

EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES CINEGÉTICAS DE CIERVO IBÉRICO, *Cervus elaphus hispanicus* MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES

M. ÁLVAREZ-ORTÍ, J. ESCRIBANO, J. GARDE, A. GARCÍA, N. ORTIZ,
L. GALLEGO Y J. ANTONIO FERNÁNDEZ*

Dpto. Ciencia y Tecnología Agroforestal. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Universidad de Castilla-La Mancha. Campus Universitarios/n. 02071 Albacete. *(jafernandez@idr-ab.uclm.es)

RESUMEN

El incremento del número de cotos de caza mayor cercados está provocando un aislamiento de las poblaciones de ciervo ibérico, que puede ocasionar un descenso en la variabilidad genética de éstas, debido a la no existencia del flujo genético entre las poblaciones y el consiguiente aumento de los niveles de endogamia o consanguinidad. La variabilidad genética es un factor fundamental en la salud de las poblaciones, por el incremento de vigor, fertilidad y resistencia a enfermedades. En el presente trabajo se estima la variabilidad genética de cuatro poblaciones de ciervo ibérico, con distinto tamaño, superficie y condiciones de manejo. Para ello se analiza el genoma mediante la técnica de las amplificaciones al azar de ADN polimórfico (RAPD). Los resultados revelan mayores valores de variabilidad en las poblaciones con un mayor número de individuos, distribuidas sobre una superficie grande. En el presente estudio, la única población no sometida a la actividad cinegética presentó unos valores comparativamente mayores de variabilidad que el resto, sometidas a un régimen cinegético. Otros factores que parecen influir en la variabilidad genética son el número de individuos de la población fundadora y su origen. A la vista de los resultados se cuestiona la mejora producida por la introducción de venados foráneos en alguna de las poblaciones estudiadas. Asimismo se evidencia una asociación entre niveles de variabilidad y calidad de los trofeos (tamaño y forma de las cuernas) en el ciervo ibérico.

Palabras clave: *Cervus elaphus hispanicus*, ciervo, RAPD, variabilidad genética.

ABSTRACT

Evaluation of genetic variability in game populations of Iberian deer, Cervus elaphus hispanicus, by means of molecular methods

The increase of hunting enclosures is causing the isolation of Iberian deer populations, which may produce a decrease of their genetic variability, due to the lack of genic flow between groups and the consequent inbreeding. Genetic variability is an essential agent in populations fitness, because of the increase of strength, fertility, illness resistance, etc. In the present study, the genetic variability existent in four deer populations with differences in number of individuals, surface and management conditions is estimated. A random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis has been carried out. The results indicate higher values of genetic variability in populations with greater number of individuals, distributed over a large surface. Besides, one population that is not submitted to hunting activity show values of variability comparatively greater than populations submitted to a hunting regime. Other agents that seem to influence deer genetic variability of populations are the number of individuals of the founding population and its origin. According to our data, the improvement produced by the introduction of males of other populations is questioned. A positive association between genetic variability and antler quality is evidenced in Iberian red deer.

Key words: *Cervus elaphus hispanicus*, deer, genetic variability, RAPD.

INTRODUCCIÓN

El ciervo rojo (*Cervus elaphus*) está clasificado en doce subespecies distribuidas por Europa, Asia y el Norte de África (Whitehead 1972), de las cuales el ciervo ibérico, *C. e. hispanicus*, está considerado como una única subespecie que habita en la Península Ibérica. Su elevada cotización como especie cinegética hace que sus poblaciones se vean sometidas a un intenso manejo antrópico, tratando de explotar económicamente esta característica de la especie mediante la creación de cotos de caza, normalmente vallados. Así, aunque se puede decir que el ciervo ibérico se encuentra en expansión, existen ciertas actuaciones derivadas del manejo que pueden ocasionar deterioros en la salud genética de la subespecie. Entre éstas se encuentra el vallado cinegético, que ocasiona un aislamiento de las poblaciones, aumentando la tasa de consanguinidad o endogamia, lo que se traduce en un incremento de individuos homocigóticos. El descenso de la variabilidad genética puede acarrear consecuencias tales como la caída de la eficacia biológica, derivada del fenómeno conocido como depresión por consanguinidad y expresada en un descenso de ciertos factores como la fertilidad, el vigor, la resistencia a enfermedades, etc. Asimismo, otra de las actuaciones que puede disminuir la variabilidad genética es la caza selectiva, destinada a eliminar principalmente aquellos individuos que se prevé no vayan a alcanzar una determinada calidad en el trofeo. Se ha documentado que la caza selectiva ocasiona la pérdida de alelos en algunos genes (Hartl et al. 1991b) y la consiguiente homogeneización genética de las poblaciones. Por otra parte, al tratar de incrementar tanto el tamaño de los individuos de la población como el tamaño de sus astas, se recurre a la introducción de ejemplares, en ocasiones pertenecientes a otras subespecies de mayor corpulencia, ocasionando mestizajes con las poblaciones de ciervo autóctonas.

