

MEMORIA FINAL DEL PROYECTO

**“CONSERVACIÓN
DE LA
LIEBRE EUROPEA
EN LA
COMUNIDAD AUTÓNOMA
DEL PAÍS VASCO”**

**DE LA ASOCIACIÓN PARA EL RESTABLECIMIENTO DE LA
LIEBRE EUROPEA “ERBI EUROPAR”**

Lasarte, febrero de 2010

RESUMEN:

En colaboración con la Diputación de Guipúzcoa hemos realizado sueltas de liebre europea (*L. europaeus*) de origen ibérico en dos localidades, Errotarán declarado Refugio de caza en la modalidad de Estación Biológica y Mendata en el Biotopo Protegido del tramo litoral Deba-Zumaia. En Errotarán se ha podido constatar el buen resultado de la suelta, habiéndose observado ejemplares en las partes altas de los montes. Sin embargo, en Mendata debido a una intrusión humana durante la aclimatación en el cercado en la segunda suelta desaparecieron la mayoría de los ejemplares y aunque posteriormente se ha observado algún ejemplar, no se ha obtenido el resultado esperado.

Los análisis de las secuencias de la región de control del mtDNA en las liebres ibéricas han detectado: a) tres líneas mtDNA dentro de *L. europaeus*: *Leeu*_{mtDNA}, *Leti*_{mtDNA} y *Legr*_{mtDNA}; b) dos líneas de mtDNA dentro de *L. granatensis*: *Lggr*_{mtDNA} y *Lgti*_{mtDNA}; y c) dos líneas de mtDNA dentro de *L. castroviejoi*: *Lcca*_{mtDNA} y *Lcti*_{mtDNA}. En relación a los individuos de *L. europaeus* encontrados en el norte de la Península Ibérica con la línea *Leeu*_{mtDNA} se resaltan dos resultados: a) las frecuencias de los microsatélites muestran diferencias significativas respecto a las otras dos líneas de mtDNA ibéricas de *L. europaeus* (*Leti*_{mtDNA}, *Legr*_{mtDNA}); b) su diversidad mitocondrial está incluida dentro de la diversidad de los individuos de Europa central. Teniendo en cuenta que han existido eventos de reintroducción con propósitos cinegéticos, los resultados sugieren que el origen de la línea de mtDNA de *L. europaeus* (*Leeu*_{mtDNA}) encontrada el norte de la Península Ibérica podría ser de algún lugar de Europa central. Por lo tanto, es importante enfatizar que la reintroducción de individuos no ibéricos de *L. europaeus* en el norte de la Península Ibérica podría dar lugar a modificaciones en el pool genético de la población autóctona.

Los datos sobre repoblaciones antiguas efectuadas con *L. europaeus* procedentes de granjas francesas ayudan a explicar la alta tasa de presencia de *L. europaeus* de origen no ibérico en el centro de Guipúzcoa, detectada a través del análisis de muestras genéticas proporcionadas por cazadores.

INTRODUCCIÓN:

La población de liebre europea (*Lepus europaeus* Pallas,1778) ha experimentado una notable regresión durante los últimos 40 años en la Península Ibérica. En la parte occidental de su distribución ha desaparecido en Asturias, Palencia y gran parte de Cantabria y País Vasco. En esta última Comunidad, la situación de deterioro conocida en Guipúzcoa y Vizcaya se ha extendido recientemente aunque en menor intensidad a Álava. Igualmente la regresión afecta a la Comunidad de Navarra.

El precario estado actual de las poblaciones naturales en el área cantábrica justificó la necesidad de un programa de restablecimiento. Este programa fué iniciado en el año 2001 y comprende la creación de una población en cautividad para realizar repoblaciones, constituida por liebres nativas capturadas en libertad con jaulas trampa y escopeta-red. El crecimiento de la población se consigue de dos formas principalmente, mediante cría de individuos en cautividad que se integran como reproductores en el programa de cría y mediante ejemplares capturados anualmente para incrementar la variabilidad genética.

Las entidades colaboradoras realizan un seguimiento sanitario de los individuos de la granja para controlar las enfermedades y epidemias y un seguimiento genético para garantizar que las liebres pertenecen a la población ibérica de liebre europea, excluyendo así los ejemplares de liebre europea no ibéricos y de momento los híbridos de liebre europea y liebre ibérica.

El estudio que puso de relieve la existencia de introgresión genética entre las diferentes poblaciones ibéricas de liebre se debe a Alves et al. (2003). Estos autores demostraron la existencia de una introgresión antigua entre la liebre variable (*Lepus timidus*) y la liebre europea en la Península Ibérica que ha servido de acicate para ulteriores investigaciones y que ha alertado sobre la necesidad de conocer a fondo la estructura genética de las poblaciones de liebres para realizar una adecuada gestión orientada a la conservación de las líneas autóctonas.

La hipótesis de trabajo principal del proyecto es que el programa de cría y las repoblaciones pueden ayudar considerablemente al restablecimiento de la liebre europea en la Comunidad Autónoma Vasca.

Otra hipótesis de trabajo tenida en cuenta es que la línea de ADN mitocondrial *Leeu_{mtDNA}* no es autóctona de la Península Ibérica y que su distribución como consecuencia de las repoblaciones puede ser localmente extensa a juzgar por los datos previos de los resultados de los análisis de ADN mitocondrial.

Finalmente, una última hipótesis considerada es que las técnicas genéticas de ADN nuclear podrían aportar evidencia relevante sobre la autoctonía o aloctonía de la línea *Leeu_{mtDNA}*.

METODOLOGÍA:

Repoblaciones

Para la repoblación de liebres se utilizan ejemplares de la línea *Leti*_{mtDNA} que se crían en la granja de Altsasu una vez que hemos descartado los individuos de la línea *Leeu*_{mtDNA}.

Se seleccionan lugares que disponen de un nivel de protección de manera que las liebres no puedan ser vulnerables a factores artificiales de mortalidad y donde no existen liebres no autóctonas pertenecientes a la línea *Leeu*_{mtDNA}, para evitar la contaminación genética.

Se utilizan liebres juveniles que tienen una gran capacidad de adaptación.

Las liebres se sueltan dentro de cercados en lugares donde disponen de alimento artificial, agua, alimento natural y refugio.

Pasados unos días se abren los cercados y las liebres entran y salen de manera que no tienen stress por el agua y el alimento. Paulatinamente las liebres se adaptan a la vida en libertad y abandonan los cercados de manera definitiva.

Para el seguimiento se utilizan métodos indirectos como observación desde puntos fijos y detección en transectos con focos de luz.

Obtención de material genético

En los animales vivos se toman muestras de pelo con raíz, excrementos y sangre. Las muestras se trasladan en seco o en el interior de tubos sumergidos en hielo a 4°C. La sangre se traslada con EDTA. También se preservan muestras de sangre, hígado, corazón, riñón y músculo rojo congeladas a -80°C o en alcohol etílico a 70°, en particular de los ejemplares muertos. Para el desarrollo del mapa genético se solicitan muestras de animales abatidos por cazadores a las Diputaciones provinciales.

