, 16: 2450-2462.

Cardoso L, Rodrigues M, Santos H *et al.* (2004) Sero-epidemiological study of canine *Leishmania spp.* infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet. Parasitol.*, 121, 21-32.

Carmichael LE, Nagy JA, Larter NC, Strobeck C (2001) Prey specialization may influence patterns of gene flow in wolves of the Canadian Northwest. *Molecular Ecology*, 10, 2787–2798.

Carmichael LE, Krizan J, Nagy JA *et al.* (2007) Historical and ecological determinants of genetic structure in arctic canids. *Molecular Ecology*, 16: 3466-3483.

Carmichael LE, Krizan J, Nagy JA *et al.* (2008) Northwest passages: conservation genetics of Arctic Island wolves. *Conservation Genetics*, 9: 879-892.

Casulli A (2001) Il lupo nella Russia Europea. Thesis. Università degli Studi di Roma La Sapienza.

Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3): 621–631.

Clutton-Brock *et al.* (2001) *Animal: The definitive Visual Guide to the World's Wildlife*. Dorling Kindersley Limited, London.

Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.

Courchamp F, Clutton-Brock T, Grenfell B (1999) Inverse density dependence and the Allee effect. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 405–410.

Crandall KA, Bininda-Emonds OR, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 290-295.

Crisler L (1962) *Wir heulten mit den wölfen*. Münche (dtv), 75.

Cubaynes S, Pradel R, Choquet R *et al.* (2010) Importance of accounting for detection heterogeneity when estimating abundance: the case of French Wolves. *Conservation Biology*, 24(2): 621-626.

Dalén L, Götherström A, Angerbjörn A (2004) Identifying species from pieces of faeces. *Conservation Genetics*, 5: 109-111.

Dallas JF, Coxon KE, Sykes T *et al.* (2003) Similar estimates of population genetic composition and sex ratio derived from carcasses and faeces of Eurasian otter *Lutra lutra*. *Molecular Ecology*, 12: 275-282.

- Dawson RJG, Gibbs HL, Hobson KA, Yezerinac SM (1997) Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79: 506–514.
- Dayan T (1999) Early domesticated dogs of the Near East. *J. Archaeol. Sci.* 21, 633-640.
- DeSalle R, Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. *Nat. Rev. Genet.* 5: 702–712.
- DiRienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes MA, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 3166-3170.
- Durnin ME, Palsbøll PJ, Ryder OA, McCullough DR (2007) A reliable genetic technique for sex determination of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) from non-invasively collected hair samples. *Conservation Genetics*, 8: 715-720.
- Echegaray J, Vilà C (2009) Noninvasive monitoring of wolves at the edge of their distribution and the cost of their conservation. *Animal conservation*, 13(2):157-161.
- Edmands S (2007) Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology*, 16: 463-475.
- Ellegren H (1999) Inbreeding relatedness in Scandinavian grey wolves *Canis lupus*. *Hereditas*, 130: 239-244.
- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline. *TIG*, 16: 551-558.
- Enseñat C (1996) European Regional Studbook. Lobo ibérico *Canis lupus signatus*. Parc Zoològic de Barcelona, Barcelona, Spain.

Estoup A, Cornuet JM (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data, pp. 50-65 in *Microsatellites: Evolution and applications*, edited by D.B. Goldstein and C. Schlötterer. Oxford University Press, Oxford.

Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11: 1591-1604.

Fabbri E, Miquel C, Lucchini V *et al.* (2007) From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology*, 16: 1661–1671.

Fain SR, Straughan DJ, Taylor BF (2010) Genetic outcomes of wolf recovery in the western Great Lakes states. *Conservation Genetics*, 11: 1747-1765.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7: 574-578.

Fisa R, Gállego M, Castillejo S *et al.* (1999) Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.*, 83, 87-97.

Flagstad Ø, Walker CW, Vilà C *et al.* (2003) Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular Ecology*, 12: 869-880.

Fox MW (1971) Ontogeny of socio-infantile and socio-sexual signals in canids. *Z. Tierpsychol.*, 28: 185-210.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E *et al.* (2006) Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 137: 214-21.

Frankham R (1995) Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conserv. Biol.*, 9: 792–799.

Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biol. Conserv.*, 126: 131–140.

Frankham R (2010) *Biological conservation*, 143: 1919-1927.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Fredrickson RJ, Siminski P, Woolf M, Hedrick PW (2007) Genetic rescue and inbreeding depression in Mexican wolves. *Proceedings of the Royal Society*, 274, 2365-2371.

Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305-318.

Geffen E, Anderson MJ, Wayne RK (2004) Climate and habitat barriers to dispersal in the highly mobile grey wolf. *Molecular Ecology*, 13: 2481-2490.

Germonpre M *et al.* (2009) Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancientDNA and stable isotopes. *J. Archaeol. Sci.*, 36: 473-490.

Gotelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum GD *et al.* (1994) Molecular genetics of the most endangered canid: The Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, 3: 301-312.

Goudet J (2000) FSTAT Version 2.9.3.2. Computer package for PCs. Institute of ecology, Lausanne, Switzerland.

Gramiccia M, Gradoni L (2005) The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35, 1169-1180.

-
- Grande del Brío R (1984) El lobo ibérico. Biología y mitología. Editorial Hermann Blume. Madrid.
- Grassé PP (1982) Manual de Zoología. Barcelona: Toray-Masson.
- Gray MM, Granka JM, Bustamante CD *et al.* (2009) Linkage Disequilibrium and Demographic History of Wild and Domestic Canids. *Genetics*, 181: 1493–1505.
- Gray MM, Nathan B Sutter NB, Ostrander EA, Wayne RK (2010) The IGF1 small dog haplotype is derived from Middle Eastern grey wolves. *BMC Biology*, 8: 16
- Gubar JP (1996) The wolf in Russia caught between hunters and environmentalists. *Russian Conservation News*, 8: 19-20.
- Hagenblad J, Olsson M, Parker HG, Ostrander EA, Ellegren H (2009) Population genomics of the inbred Scandinavian Wolf. *Molecular Ecology*, 18:1341-1351.
- Hailer F, Leonard J (2008) Hybridization among three native North American *Canis* species in a region of natural sympatry. *Plos One*, 3 (10).
- Hall ER, Nelson KR (1959) Mammals of North America. Ronald Press, New York, 2: viii + 547-1083 + 79.
- Harr B, Schlotterer C (2000) Long microsatellite alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genome-wide underrepresentation. *Genetics*, 155: 1213-1220.
- Harrington FH, Paquet PC (1982) Wolves of the world. Noyes Publications, Parck Ridge N. J.
- Hedrick PW (2009) Wolf of a different colour. *Heredity*, 103(6):435-6

Hedrick PW, Fredrickson R (2010) Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conservation Genetics*, 11, 615-626.

Hefner R, Geffen E (1999) Group Size and Home Range of the Arabian Wolf (*Canis lupus*) in Southern Israel *Journal of Mammalogy*, 80(2): 611-619.

Honghai Z (1999) Population and distribution of wolf in the world *Journal of Forestry Research*, 10(4).

Höss M, Kohn M, Pääbo S, Knauer F, Schröder W (1992) Excrement analysis by PCR. *Nature*, 359: 199.

IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3 <www.iucnredlist.org/details/3746/1/full>

Jambou D, Marty P, Jambou R *et al.* (1986) Preliminary serological study on canine leishmaniasis in the Alpes Martimes Departament, France. *Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene*, 80: 666-667.

Johnson MR, Boyd DK, Pletscher DH (1994) Serologic investigations of canine parvovirus and canine distemper in relation to wolf (*Canis lupus*) pup mortalities. *J. Wildl. Dis.*, 30(2): 270-3.

Kays R, Curtis A, Kirchman JJ (2010) Rapid adaptive evolution of northeastern coyotes via hybridization with wolves. *Biology Letters*, 6(1): 89-93.

Keller LF, Jeffery KJ, Arcese P *et al.* (2001) Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society of London*, 268: 1387-1394.

Kimura M, Crow JF (1964) The Number of Alleles that Can Be Maintained in a Finite Population. *Genetics*, 49: 725-738.