La variabilidad genética intra e interpoblacional del ciervo rojo europeo ha sido analizada mediante métodos bioquímicos: isoenzimas, proteínas sanguíneas y de otros tejidos (Gyllensten et al. 1983, Pemberton et al. 1988, Hartl et al. 1990, Strandgaard y Simonsen 1993). Sin embargo, estas técnicas tienen inconvenientes tales como el pequeño número de especies moleculares (isoenzimas y proteínas sanguíneas) para las cuales hay sistemas de análisis fácilmente disponibles y la subestimación de la variabilidad por estos métodos debido a la redundancia del código genético. Las técnicas de análisis de ADN permiten determinar la diferenciación genética entre especies, subespecies, poblaciones e individuos sobre la base del estudio directo de la molécula responsable de la herencia. Así, se han empleado varios de estos métodos principalmente para desentrañar las relaciones filogenéticas entre distintas especies de cérvidos (Lima-de-Faria et al. 1986, Schertan et al. 1990, Miyamoto et al. 1990,

Irwin et al. 1991). También ha sido posible estimar la variabilidad genética entre poblaciones en el caso del ciervo sika japonés, *C. nippon* (Tamate et al. 1995). Sin embargo, existe una total carencia de estudios sobre variabilidad genética en ciervo ibérico, tanto en el plano morfológico como molecular o bioquímico.

Por lo tanto, es objetivo del presente trabajo el estimar el grado de variabilidad genética de cuatro poblaciones de venado sometidas a diferentes sistemas de manejo, en un intento de estimar la influencia de las distintas actuaciones sobre sus características genéticas. Además, se comparan las poblaciones de ciervo ibérico con una población de ciervo escocés (*C. e. scoticus*), con el fin de buscar diferencias moleculares entre las dos subespecies, que permitan detectar mestizajes. Para ello se analiza el genoma mediante el método de amplificaciones al azar de ADN polimórfico (RAPD).

MATERIAL Y MÉTODOS

a) Poblaciones

Se estudiaron cuatro poblaciones de ciervo ibérico, *C. e. hispanicus*, en medio natural y una población cautiva de ciervo escocés, *C. e. scoticus*. La distribución geográfica de las poblaciones de ciervo ibérico se muestra en la Figura 1. La técnica de caza empleada mayoritariamente en ellas es la montería.

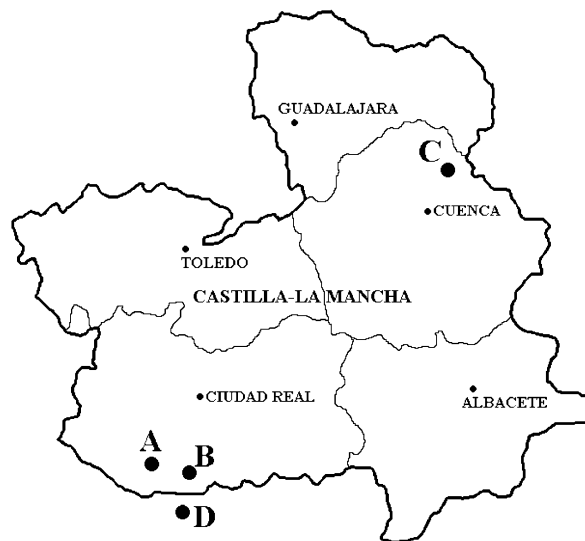


Figura 1. Distribución geográfica de las cuatro poblaciones de ciervo ibérico examinadas

Geographic distribution of the four examined populations of Iberian deer

1.- Población A (29 individuos analizados): Esta población consta de alrededor de 550 venados, de los cuales 410 son hembras y 140 machos, encerrados en una superficie de 418 ha., en la provincia de Ciudad Real. La finca se cercó en 1.992 y, posteriormente, en 1.993 se introdujeron los ciervos en un número aproximadamente igual a la población actual, todos ellos de la subespecie ibérica provenientes de fincas de Ciudad Real y Córdoba. Desde entonces se han realizado 7-8 introducciones de machos de ciervo ibérico procedentes de fincas españolas de las mismas provincias.

