

USO DE TÉCNICAS GENÉTICAS NO INVASIVAS PARA ESTIMAR EL TAMAÑO Y LA DISTRIBUCIÓN DEL LOBO (*Canis lupus* LINNAEUS, 1758) EN EL PAÍS VASCO (N ESPAÑA)

JORGE ECHEGARAY ^{1,2}, ANDRÉS ILLANA ¹, ALBERTO HERNANDO ¹, FÉLIX MARTÍNEZ DE LECEA ¹, JUANE BAYONA ¹, IRATXE COVELA ¹, JUAN ÁNGEL DE LA TORRE ¹, DIANA PANIAGUA ¹ Y CARLES VILÀ ²

1. Grupo Lobo de Euskadi/Euskadiko Otso Taldea. Apartado de Correos 899. 01080 Vitoria-Gasteiz, Álava. (grupo@loboeuskadi.org)
2. Department of Evolutionary Biology. Evolutionary Biology Centre. Uppsala University. Norbyvägen 18D, SE-752 36 Uppsala, Suecia. (carles.vila@ebc.uu.se)

RESUMEN

Durante el bienio 2003-2004 se recogieron 136 muestras fecales susceptibles de ser de lobo en un área de 2.700 km² en el País Vasco y zonas limítrofes, en el límite nororiental del área de distribución del lobo en la Península Ibérica. Dichas muestras fueron recogidas a lo largo de 690 km de itinerarios de registro de indicios. En 86 casos (63% del total) identificamos la especie que había depositado el excremento mediante la secuenciación de un fragmento de la región control del ADN mitocondrial, correspondiendo 31 a lobo (*Canis lupus* L., 1758), 2 a zorro (*Vulpes vulpes* L., 1758) y 53 a perro (*Canis familiaris* L., 1758). Los métodos genéticos no invasivos representan una alternativa viable para el seguimiento de las poblaciones ibéricas de lobo, especialmente en zonas donde se encuentren en baja densidad o donde su presencia resulte dudosa. Además, el análisis de ADN permite una asignación específica de heces más fiable, tarea a menudo difícil en los humanizados ambientes peninsulares. Mediante el análisis de 20 microsatélites localizados en cromosomas no sexuales pudimos detectar un mínimo de 18 genotipos diferentes, que asociamos a diferentes individuos. La presencia de lobo se detectó en 13 cuadrículas UTM 10x10 del País Vasco (12% del total; N=111), correspondiendo 11 a Álava y 2 a Vizcaya.

Palabras clave: ADN mitocondrial, cuadrículas UTM, genotipos, lobo, muestras fecales, perros, País Vasco.

ABSTRACT

Use of non-invasive genetic methods to estimate the size and the distribution of the wolf population in the Basque Country (north of Spain)

During the years 2003 and 2004 we collected 136 faecal samples over a 2,700 km² in the Basque Country and surrounding areas on the northeastern limit of wolf distribution in the Iberia peninsula. The samples were collected along 690 km of linear surveys. These samples were

preliminarily identified as belonging to wolves. However, the analysis of a fragment of the mitochondrial DNA control region, allowed us to identify the specie responsible for the faeces in 86 cases (65%): 31 corresponded to wolves (*Canis lupus* L., 1758), 2 to red foxes (*Vulpes vulpes* L., 1758) and 53 to dogs (*Canis familiaris* L., 1758). Genetic non-invasive methods represent a useful alternative for the monitoring of Iberian wolf populations, especially in areas with low density and where its presence is unclear. Also, the analysis of faecal DNA enables us to unambiguously identify the species, a difficult task in humanized areas. Using 20 autosomal microsatellites we identified 19 different genotypes, corresponding to a minimum of individuals. Wolves were present in thirteen 100 km² UTM grid cells of the western part of the Basque country (11,7% of total), 11 in Álava province and 2 in Biscay.

Key words: Basque country, mitochondrial DNA, dogs, faecal samples, genotypes, non invasive monitoring, UTM grid cells, wolf.

INTRODUCCIÓN

El lobo es un depredador emblemático que ha dejado una profunda huella en la cultura y mitología vascas (Altuna 1971, Barandiarán 1972, Murga 1978), cuya presencia en la Comunidad Autónoma del País Vasco está sometida a fuertes variaciones temporales, tanto en lo que se refiere a número de efectivos como a su área de distribución (Álvarez *et al.* 1998), debido a su conflictividad con la ganadería extensiva de ovino de raza “latxa” (Sáenz de Buruaga *et al.* 1994, Echeagaray *et al.* 2003).

Es importante que su gestión se base en argumentos científicos y socioeconómicos serios, cimentados en datos fiables e imparciales (Boitani 2000). Dentro de los planes de gestión es fundamental conocer el tamaño aproximado de la población y sus parámetros demográficos básicos (Fuller 1995).

El método habitualmente utilizado en el contexto internacional para estimar las poblaciones de lobos consiste en el conteo de grupos familiares, y evaluar densidades y tamaño de población durante el período otoño-invierno (Barrientos y Fernández 2002, Mech y Boitani 2003), debido a la mayor cohesión de los grupos en esta época (Fuller y Snow 1988).

En España no se han utilizado estimaciones de tamaño de grupo proveniente de muestras de campo para la estimación del número de integrantes por grupo, salvo el trabajo de Barrientos y Fernández (2002). Por otra parte, en el País Vasco resulta difícil conocer su tamaño poblacional debido a su elevada movilidad e inestabilidad espacio-temporal en dicho territorio, como consecuencia de la ecología espacial de la especie y de la elevada presión humana a la que está sometida.