-
- Kimura y Ohta (1978) Stepwise Mutation Model and Distribution of Allelic Frequencies in a Finite Population. *Proceedings of the National Academy of Science*, 75: 2868-72.
- Klütsch CF, Seppälä EH, Fall T *et al.* (2011) Regional occurrence, high frequency but low diversity of mitochondrial DNA haplogroup d1 suggests a recent dog-wolf hybridization in Scandinavia. *Animal Genetics*, 42(1): 100-3.
- Koblmüller S, Nord M, Wayne RK, Leonard JA (2009) Origin and status of the Great Lakes wolf. *Molecular Ecology*, 18: 2313-2326.
- Kohn MH, York EC, Kamradt DA, Haught G, Sauvajot RM, Wayne RK (1999) Estimating population size by genotyping faeces. *R. Soc. Lond.*, 266: 657-663.
- Kohn MH, Murphy WJ, Ostrander EA, Wayne RK (2006) Genomics and conservation genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(11): 629-637.
- Konishi M, Takata K (2004) Impact of Asymmetrical Hybridization Followed By Sterile F1 Hybrids on Species Replacement in *Pseudorasbora*. *Conservation Genetics*, 4: 463-474.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351: 117-21.
- Kurtén B (1968) *Pleistocene mammals of Europe*. Aldine Publishing Company, Chicago.
- Leakey RE, Lewin R (1996) *The sixth extinction: biodiversity and its survival*. Weidensfeld & Nicolson (eds.). London, United Kingdom, 271 pp.
- Leblois R, Slatkin M (2007) Estimating the number of founder lineages from haplotypes of closely linked SNPs. *Molecular Ecology*, 16: 2237-2245.

Lecomte G, Dumort B (2008) Lobos. Mitos y leyendas. El lobo en la actualidad. Barcelona : De Vecchi.

Leonard JA, Vilà C, Wayne RK (2005) Legacy lost: genetic variability and population size of extirpated US grey wolves (*Canis lupus*). *Molecular Ecology*, 14: 9–17.

Leonard JA (2008) Ancient DNA applications for wildlife conservation. *Molecular Ecology*, 17: 4186-4196.

Leonard JA, Wayne RK (2008) Native Great Lakes wolves were not restored. *Biol. Lett.*, 4: 95–98.

Liberg O, Andrén H, Pedersen HC *et al.* (2005) Severe inbreeding depression in a wild wolf (*Canis lupus*) population. *Biol. Lett.*, 1(1): 17-20.

Linn S, Arber W (1968) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 59:1300-1306

Locke DP, Hillier LW, Warren WC *et al.* (2011) Comparative and demographic analysis of orang-utan genomes. *Nature*, 469: 529-533.

Lomanov IK, Borisov BP, Bolodnina OA *et al.* (1995) The hunting animals of Russia. Department on protection and rational use. State service of the account of the hunting resources. Moscow (in Russian).

Lomanov IK, Borisov BP, Bolodnina OA *et al.* (2000) The hunting animals of Russia. State service of the account of the hunting resources. Ministry of agriculture of the Russian Federation. Moscow (in Russian).

Lorenz K (1963) Sobre la agresión. El pretendido mal. Siglo veintiuno editores. Décima Edición (1980). Madrid

Lucchini E, Fabbri E, Marucco F, Ricci S, Boitani L, Randi E (2002) Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, 11: 857-868.

Lucchini V, Galov A, Randi E (2004) Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Molecular Ecology*, 13: 523-536.

Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, 89: 238-247.

Manent A (2004) *El llop a Catalunya. Memòria, llegenda i història*. Pagès Ed., Lleida.

Marucco F, Pletscher DH, Boitani L, Schwartz MK, Pilgrim KL, Lebreton J (2009) Wolf survival and population trend using non-invasive capture-recapture techniques in the Western Alps. *Journal of Applied Ecology*, 46(5): 1003-1010.

Mech LD (1970) *The wolf: the ecology and behavior of an endangered species*. Natural History Press, Doubleday, New York.

Mech LD (1988) Longevity in wild wolves. *Journal of Mammalogy*, 69(1): 197-198.

Mech LD (1995) The challenge and opportunity of recovering wolf populations. *Conservation Biology*, 9: 270-278.