2.- Población B (19 individuos analizados): se sitúa en una finca vallada de 3.700 ha. de superficie también en la provincia de Ciudad Real. La finca se cercó hace 20 años, incluyéndose en ella una población de menos de 50 ejemplares de ciervo procedentes de fincas de la misma zona. Actualmente la población consta de alrededor de 300 individuos, con una relación entre machos y hembras de 1:1, aunque en años anteriores, estas cifras eran muy superiores, de hasta 1.500-1.800 individuos, que se ha ido reduciendo a lo largo de los últimos cuatro años hasta alcanzar las cifras actuales.

3.- Población C (4 individuos analizados): se sitúa en el Parque Cinegético del Hosquillo, en el corazón de la Serranía de Cuenca, pudiéndose considerar como representativa de la zona, pues a partir de esta población se han realizado numerosas sueltas de ejemplares en lo que hoy constituye la Reserva Nacional de Caza de la Serranía de Cuenca y que rodea al Parque. El Parque, que cuenta con una superficie total de 910 ha. repartidas en distintas parcelas, se cerró en 1968 con una población inicial de 50 ciervos, provenientes de los Quintos de Mora (Toledo) y Lugar Nuevo (Jaén). La población actual de venados se compone de 190 ciervos, de los cuales aproximadamente un 55 % son hembras, sin haberse introducido animales ajenos. En la población C no se realiza la actividad cinegética, pero sí se efectúa selección eliminando los animales con defectos físicos cuando entran en los capturaderos que se encuentran distribuidos por toda su superficie.

4.- Población D (18 individuos analizados): Esta población se sitúa en una finca vallada en la provincia de Jaén. Cuenta con un número total de ciervos de 700 machos y 1.500 hembras en una superficie de 10.000 ha. La finca se cercó hacia 1.963-64, con una población similar a la actual y desde entonces no se han introducido nuevos ejemplares. Las características de la cuerna de los individuos de esta población en cuanto a simetría y tamaño son notables, lo cual se traduce en un elevado número de trofeos cazados cada temporada (35 medallas en la temporada 1.996-97), con premios otorgados como el de Montería "Caracola de Oro". En esta población se realiza caza selectiva.

5.- *Población E (14 individuos analizados)*: esta población de ciervo escocés (*C. e. scoticus*) estudiada se ubica en una finca de 15 ha. situada en la provincia de Álava. Se cercó hacia 1.993, incluyendo en ella 60 ejemplares de ciervo rojo procedentes de Escocia. La población actual cuenta con 225 ejemplares, siendo la relación entre hembras y machos de 25:1. No se han realizado introducciones de machos de otras poblaciones ni se realiza ningún tipo de caza. Se trata de una población sometida a un manejo totalmente intensivo.

b) Análisis de las muestras

La sangre se recolectó bien de animales vivos como fue el caso de las poblaciones C, A y E, bien de animales muertos en cacerías como en las poblaciones D ó B. Las muestras de sangre se congelaron a -20°C lo antes posible hasta la purificación del ADN. La purificación del ADN se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Sambrook et al. (1989). Las muestras de ADN purificado se congelaron a -20°C hasta el momento de realizar la reacción de amplificación. Para comprobar el rendimiento de la purificación de ADN se realizó una cuantificación mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, ajustándose la concentración final de ADN hasta 5 ng/ml.

Las muestras se analizaron mediante el método de las ampliaciones al azar de ADN polimórfico (RAPD), por sus ventajas: no requiere información de la secuencia del ADN diana, el protocolo es relativamente rápido y fácil de ejecutar, no usa radioactividad, solo se requieren cantidades de ADN de nanogramos, la automatización es factible y suministran una provisión virtualmente ilimitada de marcadores selectivos. Este método presenta una serie de limitaciones, como son los problemas de reproducibilidad y de interpretación de las bandas y el proporcionar marcadores dominantes. A pesar de ello consideramos que los RAPD son una técnica adecuada como una primera aproximación al análisis genético de las poblaciones, que debe ser completado con otra serie de técnicas más resolutivas si se quiere profundizar más en su estructura genética.

