

**DIRECCIÓN DE BIODIVERSIDAD**  
*Departamento de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio*  
**GOBIERNO VASCO**  
**Convocatoria Orden de 14 de Junio de 2006**  
Proyecto de Investigación de la Biodiversidad.

**MEMORIA DEL PROYECTO**

**“MAPA FILOGEOGRÁFICO PARA LA  
CONSERVACIÓN DE LA LIEBRE EUROPEA  
EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS  
VASCO Y PLANIFICACIÓN DE LOS  
PROYECTOS DE REINTRODUCCIÓN O  
REFUERZO DE LA POBLACIÓN EN ZONAS  
FAVORABLES”**

**Lasarte, septiembre 2007**

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4.1. Recolección de ejemplares.....	6
4.2. Procedimiento en el laboratorio.....	10
4.2.1. Extracción de ADN.....	10
4.2.2. Amplificación de ADN.....	11
4.2.3. Purificación del ADN.....	11
4.2.4. Secuenciación.....	11
4.3. Análisis de las secuencias.....	12
5. RESULTADOS.....	12
5.1. Análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de las poblaciones de <i>Lepus europaeus</i> de Álava.....	12
5.2. Análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de las poblaciones de <i>Lepus europaeus</i> de Guipúzcoa.....	25
5.3. Análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de las poblaciones de <i>Lepus europaeus</i> de Vizcaya.....	38
5.4. Frecuencias de los grupos y distribución geográfica de las poblaciones de <i>Lepus europaeus</i> y <i>Lepus granatensis</i> de Álava y Guipúzcoa.....	38
5.5. Análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de los ejemplares del programa de cría en cautividad.....	40
5.6. Selección de lugares de reintroducción.....	47
5.7. Sueltas realizadas.....	47
5.8. Elaboración de una base de datos.....	47
5.9. Seguimiento de las liebres en la naturaleza.....	48
6. DISCUSIÓN.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE INTERÉS.....	50

## 1.- RESUMEN

La población ibérica de liebre europea (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) ha experimentado una notable regresión en su área de distribución cantábrica durante los últimos 40 años.

En el País Vasco, a causa de su escasez, se han realizado sueltas en diversas zonas con ejemplares pertenecientes a especies y poblaciones no autóctonas (*Lepus granatensis* Rosenhauer, 1856 procedentes de Iberia meridional y *L. europaeus* no ibéricas). Debido al significativo número de sueltas, en parte no controladas, así como a fenómenos de hibridación y a los movimientos de los individuos, actualmente no existe conocimiento preciso a nivel taxonómico y corológico de las poblaciones de liebre existentes.

El éxito del programa de recuperación de la liebre europea autóctona iniciado en el 2000, que se fundamenta en la creación de una población reproductora en cautividad y en la futura reintroducción de ejemplares juveniles, depende de la realización de una buena selección de localidades en las que iniciar la creación de poblaciones pioneras o reforzar las poblaciones existentes de liebres autóctonas.

En el presente proyecto, se ha realizado un mapeo genético con técnicas de ADN mitocondrial de las poblaciones de liebre que viven en la naturaleza en las provincias de Álava y Guipúzcoa de la Comunidad Autónoma de País Vasco (CAPV) con el objeto de caracterizarlas genéticamente para contribuir a la identificación de las zonas actualmente aptas para la reintroducción, en las que existen liebres autóctonas, y las zonas en las que resulta necesario que se lleven a cabo medidas correctoras para eliminar las liebres no autóctonas existentes antes de iniciar las repoblaciones.

El estudio se realizó con material procedente de las dos provincias vascas que fue facilitado al grupo de investigación por las Diputaciones provinciales de Guipúzcoa y Álava, en este último caso a través de ACCA.

Se ha realizado asimismo la identificación genética de los ejemplares del programa de cría en cautividad que fueron capturados durante 2005, ya que en algunas de las localidades seleccionadas para la captura de liebre europea autóctona se presenta una proporción significativa de híbridos entre *L. granatensis* y *L. europaeus*, así como individuos no ibéricos de *L. europaeus*. Estos datos contribuirán como información adicional al objetivo anterior de mapeo genético de las poblaciones de liebres de la CAPV.

La situación actual de las poblaciones naturales de liebre europea cantábrica refuerza la necesidad del programa de recuperación de esta especie ya que a la situación de deterioro poblacional tradicionalmente conocida de Guipúzcoa y Vizcaya se suma la tendencia regresiva actual en Álava y Navarra.

## 2.- INTRODUCCIÓN

La liebre europea (*L. europaeus*) es una de las especies de mamíferos de interés cinegético. Esta actividad cinegética ha conducido a la reintroducción de ejemplares en los cotos de caza provenientes de zonas ajenas a las poblaciones autóctonas. Históricamente, las repoblaciones ibéricas de esta especie han sido llevadas a cabo a partir de ejemplares importados de granjas francesas. En Francia, las poblaciones autóctonas de *L. europaeus*, designadas por ellos como “type méridional ou méditerranéen” se han dado por prácticamente desaparecida, debido a su declive poblacional y, sobre todo, a la reintroducción masiva del llamado “type europe centrale”, provenientes de distintos países centroeuropeos: Polonia, antigua república Checa, Rusia, Hungría, Bulgaria. (Oliver B. y P. Montet,, 1971). Las importaciones francesas alcanzaron, en las década de los 70, los 200.000 ejemplares/año (Reydellet, M., 1971) hasta que posteriormente crearon sus propias granjas de liebres, pero con reproductores de origen centroeuropeo, stock del que han sido surtidos los cotos cantábricos

En la actualidad los planes de conservación asumidos por las autoridades responsables controlan estas prácticas, han sido constatadas por nuestros estudios previos de liebres de Navarra y Álava, reintroducciones externas de ejemplares no autóctonos. Esta directriz de conservación es consecuente con el criterio establecido por la IUCN que reconoce la diversidad genética de las poblaciones como uno de los criterios de conservación, evitando prácticas de introducción de genomas extraños a las poblaciones locales (Palacios y col. 2004).

Para este tipo de estudios, el ADN mitocondrial (ADNmt) es una herramienta molecular de gran utilidad para determinar la divergencia genética intra e inter específica de las poblaciones y especies filogenéticamente emparentadas, respectivamente (Moritz y Hillis, 1996; Sunnucks 2000). La razón de ello es la alta tasa de mutación que presenta el ADNmt frente al ADN nuclear, así como su transmisión maternal como haplotipo (Brown y col. 1979).

En el género *Lepus*, este marcador ha sido ampliamente utilizado para describir y esclarecer las relaciones filogenéticas entre sus especies (Pérez-Suárez y col. 1994, Halanych y col 1999, Pierpaoli y col. 1999, Koh y col. 2001) y determinar fenómenos de introgresión interespecífica (Thulin y col. 1999, Alves y col. 2003, Pérez-Suárez y Sanz-Martín, 2004).

En nuestro caso, los estudios previos realizados, indican una clara diferencia entre las poblaciones de *L. europaeus* ibéricas respecto al resto de las poblaciones europeas, debido una ancestral introgresión de la liebre variable (*L. timidus*) en las poblaciones de *L. europaeus* ibéricas (Alves y col, 2003; Melo-Ferreira, 2005). En Arkaute y otras localidades de Álava han aparecido tanto individuos de *L. europaeus* introgresionados con *L. timidus* como introgresionados con *L. granatensis* además de ejemplares de *L. europaeus* no ibéricos, lo que impone ampliar la zona de estudio (Sanz-Martín. M.J.. 2006)

La ancestral introgresión mitocondrial de *L. timidus* mantenida en exclusiva en la población ibérica autóctona de *L. europaeus* constituye una perfecta herramienta molecular para detectar la introducciones alienígenas de *L. europaeus* de origen no-ibérico, y asimismo, ser utilizadas para determinar las características genómicas nucleares de las poblaciones autóctonas, mediante análisis discriminatorios de microsatélites, respecto al resto de poblaciones o ejemplares introducidos en la CAPV. Este estudio referencial permitiría detectar, en el caso de la otra introgresión encontrada en *L. europaeus* por *L. granatensis*, el grado y origen del que procede, y de esta forma determinar su idoneidad para ser mantenidas o excluidas en el proceso de conservación de las poblaciones vascas de *L. europaeus*. Al respecto de esto, hay que señalar que en un estudio preliminar (Estonba y col., 2006) se han detectado diferencias nucleares de gran importancia entre las tres especies ibéricas de liebre y una importante heterogeneidad entre poblaciones europeas de *L. europaeus*.

### **3.- OBJETIVOS**

La finalidad del programa de recuperación de la liebre europea es formar una población en cautividad constituida exclusivamente por ejemplares de liebre europea de origen ibérico y reintroducir sus crías en la naturaleza, tanto en localidades en las que no existe presencia actual de liebre como en localidades donde las liebres europeas de origen ibérico son escasas y puede resultar conveniente reforzarlas.

La identificación genética, a partir del ADNmt y de marcadores nucleares, de los ejemplares capturados en la CAPV y del programa de cría en cautividad que fueron capturados durante 2005, para establecer las localidades más idóneas para la captura y reintroducción de la liebre europea autóctona, ya que, según se ha determinado en estudios previos, en algunas de las localidades se presenta una proporción significativa de *L. europaeus* introgresados por *L. granatensis*, así como individuos no ibéricos de *L. europaeus*. Estos datos contribuirán como fuente de información a través del mapeo genético de las poblaciones de liebres de la CAPV.

La selección de lugares apropiados o la realización de medidas correctoras y de conservación son necesarias para garantizar el éxito del programa de reintroducción. Para ello, además de los factores ecológicos y genéticos favorables es fundamental contar con la voluntad decidida de los gestores del territorio y de los titulares de los terrenos y de los derechos de caza.