Técnicas específicas de ADN nuclear

a) *Definición de los loci microsatélites apropiados en el género Lepus.*

Para la elaboración de la metodología es necesario exponer los resultados obtenidos en la investigación anterior (Estonba et al 2001). En este trabajo, tras una revisión bibliográfica, se seleccionaron siete *loci* microsatélites inicialmente descritos en *Oryctolagus cuniculus*, que “a priori” eran idóneos para la identificación y la determinación del parentesco en estas especies. La selección se realizó atendiendo a las siguientes características: nº de alelos y frecuencias alélicas en las poblaciones estudiadas; tamaño de los productos de amplificación; condiciones de amplificación por PCR (tiempo de asociación, concentraciones de Mg^{2+} , temperatura, etc...); uso generalizado en otros laboratorios y la posibilidad de la estandarización de las técnicas de análisis.

b) *Aplicación de los microsatélites a una muestra de liebres.*

Se analizaron 54 individuos: 26 de la especie *L. europaeus*, 10 de *L. castroviejo* y 18 *L. granatensis* mediante los siete *loci* de ADN microsatélites mencionados y que se han probado útiles para la amplificación y tipaje en las tres especies del género *Lepus* analizadas. El valor del porcentaje de exclusión, Pe , es una medida de la capacidad del sistema genético propuesto para detectar tríos falsos. $Pe1 \rightarrow$ en el caso que no se conozca ningún progenitor. Y $Pe2 \rightarrow$ si un progenitor es conocido. Está calculado a partir de las frecuencias alélicas de los microsatélites en un número definido de individuos de las especies *L. europaeus* ($N = 26$), *L. granatensis* ($N = 18$) y *L. castroviejo* ($N = 10$).

En *L. europaeus*, la especie de liebre que cría la granja de Altsasu, los valores globales indican que mediante la aplicación de los siete microsatélites, el porcentaje de tríos falsos detectables es del 86% si no se conoce a ningún progenitor, y del 97,5% si se conoce a uno de los progenitores, normalmente la madre. Estos valores indican que el sistema genético propuesto es altamente discriminante y efectivo para

la resolución de casos en los que se cuestionan el parentesco o la identidad de los animales, y de aplicación directa en el control exhaustivo de los libros de registro y de los movimientos de animales, y en la trazabilidad de sus productos derivados.

Una vez puesta a punto la técnica, en el presente proyecto hemos ampliado de 7 a 17 loci microsátélites que se han seleccionado a partir de las investigaciones de Mougél et al. (1997), Rico et al. (1994), Surridge et al. (1997), van Haeringen et al. (1996), Korstanje et al. (2003), Kryger et al. (2002).

Re poblaciones antiguas

Para obtener datos sobre estas repoblaciones se han consultado los informes existentes en las Diputaciones.

RESULTADOS DE LOS OBJETIVOS:

1) MANEJO, REFORZAMIENTO DE POBLACIONES Y GESTIÓN DE LA LIEBRE EUROPEA EN LA PROVINCIA DE GUIPÚZCOA

Durante el año 2009 se han programado y ejecutado dos sueltas controladas de Liebre europea dentro del programa de reforzamiento de poblaciones en 2 puntos de Gipuzkoa: en el valle de Errotaran, término municipal de Lizartza, y en Mendata, término de Deba, dentro del área incluida en el Biotopo Protegido del tramo litoral Deba- Zumaia.

Estas sueltas se han realizado utilizando ejemplares de *L. europaeus* de origen ibérico procedentes del programa de cría en cautividad que se ha puesto en marcha a través de una colaboración entre la Universidad del País Vasco, EKOS Estudios Ambientales, la Universidad de Alcalá, el CSIC, la Fundación Gaztelán y la Asociación Erbi Europar, con ayudas del Gobierno Vasco, de la Fundación Biodiversidad y de un Programa Leader

Las características de las sueltas son las siguientes:

Errotaran (Lizartza)

Se trata de reforzar la especie en una zona con un bajo número de efectivos, tal y como se constata en los muestreos periódicamente realizados por la Diputación Foral de Gipuzkoa desde el año 1994.

Para realizar las sueltas, se ha contado con la colaboración de las sociedades de caza locales de Lizartza, Orexa y Gaztelu, que firmaron un acuerdo con la Diputación Foral de Gipuzkoa para colaborar en las labores necesarias para el buen fin de la misma, y con el compromiso de no cazar en la zona durante 3 años.

Paralelamente, mediante la Orden Foral 460/2009, de 4 de septiembre, se declaró el Refugio de caza de Errotaran, de 250 ha, en la modalidad de Estación biológica y que tendrá una vigencia indefinida.

Para efectuar las sueltas se seleccionó un terreno de matorral de propiedad pública en el paraje de Muñoa, que contó con la autorización del Ayuntamiento de Lizartza, y donde se colocó un cierre de 25 x 10 m.

Se efectuaron dos sueltas en el cercado:

- Mayo de 2009: 15 liebres (10 hembras y 5 machos).
- Octubre de 2009: 18 liebres (12 hembras y 6 machos).

Las liebres se mantuvieron alrededor de 10 días en el cercado, produciéndose un total de 7 bajas durante los primeros días, siendo los traumatismos ocasionados durante el manejo, marcaje y suelta los motivos más probables de mortandad. Una vez abierto el cercado, se proporcionó pienso y agua a lo largo del periodo en que las liebres acudían al mismo, limpiándose periódicamente los excrementos acumulados en el entorno. En total, se trajeron 33 liebres al cercado, de las cuales sobrevivieron 26 (16 hembras y 10 machos).

Mendata (Deba)

En este emplazamiento se trata de reintroducir la Liebre europea, ya que se ha constatado la ausencia de la misma. Las sueltas se han realizado dentro del Biotopo Protegido del tramo litoral Deba- Zumaia, gestionado por la Diputación, donde está prohibida la caza de la Liebre.

Las sueltas se efectuaron en un terreno de matorral-pastizal propiedad de la Diputación, donde se colocó un cierre de 25 x 10 m, que fue controlado y mantenido por guardas del Servicio Forestal y del Medio Natural.

Las sueltas realizadas fueron las siguientes:

- Julio de 2009: 15 ejemplares (10 hembras y 5 machos).
- Octubre de 2009: 17 ejemplares (12 hembras y 5 machos).

En la primera de las sueltas se contabilizaron 2 bajas por traumatismos, mientras que en la segunda a los pocos días de traer las liebres al cercado desaparecieron unos 12 ejemplares, después de que alguien rompiera el candado del cercado.

CONTROL SANITARIO

Previo al traslado de las liebres desde la granja de Altsasu a los puntos de suelta, se obtuvo la guía sanitaria expedida por el Servicio de Ganadería del Departamento de Agricultura, Ganadería y Alimentación del Gobierno de Navarra.

Una vez trasladadas las liebres a los cercados, se realizó un seguimiento durante los días que se mantuvo alimento en el cercado, contabilizándose un total de 9 bajas de un total de 65 liebres liberadas.