Como cebadores de la reacción de amplificación de fragmentos al azar se empleó un kit de 20 oligonucleótidos de 10 bases de Operon Technologies (Alameda, Ca., EEUU), probando cada uno con muestras de ciervo, gamo, cabra y oveja para detectar polimorfismos en la cadena de ADN, así como para detectar diferencias interespecíficas (resultados no mostrados). De ellos se seleccionaron dos (OPJ10: 5'AAGCCGAGG-3' y OPJ18: 5'TGGTCGCAGA-3') en base a su elevado número de bandas y a su reproducibilidad. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400, en alíquotas de 25 ml, conteniendo 5ml de ADN (aproximadamente 25 ng); 0,125 ml de fragmento Stoffel (Perkin Elmer); 2,5 ml de

10 x PCR buffer; 0,5 ml de DNTPs en una disolución 10 mM; 4 ml de $MgCl_2$ 25 mM y 11,87 ml de H_2O mQ. Las mezclas de reacción se calentaron a 94°C durante 6 minutos y después se sometieron a un ciclo de 94°C durante 1 minuto, 35°C durante 1 minuto y 72°C durante 6 minutos realizado 45 veces con una incubación final a 72°C durante 10 minutos para una completa extensión de los fragmentos amplificados. La separación de los productos de amplificación procedentes de la reacción de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa, con una concentración de agarosa de 1,8%, y corriendo la electroforesis con una diferencia de potencial de 45 voltios durante un tiempo aproximado de 2 horas. La visualización de los fragmentos de ADN resultantes se llevó a cabo mediante iluminación con rayos ultravioleta y se tomaron fotografías de cada gel para el posterior análisis estadístico de las bandas presentes. El tamaño de las bandas resultantes se estimó comparando las muestras con el marcador de peso molecular FX174 de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania). Para verificar la reproducibilidad de los análisis, las muestras se amplificaron por duplicado confirmando la existencia del mismo patrón en ambas.

Para la estimación de la variabilidad genética en las poblaciones se empleó el índice de bandas compartidas (BS), cuya fórmula se expresa: $BS = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, donde N_{xy} corresponde al número de bandas compartidas por los dos individuos y N_x y N_y a las bandas que aparecen en el individuo x e y respectivamente. Este índice varía entre 0 y 1, correspondiendo el valor 1 a aquellos individuos completamente iguales genéticamente, disminuyendo el valor según la variabilidad genética es mayor. Asimismo se realizó un estudio estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA), para tratar de estimar qué bandas podían presentar una frecuencia significativamente diferente al comparar las dos subespecies. El grado de similitud entre las diversas poblaciones se calculó haciendo análoga cada banda RAPD a un locus génico, y analizando éstos de acuerdo con Nei (1972). Con los datos de similitud se calculó el fenograma de las diversas poblaciones mediante el método UPGMA.

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 27 bandas (13 con el cebador OPJ10 y 14 con el OPJ18), es decir, 27 fragmentos de ADN amplificados al azar en el genoma del ciervo (Figura 2). Al estudiar el conjunto de los 84 individuos, independientemente de la población, se obtuvieron únicamente 2 bandas invariables (19 y 21), presentes en todos los individuos analizados. Sin embargo, si nos referimos a cada población por separado, los resultados son dispares, desde las 8 bandas invariables sobre un total de 20 observadas en la población C, hasta sólo 2 bandas invariables sobre un total de 27 en la población D, con valores intermedios en el resto de las poblaciones. No se encontró ninguna banda asignable a una única población. Sin embargo las bandas 26 y 27 apa-

recieron únicamente en individuos procedentes de las poblaciones D (ciervo ibérico) y E (ciervo escocés) en una frecuencia relativamente baja (0,11 y 0,07 respectivamente para la banda 26; 0,39 y 0,29 para la banda 27). En la población C se obtuvo un menor número de bandas (20) que en el resto de las poblaciones. Las frecuencias de las 27 bandas en cada población estudiada se reflejan en la Tabla 1.