La búsqueda de indicios es un modo habitual para intentar detectar la presencia y abundancia de lobos en una zona, pero la existencia de perros asilvestrados, incontrolados o mastines que acompañan al ganado ovino, puede dificultar en gran manera la identificación de los indicios. Debido al avance de las técnicas genéticas no invasivas durante la última década, es posible confirmar la especie que ha depositado un excremento, así como determinar el tamaño de una población aún cuando su baja densidad, su comportamiento esquivo y la humanización del medio dificulten su detección directa.

Para estudiar el tamaño de la población de lobos existente en el País Vasco, analizamos genéticamente excrementos de cánidos recogidos en las zonas donde se acumulan los indicios de presencia de la especie para determinar el número mínimo de lobos que la habitan. Así confirmamos la elevada proporción de indicios de perros presentes en dicha área.

ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio ha sido seleccionada tomando en consideración los datos oficiales de daños al ganado atribuidos al lobo cedidos por las Diputaciones Forales de Vizcaya y Álava en el período 1999-2002 y las citas previas de presencia del cánido en Euskadi (Sáenz de Buruaga *et al.* 1994, 2000, Illana y Paniagua 2002). A este área se han añadido otras zonas adyacentes con las mismas características naturales y ecológicas donde sí era conocida previamente la presencia de lobos (Blanco *et al.* 2002).

Se sitúa en el límite nororiental del área de distribución del lobo ibérico (Blanco *et al.* 1990, 2002) y comprende el occidente de la Comunidad Autónoma del País Vasco, nordeste de Burgos (Castilla y León) y sureste de Cantabria (incluyendo el enclave de Trucíos). Tiene una extensión total de 2.700 km² (Figura 1). La distribución de esta superficie corresponde al País Vasco en un 62%, el 35% a Castilla y León y el 3% a Cantabria. Este territorio destaca por la heterogeneidad de ambientes producto de la transformación humana. Las masas forestales representan el 46% de la superficie y están dominadas por pino silvestre (*Pinus silvestris*), haya (*Fagus sylvatica*), encina (*Quercus ilex*) y coníferas exóticas de repoblación. También aparecen matorrales (18%) y pastizales, tanto en altiplanos serranos (20%) como en fondos de valle dedicados a la agricultura y ganadería (12%).

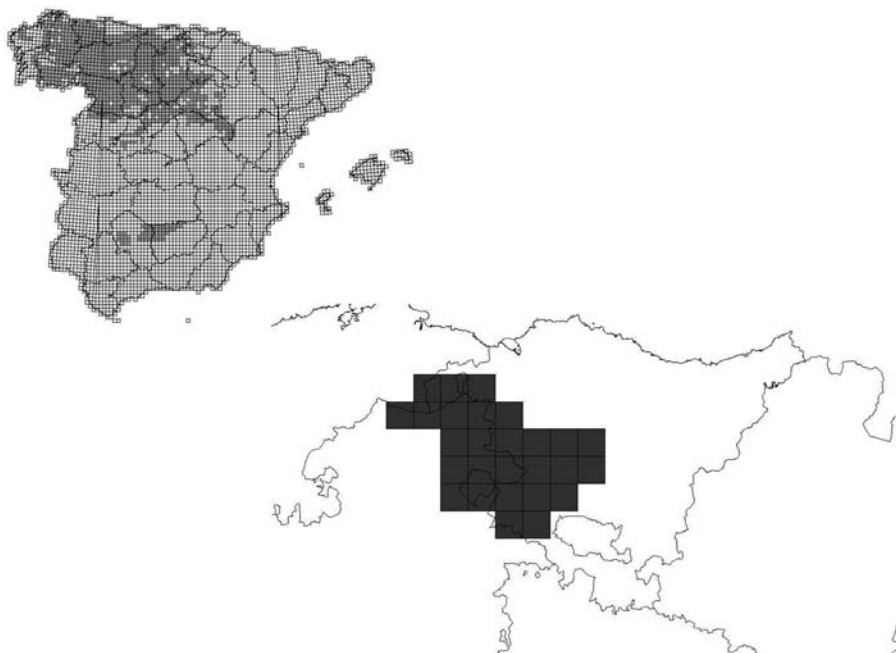


Figura 1. Distribución del lobo ibérico en España en 2001 (Blanco *et al.* 2002) y área de estudio.

Iberian wolf distribution in Spain in 2001 (Blanco et al. 2002) and study area.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el bienio 2003-2004 se recorrieron 690 km en busca de excrementos de lobo en un área de 2.700 km² (Tabla 1). El esfuerzo de prospección ha sido mayor en las cuadrículas que engloban territorio vasco (Figura 2). Se recogieron 136 muestras fecales atribuibles a lobos a lo largo de 400 recorridos prefijados de longitud variable. Éstos fueron elegidos siguiendo un muestreo dirigido (Rico *et al.* 2000). Para ello, se seleccionaron positivamente aquellos lugares querenciosos para el marcaje de lobos mediante excrementos, como caminos, pistas y cortafuegos que transcurren por los ejes de las sierras, collados y cruces (Llaneza 1996). La mayor parte de los transectos se muestrearon al menos dos veces por año y en estaciones diferentes. Se utilizaron los criterios empleados por Balmori *et al.* (2000) para atribuir los excrementos a lobo. En caso de duda, se recogieron los excrementos para su identificación mediante técnicas moleculares.