Por todos ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Desarrollo de una herramienta molecular que permita la identificación y diferenciación de las poblaciones autóctonas de *Lepus europaeus* de la CAPV del resto de poblaciones europeas de esta especie. Esta herramienta resulta imprescindible a la hora de discriminar, y en su caso eliminar, ejemplares alóctonos.
- Caracterización genética de la estructura poblacional de la liebre en la CAPV con el objeto de elaborar un mapa filogeográfico útil en la conservación de las poblaciones autóctonas. Para ello se estimará la diversidad intra e interpoblacional, y la diferenciación genética, de la liebre en las tres provincias mediante la aplicación de marcadores mitocondriales y loci de ADN microsatélite
- Elaboración de la base de datos de origen y parentesco de las liebres en cautividad para el control de las líneas genéticas de los ejemplares para reintroducción.
- Determinación de la capacidad del medio para las sueltas, entramado sociocultural, base de datos para el seguimiento de las zonas a repoblar, sueltas a realizar y seguimiento de las liebres en la naturaleza.

Para desarrollar los siguientes objetivos se realizó:

- Identificación y diferenciación a nivel molecular del ADN mitocondrial (ADNmt) de las poblaciones autóctonas de *Lepus europaeus* de la Comunidad Autónoma Vasca del resto de poblaciones europeas de esta especie, afín de poder controlar su reintroducción en dicha Comunidad Autónoma.
- Elaboración de un mapa filogeográfico que identifique las poblaciones de liebre europea autóctonas y alóctonas, con el fin de determinar las localidades o regiones aptas para la captura y reintroducción de ejemplares autóctonos en Guipúzcoa, Álava y Vizcaya.
- Incremento de las colecciones de genoma y colecciones taxonómicas de liebres para su conservación a largo plazo en los laboratorios de la Universidad del País Vasco, Universidad de Alcalá, y CSIC.
- Análisis genético de la población reproductora en cautividad de liebre europea, que garantiza la reintroducción de ejemplares autóctonos y elaboración de una base de datos de origen de las liebres en cautividad para el control de las líneas genéticas.
- Elaboración de publicaciones científicas y de divulgación.

## **4.- MATERIALES Y MÉTODOS: Genética de la conservación**

### **4.1.- Recolección de ejemplares**

Durante las temporadas cinegéticas 2005/06 y 2006/07, se creó una red de muestreo en las tres provincias vascas para la obtención de muestras para el estudio genético (oreja e hígado). La recogida de muestras se llevó a cabo por cazadores sobre el terreno. Las muestras se mantuvieron en frío o guardadas en etanol 70º para su conservación.

En el caso de Álava fueron recogidos por la guardería de ACCA y se llevaron a la granja de liebres para su congelación y distribución a los miembros del equipo investigador. Dado que ACCA gestiona casi el 80% de los cotos de caza de Álava las muestras proceden de la mayoría de las localidades de esta provincia. El número de muestras facilitadas fue de 32 en la temporada 2005/2006 y de 21 en la temporada 2006/2007. Sin embargo, en sur de la provincia de Álava se encuentra también otra especie de liebre, *L. granatensis*. Por tanto, los individuos de las localidades de Labastida, Samaniego, Leza, Laguardia, Baños de Ebro, Assa, Yecora y Viana (Navarra), fueron clasificados como liebre ibérica, según el mapa de distribución de especies de liebre en Álava de ACCA (<http://www.accajalava.es/plliebre.htm>), ya que con las muestras no se facilitaba ningún dato sobre su determinación específica.

En el caso de Guipúzcoa las muestras se llevaron al laboratorio que la Diputación tiene en Fraisoro, donde se congelaron, y desde allí se enviaron al laboratorio genético. El número de muestras facilitadas y analizadas fueron 23 en la temporada 2005/2006 y 38 en la temporada 2006/2007. También se realizaron reuniones explicativas con la finalidad de informar y concienciar al colectivo de cazadores. En estas reuniones se les repartió un kit con el material necesario: ficha donde anotar la información de interés, anotaciones sobre el protocolo a seguir para la recogida de la muestra, bolsa de plástico con cierre hermético, guantes de látex, envases para recoger las muestras y alcohol para su conservación. Asimismo, se ha organizado para la próxima temporada de caza 2007/08 una red de recogida de muestras, que tiene en cuenta las localidades de las que no se obtuvieron muestras en años precedentes, y de las cuales sería interesante obtener alguna muestra para completar el mapa genético, como son la comarca de Bidasoa-Oarsoaldea, y los entornos de Izarraitz y Antzuola en Guipúzcoa.

En el caso de Vizcaya se enviaron únicamente 7 muestras al laboratorio de Genética de la UPV en Leioa, de las cuales tras analizarlas no se pudo obtener ningún resultado debido a su mal estado de conservación.

Las capturas de liebres vivas en Álava se realizaron en 2005 en Entzia, Izki, Valderejo y Kuartango . En el año 2006 no fue capturado ningún ejemplar ya que ACCA no accedió a colaborar durante el periodo idóneo, a pesar de tener permiso de captura de la Diputación Foral de Álava.

En el presente estudio se han procesado en total 121 ejemplares de las tres provincias de la Comunidad Autónoma de País Vasco (Tabla 1). Además, se han analizado 60 individuos capturados, para el programa de cría en cautividad (Tabla 2).

Se ha utilizado las secuencias de la región de control del ADN mitocondrial como marcador genético. En los casos en los que era necesario un segundo análisis se utilizó el gen mitocondrial del citocromo b. Adicionalmente, se tomaron datos de secuencias de referencia del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) correspondientes a haplotipos de *Lepus timidus*.

**TABLA 1.-** Lista de ejemplares analizados de *L. europaeus* y *L. granatensis*. Se indica la localidad, provincia y tipo.

Individuo	Especie	Localidad	Provincia	Tipo
A001	<i>L. europaeus</i>	Ezkerekotxa	Álava	autóctono
A002	<i>L. europaeus</i>	Durana	Álava	" <i>granatensis</i> "
A003	<i>L. europaeus</i>	Lubiano-Urizar	Álava	autóctono
A004	<i>L. granatensis</i>	Viana	Navarra	autóctono
A005	<i>L. europaeus</i>	Urizar	Álava	autóctono
A006	<i>L. europaeus</i>	Alangua	Álava	" <i>granatensis</i> "
A007	<i>L. europaeus</i>	Ezkerekotxa	Álava	" <i>granatensis</i> "
A008	<i>L. europaeus</i>	Aberasturi-Castillo	Álava	autóctono
A009	<i>L. europaeus</i>	Retana	Álava	autóctono
A010	<i>L. europaeus</i>	Zuazo de Vitoria	Álava	autóctono
A011	<i>L. europaeus</i>	Okariz	Álava	autóctono
A012	<i>L. europaeus</i>	Lubiano-Arroyabe	Álava	autóctono
A013	<i>L. europaeus</i>	Lubiano-Urizar	Álava	" <i>granatensis</i> "
A014	<i>L. europaeus</i>	Alaiza	Álava	autóctono
A015	<i>L. granatensis</i>	Laguardia	Álava	" <i>granatensis</i> "
A016		Mandajora	Álava	" <i>granatensis</i> "
A017	<i>L. granatensis</i>	Viana	Navarra	autóctono
A018	<i>L. europaeus</i>	Gauna	Álava	" <i>granatensis</i> "
A019	<i>L. granatensis</i>	Leza	Álava	autóctono
A020	<i>L. europaeus</i>	Aberasturi	Álava	autóctono
A021	<i>L. europaeus</i>	Gauna	Álava	" <i>granatensis</i> "
A022	<i>L. europaeus</i>	Alaiza	Álava	autóctono
A023	<i>L. europaeus</i>	Ordoñana	Álava	autóctono
A024	<i>L. europaeus</i>	Ordoñana	Álava	autóctono
A025	<i>L. granatensis</i>	Assa	Álava	autóctono
A026	<i>L. granatensis</i>	Baños de Ebro	Álava	autóctono
A027	<i>L. europaeus</i>	Estavillo	Álava	autóctono
A028	<i>L. europaeus</i>	Aberasturi	Álava	autóctono
A029	<i>L. europaeus</i>	Ullibarrivíña	Álava	" <i>granatensis</i> "
A030	<i>L. granatensis</i>	Leza	Álava	" <i>granatensis</i> "
A031	<i>L. granatensis</i>	Samaniego	Álava	autóctono
A032	<i>L. granatensis</i>	Yecora	Álava	autóctono
A033	<i>L. granatensis</i>	Samaniego	Álava	" <i>granatensis</i> "
A034	<i>L. europaeus</i>	Lubiano	Álava	autóctono
A035	<i>L. europaeus</i>	Agurain	Álava	autóctono
A036	<i>L. europaeus</i>	Zuazo de San Millán	Álava	autóctono
A037	<i>L. europaeus</i>	Araka	Álava	" <i>granatensis</i> "
A038	<i>L. europaeus</i>	Ariñez	Álava	" <i>granatensis</i> "
A039	<i>L. granatensis</i>	Labastida	Álava	" <i>granatensis</i> "
A040	<i>L. europaeus</i>	Jokano	Álava	autóctono
A041	<i>L. granatensis</i>	Labastida	Álava	" <i>granatensis</i> "
A042	<i>L. europaeus</i>	Agurain	Álava	" <i>granatensis</i> "
A043	<i>L. europaeus</i>	Zuazo de San Millan	Álava	No secuencia
A044	<i>L. europaeus</i>	Aprikano	Álava	autóctono
A045	<i>L. europaeus</i>	Orbiso	Álava	autóctono
A046	<i>L. granatensis</i>	Labastida	Álava	autóctono
A047	<i>L. granatensis</i>	Yecora	Álava	autóctono
A048	<i>L. europaeus</i>	Caicedo Yuso	Álava	autóctono
A049	<i>L. europaeus</i>	Salinas de Añana	Álava	autóctono
A050	<i>L. europaeus</i>	Manurga	Álava	autóctono
A051	<i>L. europaeus</i>	Aberasturi	Álava	autóctono
A052	<i>L. europaeus</i>	Andollu	Álava	autóctono