TABLA 1
Frecuencias de las bandas obtenidas en cada población

Band frequency on each population

| Banda | Población A | Población B | Población C | Población D | Población E |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 0,79 | 0,74 | 0,50 | 0,39 | 0,29 |
| 2 | 0,76 | 0,95 | 0,50 | 0,11 | 0,29 |
| 3 | 1,00 | 0,89 | 0,50 | 0,61 | 0,43 |
| 4 | 0,96 | 0,95 | 0,50 | 0,78 | 0,86 |
| 5 | 0,38 | 0,58 | 0,00 | 0,56 | 0,21 |
| 6 | 0,76 | 0,47 | 1,00 | 0,72 | 0,57 |
| 7 | 0,59 | 1,00 | 0,75 | 0,56 | 0,71 |
| 8 | 1,00 | 0,89 | 0,50 | 0,83 | 1,00 |
| 9 | 0,76 | 0,89 | 0,50 | 0,72 | 0,43 |
| 10 | 0,79 | 0,79 | 1,00 | 0,39 | 0,86 |
| 11 | 1,00 | 0,89 | 0,50 | 0,89 | 1,00 |
| 12 | 0,90 | 1,00 | 1,00 | 0,67 | 0,79 |
| 13 | 0,45 | 0,26 | 0,00 | 0,67 | 0,43 |
| 14 | 0,90 | 0,42 | 0,00 | 0,11 | 0,21 |
| 15 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,56 | 0,79 |
| 16 | 0,38 | 0,42 | 0,00 | 0,17 | 0,29 |
| 17 | 0,24 | 0,31 | 0,00 | 0,06 | 0,21 |
| 18 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,94 | 1,00 |
| 19 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 20 | 0,38 | 0,00 | 0,25 | 0,17 | 0,21 |
| 21 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 22 | 0,93 | 0,94 | 0,75 | 0,94 | 1,00 |
| 23 | 0,86 | 0,84 | 1,00 | 0,89 | 0,93 |
| 24 | 0,48 | 0,53 | 0,25 | 0,89 | 0,43 |
| 25 | 0,55 | 0,68 | 0,75 | 0,56 | 0,64 |
| 26 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,11 | 0,07 |
| 27 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,39 | 0,29 |

Los valores del índice BS obtenidos para cada población fueron variables, siendo la mayor variabilidad genética la correspondiente a la población D, con un valor de BS de 0,715; mientras que los niveles menores de variabilidad correspondieron a las poblaciones B y A, con valores de BS de 0,821 y 0,832 respectivamente, mientras que las poblaciones C y E arrojaron valores intermedios (Tabla 2).

En cuanto al análisis de varianza, para un intervalo de confianza del 99% ($\alpha=0,01$) se obtuvieron tres bandas en las cuales las frecuencias difieren en las dos subespecies (1, 3 y 9; con valores de F para 2 grupos y 83 grados de libertad de 7,08; 12,93 y 7,13 respectivamente); mientras que para un intervalo de confianza del 95% ($\alpha=0,05$) esta cifra de bandas se amplió a 5 (1, 2, 3, 9 y 14; obteniendo para las bandas 2 y 14 unos valores de F de 5,85 y 4,33).

Figura 2. Representación esquemática de las 27 bandas RAPD obtenidas en la amplificación con los cebadores OPJ10 y OPJ18, tras su separación electroforética. El número que aparece junto a las bandas es el nombre asignado a cada una de ellas. En la tercera columna aparece el patrón del marcador de peso molecular λ X174, con el tamaño de cada una de sus bandas (pb) junto a éstas

Schematic representation of 27 RAPD bands obtained in the amplification with primers OPJ10 and OPJ18 after electrophoretic separation. The number near the bands is the name attributed to each of them. The pattern of the molecular weight marker λ X174, with the size of each one of its bands (pb) is shown in the third column

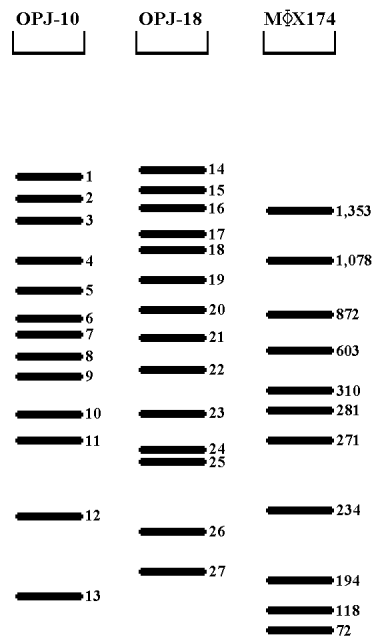


TABLA 2

Valores medios del índice BS de las cinco poblaciones estudiadas. La fila de *C. e. hispanicus* hace referencia a los valores medios de las cuatro poblaciones de esta subespecie. La fila de Total hace referencia a los valores medios totales

Mean values of BS index of five studied populations. C. e. hispanicus line refers to mean values of four populations of this subspecies. Line Total refers to total mean values

| | BS |
|-------------------------|-------|
| Población A | 0.821 |
| Población B | 0.832 |
| Población C | 0.743 |
| Población D | 0.715 |
| <i>C. e. hispanicus</i> | 0.775 |
| <i>C. e. scoticus</i> | 0.736 |
| Total | 0.756 |

Al estudiar el grado de similitud entre las poblaciones, se encontró que ésta fue mayor entre las poblaciones D (ciervo ibérico) y E (ciervo escocés), dando un valor de 0,043, que entre la primera y el resto de poblaciones de ciervo ibérico (entre

0,080 y 0,131). Dentro de las cuatro poblaciones de ciervo ibérico estudiadas, se encontró una relación muy estrecha entre las poblaciones A y B, con un coeficiente de similitud de 0,027, mientras que la más alejada fue la población C, con valores de similitud entre 0,087 y 0,131 con el resto de poblaciones de ciervo ibérico (Tabla 3). El fenograma obtenido por el método UPGMA se muestra en la Figura 3, en el que se observan los agrupamientos, por un lado de las poblaciones de ciervo escocés y D y por otro de las poblaciones A y B, quedando más distante la población C.