TABLA 1
Kilómetros recorridos y número de excrementos atribuidos a lobo recogidos
en las cuadrículas UTM estudiadas.

Wolf transect surveys and number of scats collected in each UTM grid cells.

Cuadrícula	Km recorridos	Nº excrementos
VN76	5,69	4
VN87	6,08	0
VN78	6,46	2
VN68	6,47	0
VN57	6,50	7
VN74	6,64	15
VN77	6,91	0
VN75	10,99	11
VN67	12,58	5
VN88	13,28	3
WN25	13,33	0
VN93	13,94	0
VN97	17,57	0
VN95	19,80	10
VN86	25,32	5
WN03	29,59	12
VN84	30,14	12
VN96	30,87	1
VN85	39,16	28
WN06	41,60	1
WN15	45,66	3
WN26	46,41	0
WN14	47,82	0
VN94	48,05	1
WN04	50,45	5
WN05	53,97	11
WN16	54,74	0
TOTAL	690,02	136

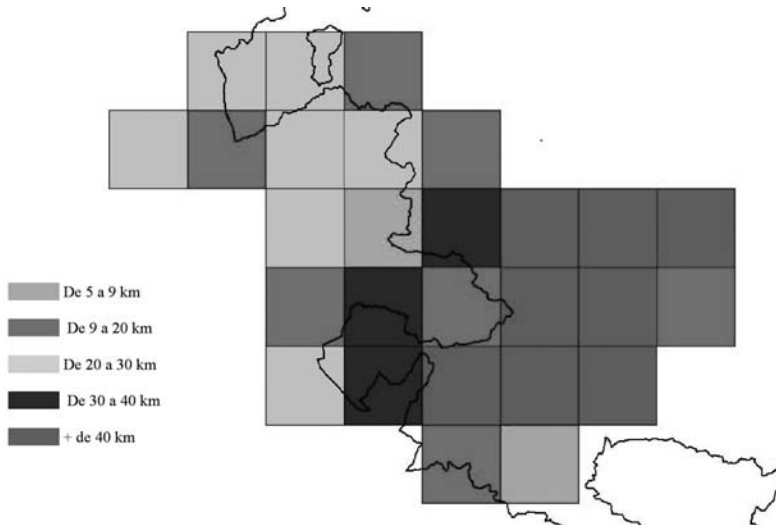


Figura 2. Esfuerzo de muestreo en cada una de las cuadrículas UTM de 10x10 km del área de estudio.

Sampling effort in each UTM 10x10 km grid cells of the study area.

Todos los excrementos fueron individualizados en bolsas y se caracterizaron mediante una ficha de registro que recogía sus características y las del lugar en el que se encontraron. De cada excremento se seleccionó un fragmento que se conservó en etanol al 96% y se almacenó en un congelador a -20° C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Para la descripción y delimitación cartográfica del área de estudio se utilizó el Sistema de Información Geográfica ArcView GIS V.3.2.

La extracción de ADN de los excrementos se efectuó utilizando el kit QIAamp® DNA Stool Mini Kits (QIAGEN Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación de la región control del ADN mitocondrial se utilizaron cebadores descritos por Vilà *et al.* (1999) y Leonard *et al.* (2002), que amplifican secuencias de entre 176 y 470 pares de bases (bp). Para la secuenciación de los productos de PCR se utilizó un instrumento MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences) siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en bases de datos públicas (GenBank) para identificar a la especie que depositó el excremento.

Cada una de las muestras identificada como perteneciente a lobo fue analizada mediante 20 microsatélites autosómicos (2001, 2006, 2010, 2017, 2054,

2079, 2088, 2096, 109, 250, 253, 173, 225, vWF, PEZ1, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8 y PEZ 12; Vilà *et al.* 2003). Estos microsatélites se amplificaron mediante PCR siguiendo las condiciones y protocolos descritos por Vilà *et al.* (2003). Los productos de las amplificaciones fueron sometidos a electroforesis capilar en un secuenciador automático MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences) utilizando los protocolos recomendados por el fabricante. La lectura e interpretación de los electroferogramas resultantes para cada uno de los microsatélites se realizó con el programa Genetic Profiler v2.0 (Amersham Biosciences).

El genotipo obtenido permitió la identificación de individuos. Para evitar los problemas de sobreestimación derivados de errores técnicos en las amplificaciones de ADN de baja calidad, se realizaron 6 réplicas independientes de los análisis de cada excremento y se empleó el “matching approach” o método de emparejamiento (Creel *et al.* 2003) para la correcta identificación individual.

Para la determinación del sexo de los ejemplares se utilizó una combinación de dos pares de cebadores optimizada para heces de cánidos (Seddon 2005). Este método permite la amplificación simultánea de un fragmento del intrón 7 del gen DBY en el cromosoma Y y del intrón 6 de DBX en el cromosoma X. Los productos de esta amplificación por medio de PCR, al ser sometidos a electroforesis, producen dos bandas en machos y una sola banda en hembras. Este método es más eficiente que métodos basados en la amplificación exclusiva de secuencias del cromosoma Y ya que la no amplificación podría indicar tanto que se trata de una hembra como que la amplificación no ha funcionado por problemas técnicos. En cambio, el método que utilizamos requiere la amplificación con éxito de secuencias tanto en machos como en hembras.

Para el análisis de los datos genéticos se ha utilizado el programa Microsatellite Toolkit para Microsoft Excel (Park 2001).