Mech LD (1999) Alpha status, dominance, and division of labor in wolf packs. *Can. J. Zool.*, 77: 1196-1203.

Mech LD (2000) Leadership in wolf, *Canis lupus*, packs. *Can. Field-Nat.*, 114(2): 259-263.

- Meselson M, Yuan R (1968) DNA Restriction Enzyme from *E. coli*. *Nature*, 217: 1110-1114.
- Millar CD, Huynen L, Subramanian S, Mohandesan E, Lambert DM (2008) New developments in ancient genomics. *Trends in Ecology and Evolution*, 23: 386–393.
- Mohebbali M, Hajjarian H, Hamzavi Y *et al.* (2005) Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitology*, 129: 243-251.
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK, SNP workshop group (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(4): 208-216.
- Morin P, McCarthy M (2007) Highly accurate SNP genotyping from historical and low quality samples. *Molecular Ecology Notes*, 7: 937–946.
- Moritz C (1994) Defining ‘evolutionary significant units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.
- Mörner T, Eriksson H, Bröjer C *et al.* (2005) Diseases and mortality in free-ranging brown bear (*Ursus arctos*), gray wolf (*Canis lupus*), and wolverine (*Gulo gulo*) in Sweden. *J Wildl Dis.*, 41(2): 298-303.
- Mucci N, Randi E (2007) Sex identification of Eurasian otter (*Lutra lutra*) non-invasive DNA samples using ZFX/ZFY sequences. *Conservation Genetics*, 8: 1479-1482.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51(1): 263-73.
- Murie A (1944) The wolves of Mount McKinley. *Fauna of the Nat.Parks of the USA*. *Fauna Ser.*, 5.

-
- Musiani M, Leonard JA, Cluff HD *et al.* (2007) Differentiation of tundra/taiga and boreal coniferous forest wolves: genetics, coat colour and association with migratory caribou. *Molecular Ecology*, 16: 4149-4170.
- Nielsen EE, Hansen MM, Back L (2001) Looking for a needle in a haystack: discovery of indigenous salmon in heavily stocked populations. *Conservation Genetics*, 2: 219-232.
- Nieto CG, Navarrete I, Habela M, Hernández-Rodríguez S (1992) Seroprevalence of canine leishmaniasis around Cáceres, Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 13: 173-178.
- Nowak RM (1996) Another look at wolf taxonomy. Ecology and behavior of wolves in a changing world. Canadian Circumpolar Institute, Occasional Publication no. 35, Edmonton.
- O'Brien SJ, Johnson W, Driscoll C, Pontius J, Pecon-Slattery J, Menotti-Raymond M (2008) State of cat genomics. *Trends in Genetics*, 24(6): 268-279.
- Olsen JO (1985) Origins of the domestic dog. The fossil record. Tucson University of Arizona Press cop.
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F *et al.* (2010) Diagnosis of Canine Vector-Borne Diseases in Young Dogs: a Longitudinal Study. *J. Clin. Microbiol.*, 48(9): 3316–3324.
- Ouborg NJ, Pertoldi C, Loeschcke V, Bijlsma R, Hedrick PW (2010) Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in genetics*, 26:177-187.

Padial JM, Contreras FJ, Pérez J, Ávila E, Barea JM (2000) Análisis de la situación y problemática del lobo (*Canis lupus signatus*) en Sierra Morena Oriental (Sur de España). *Galemys* 12 (nº especial).

Palacios B, Blanco JC, Areces JJ *et al.* (2006) Estrategia para la conservación y la gestión del lobo (*Canis lupus*) en España. Madrid. Ministerio de Medio Ambiente.

Pang JF, Cornelya Kluetsch C, Zou XJ *et al.* (2009) mtDNA Data indicate a single origin for dogs South of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Mol. Biol. Evol.*, 26(12): 2849–2864.

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

Peel D, Ovenden JR, Peel SL (2004) NeEstimator: software for estimating effective population size, Version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries.

Pilot M, Branicki W, Jędrzejewski W *et al.* (2010) Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 104

Pilot M, Jędrzejewski W, Branicki W *et al.* (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology*, 15: 4533-4553.