TABLA 3
Matriz de similitud genética de las cinco poblaciones

Genetic similarity matrix of the five populations

| | Población A | Población B | Población C | Población D | Población E |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Población A | - | | | | |
| Población B | 0.027 | - | | | |
| Población C | 0.098 | 0.087 | - | | |
| Población D | 0.080 | 0.083 | 0.131 | - | |
| Población E | 0.054 | 0.055 | 0.071 | 0.043 | - |

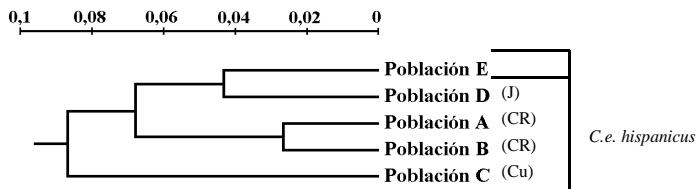


Figura 3. Fenograma de las cinco poblaciones estudiadas

Phenogram of the five studied populations

DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente trabajo ha sido estimar los niveles de variabilidad genética de diversas poblaciones de ciervo ibérico, sometidas a un manejo en el que la característica más importante es su aislamiento mediante vallado cinegético. El estudio de la variabilidad dentro de las diferentes poblaciones de ciervo ibérico analizadas mostró que los mayores valores se encontraron en la población D, siendo ésta la que presenta un mayor número de individuos y la que se encuentra distribuida en una mayor superficie. Valores de variabilidad semejantes, aunque algo menores se detectaron en la población C, con una densidad de población total muy similar a la de la población D, mientras que las poblaciones A y B mostraron los menores valores de variabilidad, siendo para ambas del mismo orden, datos que sugieren un mayor

grado de consanguinidad. Considerando el tamaño de las poblaciones, los resultados de variabilidad genética obtenidos en nuestro trabajo concuerdan con los reflejados por Tamate et al. (1995) sobre el ciervo sika japonés, en el cual, las poblaciones con un mayor número de individuos se mostraron más variables. La excepción a esta premisa es la población C, que mantiene valores de variabilidad elevados en comparación con el resto de poblaciones analizadas, pero con un tamaño de población muy reducido. Es destacable reseñar que en esta población no se realiza la actividad cinegética, por lo que los venados no se ven sometidos a una presión humana tan elevada como en las poblaciones D ó B. Se ha documentado que la actividad cinegética puede tener implicaciones genéticas sobre las poblaciones, principalmente en lo que respecta a la sustitución alélica (Hartl et al. 1991a), si bien, no está suficientemente clara la influencia que puede ejercer esta actividad sobre la variabilidad genética. Sin embargo, es posible que la actividad cinegética esté causando un efecto de disminución de la variabilidad. Los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen apuntar esta hipótesis.

Otro factor a considerar es la superficie en la que se mantiene a cada población, teniendo en cuenta los patrones de dispersión del ciervo rojo, principalmente de los machos, que pueden llegar a alejarse hasta 20 km. de su lugar de nacimiento, evitando así los cruzamientos con miembros de su misma familia y reduciendo las tasas de consanguinidad. En este sentido, también parecen concordar los datos obtenidos, pues los mayores valores de variabilidad se encontraron en las poblaciones ubicadas en fincas de mayor superficie, exceptuando la población B, que con una superficie casi nueve veces mayor que la población A presenta valores de variabilidad muy próximos a ésta. Pensamos que esta variabilidad tan reducida se debe al efecto fundador, pues la población B se fundó con un grupo muy reducido de venados (menos de 50 individuos) provenientes todos del mismo lugar de origen.