A053	<i>L. europaeus</i>	Manclares de la Oca	Álava	autóctono
G001	<i>L. europaeus</i>	Ataun	Guipúzcoa	autóctono
G002	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
G003	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	"granatensis"
G004	<i>L. europaeus</i>	Aretxabaleta	Guipúzcoa	"granatensis"
G005	<i>L. europaeus</i>	Berrobi	Guipúzcoa	autóctono
G006	<i>L. europaeus</i>	Belauntza	Guipúzcoa	autóctono
G007	<i>L. europaeus</i>	Albiztur	Guipúzcoa	foránea
G008	<i>L. europaeus</i>	Zegama	Guipúzcoa	autóctono
G009	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
G010	<i>L. europaeus</i>	Zegama	Guipúzcoa	autóctono
G011	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
G012	<i>L. europaeus</i>	Billabona	Guipúzcoa	No secuencia
G013	<i>L. europaeus</i>	Albiztur	Guipúzcoa	foránea
G014	<i>L. europaeus</i>	Lizartza	Guipúzcoa	foránea
G015	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	"granatensis"
G016	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	"granatensis"
G017	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	autóctono
G018	<i>L. europaeus</i>	Arama	Guipúzcoa	autóctono
G019	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	autóctono
G020	<i>L. europaeus</i>	?	Guipúzcoa	autóctono
G021	<i>L. europaeus</i>	Zerain	Guipúzcoa	autóctono
G022	<i>L. europaeus</i>	Ataun	Guipúzcoa	autóctono
G023	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
G024	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	No secuencia
G025	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
G026	<i>L. europaeus</i>	Idiazabal	Guipúzcoa	autóctono
G027	<i>L. europaeus</i>	Zegama	Guipúzcoa	autóctono
G028	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
G029	<i>L. europaeus</i>	Idiazabal	Guipúzcoa	autóctono
G030	<i>L. europaeus</i>	Zegama	Guipúzcoa	"granatensis"
G031	<i>L. europaeus</i>	Zegama	Guipúzcoa	No secuencia
G032	<i>L. europaeus</i>	Bidania	Guipúzcoa	No secuencia
G033	<i>L. europaeus</i>	Beizama	Guipúzcoa	No secuencia
G034	<i>L. europaeus</i>	Errezil	Guipúzcoa	foránea
G035	<i>L. europaeus</i>	Errezil	Guipúzcoa	foránea
G036	<i>L. europaeus</i>	Errezil	Guipúzcoa	foránea
G037	<i>L. europaeus</i>	Bidania	Guipúzcoa	foránea
G038	<i>L. europaeus</i>	Idiazabal	Guipúzcoa	autóctono
G039	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
G040	<i>L. europaeus</i>	Eskoriatza	Guipúzcoa	"granatensis"
G041	<i>L. europaeus</i>	Eskoriatza	Guipúzcoa	"granatensis"
G042	<i>L. europaeus</i>	Beizama	Guipúzcoa	foránea
G043	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	"granatensis"
G044	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	"granatensis"
G045	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	autóctono
G046	<i>L. europaeus</i>	Errezil	Guipúzcoa	foránea
G047	<i>L. europaeus</i>	Errezil	Guipúzcoa	foránea
G048	<i>L. europaeus</i>	Tolosa	Guipúzcoa	autóctono
G049	<i>L. europaeus</i>	Bidania	Guipúzcoa	autóctono
G050	<i>L. europaeus</i>	Larraul	Guipúzcoa	foránea

G051	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	autóctono
G052	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	"granatensis"
G053	<i>L. europaeus</i>	Oñati	Guipúzcoa	"granatensis"
G054	<i>L. europaeus</i>	Zegama	Guipúzcoa	autóctono
G055	<i>L. europaeus</i>	Zegama	Guipúzcoa	"granatensis"
G056	<i>L. europaeus</i>	Aretxabaleta	Guipúzcoa	"granatensis"
G057	<i>L. europaeus</i>	Arrasate	Guipúzcoa	"granatensis"
G058	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
G059	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
G060	<i>L. europaeus</i>	Zegama	Guipúzcoa	autóctono
G061	<i>L. europaeus</i>	Olaberria	Guipúzcoa	autóctono
BI001	<i>L. europaeus</i>	Ubidea-Otxandio	Vizcaya	No secuencia
BI002	<i>L. europaeus</i>	Pinal y Sierra de monte -Karrantza-	Vizcaya	No secuencia
BI003	<i>L. europaeus</i>	Lendoyo	Vizcaya	No secuencia
BI004	<i>L. europaeus</i>	Karrantza	Vizcaya	No secuencia
BI005	<i>L. europaeus</i>	Fincas a Pastizal -Karrantza-	Vizcaya	No secuencia
BI006	<i>L. europaeus</i>	Karrantza	Vizcaya	No secuencia
BI007	<i>L. europaeus</i>	Dima-Zona controlada	Vizcaya	No secuencia

**TABLA 2.-** Lista de ejemplares analizados de *Lepus europaeus* para el programa de cría en cautividad.

Individuo	Localidad	Provincia	Tipo
Le11	Kuartango	Álava	Autóctono
Le15	Altsasu	Navarra	Autóctono
Le16	Altsasu	Navarra	Autóctono
Le18	Arkaute	Álava	Autóctono
Le20	Arkaute	Álava	Autóctono
Le21	Arkaute	Álava	Autóctono
Le22	Kuartango	Álava	Autóctono
Le23	Arkaute	Álava	Autóctono
Le24	Arkaute	Álava	"granatensis"
Le25	Arkaute	Álava	Autóctono
Le26	Arkaute	Álava	Autóctono
Le27	Arkaute	Álava	Autóctono
Le28	Arkaute	Álava	Autóctono
Le29	Arkaute	Álava	Autóctono
Le30	Kuartango	Álava	Autóctono
Le31	Kuartango	Álava	Autóctono
Le32	Arkaute	Álava	Autóctono
Le33	Arkaute	Álava	Autóctono
Le34	Arkaute	Álava	Foráneo
Le35	Arkaute	Álava	"granatensis"
Le36	Arkaute	Álava	Autóctono
Le37	Cría de Granja		Autóctono
Le38	Kuartango	Álava	Autóctono
Le61	Arkaute	Álava	Autóctono
Le62	Arkaute	Álava	Autóctono
Le63	Arkaute	Álava	Autóctono
Le66	Kuartango	Álava	Autóctono
Le67	Arkaute	Álava	Autóctono
Le69	Arkaute	Álava	"granatensis"
Le72	Arkaute	Álava	Autóctono

Le73	Arkaute	Álava	"granatensis"
Le74	Arkaute	Álava	Autóctono
Le75	Arkaute	Álava	Autóctono
Le76	Arkaute	Álava	Autóctono
Le78	Valderejo	Álava	Autóctono
Le79	Arkaute	Álava	"granatensis"
Le80	Arkaute	Álava	Autóctono
Le81	Arkaute	Álava	"granatensis"
Le82	Arkaute	Álava	"granatensis"
Le86		Huesca	Autóctono
Le130	Arkaute	Álava	Autóctono
Le132	Arkaute	Álava	Foráneo
Le134	Izki	Álava	"granatensis"
Le136	Entzia	Álava	Autóctono
Le138	Izki	Álava	Autóctono
Le140	Valderejo	Álava	"granatensis"
Le141	Valderejo	Álava	Autóctono
Le144	Valderejo	Álava	Autóctono
Le146	Entzia	Álava	Autóctono
Le147	Betelu	Navarra	Autóctono
Le169	Beasain	Guipúzcoa	Autóctono
Le179	Entzia	Álava	Autóctono
Le181	Entzia	Álava	Autóctono
Le192	Entzia	Álava	Autóctono
Le194	Kuartango	Álava	"granatensis"
Le195	Kuartango	Álava	"granatensis"
Le197	Izki	Álava	Autóctono
Le198	Izki	Álava	Autóctono
Le199	Valderejo	Álava	Autóctono
Le200	Valderejo	Álava	Autóctono

#### 4.2.- Procedimiento en el laboratorio

##### 4.2.1.- Extracción del ADN

El ADN mitocondrial se obtuvo de tejidos de oreja e hígado conservados en etanol 70º o congelados a -20º C.

La extracción del ADN se realizó mediante el proceso con SDS, proteinasa K, extracción con cloruro sódico y precipitación alcohólica (Miller y col., 1988; Maniatis y col., 1992).

El ADN se extrajo lisando 20-25 mg de tejido en 500 µl de Buffer de lisis o extracción (solución de lisis celular: 10 mm Tris; 100 mm EDTA; 2% SDS) y 10 µl de proteinasa K (10mg/ml); seguido de una incubación de dos horas o toda la noche a 55°C con agitación. Entonces se trató opcionalmente con 5µl de ARNasa (10mg/ml) y se incubó durante una hora a 55°C. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 15.000 rpm., agregando a 500 µl del sobrenadante, 300 µl de cloruro sódico (5M). Después de esto se volvió a centrifugar a 15.000 rpm. Y descartando todo el líquido del sobrenadante y finalmente las muestras eran resuspendidas en 100 µl de 1xTE. Así eran guardadas a -20°C.

#### **4.2.2.- Amplificación del ADN**

Se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, Saiki y col., 1988) (Erlich, 1989) para obtener gran cantidad de copias de ADN de la región control y del gen que codifica para el citocromo b del ADN mitocondrial, a partir de una pequeña cantidad de ADN disponible, previamente extraído y diluido 1:100.

Para este estudio se tomaron 50  $\mu$ l de ADN mitocondrial (este volumen contiene entre  $10^2$  a  $10^6$  copias de ADN) previamente extraído y diluido 1:100 para realizar amplificaciones de doble hebra de la región control, mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR, Saiki y col., 1988) (Elrich, 1989).

La amplificación de la región control se realizó en un único fragmento, utilizando los oligonucleótidos: Thr (TCAAAGCTTACACCAGTCTTGAAACC) y TDKD (CCTGAAGTAGGAACCAGATG).