Con el objeto de analizar la evolución en la distribución del lobo en el País Vasco, se han comparado los datos obtenidos en este trabajo con citas previas sobre su presencia reflejada en cuadrículas UTM 10x10 km (Madoz 1845, Álvarez *et al.* 1985, Sáenz de Buruaga *et al.* 1994, 2000).

RESULTADOS

Mediante secuencias de ADN mitocondrial se identificó la especie responsable del excremento en 86 casos (63%; N=136), siendo 31 muestras fecales pertenecientes a lobo (36%), 2 a zorro (2%) y 53 a perro (62%). Para el resto de las muestras no se obtuvo la amplificación del ADN probablemente debido a estar altamente

degradado. Todas la secuencias de los lobos obtenidas corresponden al haplotipo lu4, uno de los cuatro presentes en la Península Ibérica (Vilà *et al.* 1999).

Para la identificación de individuos se decidió no considerar a aquellos genotipos para los que no se obtuvo amplificación de más de 8 loci. Se hallaron un mínimo de 18 genotipos diferentes distribuidos en 2.700 km², que asociamos con distintos individuos. Cada uno de estos genotipos se identificó mediante las iniciales del nombre científico del lobo en latín (CL), seguidas de un número correlativo según fueron identificados (CL1, CL2, etc.). Además, hemos constatado la presencia de lobo en 13 cuadrículas UTM de 100 km² del País Vasco (Figura 3).

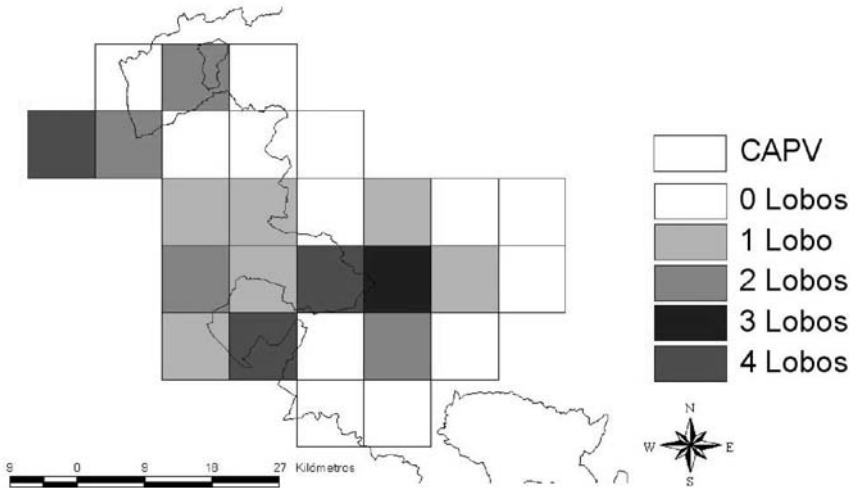


Figura 3. Número de lobos identificados en cada cuadrícula UTM de 10x10 km mediante técnicas genéticas. Algunos individuos aparecen en varias cuadrículas.

Number of wolves identified in 10x10 km UTM grid cells using genetic no invasive methods. Some wolves are present in more than one cell.

De los 18 lobos identificados mediante microsatélites (Figura 2), se ha podido determinar el sexo de 12 (67%): 5 machos y 7 hembras. La relación de sexos está sesgada hacia las hembras, siendo de 1,4 hembras por cada macho (1:1,4). Sin embargo, esta relación no es significativamente diferente de la relación 1:1 ($\chi^2=1,800$; $gl=1$; $p=0,180$).

Tres individuos (CL11, CL17 y CL22) fueron detectados en varias ocasiones (n=12). El ejemplar que aportó la información más relevante en cuanto a sus localizaciones fue la hembra CL11, que fue detectada por primera vez en primavera en la Sierra de Guibijo (Álava) y un mes después en la sierra de Badaya (Álava), a 14,5 km en línea recta de distancia de la anterior localización. Ocho días después fue localizada en la Sierra de Árcamo, a más de 13 km de la última recaptura. Estos tres puntos delimitan una superficie de 3.700 ha. Durante sus movimientos esta hembra tuvo que atravesar una barrera artificial “poco permeable” para la mastofauna, como es la Autopista A68 (Bilbao-Zaragoza), al menos en una ocasión.

DISCUSIÓN

La Estrategia para la conservación y gestión del lobo en España, siguiendo las recomendaciones de la UICN, indica la necesidad de conocer y actualizar el estatus y distribución de la especie. Dentro de esta línea, hemos aplicado técnicas genéticas no invasivas por primera vez en España para confirmar la presencia de lobos, estimar su distribución, número de ejemplares e identificar su sexo en el País Vasco y su entorno.

Hasta fechas recientes, el radiomarcaje era considerado el único método de censo válido para especies como el lobo (Mech y Boitani 2003). Las mejoras técnicas y metodológicas experimentadas en los últimos años han satisfecho las necesidades específicas de los análisis genéticos y han diversificado el campo de acción de los estudios de la genética de la conservación de poblaciones. Además, los métodos no invasivos presentan indudables beneficios frente a otros que implican un coste económico y humano más elevado (Ayuso y Vilà 2001) y permiten acceder a una gran cantidad de información sin representar una molestia a las poblaciones objeto de estudio. También es posible identificar y sexar a los individuos a partir de heces recogidas en muestreos de campo (Lucchini *et al.* 2002, García *et al.* 2003) a pesar de que presentan un ADN altamente degradado (Kohn *et al.* 1999). La utilización de estos análisis genéticos puede ser útil para conocer algunos de los movimientos de estos animales, incluso en áreas muy extensas (Vilà *et al.* 2003, García *et al.* 2003) y resulta muy adecuado en territorios donde se pueda movilizar un número elevado de voluntarios (Bellemain *et al.* 2005).