La introducción de machos foráneos realizados en la población A no parece haber tenido un efecto positivo en su variabilidad genética (al menos en los fragmentos de ADN que se han amplificado), pues a pesar de la inclusión de animales ajenos a la población, los valores de variabilidad siguen manteniéndose muy por debajo de los valores medios para las poblaciones de *C. e. hispanicus* analizadas. Este hecho puede ser debido a que los animales introducidos posteriormente hayan sido pocos o que presenten el mismo origen que los de la población inicial, por lo que no se han introducido genotipos nuevos que puedan dar lugar a un incremento de variabilidad. En este aspecto pueden ser beneficiosas otra serie de técnicas aplicadas a la gestión de las poblaciones cinegéticas, como es la inseminación artificial, que comienza a dar buenos resultados (Garde et al. 1996, 1998), la cual evita los riesgos sanitarios de la introducción de ejemplares y,

precedida de un simple análisis genético (con RAPDs, por ejemplo) que ponga de manifiesto la desigualdad genética entre los parentales, asegura la introducción de nuevas variantes genéticas en la población.

En cuanto a la relación entre la cantidad de variabilidad genética y el tamaño de la cuerna, en estudios anteriores no se ha encontrado ningún tipo de efecto positivo mediante análisis isoenzimáticos (Hartl et al. 1991a, b, 1995), pero tampoco se puede descartar completamente, pues sí se ha hallado este tipo de relación en especies cercanas al ciervo rojo, como es el caso del ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), en el que los animales heterocigotos presentan un mayor tamaño de la cuerna, tanto en diámetro como en longitud de la caña (Scribner et al. 1989). Así, en el presente trabajo se ha constatado que la mayor variabilidad genética corresponde a la población D, que presenta una enorme calidad en sus venados.

En cuanto a la relación existente entre las dos subespecies estudiadas, la técnica RAPD, al proporcionar patrones multilocus, es un método válido para distinguir entre especies emparentadas cercanamente (Karp et al. 1997). En este mismo trabajo aparecieron patrones de bandas totalmente distintos al comparar las muestras de ciervo con otras muestras de oveja y cabra procedentes de la Granja Experimental de la E. T. S. I. A. de Albacete y con otra población de gamo (resultados no mostrados). Sin embargo, no se detectaron bandas características de ninguna de las dos subespecies de ciervo rojo y que pudieran servir como identificadores claros de éstas. Al examinar la frecuencia con la que aparecen las bandas en las distintas poblaciones sí aparecieron diferencias significativas. Por lo tanto, ateniéndonos a estos resultados, la presencia o ausencia de las bandas en un individuo no asegura su inclusión en ninguna de las dos subespecies, pero el análisis conjunto de una población sí podría proporcionarnos información sobre la subespecie a la que pertenece.

Los resultados obtenidos al analizar la similitud genética entre las diversas poblaciones, muestran dos grupos relacionados: por un lado, las poblaciones A y B muy próximas, mientras que por otro lado aparecen las poblaciones D y E (ciervo escocés), con una similitud algo menor. La población C es en principio la más alejada genéticamente del resto de poblaciones estudiadas (Figura 3). Es sorprendente la similitud entre las poblaciones de ciervo escocés y la población D, con bandas en común presentes únicamente en estas dos poblaciones. Una posible explicación a este hecho sería algún tipo de mestizaje entre ambas poblaciones. Sin embargo, según datos aportados por la propiedad, no se han introducido animales ajenos a la población D desde que se cercara en 1963, luego es posible que la relación encontrada se deba únicamente al azar. No obstante, sería conveniente realizar otro tipo de estudios con técnicas más resolutivas para tratar de esclarecer este punto.

Los valores de similitud genética entre las poblaciones A y B son muy altos comparados con el resto de las poblaciones estudiadas, pudiendo deberse a un origen común de ambas o a un contacto entre ellas antes de ser valladas las fincas en las que se encuentran actualmente, pues se encuentran relativamente cercanas. Posteriormente parece ser que no ha habido mezcla entre ambas poblaciones por lo que se debe descartar una hibridación que haya mezclado sus genotipos. La población C es la más divergente genéticamente del resto de las poblaciones ibéricas. Se da la coincidencia de que esta población es la más alejada geográficamente del resto (exceptuando los ciervos de origen escocés). En principio, no parece ser ésta una causa probable de un distanciamiento genético con respecto al resto de poblaciones, pues en estudios anteriores se ha demostrado la relativa escasa importancia de la distancia geográfica (Chesser et al. 1982). Además, el origen de la población C es similar, al menos en parte, a las otras poblaciones, por lo que es más probable que la diferencia genética entre las poblaciones se deba más a fenómenos como el efecto fundador que a la distancia geográfica, pues esta población se fundó a partir de un número de alrededor de 50 individuos. En cualquier caso, el bajo número de ejemplares examinados en esta población pudiera originar valores sesgados.