Al detectarse una baja, el animal era retirado del cercado y se analizó la causa más probable de muerte. En todos los casos, los traumatismos ocasionados durante la manipulación de los animales o en los momentos posteriores a las sueltas parecen haber sido la causa. Cuando ha habido duda al respecto (en un caso de las 9 bajas detectadas), se ha enviado el ejemplar al centro de Derio de Neiker- Tecnalia, para que fuera analizado por un veterinario, confirmándose el traumatismo como la causa más probable de muerte.

En los cercados se han tomado medidas preventivas para evitar la propagación de enfermedades como la coccidiosis intestinal, para lo que se ha procedido a limpiar de heces las zonas donde se han acumulado heces en el cercado y se ha extendido cal viva. Asimismo, en el comedero y bebedero se ha instalado unas rejillas para impedir el contacto de las liebres con los excrementos.

SEGUIMIENTO DE LAS POBLACIONES

Con la finalidad de conocer la evolución de las poblaciones, se utilizan distintas fuentes de información:

Muestreos nocturnos específicos en las zonas donde se han realizado sueltas:

- Errotaran: En los transectos nocturnos para el seguimiento de la especie realizados con focos halógenos desde vehículo todoterreno en el entorno durante el otoño de 2009 se ha podido constatar el buen resultado de la suelta, habiéndose observado ejemplares tanto en las cercanías del cercado como en las partes altas de los montes más cercanos.
- Mendata: En otoño de 2009 se realizaron una serie de recorridos nocturnos a pie para la observación de la especie, habiéndose observado un único ejemplar en la zona. Teniendo en cuenta ello y la desaparición de liebres del cercado en la segunda suelta realizada, se puede concluir que en Mendata no se ha obtenido el resultado esperado.

Resultados de los **rastreos** realizados por cazadores de la zona:

La Diputación ha autorizado a 8 cuadrillas la realización de muestreos específicos en la comarca de Tolosaldea entre septiembre y octubre de 2009. Estos muestreos los realizan con la ayuda de perros de caza y para 28 rastreos realizados se han detectado 20 liebres.

Seguimiento de todas las poblaciones en Gipuzkoa:

Para el seguimiento de la especie se vienen realizando anualmente en 2 ocasiones (en primavera y en otoño) transectos nocturnos en 8 zonas del Territorio: Sierras de Aloña y Aralar, Izarraitz, Antzuola, Berastegi (San Lorenzo), Ernio, Pagoeta y Zaldin (Oiartzun), dentro de los “Trabajos de ordenación y gestión cinegética en Gipuzkoa. Año 2009” (Ekos Estudios Ambientales S.L.U., para Diputación Foral de Gipuzkoa). Los resultados de estos muestreos son tenidos en cuenta y valorados en la planificación de los trabajos y en la selección de los lugares de suelta y campañas de seguimiento a realizar en las nuevas zonas repobladas.

2) ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y VARIACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES DE LIEBRES DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA VASCA EN BASE AL ADN MITOCONDRIAL Y ADN NUCLEAR.

Las relaciones evolutivas y la taxonomía de las cinco especies morfológicas de liebre en Europa (Palacios 1989, 1996) están sujetas a continuas controversias (Petter, 1961; Angermann 1983; Flux 1983; Chapman & Flux 1990; Hoffmann 1993; Pierpaoli et al., 1999; Alves et al., 2003, Estonba et al., 2006). En este debate es esencial estudiar el norte de la Península Ibérica porque es el área geográfica donde podemos encontrar tres de las 5 especies. Además, en base a datos paleontológicos (Altuna 1995,1996), durante el último período glacial una cuarta especie, *L. timidus*, estuvo presente en este área-refugio.

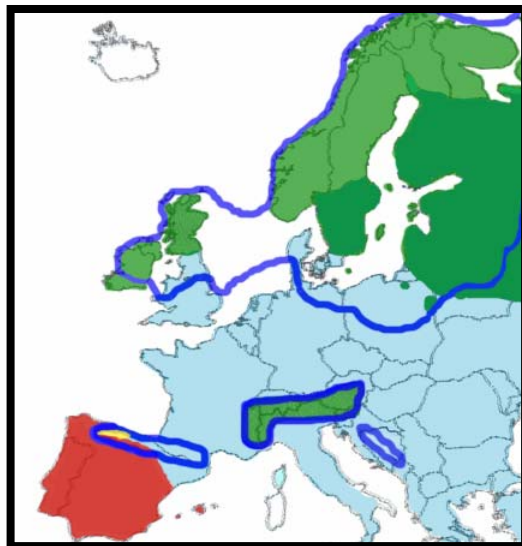


Figura 1.- Distribuciones de *Lepus* en Europa (Flux & Angermann, 1990; Mitchell-Jones et al., 1999). Área verde claro: *L. timidus*. Área azul: *L. europaeus*. Área verde oscuro: solapamiento entre *L. timidus* y *L. europaeus*. Área roja: *L. granatensis*. Área amarilla: *L. castroviejo*. Línea azul: Extensión máxima del hielo en Europa durante el período glacial más reciente (Weichsel) (Soffer & Gamble 1990).

Objetivos:

Estudiar la estructura genética de las poblaciones de liebre del norte de la Península Ibérica y su relaciones filogenética respecto a las cinco especies de liebres de Europa usando mtDNA y marcadores nucleares (loci microsatélites).

Materiales y métodos:

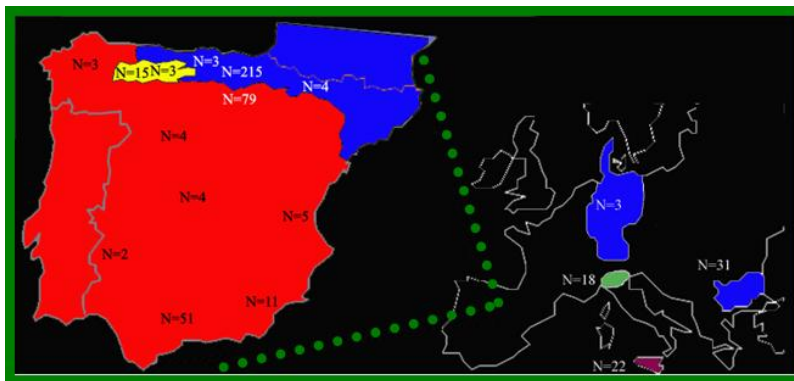
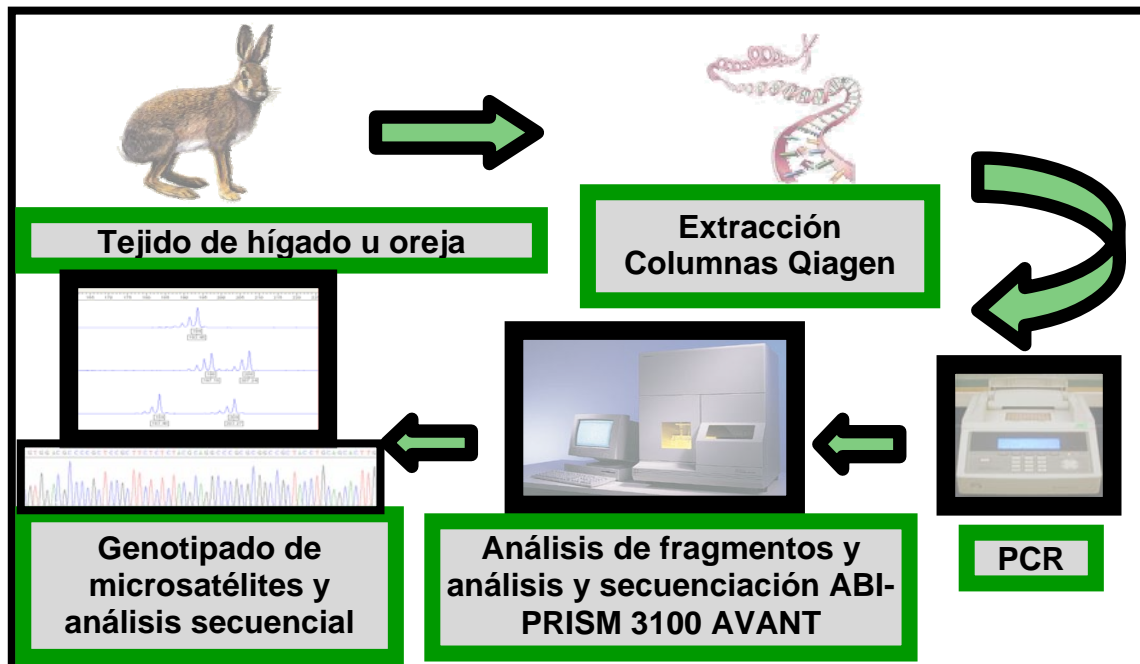


Figura 2.- Mapa que refleja los puntos de muestreo y el tamaño de las muestras



AND mitocondrial:

398 secuencias de *L. europaeus*, *L. granatensis*, *L. castroviejo* y *L. corsicanus*.

Se analizó un fragmento de la región de control del adn mitocondrial de 300 pares de bases. Primers: THR (L15926, Kocher et al., 1989) TDKD (H16498, Meyer et al., 1990)

Secuencias del GenBank: *L. timidus* (Thulin et al. 1997) *L. europaeus* (Fickel et al. 2005, Pierpaoli et al. 1999)

Microsatélites:

407 ejemplares de *L. europaeus*, *L. granatensis*, *L. castroviejo*, *L. corsicanus* y *L. timidus*

17 loci microsatélites loci a partir de Mougél et al. 1997, Rico et al. 1994, Surridge et al. 1997, van Haeringen et al. 1996, Korstanje et al. 2003, Kryger et al., 2002.

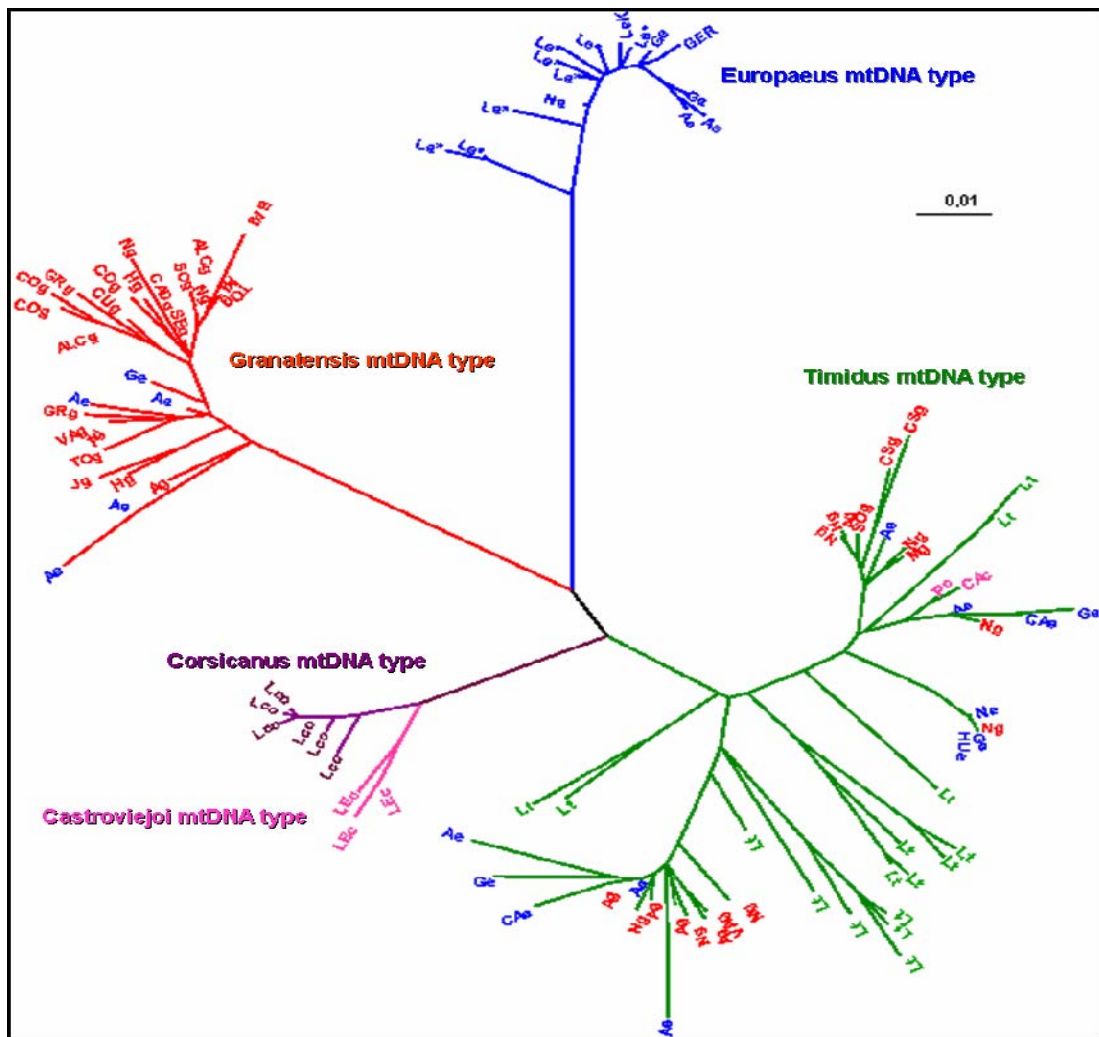
Resultados:

AND mitocondrial:

A)	d	S.E.
<i>Le</i> _{ti} -mtDNA	0.054	0.009
<i>Lg</i> _{ti} -mtDNA	0.048	0.009
<i>L. timidus</i>	0.068	0.009
<i>Lc</i> _{ti} -mtDNA	0.012	0.005
<i>L. corsicanus</i>	0.050	0.009
<i>Lc</i> _{cas} -mtDNA	0.016	0.006
<i>Le</i> _{eu} -mtDNA	0.013	0.005
<i>Le</i> _{eu} ^{CRTRAF FKHRRF} -mtDNA	0.024	0.006
<i>Le</i> _{gr} -mtDNA	0.026	0.007
<i>Lg</i> _{gr} -mtDNA	0.031	0.005

B)	d	S.E.
Timidus mtDNA type	0.061	0.009
Castroviejo mtDNA type	0.016	0.006
Corsicanus mtDNA type	0.011	0.003
Europaeus mtDNA type	0.022	0.005
Granatensis mtDNA type	0.034	0.005

Tabla 1.- Distancias genéticas (TN93) y error standard de las secuencias de la región de control (CR). A) dentro de las líneas genéticas de mtDNA. B) Dentro de los tipos de mtDNA.