Blanco y Cortés (2003) dudan de la utilidad real como método de censo de las técnicas genéticas. Sin embargo, y en fechas muy anteriores, algunos trabajos científicos habían pronosticado su utilidad como método de estima poblacional

(Hoss *et al.* 1992) y muchos grupos de investigación de todo el mundo estaban ya trabajando con este tipo de técnicas. Para entonces, ya habían sido utilizadas para censar poblaciones de especies tan dispares como osos pardos (Taberlet *et al.* 1997), coyotes (Kohn *et al.* 1999), elefantes (Eggert *et al.* 2003), tejones (Wilson *et al.* 2003) e incluso lobos (Ayuso 1999, Luccini *et al.* 2002, Valière 2002, Creel *et al.* 2003). Además, ya se había comparado la eficacia de los muestreos genéticos no invasivos como alternativa seria y menos costosa que el radiomarcaje masivo para censar las poblaciones de lobo (Creel *et al.* 2003). Desde entonces, estos métodos se han convertido en una herramienta habitual para el seguimiento de carnívoros ya que representan una alternativa viable frente a otros métodos, especialmente en zonas donde su presencia resulte dudosa o se hallen en baja densidad (Rey *et al.* 2000, Ayuso y Vilà 2001, Vilà y Ayuso 2001, Palomares *et al.* 2002, Eggert *et al.* 2003, Flagstad *et al.* 2004).

Sin embargo, todo esto no significa que el seguimiento de poblaciones animales a partir de análisis genéticos no invasivos sea fácil. Las limitaciones que esta metodología presenta se pueden resumir en la calidad y cantidad de ADN con la que se trabaja en estos análisis, siendo en el caso de excrementos un ADN fragmentado, de baja calidad, y con presencia de numerosos inhibidores enzimáticos de las reacciones de PCR. Esta baja calidad del ADN obtenido de excrementos determina diversos errores y la posibilidad de contaminación de las muestras. En el genotipado también existen varios errores asociados al proceso: errores de amplificación en la PCR, la dificultad de detección de uno de los alelos de un individuo heterocigoto o *drop out*, y la aparición de falsos alelos que interfieren en la asignación de los alelos a cada muestra (Taberlet *et al.* 1997). A grandes rasgos, las propuestas para minimizar estos errores vienen determinadas por la realización de múltiples réplicas (Ayuso 1999, Taberlet *et al.* 1999, Waits *et al.* 2001).

Por otra parte, la determinación del sexo en muestras biológicas ha venido efectuándose gracias a los análisis con RFLP de los polimorfismos específicos de los cromosomas sexuales y/o autonómicos (Koopman *et al.* 1990, Amstrup *et al.* 1993, García-Muro *et al.* 1997). La ventaja del método descrito por Seddon (2005) es que está optimizado específicamente para cánidos (perros, lobos y coyotes). Además, al amplificarse ADN de cromosomas sexuales (X, Y) no es necesario recurrir al empleo de cebadores autosomales o nucleares, evitándose confusiones si fallara el proceso de amplificación del cromosoma Y y no sucediese lo mismo en el cromosoma X. En el caso de machos, si hubiera un sesgo por la amplificación del cromosoma Y al haber el mismo número de copias de los dos

genes sexuales (X e Y) es tan probable que fallara la amplificación del cromosoma X como del Y para la misma reacción de PCR.

En cuanto a la distribución del lobo obtenida mediante este trabajo, podemos comprobar que no representa un cambio notable comparado con la obtenida en años previos (Madoz 1845, Álvarez *et al.* 1985, Sáenz de Buruaga *et al.* 1994, 2000, Echegaray *et al.* 2005) (Figura 4). No obstante, esta información no se puede utilizar para caracterizar de manera detallada la evolución de la distribución del lobo en el País Vasco ya que los datos utilizados para generar los distintos mapas proceden de metodologías diferentes. A pesar de ello, si podemos establecer una aproximación general, observándose un aumento del área de la distribución del lobo en las décadas de 1980 y 1990, tras su extinción a mediados del siglo XX. La distribución actual es similar a la observada en el periodo de 1994-1997 (Sáenz de Buruaga *et al.* 2000), lo que sugiere un relativo estancamiento. Esto puede ser debido a la elevada presión a la que la especie está sometida, que impide su potencial expansión hacia oriente (Pirineos).

En España es frecuente utilizar métodos basados en la identificación visual de excrementos en trabajos de detección, estima de la abundancia y alimentación de lobos. Mientras que la asignación específica visual de excrementos de lobo ha de tomarse con cautela en numerosos lugares, la asignación genética permite confirmar la identidad de los excrementos (Ayuso 1999, Ayuso y Vilà 2001). A tenor de los resultados obtenidos, habría que asumir la posible existencia de errores en la atribución de excrementos asignados a lobo, especialmente en áreas de baja densidad de carnívoros, elevada antropización, abundancia de perros, etc.