Pimm SL; Russel GR, Gittleman JL, Brooks TM (1995) The future of Biodiversity. *Science*, 269: 347-350.

Primmer CR (2009) From conservation genetics to conservation genomics. *The Year in Ecology and Conservation Biology. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1162: 357–368.

- Ramírez O, Altet L, Enseñat C, Vilà C, Sánchez A, Ruiz A (2006). Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conservation Genetics*, 7: 861-878.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12): 2092-2100.
- Randi E, Lucchini V (2002) Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conservation Biology*, 3: 31-45.
- Randi E (2008) Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives *Molecular Ecology*, 17: 285–293.
- Raymond M and Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Riera C, Valladares JE, Gallego M *et al.* (1999) Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.*, 84: 33-47.
- Rodríguez de la Fuente (1978) TVE, Televisión Española: El hombre y la tierra.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.
- Rutledge LY, Wilson PJ, Kyle CJ, Wheeldon TJ, Patterson BR, White BN (2009) How the gray wolf got its color. *Science*, 325(5936): 33-4.
- Rutledge LY, Garroway CJ, Loveless KM, Patterson BR (2010) Genetic differentiation of eastern wolves in Algonquin Park despite bridging gene flow between coyotes and grey wolves. *Heredity*, 105: 520-531.

- Santos N, Almendra C, Tavares L (2009) Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus in free-ranging wild carnivores from Portugal. *J. Wildl. Dis.*, 45(1): 221-6.
- Scandura M (2005) Individual sexing and genotyping from blood spots on the snow: A reliable source of DNA for non-invasive genetic surveys. *Conservation Genetics*, 6: 871-874.
- Schenkel R (1947) Expression studies for wolves. *Behaviour*, 1: 81-129.
- Skoglund P, Götherström A, Jakobsson M (2010) Estimation of population divergence times from non-overlapping genomic sequences: examples from dogs and wolves. *Molecular Biology and Evolution*, 28(4): 1505-1517.
- Seddon JM (2005) Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics*, 6: 147-149.
- Seddon JM, Parker HG, Ostrander EA, Ellegren H (2005) SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population. *Molecular Ecology*, 14: 503–511.
- Shore RF, Casulli A, Bologov VV *et al.* (2001) Organochlorine pesticide, polychlorinated biphenyl and heavy metal concentrations in wolves (*Canis lupus L.* 1758) from European Russia. *The Science of the Total Environment*, 280: 45-54.
- Sillero-Zubiri C, Hoffman M, Macdonald DW (2004) Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, y col (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346: 240-4

Singer M y Berg P (1991) *Genes and Genomes*. University Science Books. Mill Valley, California.

Smith DA, Ralls K, Hurt A, Adams B, Parker M, Maldonados E (2006) Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. *Molecular Ecology*, 15: 387-406.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2006) Arlequin ver 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab. University of Berne, Switzerland.

Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A *et al.* (2008) Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, 155: 198-203.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L (2001) Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 560–563.

Soulé ME (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In: *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective* (eds Soulé ME, Wilcox BA), pp. 151-169. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, USA.

Stronen AV, Sallows T, Forbes GJ, Wagner B, Paquet PC (2011) Diseases and parasites in wolves of the Riding Mountain National Park Region, Manitoba, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(1): 222-227.

Sugimoto T, Nagata J, Aramilev VV, Belozor A, Higashi S, McCullough DR (2006) Species and sex identification from faecal samples of sympatric carnivores, Amur leopard and Siberian tiger, in the Russian Far East. *Conservation Genetics*, 7: 799-802.

Sumida M, Ogata M, Nishioka M (2000) Molecular phylogenetic relationship of pond frogs distributed in the Palearctic region inferred from DNA sequences of mitochondrial

12s ribosomal RNA and cytochrome b genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16 (2): 278-285.

Sundqvist AK, Ellegren H, Olivier M, Vilà C (2001) Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 10: 1959-1966.

Taberlet P, Bouvet J (1991) Single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *The auk*, 108 (4): 959-960.

Taberlet P, Bouvet J (1992) Bear conservation genetics. *Nature*, 358: 197.

Taberlet P, Griffin S, Goossens B *et al.* (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24: 3189-3194.