Las reacciones de amplificación se realizaron con las siguientes condiciones: 30 ciclos con una temperatura de desnaturación de 94°C durante 30 segundos; 30 segundos de alineación de los oligonucleótidos a 46°C o 48°C; y durante 30 segundos de extensión a 72°C. Con un ciclo previo a 94°C durante 7 minutos que origina la activación del  $\approx$  40% de la enzima, suficiente para realizar una eficiente amplificación durante los primeros ciclos de la reacción cuando el ADN es menos abundante. Ya que la mayor parte de la enzima es activada cada ciclo durante la fase de desnaturación. La actividad enzimática aumenta con el número de moléculas de ADN, dando una función óptima de PCR. Por último, tiene un ciclo final de 10 minutos a 72°C para la última extensión.

Se utilizó un termociclador (Perkin-Elmer GeneAmp PCR system 2400) para realizar automáticamente cambios de temperatura rápidos e incubaciones.

Las concentraciones en la mezcla fueron: Buffer 1X, dNTPs 0.75 mM, primer oligonucleótido Thr 1  $\mu$ M, primer oligonucleótido TDKD 1  $\mu$ M, Cloruro de Magnesio 1.9 mM y enzima Taq Polimerasa 0.625 unidades. Aunque la concentración del Cloruro Magnesio fue incrementada en algunas PCR para aumentar la afinidad de la ADN Polimerasa.

Para comprobar la contaminación, se incorporaba a cada PCR un control negativo de mezcla de reactivos sin muestra de ADN.

Todas las amplificaciones fueron comprobadas con electroforesis, aplicando 5  $\mu$ l del producto de PCR en minigelos de agarosa al 2% con Buffer TAE 1X, usando un marcador de tamaño molecular 100 pares de bases para estimar los tamaños de los fragmentos. Esto se visualizó con Bromuro de Etidio en una lámpara de luz UV.

#### **4.2.3.- Purificación del ADN**

La purificación se realiza mediante un kit de columnas para purificación de ADN. Está basado en una matriz de sílice para purificación, concentración y eliminación de sales para ADN con tamaño de 0.1 a 10 kb. Las columnas de purificación están diseñadas para recuperar ADN de diferentes soluciones como reacciones de PCR, células supernadantes, etc, eliminando diferentes productos contaminantes tales como enzimas, oligonucleótidos, dNTPs, etc.

El ADN se recupera de la matriz de sílice, por lavado de la misma con buffer TE o agua y posterior centrifugado.

#### **4.2.4.- Secuenciación**

Con los productos de PCR purificados se realizó la reacción de secuenciación por ciclos. Las condiciones de ciclado fueron: 1 minuto de desnaturación inicial a 96°C, 30 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 5 segundos a 50°C, y 4 minutos a 60°C. Se usaron microcolumnas de Sephadex para purificar las reacciones de secuenciación.

Las secuencias se obtuvieron en un secuenciador automático modelo “ABI (Applied Biotechnology) 373<sup>a</sup> Stretch Automated DNA Sequencer”. Dichas secuencias se leyeron con el programa CHROMAS.

#### **4.3.- Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas se alinearon mediante el programa CLUSTALX (Thompson y col., 1997). Se utilizó el formato FASTA para el fichero de datos de las secuencias. Se calcularon las distancias de Tamura-Nei (Tamura-Nei, 1993) y se construyeron los árboles filogenéticos mediante el método de neighbor-joining aplicando 500 réplicas de bootstrap, utilizando el programa MEGA 3.0 (Kumar y col., 2004).

### **5.– RESULTADOS**

#### **5.1.- Análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de las poblaciones de *Lepus europaeus* de Álava.**

El conjunto de datos consistió en 535 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial que incluye 121 variables y 110 sitios filogenéticamente informativos de 52 secuencias obtenidas de los 53 individuos analizados. Adicionalmente al conjunto de datos se añadió como secuencias de referencia: haplotipos de *L. timidus* y *L. europaeus* previamente publicados en bases de datos (GenBank), dos secuencias propias de *L. europaeus* de Alemania (Le17) y de un individuo de una granja de cría francesa (Lek10) y dos secuencias propias correspondientes a haplotipos *L. granatensis* del centro y sur de la Península Ibérica (Lg2 y Lg4).

En el siguiente apartado se presentan las secuencias alineadas de los individuos de la provincia de Álava junto con las secuencias de referencia de las especies *L. europaeus* (L.e.), *L. granatensis* (L.g) y *L. timidus* (L.t), la razón de incluir está última especie, ausente en la actualidad en la Península Ibérica, se debe a que se ha detectado una introgresión ancestral en ADN mitocondrial de las poblaciones del norte de la Península Ibérica de *L. europaeus* y de *L. granatensis* del genotipo mitocondrial de *L. timidus* (Alves y col. 2003, Melo-Ferreira y col., 2005). Este acontecimiento se produjo en el pasado, durante los períodos de las últimas glaciaciones, en que se ha detectado fósiles de la especie de *L. timidus* en el norte de España (Altuna, 1970) lo que confirma la amplia distribución que tuvo en el pasado esta especie. En la actualidad, también ha sido detectado este tipo de introducción en poblaciones de liebres europeas de la Península de Escandinavia. (Thulin y col., 1997). **Este acontecimiento evolutivo permite diferenciar las poblaciones autóctonas de *Lepus europaeus* y *Lepus granatensis* de la CAPV.** Además al introducir en el conjunto de datos secuencias de *L. granatensis* del sur de la Península, se puede detectar individuos reintroducidos desde otras regiones en las poblaciones de *L. granatensis* de Álava y en las poblaciones de *L. europaeus* se puede identificar a los individuos con introducción de *L. granatensis* que no son típicos de la región norte de la Península Ibérica.

**Secuencias.-** Secuencias alineadas de los ejemplares de *L. europaeus*, *L. granatensis* y *L. timidus* de la provincia de Álava, correspondientes a 535 nucleótidos de la región de control del ADN mitocondrial.

#A2	-----	-----	-----	G	GCCCCATGCC	CACCACAGC
#A13	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A16	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A18	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A21	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A29	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A37	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A6	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A7	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A42	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A38	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A15	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A30	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A33	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A41	-----	-----	-----	.	.....	.....
#Lg2	-----	-----	-----	.	.....	.....
#Lg4	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A39	-----	-----	-----	.	.....	.....
#A1	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A5	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A24	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A9	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A51	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A20	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A35	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A28	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A31	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A44	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A45	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A48	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A53	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A36	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A17	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A32	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A52	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A19	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A25	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A47	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#Lt_Y15314	-----	-----	-----			
#Lt_Y15312	-----	-----	-----			
#Lt_Y15305	-----	-----	-----			
#A26	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A3	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A8	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A10	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A12	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A27	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A34	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A46	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A4	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A23	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A50	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A11	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A14	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A22	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#A40	-----	-----	-----	.	TT..A...	.....
#A49	-----	-----	-----	.	TTT..A...	.....
#Le_AY153530	-----	-----	C	CCTGGGACAT	CAGAGAAAGA	.....
#Lek10	-----	-----	C	CCTGGGACAT	CAGAGAAAGA	.....
#Le17	NAGAGAGGAG	ATTAACTCAC	CCTGGGACAT	CAGAGAAAGA	.....	.....
#Le_AY300036	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Le_AY154666	-----	-----	-----	-----	-----	-----

#A2	ACCCAAAGCT GAAATTCTCT TTAAACTACT CTCTGCTTT TCCTAATAAA TATATCCAAG
#A13	.....
#A16	.....
#A18	.....
#A21	.....
#A29	.....
#A37	.....
#A6	.....
#A7	.....
#A42	.....
#A38	..... N .....
#A15	.....
#A30	.....
#A33	.....
#A41	.....
#Lg2	.....
#Lg4	.....
#A39	.....
#A1	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A5	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A24	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A9	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A51	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A20	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A35	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A28	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A31	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A44	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A45	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A48	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A53	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A36	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A17	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A32	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A52	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A19	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A25	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A47	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#Lt_Y15314	----- T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#Lt_Y15312	----- T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#Lt_Y15305	----- T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A26	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A3	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A..T....
#A8	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A..T....
#A10	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A..T....
#A12	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A..T....
#A27	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A..T....
#A34	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A..T....
#A46	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A..T....
#A4	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A..T....
#A23	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A50	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A11	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A14	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A22	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A40	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#A49	..... T. .... C CT.CT.AT.. C.A.....
#Le_AY153530	-----
#Lek10	..... T. .... A CT..T.AT.. C.....
#Le17	..... T. .... A CT..T.AT.. C.....
#Le_AY300036	-----
#Le_AY154666	-----

#A2	TAACTTGTTA	CTATTGACAA	AAATCTCCTT	TAACGCTATG	TAATTCGTGC	ATTAATGCTT
#A13	.	.	.	.	.	.
#A16	.	.	.	.	.	.
#A18	.	.	.	.	.	.
#A21	.	.	.	.	.	.
#A29	.	.	.	.	.	.
#A37	.	.	.	.	.	.
#A6	.	.	.	.	.	.
#A7	.	.	.	.	.	.
#A42	.	.	.	.	.	.
#A38	.	.	.	.	.	G.
#A15	.	.	.	.	.	.
#A30	.	.	.	.	.	.
#A33	.	.	.	.	.	.
#A41	.	.	.	.	.	.
#Lg2	.	.	.	.	.	.
#Lg4	.	.	.	.	.	.
#A39	.N.	.	.N.	.	.	G.
#A1	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A5	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A24	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A9	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A51	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A20	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A35	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A28	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A31	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A44	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A45	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A48	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A53	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A36	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A17	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A32	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A52	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A19	.C.	C.	TCT.	C.	.	G..C.
#A25	.C.	C.	TCT.	C.	.	G..C.
#A47	.C.	C.	TCT.	C.	.	C.
#Lt_Y15314	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#Lt_Y15312	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#Lt_Y15305	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A26	.C.	C.	TC.	C.	.	C.
#A3	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A8	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A10	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A12	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A27	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A34	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A46	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A4	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A23	.C.	C.	TC.	C.	.	GG..C.
#A50	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A11	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A14	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A22	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A40	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#A49	.C.	C.	TC.	C.	.	G..C.
#Le_AY153530	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Lek10	.....	C.	.....	-CAC.	....T.	.....
#Le17	.....	C.	.....	-CAC.	....T.	....G.
#Le_AY300036	-----	-----	-----	-----	-----	....G.
#Le_AY154666	-----	-----	-----	-----	-----	....G.