En conclusión, la variabilidad genética fue más elevada en la población que presenta un mayor número de individuos, distribuidos sobre la mayor superficie. Aquella población no sometida a actividad cinegética presentó valores de variabilidad comparativamente mayores, mientras que las poblaciones con un tamaño reducido de la población fundadora mostraron valores de variabilidad más reducidos. Además, la mayor variabilidad se encontró en la población con mayor calidad de los trofeos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha por la financiación.

REFERENCIAS

- CHESSER, R. K., C. REUTERWALL Y N. RYMAN (1982). Genetic differentiation of Scandinavian moose *Alces alces* populations over short geographical distances. *Oikos*, 39: 125-130
- GARDE, J., A. J. GARCÍA, N. ORTIZ, Y L. GALLEGO (1996). Evaluación de espermatozoides obtenidos *postmortem* en el ciervo. *Doñana Acta Vertebrata*, 23: 229-241
- GARDE, J., N. ORTIZ, A. J. GARCÍA, L. GALLEGO, T. LANDETE-CASTILLEJOS Y A. LÓPEZ (1998). Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Archiv. Androl.*, 41: 195-202
- GYLLENSTEN, U., N. RYMAN, C. REUTERWALL Y P. DRATCH (1983). Genetic differentiation in four European subspecies of red deer (*Cervus elaphus* L.). *Heredity*, 51: 561-580

- HARTL, G. B., R. WILLING, G. LANG, F. KLEIN Y J. KÖLLER (1990). Genetic variability and differentiation in red deer (*Cervus elaphus* L.) of Central Europe. *Genet. Sel. Evol.*, 22: 289-306
- HARTL, G. B., G. LANG, F. KLEIN Y R. WILLING (1991a). Relationships between allozymes, heterozygosity and morphological characters in red deer (*Cervus elaphus*), and the influence of selective hunting on allele frequency distributions. *Heredity* 66: 343-350
- HARTL, G. B., J. KÖLLER, F. KLEIN Y G. LANG (1991b). Allozymes as genetic markers for the development of morphological characters in red deer (*Cervus elaphus*): further evidence. *XXth Congress of the International Union of Game Biologists, Gödöllő, Hungary*: 810-815
- HARTL, G. B., F. KLEIN, R. WILLING, M. APOLLONIO Y G. LANG (1995). Allozymes and the genetics of antler development in red deer (*Cervus elaphus*). *J. Zool., Lond.*, 237: 83-100
- IRWIN, D. M., T. D. KOCHERY A. C. WILSON (1991). Evolution of the Cytochrome *b* Gene of Mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144
- KARP, A., K. J. EDWARDS, M. BRUFORD, S. FUNK, B. VOSMAN, M. MORGANTE, O. SEBERG, A. KREMER, P. BOURSOT, P. ARCTANDER, D. TAUTZ Y G. M. HEWITT (1997). Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges. *Nature Biotechnology*, 15: 625-628
- LIMA-DE-FARIA, A., U. ARNASON, B. WIDEGREN, M. ISAKSSON, J. ESSEN-MÖLLER Y H. JAWORSKA (1986). DNA Cloning and Hybridization in Deer Species Supporting the Chromosome Field Theory. *BioSystems* 19: 185-212
- MIYAMOTO, M. M., F. KRAUS Y O. A. RYDER (1990). Phylogeny and evolution of antlered deer determined from mitochondrial DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6127-6131
- NEI, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 949: 283-292
- PEMBERTON, J. M., S. D. ALBON, F. E. GUINNESS, T. H. CLUTTON-BROCK Y R. J. BERRY (1988). Genetic variation and juvenile survival in red deer. *Evolution*, 42 (5): 921-934
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH Y T. MANIATIS (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHERTAN, H., Ú. ÁRNASON Y A. LIMA-DE-FARIA (1990). Localization of cloned, repetitive DNA sequences in deer species and its implications for maintenance of gene territory. *Hereditas*, 112: 13-20
- SCRIBNER, K. T., M. H. SMITH Y P. E. JOHNS (1989). Environmental and genetic components of antler growth in white-tailed deer. *J. Mammal.*, 70 (2): 284-291
- STRANDGAARD, H. Y V. SIMONSEN (1993). Genetic differentiation in populations of red deer, *Cervus elaphus*, in Denmark. *Hereditas* 119: 171-177
- TAMATE, H. B. Y T. TSUCHIYA (1995). Mitochondrial DNA Polymorphism in Subspecies of the Japanese Sika Deer, *Cervus nippon*. *Journal of Heredity* 86 (3): 211-215
- WHITEHEAD, G. K. (1972). Deer of the world. *Constable & Company, London*, 155-159