En Álava, durante el período de estudio hubo 163 registros oficiales de ataques al ganado (Sáenz de Buruaga *et al.* 2004, 2005), siendo el 95% atribuido a lobos (101 en el año 2003 y 52 en 2004). Sólo 10 ataques fueron atribuidos a perros (6 en el año 2003 y 4 en 2004). Nuestros resultados muestran una elevada presencia de muestras de perros en zonas con elevada incidencia de ataques al ganado doméstico achacados a lobos. Debido a la elevada presencia de perros en el monte (incontrolados, asilvestrados, y especialmente mastines, subvencionados como método de prevención de ataques y cuyo número mínimo en territorio alavés durante el periodo de estudio era de 153 ejemplares), convendría plantearse si el volumen de daños atribuido a los lobos en el área de estudio es real. La atribución de daños al ganado al lobo en Álava durante el período 1994-2004 ha implicado que se hayan abatido 3,7 ejemplares de lobo al año y la realización de 262 batidas específicas al lobo, el 73,4% de las cuales efectuadas fuera de la época hábil de caza.

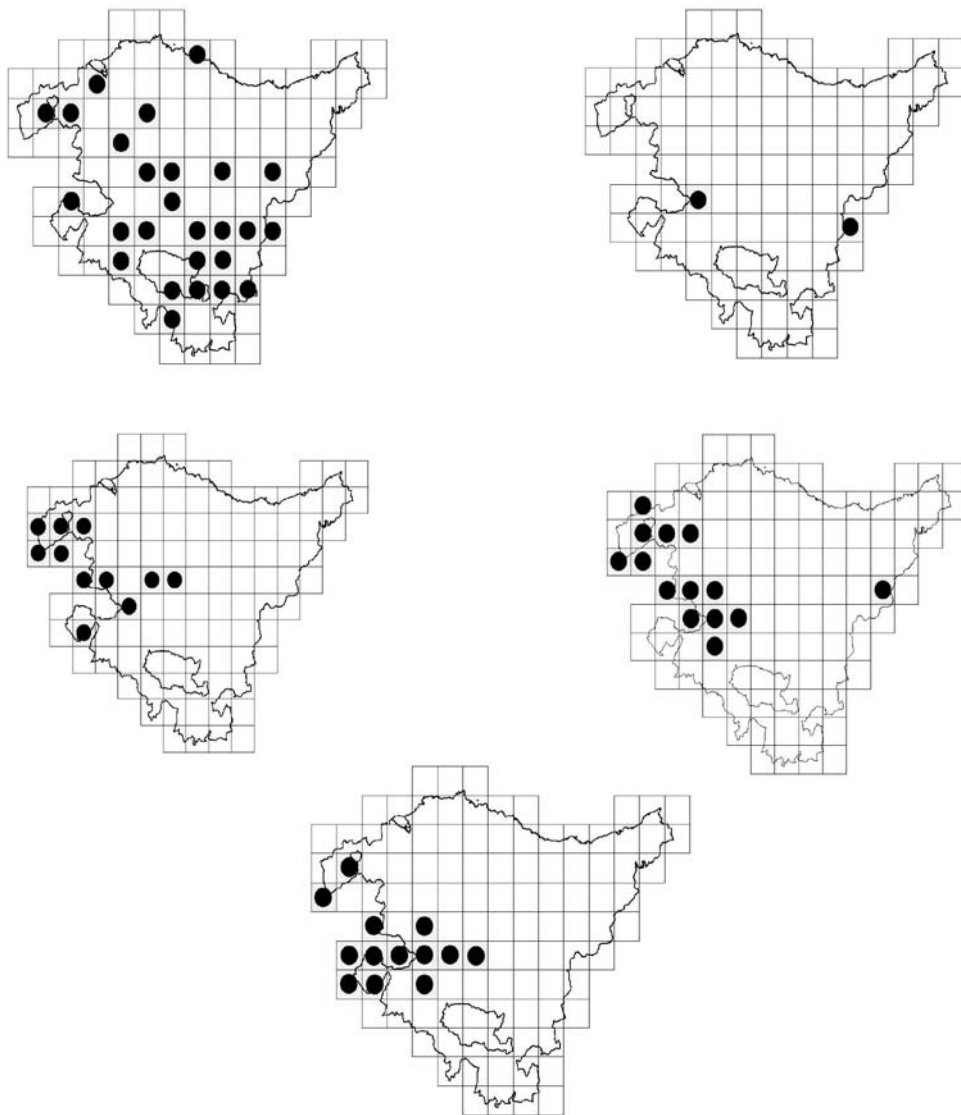


Figura 4. Evolución de la distribución del lobo en el País Vasco durante el período 1833-2004 en cuadrículas UTM 10x10 km.

Wolf distribution in 10x10 km UTM grid cells in the Basque Country during 1833-2004.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo de la Dirección de Biodiversidad del Departamento de Ordenación del Territorio y Medio Ambiente del Gobierno Vasco, que con su contribución económica ha hecho posible la realización de este trabajo y en especial a Josu Erkiaga. A Santiago Castroviejo, Violeta Muñoz, Jennifer Leonard, Malin Johansson, Cecilia Wärdig, Susanne Björnerfeldt y Frank Hailer por su ayuda en el trabajo de laboratorio. Agradecemos a Javier Talegón y Alberto Fernández sus aportaciones y la revisión del manuscrito original.