#A2	TTCCCCATTA	ACATGTATCT	ATACTATTAT	TTCATAATCA	ACATTAGACC	ATTCTATGTT
#A13	.	.	.	.	.	.
#A16	.	.	.	.	.	.
#A18	.	.	.	.	.	.
#A21	.	.	.	.	.	.
#A29	.	.	.	.	.	.
#A37	.	.	.	.	.	.
#A6	.	.	.	.	.	.
#A7	.	.	.	.	.	.
#A42	.	.	.	.	.	.
#A38	.	.	.	.	.	.
#A15	.	.	.	.	.	.
#A30	.	.	.	.	.	.
#A33	.	C.	.	.	.	.
#A41	.	C.	.	.	.	.
#Lg2	.	C.	.	.	.	.
#Lg4	.	C.	.	.	.	.
#A39	.	.	.	.	.	.
#A1	C.	.	C.	.	.	.
#A5	C.	.	C.	.	.	.
#A24	C.	.	C.	.	.	.
#A9	C.	.	C.	.	.	.
#A51	C.	.	C.	.	.	.
#A20	C.	.	C.	.	.	.
#A35	C.	.	C.	.	.	.
#A28	C.	.	C.	.	.	.
#A31	C.	.	C.	.	.	.
#A44	C.	.	C.	.	.	.
#A45	C.	.	C.	.	.	.
#A48	C.	.	C.	.	.	.
#A53	C.	.	C.	.	.	.
#A36	C.	.	C.	.	.	.
#A17	C.	.	C.	.	.	.
#A32	C.	.	C.	.	.	.
#A52	G.	.	C.	.	.	.
#A19	C.	.	C.	.	.	.
#A25	C.	.	C.	.	.	.
#A47	C.	.	C.	.	.	.
#Lt_Y15314	.	C.C	.	C.	.	.
#Lt_Y15312	.	C.C	.	C.	.	.
#Lt_Y15305	.	.	C.	C.	.	.
#A26	C.	.	C.	.	.	.
#A3	C.	.	C.	.	.	.
#A8	C.	.	C.	.	.	.
#A10	C.	.	C.	.	.	.
#A12	C.	.	C.	.	.	.
#A27	C.	.	C.	.	.	.
#A34	C.	.	C.	.	.	.
#A46	C.	.	C.	.	.	.
#A4	C.	.	C.	.	.	.
#A23	C.	.	C.	.	T	.
#A50	C.	.	C.	.	T	.
#A11	C.	.	C.	.	T	.
#A14	C.	.	C.	.	T	.
#A22	C.	.	C.	.	T	.
#A40	C.	.	C.	.	T	.
#A49	C.	.	C.	.	T	.
#Le_AY153530	.	C.C	.	C.	.	AC
#Lek10	.	C.	.	C.	.	AC
#Le17	.	C.	.	C.	.	AC
#Le_AY300036	.	C.	.	C.	.	AC
#Le_AY154666	.	C.	.	C.	.	AC

#A2	TAATCGTACA	TTAAAACCTT	ACCCCCATGC	ATATAAGCTA	GTACATTCCCT	GCTTAATAGG
#A13	.	.	.	.	.	.
#A16	.	.	.	.	.	.
#A18	.	.	.	.	.	.
#A21	.	.	.	.	.	.
#A29	.	.	.	.	.	.
#A37	.	.	.	.	.	.
#A6	.	.	.	.	.	.
#A7	.	.	.	.	.	.
#A42	.	.	.	.	.	.
#A38	.	.	.	.	.	.
#A15	.	T.	.	.	.	.
#A30	.	T.	.	.	.	.
#A33	.	T.	.	.	.	.
#A41	T.	.	.	.	.	.
#Lg2	T.	.	.	.	.	.
#Lg4	T.	.	.	.	.	.
#A39	.	.	.	.	.	.
#A1	.	G.	.	C.	C.	C.
#A5	.	G.	.	C.	C.	C.
#A24	.	G.	.	C.	C.	C.
#A9	.	G.	.	C.	C.	C.
#A51	.	G.	.	C.	C.	C.
#A20	.	G.	.	C.	C.	C.
#A35	.	G.	.	C.	C.	C.
#A28	.	G.	.	C.	C.	C.
#A31	.	G.	.	C.	C.	C.
#A44	.	G.	.	C.	C.	C.
#A45	.	G.	.	C.	C.	C.
#A48	.	G.	.	C.	C.	C.
#A53	.	G.	.	C.	C.	C.
#A36	.	G.	.	C.	C.	C.
#A17	.	G.	.	C.	C.	C.
#A32	.	G.	.	C.	C.	C.
#A52	.	G.	.	C.	C.	C.
#A19	.	GT.	.	C.	C.	C.
#A25	.	GT.	.	C.	C.	C.
#A47	.	GT.	.	C.	C.	C.
#Lt_Y15314	.	T.	.	C.	C.	C.
#Lt_Y15312	.	T.	.	C.	C.	C.
#Lt_Y15305	.	.	.	C.	.	.
#A26	T.	GT.	.	C.	C.	C.
#A3	.	T.	T.	C.	.	C.
#A8	.	T.	T.	C.	.	C.
#A10	.	T.	T.	C.	.	C.
#A12	.	T.	T.	C.	.	C.
#A27	.	T.	T.	C.	.	C.
#A34	.	T.	T.	C.	.	C.
#A46	.	T.	T.	C.	.	C.
#A4	.	T.	T.	C.	.	.
#A23	.	T.	T.	C.	C.	C.
#A50	.	T.	T.	C.	C.	C.
#A11	.	T.	T.	C.	C.	C.
#A14	.	T.	T.	C.	C.	C.
#A22	.	T.	T.	C.	C.	C.
#A40	.	T.	T.	C.	C.	C.
#A49	.	T.	T.	C.	C.	C.
#Le_AY153530	G.	G.T.	-T.	.	C.	.
#Lek10	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#Le17	G.	G.TC.	-T.	.	CT.	.
#Le_AY300036	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#Le_AY154666	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.

#A2	ACATAAGCAC
#A13	ATACACTTGC
#A16	TCAACCCACA
#A18	ACACCCTACC
#A21	AACAAACACGA
#A29	ATACCCACAA
#A37	
#A6	
#A7	
#A42	
#A38	
#A15	C.
#A30	C.
#A33	C.
#A41	T.
#Lg2	T.
#Lg4	
#A39	A.
#A1	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A5	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A24	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A9	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A51	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A20	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A35	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A28	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A31	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A44	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A45	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A48	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A53	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A36	-T.. .-TT.C.. .G.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A17	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A32	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A52	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A19	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A25	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#A47	-T.. .-TT.C.. .G.. T.. AC.. T.. T.. .T.. .T..
#Lt_Y15314	....-T.C.. CA.. T.. AT.....T C.. G.. .T..
#Lt_Y15312	....-C.C.. CA.. T.. AT.....T C.. G.. .T.. G..
#Lt_Y15305	....G-T.. .-T.C.. CA.. T.. AT.....T ..T.. G.. T.. T..
#A26	....-T.. .-TT.C.. .G.. TT.. AT.. T.. T.. .T.. .T..
#A3	....G-.. .-TC.C.. CA.. T.. GAT.. T.. T.. .T.. T..
#A8	....G-.. .-TC.C.. CA.. T.. GAT.. T.. T.. .T.. T..
#A10	....G-.. .-TC.C.. CA.. T.. GAT.. T.. T.. .T.. T..
#A12	....G-.. .-TC.C.. CA.. T.. GAT.. T.. T.. .T.. T..
#A27	....G-.. .-TC.C.. CA.. T.. GAT.. T.. T.. .T.. T..
#A34	....G-.. .-TC.C.. CA.. T.. GAT.. T.. T.. .T.. T..
#A46	....G-.. .-TC.C.. CA.. T.. GAT.. T.. T.. .T.. T..
#A4	....G-.. .-TC.C.. A.. T.. GAT.. T.. T.. .T.. T..
#A23	....G-.. .-TC.C.. CA.. .AC.. T.. T.. .T.. T..
#A50	....G-.. .-TC.C.. G.. CA.. .AC.. T.. T.. .T.. T..
#A11	....G-.. .-TC.C.. CA.. .AC.. T.. T.. .T.. T..
#A14	....G-.. .-TC.C.. CA.. .AC.. T.. T.. .T.. T..
#A22	....G-.. .-TC.C.. CA.. .AC.. T.. T.. .T.. T..
#A40	....G-.. .-TC.C.. CA.. .AC.. T.. T.. .T.. T..
#A49	....G-.. .-TC.C.. CA.. .AC.. T.. T.. .T.. T..
#Le_AY153530	....G-T.. .T.. C.A.. A.. T.. TA.. T.. T.. .T.G.. TT.. ATT
#Lek10	....G-T.. .T.. C.A.. A.. T.. TA.. T.. T.. .C.. T.G.. TT.. ACT
#Le17	....G-T.. .T.. C.A.. A.. T.. TA.. T.. T.. .C.. T.G.. TT.. ATT
#Le_AY300036	....G-T.. .T.. C.A.. A.. T.. TA.. T.. T.. .C.. T.G.. TT.. ATT
#Le_AY154666	....G-T.. .T.. C.A.. A.. T.. TA.. T.. T.. .C.. T.G.. TT.. ATT