Árbol 1.- Región de control del mtDNA: árbol Neighbour-joining (NJ) computado con Mega 4 usando distancias genéticas TN93 genetic distances. En azul *L. europaeus*, en rojo *L. granatensis*, en verde *L. timidus*, en rosa *L. castroviejoii*, en morado *L. corsicanus*.

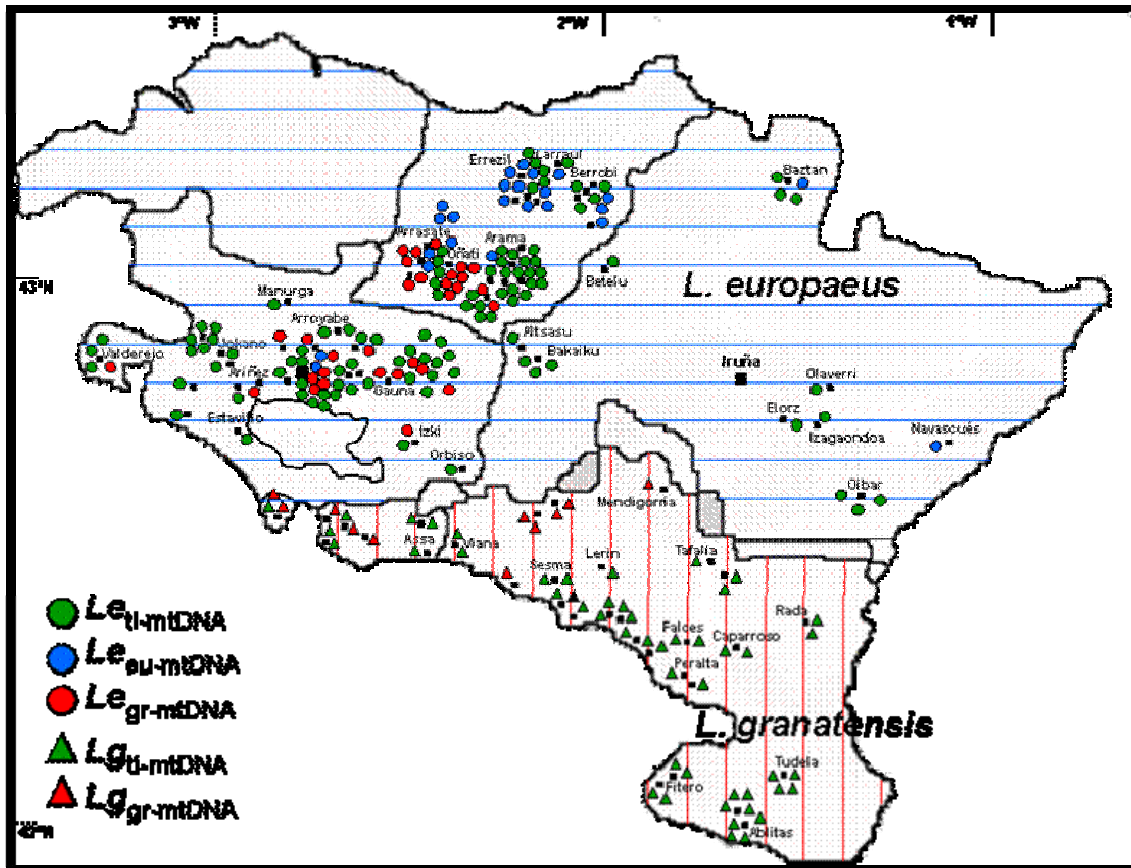


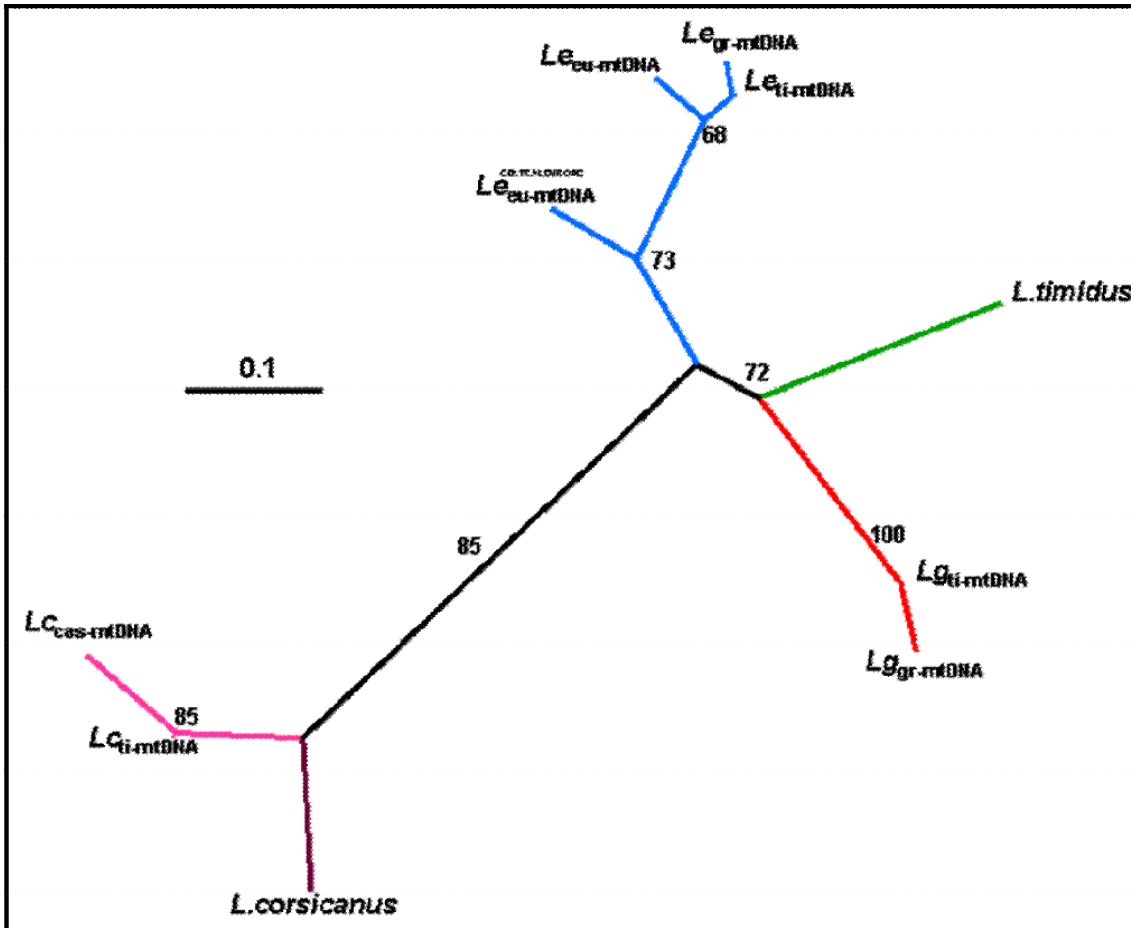
Figura 3.- Mapa que muestra la distribución de las líneas de mtDNA en la Comunidad Autónoma del País Vasco y en Navarra. Rayado horizontal y vertical: Áreas de distribución de *L. europaeus* y *L. granatensis*, respectivamente, según Mitchel-Jones et al., 1999.