REFERENCIAS

- ALTUNA, J. (1971). *Fauna de mamíferos de los yacimientos prehistóricos de Guipúzcoa*. San Sebastián.
- ÁLVAREZ, A. J. M. BEA, E. FAUS, E. CASTIÉN E I. MENDIOLA (1985). *Atlas de los Vertebrados Continentales de Álava, Vizcaya y Guipúzcoa (excepto Chiroptera)*. Ed. Gobierno Vasco, Vitoria-Gasteiz. 464 pp.
- ÁLVAREZ, J., J. M. FERNÁNDEZ DE MENDIOLA Y A. BEA (1998). *Vertebrados Continentales: situación actual en la Comunidad Autónoma del País Vasco*. Ed. Gobierno Vasco, Vitoria-Gasteiz.
- AMSTRUP, S. C., G. W. GARNER, M. A. CRONIN Y J. C. PATTON (1993). Sex identification of polar bears from blood and tissue samples. *Canadian Journal of Zoology*, 71: 2174-2177.
- AYUSO, A. (1999). *Use of non-invasive sampling techniques for microsatellite genotyping of Swedish wolves*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Uppsala, Suecia.
- AYUSO, A. Y C. VILÀ (2001). *Uso de ADN fecal para la identificación de lobos en Suecia*. Resúmenes V Jornadas de la SECEM, Vitoria-Gasteiz, 35.
- BALMORI, A., M. RICO, J. NAVES Y E. LLAMAZARES (2000). Contribución al estudio de endoparásitos del lobo en la Península Ibérica: una investigación coprológica. *Galemys*, 12 (NE): 13-27.
- BARANDIARÁN, J. M. (1972). *Diccionario ilustrado de mitología vasca*. Bilbao.
- BARRIENTOS, L. M. Y A. FERNÁNDEZ (2002). ¿Cómo estimar el tamaño de grupo en las poblaciones ibéricas de lobos?. En: *Propuestas para el estudio de la dinámica de las poblaciones de lobo en la Península Ibérica*. Fuentes de Nava (Palencia), Asociación para la Conservación y Estudio del Lobo Ibérico. 11 pp.
- BELLEMAIN, E., J. E. SWENSON, D. TALLMON, S. BRUNVERG Y P. TABERLET (2005). Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected faeces: four methods with brown bears. *Conservation Biology*, 15 (1): 150-161.
- BLANCO, J. C., L. CUESTA, Y S. REIG (eds.) (1990). *El lobo (Canis lupus) en España. Situación, problemática y apuntes sobre su ecología*. Colección técnica. ICONA. Madrid. 118 pp.
- BLANCO, J. C., M. SÁENZ DE BURUAGA Y L. LLANEZA (2002). *Canis lupus* Linnaeus, 1758. Pp.: 234-237. En: L. J. Palomo y J. Gisbert (eds.). 2002. *Atlas de los Mamíferos*

- Terrestres de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. SECEM-SECEMU, Madrid.
- BLANCO, J. C. y Y. CORTÉS (2003). Respuesta a la Nota de C. Vilà y A. Ayuso. *Galemys*, 15 (1): 103-104.
- BOITANI, L. (2000). *Action plan for the conservation of wolves (Canis lupus) in Europe*. Consejo de Europa, Estrasburgo, 86 pp.
- CREEL, S., G. SPONG, J. L. SANDS, J. ROTELLA, J. ZEIGLE, L. JOE, K. MURPHY y D. SMITHS (2003). Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, 12: 2003-2009.
- ECHEGARAY, J., A. ILLANA y D. PANIAGUA (2003). El lobo intenta asentarse en la provincia de Álava. *Quercus*, 217: 22-28.
- ECHEGARAY, J., A. ILLANA, A. HERNANDO, F. MARTÍNEZ DE LECEA, J. BAYONA, J. A. DE LA TORRE, D. PANIAGUA y C. VILÀ (2005). *El Lobo (Canis lupus Linnaeus, 1758) en la C.A.P.V. Uso de ADN fecal para el seguimiento de sus poblaciones*. Departamento de Ordenación del Territorio y Medio Ambiente. Informe inédito. 252 pp.
- EGGERT, L. S., J. A. EGGERT y D. S. WOODRUFF (2003). Estimating population size for elusive animals: for the forest elephants of Kalum National Park, Ghana. *Molecular Ecology*, 12: 1389-1402.
- FLAGSTAD, O., E. HEDMARK, A. LANDA, H. BROSETH, J. PERSSON, P. SEGERSTRÖM y H. ELLEGREN (2004). Noninvasive Monitoring of a Reestablished Wolverine Population. *Conservation Biology*, 18 (3): 676-688.
- FULLER, T. K. y W. J. SNOW (1988). Estimating winter wolf density using radiotelemetry data. *Wildlife Society Bulletin*, 16: 367-370.
- FULLER, T. K. (1995). *Guidelines for Gray Wolf Management in the Northern Great Lakes Region*. International Wolf Center, Technical Publication n° 27.
- GARCÍA, J. L., I. REY e I. DOADRIO (2003). *Estudio genético del oso pardo cantábrico en Asturias*. CSIC, Principado de Asturias. Informe inédito. 60 pp.
- GARCÍA-MURO, E., M. P. AZNAR, C. RODELLAR y P. ZARAGOZA (1997). Sex-specific PCR/RFLPs in the canine ZFY/ZFX loci. *Animal Genetics*, 28: 15.
- HÖSS M., M. KOHN, F. KNAUER, W. SCHRÖEDER y S. PÄÄBO (1992). Excremental analysis by PCR. *Nature*, 359: 199.
- ILLANA, A. y D. PANIAGUA (2002). *Atlas de distribución de carnívoros en el Territorio Histórico de Alava*. Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco. Informe inédito. 259 pp.
- KOHN, M., E. C. YORK, D. A. KAMRADT, G. HAUGHT, R. M. SAUVAJOT y R. K. WAYNE (1999). Estimating population size by genotyping feces. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 266: 657-663.
- KOOPMAN, P., A. MUNSTERBERG y B. CAPEL (1990). Expression of candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348: 350-352.