#A2	CCAA--TACA CACCTTAACC AACATCCAGA CATACTTCC TTAATCGATC ATACCCCATC
#A13	.....-.....
#A16	.....-.....
#A18	.....-.....
#A21	.....-.....
#A29	.....-.....
#A37	.....-.....
#A6	.....-.....
#A7	.....-.....
#A42	.....-.....
#A38	.....-.....
#A15	.....-..... G.
#A30	.....-..... G.
#A33	.....-..... G.
#A41	.....-C.....
#Lg2	.....-C.....
#Lg4	.....-C.....
#A39	.....-..... C .. N. .... T. .... T. .... C. ....
#A1	..C.AT...C ..T.....
#A5	..C.AT...C ..T.....
#A24	..C.AT...C ..T.....
#A9	..C.AT...C ..T.....
#A51	..C.AT...C ..T.....
#A20	..C.AT...C ..T.....
#A35	..C.AT...C ..T.....
#A28	..C.AT...C ..T.....
#A31	..C.AT...C ..T.....
#A44	..C.AT...C ..T.....
#A45	..C.AT...C ..T.....
#A48	..C.AT...C ..T.....
#A53	..C.AT...C ..T.....
#A36	..C.AT...C ..T.....
#A17	..C.AT...C ..T.....
#A32	..C.AT...C ..T.....
#A52	..C.AT...C ..T.....
#A19	..C.AT...C ..T.....
#A25	..C.AT...C ..T.....
#A47	..C.AT...C ..T.....
#Lt_Y15314	..C.AT...TC ..
#Lt_Y15312	..C.AT...TC ..
#Lt_Y15305	..C.AT...TC .. A. ....
#A26	..C.AT...C ..T.....
#A3	..C.ATC..C .. A. ....
#A8	..C.ATC..C .. A. ....
#A10	..C.ATC..C .. A. ....
#A12	..C.ATC..C .. A. ....
#A27	..C.ATC..C .. A. ....
#A34	..C.ATC..C .. A. ....
#A46	..C.ATC..C .. A. ....
#A4	..C.ATC..C .. G. .... A. ....
#A23	..C.AT...C .. A. ....
#A50	..C.AT...C .. A. ....
#A11	..C.AT...C .. A. ....
#A14	..C.AT...C .. A. ....
#A22	..C.AT...C .. A. ....
#A40	..C.AT...C .. A. ....
#A49	..C.AT...C .. A. ....
#Le_AY153530	....-C..C .. T. ....
#Lek10	....-C..C .. T. ....
#Le17	....-C..C .. T. ....
#Le_AY300036	....-C..C .. GT. ....
#Le_AY154666	....-C..C .. T. ....

#A2	CGAGTCAAAT
#A13	CCTTTCTTGT
#A16	CCATATGCCT
#A18	ATCCCCCTCC
#A21	CTTGGGAGTC
#A29	CCTTGATCTA
#A37	
#A6	
#A7	
#A42	
#A38	
#A15	.A.....C.....A.....
#A30	.A.....C.....A.....
#A33	.A.....C.....A.....
#A41	.A.....C.....A.....
#Lg2	.A.....C.....A.....
#Lg4	.A.....C.....A.....
#A39	.....N.....A.....
#A1	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A5	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A24	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A9	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A51	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A20	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A35	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A28	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A31	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A44	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A45	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A48	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A53	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A36	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A17	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A32	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A52	.A.....T.CC..C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A19	.A.....T.C...C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A25	.A.....T.C...C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#A47	.A.....T.C...C.....C.C.A.....T.....A...A.....
#Lt_Y15314	.A.....C...C.....C.A.....T.....C.....A.....
#Lt_Y15312	.A.....C...C.....C.A.....T.....C.....A.....
#Lt_Y15305	.A.....C...C.....C.A.....T.....A...A.....
#A26	.A.....C...C.....C.A.....T.....A...A.....
#A3	.A.....A.....A.....TC.....A...A.....
#A8	.A.....A.....A.....TC.....A...A.....
#A10	.A.....A.....A.....TC.....A...A.....
#A12	.A.....A.....A.....TC.....A...A.....
#A27	.A.....A.....A.....TC.....A...A.....
#A34	.A.....A.....A.....TC.....A...A.....
#A46	.A.....T.....A.....TC.....A...A.....
#A4	.A.....T.....A.....TC.....A...A.....
#A23	.A.....T.....C.....A.....TC.....A...A.....
#A50	.A.....T.....C.....A.....TC.....A...A.....
#A11	.A.....T.....C.....A.....TC.....A...A.....
#A14	.A.....T.....C.....A.....TC.....A...A.....
#A22	.A.....T.....C.....A.....TC.....A...A.....
#A40	.A.....T.....C.....A.....TC.....A...A.....
#A49	.A.....T.....C.....A.....TC.....A...A.....
#Le_AY153530	.....A.....CCA.T.A...T...A.....
#Lek10	.....A.....CA.T.A...T...A.....
#Le17	.....A.....T...CCA.T.A...T...A.....
#Le_AY300036	.....A.....CCA.T.A...T...A.....
#Le_AY154666	.....A.....C.A.T.A...T...A.....

#A2	CCATCCTCCG
#A13	TGAAACCAGC
#A16	AACCCGCCCA
#A18	CCTCGTATCC
#A21	CTCTTCTCGC
#A29	TCCGGGCCA
#A37	.
#A6	.
#A7	.
#A42	.
#A38	.
#A15	.
#A30	.
#A33	.
#A41	.
#Lg2	.
#Lg4	.
#A39	.
#A1	.
#A5	.
#A24	.
#A9	.
#A51	.
#A20	.
#A35	.
#A28	.
#A31	.
#A44	.
#A45	.
#A48	.
#A53	.
#A36	.
#A17	.
#A32	.
#A52	.
#A19	.
#A25	.
#A47	.
#Lt_Y15314	-
#Lt_Y15312	-
#Lt_Y15305	-
#A26	-
#A3	T
#A8	T
#A10	T
#A12	T
#A27	T
#A34	T
#A46	T
#A4	T
#A23	-
#A50	-
#A11	-
#A14	-
#A22	-
#A40	-
#A49	-
#Le_AY153530	G
#Lek10	G
#Le17	NG
#Le_AY300036	G
#Le_AY154666	G

#A2	TCAAACCTT-G	GGGGTTTCTA	GAGTGAAACT	ATAA-----	-----
#A13	.....-	.....	.....	.....	-----
#A16	.....-	.....	.....	.....	-----
#A18	.....-	.....	.....	.....	-----
#A21	.....-	.....	.....	.....	-----
#A29	.....-	.....	.....	.....	-----
#A37	.....-	.....	.....	.....	-----
#A6	.....-	.....	.....	.....	-----
#A7	.....-	.....	.....	.....	-----
#A42	.....-	.....	.....	.....	-----
#A38	.....-	.....	.....	.....	-----
#A15	.....-	.....	.....	.....	-----
#A30	.....-	.....	.....	.....	-----
#A33	.....-	.....	.....	.....	-----
#A41	.....-	.....	.....	.....	-----
#Lg2	.....-	.....	.....	.....	-----
#Lg4	.T	.....	.....	.....	-----
#A39	...G	.....	.....	.....	-----
#A1	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A5	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A24	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A9	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A51	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A20	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A35	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A28	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A31	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A44	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A45	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A48	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A53	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A36	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A17	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A32	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A52	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A19	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A25	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A47	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#Lt_Y15314	-----	-----	-----	-----	-----
#Lt_Y15312	-----	-----	-----	-----	-----
#Lt_Y15305	-----	-----	-----	-----	-----
#A26	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A3	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A8	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A10	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A12	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A27	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A34	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A46	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A4	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A23	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A50	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A11	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A14	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A22	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A40	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#A49	.T.C	.....	.C.	.....	-----
#Le_AY153530	.TCT	.....	.C.	.....	-----
#Lek10	.TCT	.....	.C.	.....	CTGG-----
#Le17	.TCT	....T	.....	.C..N.....	CTGGCA TCTGGGTCCCT NNTCNAGGAA
#Le_AY300036	.TCC	.....	.C.	.....	-----
#Le_AY154666	.TCT	.....	.C.	.....	-----