Microsatélites:

A) Species	$F_{ST} \pm S.E.$	Probability
<i>L.castroviejoi</i> - <i>L.granatensis</i>	0.370±0.049	SIGN.
<i>L.castroviejoi</i> - <i>L.corsicanus</i>	0.391±0.062	SIGN.
<i>L.castroviejoi</i> - <i>L.europaeus</i>	0.347±0.058	SIGN.
<i>L.castroviejoi</i> - <i>L.timidus</i>	0.426 ±0.062	SIGN.
<i>L.granatensis</i> - <i>L.corsicanus</i>	0.369 ±0.064	SIGN.
<i>L.granatensis</i> - <i>L.europaeus</i>	0.194 ±0.044	SIGN.
<i>L.granatensis</i> - <i>L.timidus</i>	0.166 ±0.031	SIGN.
<i>L.corsicanus</i> - <i>L.europaeus</i>	0.337 ±0.066	SIGN.
<i>L.corsicanus</i> - <i>L.timidus</i>	0.403 ±0.085	SIGN.
<i>L.europaeus</i> - <i>L.timidus</i>	0.208±0.042	SIGN.

B) mtDNA lineages	$F_{ST} \pm S.E.$	Prob.
<i>Le</i> _{gr-mtDNA} - <i>Le</i> _{ti-mtDNA}	0.003±0.003	N.S.
<i>Le</i> _{gr-mtDNA} - <i>Le</i> _{eu-mtDNA}	0.032±0.008	SIGN.
<i>Le</i> _{gr-mtDNA} - <i>Le</i> _{eu-mtDNA} ^{CENTRAL EUROPE}	0.172±0.021	SIGN.
<i>Le</i> _{ti-mtDNA} - <i>Le</i> _{eu-mtDNA}	0.027±0.011	SIGN.
<i>Le</i> _{ti-mtDNA} - <i>Le</i> _{eu-mtDNA} ^{CENTRAL EUROPE}	0.109±0.026	SIGN.
<i>Le</i> _{eu-mtDNA} - <i>Le</i> _{eu-mtDNA}	0.084±0.028	SIGN.
<i>Lg</i> _{ti-mtDNA} - <i>Lg</i> _{gr-mtDNA}	0.002±0.008	N.S.

Tabla 2.- Valores F_{ST} , error standard y test de Bonferroni de 17 microsátelites. A) Entre especies. B) Entre individuos de diferentes líneas de mtDNA.



Árbol 2.- 17 loci microsátelites: árbol Unrooted neighbour-joining basado en la distancia genética standard de Nei, Ds (1971) (POPULATIONS 1.2.28) de las cinco especies de liebre de Europa divididas en sus líneas de mtDNA. El Bootstrap support se indica en ramas que han recibido más del 50% de apoyo en 1000 replicaciones del bootstrap.

Conclusiones:

1.- Los análisis filogenéticos que hemos efectuado basados en secuencias de la región de control del mtDNA y los datos de 17 microsátelites evidencian que las cinco especies

morfológicas de liebre existentes en Europa son genéticamente distintas: *L. europaeus*, *L. granatensis*, *L. castroviejo*, *L. timidus* y *L. corsicanus*. (Árbol 1, Árbol 2 y Tabla 2A).

2.- Los análisis de las secuencias de la región de control del mtDNA detectan por primera vez introgresión mitocondrial de *L. granatensis* en *L. europaeus*. Por otro lado, la introgresión mitocondrial de *L. timidus* en las tres especies ibéricas de liebre se confirma (Árbol 1). Por lo tanto, las especies de liebres ibéricas incluyen (Figuras 2 y 3):

- tres líneas mtDNA dentro de *L. europaeus*: *Leeu_{mtDNA}*, *Leti_{mtDNA}* y *Legr_{mtDNA}*.
- dos líneas de mtDNA dentro de *L. granatensis*: *Lggr_{mtDNA}* y *Lgti_{mtDNA}*
- dos líneas de mtDNA dentro de *L. castroviejo*: *Lccas_{mtDNA}* y *Lcti_{mtDNA}*

3.- En relación a los individuos de *L. europaeus* encontrados en el norte de la Península Ibérica con la línea *Leeu_{mtDNA}* sobresalen dos resultados:

- las frecuencias de los microsatélites muestran diferencias significativas respecto a las otras dos líneas de mtDNA ibéricas de *L. europaeus* (*Leti_{mtDNA}*, *Legr_{mtDNA}*) (Tabla 2B).
- su diversidad mitocondrial esta incluida dentro de la diversidad de los individuos de Europa central (Tabla 1).

Teniendo en cuenta que han existido eventos de reintroducción con propósitos cinegéticos, los resultados genéticos sugieren que el origen de la línea de mtDNA de *L. europaeus* (*Leeu_{mtDNA}*) encontrada en el norte de la Península Ibérica podría ser de algún lugar de Europa central. Por lo tanto, es importante enfatizar que la reintroducción de individuos no ibéricos de *L. europaeus* en el norte de la Península Ibérica podría dar lugar a modificaciones en el pool genético nativo.

Referencias:

Altuna. 1995. In: Moore Romanillo, A. & González Saiz, C. El final del Paleolítico Cantábrico. Ed. Universidad de Cantabria: 77-117.