Tallmon DA, Luikart G, Waples R (2004) The alluring Simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends Ecol. Evol.*, 19: 489-496.

Tautz D (1993) Notes on the defunction and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. En: Pena S., Chakraborty D., Epplen J., Jeffreys A., Birkhauser verlag: Basel (eds.) *DNA fingerprinting: state of the science*. pp 21-28.

Tedford RH (1978) History of dogs and cats: A view from the fossil record. Pages 1 -10 in *Nutrition and Management of Dogs and Cats*. Ralston Purina Co.: St. Louis.

Thompson RC, Wang IJ, Johnson JR (2010) Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology*, 19: 2184-2195.

Valdiosera CE, Garcia-Garitagoitia JL, García N *et al.* (2008) Surprising migration and population size dynamics in ancient Iberian brown bears (*Ursus arctos*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 5123-5128.

- Valière N, Fumagalli L, Gielly L *et al.* (2003) Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation*, 6: 83-92
- Valverde JA (1971). El lobo español. *Montes* 159: 228-241.
- Verardi A, Lucchini V, Randi E (2006) Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology*, 15: 2845-2855.
- Vidal O, Pérez-Serra A, Pla C (2010) A sex determination protocol for the Iberian desman (*Galemys pyrenaicus*) based on a three primer amplification of DBX and DBY fragments with non-invasive samples. *Conservation Genetics*, 11:1185-1187.
- Vilà C (2010) Viabilidad de las poblaciones ibéricas de lobos. Enseñanzas de la genética para la conservación. Pp 157-171. In: Fernández-Gil A, Álvares F, Vilà C, Ordiz A, Los lobos de la Península Ibérica. Propuestas para el diagnóstico de sus poblaciones. ASCEL, Palencia, Spain.
- Vilà C, Savolainen P, Maldonado JE *et al.* (1997) Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276: 1687-1689.
- Vilà C, Amorin IR, Leonard JA *et al.* (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, 8: 2089-2103.
- Vilà C, Sundqvist AK, Flagstad Ø *et al.* (2003a) Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 270: 91-97.
- Vilà C, Walker C, Sundqvist AK *et al.* (2003b) Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity*, 90: 17-24.

vonHoldt BM, Stahler DR, Smith DW, Earl DA, Pollinger JP, Wayne RK (2008) The genealogy and genetic viability of reintroduced Yellowstone grey wolves. *Molecular Ecology*, 17: 252-274.

vonHoldt BM, Stahler DR, Bangs EE *et al.* (2010a). A novel assessment of population structure and gene flow in grey wolf populations of the Northern Rocky Mountains of the United States. *Molecular Ecology*, doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04769.x

vonHoldt BM, Pollinger JP, Lohmueller KE *et al.* (2010b) Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* doi:10.1038/nature08837.

Wabakken P, Sand H, Liberg O, Bjārvall A (2001) The recovery, distribution, and population dynamics of wolves on the Scandinavian peninsula, 1978–1998. *Can. J.Zool.*, 79: 710–725.

Wandeler P, Hoeck PEA, Keller LF (2007) Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 634-642.

Waples R (2006) A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*, 7: 167-184.

Waters PD, Wallis MC, Marshall Graves JA (2007) Mammalian sex-Origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Cell & Developmental Biology*, 18: 389-400.

Wayne RK, Jenks SM (1991) Mitochondrial-Dna Analysis Implying Extensive Hybridization of the Endangered Red Wolf *Canis rufus*. *Nature*, 351, 565-568.

Wayne RK (1993) Molecular evolution of the dog family. *Trends in Genetics*, 9: 218-224.

Wayne RK, Ostrander EA (2007) Lessons learned from the dog genome. *Trends in Genetics*, 23 (11).

Weber JL, Wong C (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2(8): 1123-1128.

Wheeldon TJ, Patterson BR, White BN (2010) Sympatric wolf and coyote populations of the western Great Lakes region are reproductively isolated. *Molecular Ecology*, 19: 4428-4440.

Xu X, Peng M, Fang Z, Xu X (2000) The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics*, 24: 396-399.

Zimen E, Boitani L (1975) Number and distribution of wolves in Italy. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 40: 102-112.