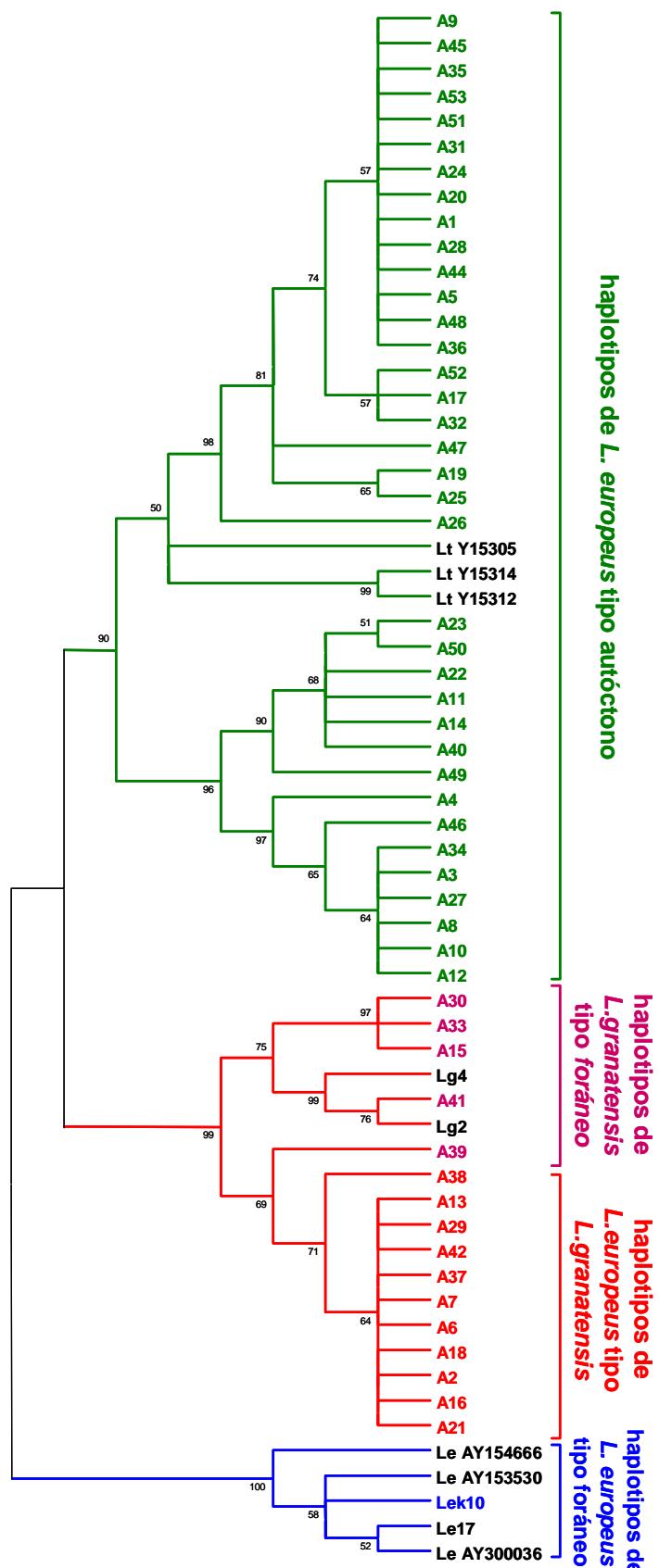
En el árbol 1 se presentan los resultados del análisis filogénético de las secuencias de *L. europaeus* y *L. granatensis* analizadas de la provincia de Álava. Este árbol presenta cuatro grupos claramente diferenciados:

1.- Este grupo denominado “***L. europaeus* y *L. granatensis* tipo autóctono**” en la provincia de Álava se puede a su vez subdividir en dos grupos, dependiendo de la especie a la que pertenezca la muestra. En él se confirma la característica introgresión ancestral mitocondrial por *L. timidus* citada para las poblaciones alavesas de *L. europaeus* y *L. granatensis* del norte peninsular, en que aparecen los ejemplares A1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 34, 35, 36, 40, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53.

2.- El grupo denominado “***L. europaeus* tipo foráneo (no ibérico)**” que se corresponde con las secuencias de *L. europaeus* del resto de Europa (Alemania) y a la secuencia del ejemplar obtenido de una granja de cría francesa (Lek10). En este grupo no se han encontrado ningún individuo analizado de la provincia de Álava.

3.- El grupo o rama “***L. europaeus* tipo *L. granatensis***”. En este grupo se confirma la introgresión de haplotipos de *L. granatensis* del sur de la Península Ibérica. En este grupo se encuentran los siguientes ejemplares: A2, 6, 7, 13, 16, 18, 21, 29, 37, 38 y 42.

4.- En el grupo “***L. granatensis* tipo foráneo**”. Se encuentran los individuos de *L. granatensis* que no presentan la introgresión de *L. timidus* característica de las poblaciones de liebre ibérica del norte peninsular y cuyas secuencias mitocondriales son prácticamente iguales a los haplotipos del sur peninsular. La presencia de estos ejemplares se explica, al igual que para el caso de *L. europaeus*, como ejemplares provenientes del centro y sur de la Península por repoblación de liebres no reguladas. En este caso si hay constancia de estas acciones ilegales en la Comunidad Foral de Navarra (B.O. Parlamento de Navarra, nº 48, pag 12, del 26-06-97). En este grupo están los siguientes ejemplares: A15, 30, 33, 39 y 41.



**ÁRBOL 1.-** Árbol filogenético de las poblaciones de *L. europaeus* y *L. granatensis* de la provincia de Álava obtenido mediante el logaritmo de neighbor-joining con el estimador numérico de sustituciones de Tamura-Nei (1993). Los números indican los valores (en porcentaje) que recibe cada nodo en 1000 réplicas de Bootstrap.

Estas diferencias entre linajes se reflejan en las distancias genéticas (Tabla 3). La divergencia interespecífica obtenida varía entre un 17,1% (*L. europaeus* y *L.granatensis*) y 12,1% (*L. timidus* y *L.granatensis*). Sin embargo, las distancias genéticas diminuyen significativamente cuando comparamos los distintos linajes obtenidos de la CAPV con sus respectivas especies de referencia. Por ejemplo, el linaje “*L. europaeus tipo foráneo*”, que está caracterizado por una introgresión ancestral por *L. timidus*, su divergencia respecto a esta especie de referencia (Lt) es de 7,9%. La distancia genética es todavía menor (2,4%) si comparamos el grupo “*L. europaeus tipo L. granatensis*” con su especie de referencia (Lg). Otro dato a destacar, es que la distancia genética entre las poblaciones de *L. europaeus* ibéricas (Le-Lt) y las no ibéricas (Le) (17,2%) es igual o ligeramente superior a la distancia que hay entre *L. europaeus* y otra especies (Lg: 17,1% y Lt: 12,7%).

	<b>Le-Lg</b>	<b>Lg</b>	<b>Le-Lt</b>	<b>Lt</b>	<b>Le</b>
<b>Le-Lg</b>		0,008	0,019	0,019	0,025
<b>Lg</b>	<b>0,024</b>		0,020	0,021	0,026
<b>Le-Lt</b>	0,129	0,134		0,013	0,024
<b>Lt</b>	0,122	<b>0,127</b>	<b>0,078</b>		0,024
<b>Le</b>	0,164	<b>0,171</b>	<b>0,172</b>	<b>0,159</b>	

**Tabla 3.** Distancia genética de Tamura-Nei (1993) para las secuencias de la región control entre linajes de haplotipos mitocondriales de las poblaciones de Guipúzcoa. *Lepus europaeus* está separado en dos linajes: haplotipos tipo autóctonos (Le-Lt) y los haplotipos tipo “granatensis” (Le-Lg). También están representadas las especies de referencia: *L. granatensis* (Lg), *L. timidus* (Lt) y *L. europaeus* (Le).

### **5.2.- Análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de las poblaciones de *Lepus europaeus* de Guipúzcoa.**

El conjunto de datos consistió en 535 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial que incluye 124 variables y 112 sitios filogenéticamente informativos de 56 secuencias obtenidas de los 61 individuos analizados. Adicionalmente al conjunto de datos se añadió como secuencias de referencia: haplotipos de *L. timidus* y *L. europaeus* previamente publicados en bases de datos (GenBank), dos secuencias propias de *L. europaeus* de Alemania (Le17) y de un individuo de una granja de cría francesa (Lek10) y dos secuencias propias correspondientes al haplotipo *L. granatensis* (Lg2 y Lg4).

En el siguiente apartado se presentan las secuencias alineadas de los individuos de la provincia de Guipúzcoa junto con las secuencias de referencia de las especies *L. europaeus* (L.e.), *L. granatensis* (L.g) y *L. timidus* (L.t)

**Secuencias.-** Secuencias alineadas de los ejemplares de *L. europaeus* y *L. timidus* de la provincia de Guipúzcoa, correspondientes a 535 nucleótidos de la región de control del ADN mitocondrial.

#G3	-----	G	GCCCCATGCC	CACCATCAGC
#G4	-----	.	.....	.....
#G30	-----	.	.....	.....
#G40	-----	.	.....	.....
#G41	-----	.	.....	.....
#G43	-----	.	.....	.....
#G44	-----	.	.....	.....
#G55	-----	.	.....	.....
#G52	-----	.	.....	.....
#G53	-----	.	.....	.....
#G56	-----	.	.....	.....
#G57	-----	.	.....	.....
#G16	-----	.	.....	.....
#G15	-----	.	.....	.....
#LG2	-----	.	.....	.....
#LG4	-----	.	.....	.....
#G2	-----	.	TT..A.	.....
#G49	-----	.	TT..A.	.....
#G9	-----	.	TTT..A.	.....
#G60	-----	.	TTT..A.	.....
#G48	-----	.	TTT..A.	.....
#G11	-----	.	TTT..A.	.....
#G38	-----	.	TTT..A.	.....
#G5	-----	.	TTT..A.	.....
#G6	-----	.	TTT..A.	.....
#G20	-----	.	TTT..A.	.....
#G21	-----	.	TTT..A.	.....
#G27	-----	.	TTT..A.	.....
#G58	-----	.	TTT..A.	.....
#G28	-----	.	TTT..A.	.....
#G26	-----	.	TTT..A.	.....
#G54	-----	.	TTT..A.	.....
#G8	-----	.	TTT..A.	.....
#G1	-----	.	TTT..A.	.....
#G29	-----	.	TTT..A.	.....
#G39	-----	.	TTT..A.	.....
#G51	-----	.	TTT..A.	.....
#G45	-----	.	TTT..A.	.....
#G10	-----	.	TTT..A.	.....
#G22	-----	.	TTT..A.	.....
#G23	-----	.	TTT..A.	.....
#G25	-----	.	TTT..A.	.....
#G59	-----	.	TTT..A.	.....
#G61	-----	.	TTT..A.	.....
#G18	-----	.	TTT..A.	.....
#G19	-----	.	TTT..A.	.....
#G17	-----	.	TTT..A.	.....
#Lt_Y15314	-----	.	.....	.....
#Lt_Y15312	-----	.	.....	.....
#Lt_Y15305	-----	.	.....	.....
#G7	-----	.	.....	.....
#G34	-----	.	.....	.....
#G47	-----	.	.....	.....
#Le_AY300036	-----	.	.....	.....
#Le_AY153530	-----	.	.....	.....
#Le_AY154666	-----	.	.....	.....
#Le17	-----	.	.....	.....
#G42	-----	.	.....	.....
#G14	-----	.	.....	.....
#G13	-----	.	.....	.....
#Lek10	-----	.	.....	.....
#G37	-----	.	.....	.....
#G35	-----	.	.....	.....
#G36	-----	.	.....	.....
#G46	-----	.	.....	.....
#G50	-----	.	.....	.....