- Altuna. 1996.** In: Ramil-Rego y col. Biogeografía Pleistoceno-Holoceno de la Península Ibérica. Universidad de Santiago.
- Alves et al.. 2003.** Molecular Phylogenetics and Evolution, 27, 70-80.
- Angermann, 1983.** Acta Zoologica Fennica, 174, 17-21.
- Chapman and Flux. 1990.** IUCN/SSC Lagomorph Specialist Group. Gland, Switzerland.
- Estomba et al. 2006.** Mammalian biology 71: 52-59.
- Fickel et al. 2005.** J. Wildlife Manage 69:760-771.
- Flux. 1983.** Acta. Zoologica Fennica 174:7-10.
- Hoffmann. 1993.** In: Mammal Species of the world: A Taxonomic and Geographic Reference, second edition. (D. E. Wilson and D. M.Reeder, Eds.), 807-827, Smithsonian Institution Press, Washington.
- Kocher et al. 1989.** Proceedings National. Academy of Sciences USA. 86: 6196-6200.
- Korstanje et al. 2003.** Journal of Heredity. 94(2): 161-169.
- Kryger et al., 2002.** Molecular Ecology. 2:422-424.
- Meyer et al. 1990.** Journal of Molecular Evolution 31: 359-364.
- Mitchell-Jones et al.. 1999.** Academic Press, London.
- Mougel et al., 1997.** Anim. Genet. 28:58-59.
- Palacios. 1989.** Mammalia 73 (2): 227-264.
- Palacios. 1996.** Bönner Zool. Beitr. 46 (1-4):59-91.
- Pérez-Suárez, et al. 1994.** Biochem. Genetics 32: 423-436.
- Petter. 1961.** Zeits. F. Säugetierk. 26, 30-40.
- Pierpaoli et al. 1999.** Molecular Ecology 8: 1805-1817.
- Rico et al. 1994.** Anim. Genetics.25:367.
- Soffer and Gamble. 1990** Unwin-Human, London.
- SurrIDGE et al. 1997.** Anim. Genetics. 28:302-305.
- Thulin et al.. 1997.** Molecular Ecology 6, 463-467.
- Van Haeringen et al. 1996.** J. Exp. Anim. Sci. 38: 49:57

Apéndice:

Relación de localidades de origen de las muestras de ADN estudiadas donde se señala además el tamaño de las muestras, los haplotipos y la línea de ADN mitocondrial a la

que corresponden las muestras. La mayoría de estas muestras han sido aportadas por cazadores a través de las Asociaciones o de las Diputaciones.

ID	Locality (Province)	N	Haplotypes	mtDNA type
1	Aberasturi (A)	4	E05(3)-E01	Le _{ti} -mtDNA
2	Agurain(A)	1	E05	Le _{ti} -mtDNA
2	Agurain (A)	1	E07	Le _{gr} -mtDNA
3	Alaiza (A)	2	E08(2)	Le _{ti} -mtDNA
4	Alangua (A)	1	E07	Le _{gr} -mtDNA
5	Andollu (A)	1	E04	Le _{ti} -mtDNA
6	Aprikano (A)	1	E05	Le _{ti} -mtDNA
7	Araka (A)	1	E07	Le _{gr} -mtDNA
8	Ariñez (A)	1	E06	Le _{gr} -mtDNA
9	Arkaute (A)	22	E01(5)-E05(9)-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E22-E24	Le _{ti} -mtDNA
9	Arkaute (A)	7	E02(2)-E07(4)-E21	Le _{gr} -mtDNA
9	Arkaute (A)	2	E20-E23	Le _{eu} -mtDNA
10	Assa (A)	1	G01	Lg _{ti} -mtDNA
11	Baños de Ebro (A)	1	G05	Lg _{ti} -mtDNA
12	Caicedo Yuso (A)	1	E05	Le _{ti} -mtDNA
13	Durana (A)	1	E07	Le _{gr} -mtDNA
14	Entzia (A)	2	E32-E33	Le _{ti} -mtDNA
15	Estavillo (A)	1	E01	Le _{ti} -mtDNA
16	Ezkerekotxa (A)	1	E05	Le _{ti} -mtDNA
16	Ezkerekotxa (A)	1	E07	Le _{gr} -mtDNA
17	Gauna (A)	2	E07(2)	Le _{gr} -mtDNA
18	Izki (A)	1	E34	Le _{gr} -mtDNA
18	Izki (A)	1	E05	Le _{ti} -mtDNA
19	Jokano (A)	1	E08	Le _{ti} -mtDNA
20	Kuartango (A)	6	E05(2)-E35-E36-E37-E38	Le _{ti} -mtDNA
21	Labastida (A)	2	G06-G18	Lg _{gr} -mtDNA
21	Labastida (A)	1	G02	Lg _{ti} -mtDNA
22	Laguardia (A)	1	G07	Lg _{gr} -mtDNA
23	Leza (A)	1	G01	Lg _{ti} -mtDNA
23	Leza (A)	1	G07	Lg _{gr} -mtDNA
24	Lubiano (A)	3	E01(3)	Le _{ti} -mtDNA
24	Lubiano (A)	1	E07	Le _{gr} -mtDNA
25	Mandajora (A)	1	E07	Le _{gr} -mtDNA
26	Manurga (A)	1	E08	Le _{ti} -mtDNA
27	Nanclares de Oca (A)	1	E05	Le _{ti} -mtDNA
28	Okariz (A)	1	E08	Le _{ti} -mtDNA
29	Orbiso (A)	1	E05	Le _{ti} -mtDNA
30	Ordoñana (A)	2	E05-E08	Le _{ti} -mtDNA
31	Retana (A)	1	E05	Le _{ti} -mtDNA
32	Salinas de Añana (A)	1	E08	Le _{ti} -mtDNA
33	Samaniego (A)	1	G03	Lg _{ti} -mtDNA
33	Samaniego (A)	1	G07	Lg _{gr} -mtDNA
34	Ullibarriña (A)	1	E07	Le _{gr} -mtDNA
35	Urizar (A)	1	G05	Lg _{ti} -mtDNA
36	Valderejo (A)	3	E03-E05-E43	Le _{ti} -mtDNA
36	Valderejo (A)	1	E42	Le _{gr} -mtDNA
37	Yecora (A)	2	G01-G04	Lg _{ti} -mtDNA
38	Zuazo de San Millan (A)	1	E05	Le _{ti} -mtDNA