- LLANEZA, L. (1996). *Selección de presa y alimentación del Lobo Ibérico (Canis lupus L.) en el Parque Natural de Somiedo (Asturias)*. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo. Informe inédito. 20 pp.
- LEONARD, J., R. K. WAYNE, J. WHEELER, R. VALADEZ, S. GUILLÉN Y C. VILÀ (2002). Ancient DNA evidence for old world origin of new world dogs. *Science*, 298: 1613-1616.
- LUCCHINI, V., E. FABBRI, F. MARUCCO, S. RICCI, L. BOITANI Y E. RANDI (2002). Non-invasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, 11: 857-868.
- MADOZ, P. (1845-1850). *Diccionario Geográfico-Estadístico-Histórico de España y sus posesiones de ultramar*. Ediciones facsímil de Álava, Vizcaya y Guipúzcoa.
- MECH, L. D. Y L. BOITANI (2003). *Wolves. Behaviour, Ecology and Conservation*. The University of Chicago Press. 448 pp.
- MURGA, F. (1978). Catálogo de loberas de las provincias de Álava, Burgos y León. *Kobie*, 8: 159-189.
- PALOMARES, F., J. A. GODOY, A. PIRIZ, S. J. O'BRIEN Y W. E. JONSON (2002). Faecal genetic análisis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian Lynx. *Molecular Ecology*, 11: 2171-2182.
- PARK, S. D. E. (2001). *Trypanotolerance in west African cattle and the population genetic effects of selection*. Ph. D. Thesis, University of Dublin.
- REY, I., I. DOADRIO, G. PALOMERO, P. TABERLET Y L. WAITS (2000). Identificación, determinación de sexo y variabilidad genética del núcleo oriental de oso pardo en la Cordillera Cantábrica. En: *La conservación del oso pardo en Europa: un reto de cara al siglo XXI*. Ed. Fundación Biodiversidad. 123 pp
- RICO, M., L. LLANEZA, P. FERNÁNDEZ-LLARIO Y J. CARRANZA (2000). Datos sobre el lobo ibérico (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) en Extremadura. *Galemys*, 12 (NE): 103-111.
- SÁENZ DE BURUAGA, M., A. ONRUBIA, M. A. CAMPOS, E. ARBERAS, A.J. LUCIO Y F.J. PURROY (1994). *El lobo en Euskadi*. Gobierno Vasco y Diputaciones Forales de Álava y Vizcaya. Informe inédito. 324 pp.
- SÁENZ DE BURUAGA, M., M. A. CAMPOS, E. ARBERAS Y A. ONRUBIA (2000). Últimos datos sobre el lobo (*Canis lupus*) en el País Vasco y Navarra. *Galemys*, 12 (NE): 149-162.
- SÁENZ DE BURUAGA, M., M. A. CAMPOS, E. ARBERAS Y A. ONRUBIA (2004). *Seguimiento y gestión del lobo (Canis lupus) en el Territorio Histórico de Álava. Informe de síntesis del año 2003*. Consultora de Recursos Naturales S. L. Diputación Foral de Álava. Vitoria-Gasteiz. Informe inédito. 46 pp.
- SÁENZ DE BURUAGA, M., M. A. CAMPOS, E. ARBERAS Y A. ONRUBIA (2005). *Seguimiento y gestión del lobo (Canis lupus) en el Territorio Histórico de Álava. Informe de síntesis del año 2004*. Consultora de Recursos Naturales S. L. Diputación Foral de Álava. Vitoria-Gasteiz. Informe inédito. 36 pp.

- SEDDON, J. M. (2005). Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics*, 6: 147-149.
- TABERLET, P., J. J. CAMARRA, S. GRIFFIN, E. UHRÈS, O. HANNOTE, L. P. WAITS, C. DUBOIS-PAGANON, T. BURKE Y J. BOUVET (1997). Non-invasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, 6: 869-871.
- TABERLET, P., L. WAITS Y G. LUIKHART (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecological Evolution*, 14: 323-327.
- VALIÈRE, N. (2002). *Améliorización et optimisation des méthodes non-invasives et des marqueurs microsatellites en Biologie des Populations et de la Conservation*. Tesis Doctoral, Université Claude Bernard Lyon. 191 pp.
- VILA, C., I. R. AMORIM, J.A. LEONARD, D. POSADA, J. CASTROVIEJO, F. PETRUCCI-FONSECA, K., A. CRANDALL, H. ELLEGREN Y R. K. WAYNE (1999). Mitochondrial DNA phylogeography and population history of grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, 8: 2089-2103.
- VILA, C. Y A. AYUSO (2001). Uso de métodos no invasivos para estimar el tamaño de la población de lobos (*Canis lupus*). *Galemys*, 14 (2): 60-63.
- VILA, C., A.-K. SUNDQVIST, Ø. FLAGSTAD, J. SEDDON, S. BJÖRNERFELDT, I. KOJOLA, A. CASULLI, H. SAND, P. WABAKKEN Y H. ELLEGREN (2003). Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B.*, 270: 91-97.
- WAITS, L., G. LUIKHART Y P. TABERLET (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10: 249-256.
- WILSON, G. J., A. C. FRANTZ, L. C. POPE, T. J. ROPER, T. A. BURKE, C. L. CHEESEMAN Y R. J. DELAHAY (2003). Estimation of badger abundance using faecal DNA typing. *Journal of Applied Ecology*, 40: 658-666.