39	Zuazo de Vitoria (A)	1	E01	Le _{ti} -mtDNA
40	Albiztur (G)	2	E10(2)	Le _{eu} -mtDNA
41	Arama (G)	1	E04	Le _{ti} -mtDNA
42	Aretxabaleta (G)	2	E07(2)	Le _{gr} -mtDNA
43	Arrasate (G)	1	E07	Le _{gr} -mtDNA
44	Ataun (G)	2	E12-E25	Le _{ti} -mtDNA
45	Beizama (G)	1	E27	Le _{eu} -mtDNA
46	Belauntza (G)	1	E28	Le _{ti} -mtDNA
47	Berrobi (G)	1	E29	Le _{ti} -mtDNA
48	Bidania (G)	1	E10	Le _{eu} -mtDNA
48	Bidania (G)	1	E11	Le _{ti} -mtDNA
49	Errezil (G)	5	E10(5)	Le _{eu} -mtDNA
50	Eskoriatza (G)	2	E07(2)	Le _{gr} -mtDNA
51	Idiazabal (G)	3	E05-E08-E12	Le _{ti} -mtDNA
52	Larraul (G)	1	E10	Le _{eu} -mtDNA
53	Lizartza (G)	1	E39	Le _{eu} -mtDNA
54	Olaberria (G)	10	E05-E08(2)-E09(3)-E11-E12(2)-E41	Le _{ti} -mtDNA
55	Oñati (G)	7	E06(2)-E07(5)	Le _{gr} -mtDNA
55	Oñati (G)	4	E04(2)-E05(2)	Le _{ti} -mtDNA
56	Tolosa (G)	1	E08	Le _{ti} -mtDNA
57	Zegama (G)	5	E05-E08-E12(3)	Le _{ti} -mtDNA
57	Zegama (G)	2	E07(2)	Le _{gr} -mtDNA
58	Zerain (G)	1	E12	Le _{ti} -mtDNA
59	Ablitas (N)	4	G04-G12(2)-G14	Lg _{ti} -mtDNA
60	Altsasu (N)	1	E11	Le _{ti} -mtDNA
61	Andosilla (N)	1	G12	Lg _{ti} -mtDNA
62	Arroniz (N)	2	G07-G15	Lg _{gr} -mtDNA
63	Azagra (N)	2	G12(2)	Lg _{ti} -mtDNA
64	Bakaiku (N)	3	E11(2)-E13	Le _{ti} -mtDNA
65	Baztan (N)	3	E12(3)	Le _{ti} -mtDNA
65	Baztan (N)	1	E26	Le _{eu} -mtDNA
66	Betelu (N)	1	E30	Le _{ti} -mtDNA
67	Catarroso (N)	2	G08-G11	Lg _{ti} -mtDNA
68	Carcar (N)	3	G09-G10(2)	Lg _{ti} -mtDNA
69	Cascante (N)	4	G04-G12(3)	Lg _{ti} -mtDNA
70	Cintruenigo (N)	2	G09-G12	Lg _{ti} -mtDNA
71	Elorz (N)	1	E31	Le _{ti} -mtDNA
72	Falces (N)	2	G12-G14	Lg _{ti} -mtDNA
73	Fitero (N)	1	G09	Lg _{ti} -mtDNA
73	Fitero (N)	1	G16	Lg _{gr} -mtDNA
74	Funes (N)	1	G17	Lg _{ti} -mtDNA
75	Izagaondua (N)	1	E12	Le _{ti} -mtDNA
76	Lerin (N)	1	G05	Lg _{ti} -mtDNA
77	Lodosa (N)	1	G15	Lg _{gr} -mtDNA
77	Lodosa (N)	1	G09	Lg _{ti} -mtDNA
78	Los Arcos (N)	2	G07-G15	Lg _{gr} -mtDNA
79	Mendavia (N)	1	G07	Lg _{gr} -mtDNA
80	Mendigorría (N)	1	G15	Lg _{gr} -mtDNA
81	Milagro (N)	1	G04	Lg _{ti} -mtDNA
82	Navascues (N)	1	E40	Le _{eu} -mtDNA
83	Oibar (N)	2	E08-E13	Le _{ti} -mtDNA
84	Olaverri (N)	1	E13	Le _{ti} -mtDNA
85	Olite (N)	2	G11-G19	Lg _{ti} -mtDNA
86	Peralta (N)	1	G04	Lg _{ti} -mtDNA
87	Rada (N)	2	G13(2)	Lg _{ti} -mtDNA
88	San Adrian (N)	1	G09	Lg _{ti} -mtDNA

89	Sartaguda (N)	1	E08	Le _{ti} -mtDNA
90	Sesma (N)	2	G09-G10	Lg _{ti} -mtDNA
91	Tafalla (N)	1	G04	Lg _{ti} -mtDNA
92	Tudela (N)	3	G09-G12(2)	Lg _{ti} -mtDNA
92	Tudela (N)	1	G06	Lg _{gr} -mtDNA
93	Uterga (N)	1	E12	Le _{ti} -mtDNA
94	Viana (N)	2	G04-G10	Lg _{ti} -mtDNA
95	Borau (HU)	1	Le1	Le _{ti} -mtDNA
96	Guasa (HU)	1	Le2	Le _{ti} -mtDNA
97	Arenas de Iguña (CA)	1	Le3	Le _{ti} -mtDNA
98	Argueso (CA)	2	Le4-Le5	Le _{ti} -mtDNA
99	Villaluenga (TO)	1	Lg1	Lg _{gr} -mtDNA
100	Coto de Sabiote (JA)	1	Lg2	Le _{cu} -mtDNA
101	Breeding farm (France)	1	Le6	Le _{cu} -mtDNA
102	Nordrhein Westfalen (Germany)	1	Le7	Le _{cu} -mtDNA
103	Rocha (Uruguay)	1	Le8	Le _{cu} -mtDNA
104	Y15312	1	Lt1	Lt _{ti} -mtDNA
105	Y15299	1	Lt2	Lt _{ti} -mtDNA

3) REPOBLACIONES ANTIGUAS REALIZADAS CON LIEBRES (*LEPUS EUROPAEUS*) NO AUTÓCTONAS EN GUIPÚZCOA

Los datos sobre repoblaciones de liebres (*Lepus europaeus*) realizadas en Guipúzcoa durante el periodo 1994-2000 se indican en la Tabla 3.

	ALO- ÑA	ANTZUO -LA	EREÑO- ZU	ERNIO ZELAI- TXIKI	ERNIO GAZU ME	IZA- RRAITZ	LIZAR- TZA	ON- YI	PAGO- ETA	ZAL- DIN	TO- TAL
1994	16			20			16	20	58	40	170
1995				45			20		55	60	180
1996				60	60				100	81	301
1997				60	95	130				60	345
1998		65	65	45	45	25				47	292
1999		56	48			56					160
2000		53				25					78
TOTAL	16	174	113	230	200	236	36	20	213	288	1.526

Tabla 3. Número de ejemplares de *L. europaeus* procedentes de granjas francesas, de origen no ibérico, repoblados en distintas localidades de la provincia de Guipúzcoa entre 1994 y 2000.

Estos datos están recogidos en el informe de EKOS (2008) titulado: La liebre europea (*Lepus europaeus*) en Gipuzkoa, publicado por el Departamento de Desarrollo del Medio Rural, Dirección General de Montes y Medio Natural, Diputación Foral de Gipuzkoa.

Tiene interés resaltar que estos datos completan la información que se aporta en la Figura 3 del objetivo 2 y en el Apéndice y muestran que la alta presencia en el centro de Guipúzcoa de *L. europaeus* no ibéricas detectadas a través del análisis de muestras aportadas por cazadores coincide con la suelta de ejemplares de *L. europaeus* procedentes de granjas francesas.

Actualmente, la gestión de la liebre europea (*Lepus europaeus*) en Guipúzcoa se está haciendo ya mediante el desarrollo de buenas prácticas que incluyen: a) el control de las liebres no autóctonas repobladas cuando aún no se sabía que existían marcadas diferencias genéticas entre *L. europaeus* de origen ibérico y *L. europaeus* de origen no ibérico; b) la repoblación con *L. europaeus* de origen ibérico procedentes del programa de cría mencionado al principio de este informe.