#G3	ACCCAAAGCT	GAAATTCTCT	TTAAACTACT	CTCTGCTTTT	TCCTAATAAA	TATATCCAAG
#G4	.	.	.	.	.	.
#G30	.	.	.	.	.	.
#G40	.	.	.	.	.	.
#G41	.	.	.	.	.	.
#G43	.	.	.	.	.	.
#G44	.	.	.	.	.	.
#G55	.	.	.	.	.	.
#G52	.	.	.	.	.	.
#G53	.	.	.	.	.	.
#G56	.	.	.	.	.	.
#G57	.	.	.	.	.	.
#G16	.	.	.	.	.	.
#G15	.	.	.	.	.	.
#LG2	.	.	.	.	.	.
#LG4	.	.	.	.	.	.
#G2	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G49	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G9	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G60	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G48	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G11	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G38	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G5	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G6	.	.	T.	.	C CT.CG.AT..	C.A.....
#G20	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G21	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G27	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G58	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G28	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G26	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G54	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G8	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G1	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G29	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G39	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G51	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G45	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G10	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G22	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G23	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G25	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G59	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G61	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G18	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G19	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G17	.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#Lt_Y15314	-----.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#Lt_Y15312	-----.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#Lt_Y15305	-----.	.	T.	.	C CT.CT.AT..	C.A.....
#G7	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G34	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G47	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#Le_AY300036	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Le_AY153530	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Le_AY154666	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Le17	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G42	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G14	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G13	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#Lek10	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G37	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G35	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G36	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G46	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....
#G50	.	.	T.	.	A CT..T.AT..	C.....

#G3	TAACTTGTTA	CTATTGACAA	AAATCTCCTT	TAACGCTATG	TAATTCGTGC	ATTAATGCTT
#G4	.	.	.	.	.	.
#G30	.	.	.	.	.	.
#G40	.	.	.	.	.	.
#G41	.	.	.	.	.	.
#G43	.	.	.	.	.	.
#G44	.	.	.	.	.	.
#G55	.	.	.	.	.	.
#G52	.	.	.	.	.	.
#G53	.	.	.	.	.	.
#G56	.	.	.	.	.	.
#G57	.	.	.	.	.	.
#G16	.	.	.	.	.	G.
#G15	.	.	C.	.	.	G.
#LG2	.	.	.	.	.	.
#LG4	.	.	.	.	.	.
#G2	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C.
#G49	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C.
#G9	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C.
#G60	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C.
#G48	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C.
#G11	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C.
#G38	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C.
#G5	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..CC
#G6	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..CC
#G20	.C.	.C.	TC.	C.	C.	C..C.
#G21	.C.	.C.	TC.	C.	C.	C..C.
#G27	.C.	.C.	TC.	C.	C.	C..C.
#G58	.C.	.C.	TC.	C.	C.	C..C.
#G28	.C.	.C.	TC.	C.	C.	C..C.
#G26	.C.	.C.	TC.	C.	C.	C..C.
#G54	.C.	.C.	TC.	C.	C.	C..C.
#G8	.C.	.C.	TC.	C.	C.	C..C.
#G1	.C.	.C.	TC.	C.	C.	G..C.
#G29	.C.	.C.	TC.	C.	.	C..C.
#G39	.C.	.C.	TC.	C.	.	C..C.
#G51	.C.	.C.	TC.	C.	.	C..C.
#G45	.C.	.C.	TC.	C.	.	C..C.
#G10	.C.	.C.	TC.	C.	T.	C..C.
#G22	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..CC
#G23	.C.	.C.	TC.	C.	.	CC..CC
#G25	.C.	.C.	TC.	C.	.	CC..CC
#G59	.C.	.C.	TC.	C.	.	CC..CC
#G61	.C.	.C.	TC.	C.	.	CC..CC
#G18	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C..C.
#G19	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C..C.
#G17	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C..C.
#Lt_Y15314	.C.	.C.	TC.	C.	.	G..C..C.
#Lt_Y15312	.C.	.C.	TC.	C.	.	C..C.
#Lt_Y15305	.C.	.C.	TC.	C.	.	C..C.
#G7	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G34	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G47	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#Le_AY300036	-----	-----	-----	-----	-----	G..
#Le_AY153530	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Le_AY154666	-----	-----	-----	-----	-----	G..
#Le17	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G42	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G14	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G13	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	C..
#Lek10	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G37	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G35	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G36	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G46	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....
#G50	.....C.	.....	-CAC	.....	T.	.....

#G3	TTCCCCATTA	ACATGTATCT	ATACTATTAT	TTCATAATCA	ACATTAGACC	ATTCTATGTT
#G4	.	.	.	.	.	.
#G30	.	.	.	.	.	.
#G40	.	.	.	.	.	.
#G41	.	.	.	.	.	.
#G43	.	.	.	.	.	.
#G44	.	.	.	.	.	.
#G55	.	.	.	.	.	.
#G52	.	.	.	.	.	.
#G53	.	.	.	.	.	.
#G56	.	.	.	.	.	.
#G57	.	.	.	.	.	.
#G16	.	.	.	.	.	.
#G15	.	.	.	.	.	.
#LG2	.	C.	.	.	.	.
#LG4	.	C.	.	.	.	.
#G2	.	C.	.	C.	.	T.
#G49	.	C.	.	C.	.	T.
#G9	.	C.	.	C.	.	T.
#G60	.	C.	.	C.	.	T.
#G48	.	C.	.	C.	.	T.
#G11	.	C.	.	C.	.	T.
#G38	.	C.	.	C.	.	T.
#G5	.	C.	.	C.	.	T.
#G6	.	C.	.	C.	.	T.
#G20	.	C.	.	C.	.	.
#G21	.	C.	.	C.	.	.
#G27	.	C.	.	C.	.	.
#G58	.	C.	.	C.	.	.
#G28	.	C.	.	C.	.	.
#G26	.	C.	.	C.	.	.
#G54	.	C.	.	C.C.	.	.
#G8	.	C.	.	C.	.	.
#G1	.	S.	.	C.	.	.
#G29	.	C.	.	C.	.	.
#G39	.	C.	.	C.	.	.
#G51	.	C.	.	C.	.	.
#G45	.	C.	.	C.	.	.
#G10	.	C.	.	C.	.	.
#G22	.	CG	.	C.	.	.
#G23	.	CG	.	C.	.	.
#G25	.	C.	.	C.	.	.
#G59	.	C.	.	C.	.	.
#G61	.	C.	.	C.	.	.
#G18	.	C.	.	C.	.	.
#G19	.	C.	.	C.	.	.
#G17	.	C.	.	C.	.	.
#Lt_Y15314	.	.	C.C.	C.	.	.
#Lt_Y15312	.	.	C.C.	C.	.	.
#Lt_Y15305	.	.	.	C.	C.	.
#G7	.	.	C.	C.	C.	AC.
#G34	.	.	C.	C.	.	AC.
#G47	.	.	C.	C.	.	AC.
#Le_AY300036	.	.	C.	C.	.	AC.
#Le_AY153530	.	.	C.C.	C.	.	AC.
#Le_AY154666	.	.	C.	C.	.	AC.
#Le17	.	.	C.	C.	.	AC.
#G42	.	.	C.	C.	.	AC.
#G14	.	.	.	C.	.	AC.
#G13	.	.	C.	C.	.	AC.
#Lek10	.	.	C.	C.	.	AC.
#G37	.	.	C.	C.	.	AC.
#G35	.	.	C.	C.	.	AC.
#G36	.	.	C.	C.	.	AC.
#G46	.	.	C.	C.	.	AC.
#G50	.	.	C.	C.	.	AC.

#G3	TAATCGTACA	TTAAAACCTT	ACCCCCATGC	ATATAAGCTA	GTACATTCCCT	GCTTAATAGG
#G4	.	.	.	.	.	.
#G30	.	.	.	.	.	.
#G40	.	.	.	.	.	.
#G41	.	.	.	.	.	.
#G43	.	.	.	.	.	.
#G44	.	.	.	.	.	.
#G55	.	.	.	.	.	.
#G52	.	.	.	.	.	.
#G53	.	.	.	.	.	.
#G56	.	.	.	.	.	.
#G57	.	.	.	.	.	.
#G16	.	.	.	.	.	.
#G15	.	.	.	.	.	.
#LG2	T.	.	.	.	.	.
#LG4	T.	.	.	.	.	.
#G2	.	T.	T.	C.	C.	C.
#G49	.	T.	T.	C.	C.	C.
#G9	.	T.	T.	C.	C.	C.
#G60	.	T.	T.	C.	C.	C.
#G48	.	T.	T.	C.	C.	C.
#G11	.	T.	T.	C.	C.	C.
#G38	.	T.	T.	C.	C.	C.
#G5	.	T.	T.	C.	C.	C.
#G6	.	T.	T.	C.	C.	C.
#G20	.	.	T.	C.	C.	A.
#G21	.	.	T.	C.	C.	C.
#G27	.	.	T.	C.	C.	C.
#G58	.	.	T.	C.	C.	C.
#G28	.	.	T.	C.	C.	C.
#G26	.	.	T.	C.	C.	C.
#G54	.	.	T.	C.	C.	C.
#G8	.	.	T.	C.	C.	C.
#G1	.	.	T.	C.	C.	C.
#G29	.	.	G.	C.	C.	C.
#G39	.	.	G.	C.	C.	C.
#G51	.	.	G.	C.	C.	C.
#G45	.	.	G.	C.	C.	C.
#G10	.	.	G.	C.	C.	C.
#G22	.	.	G.	C.	C.	C.
#G23	.	.	G.	C.	C.	C.
#G25	.	.	G.	C.	C.	C.
#G59	.	.	G.	C.	C.	C.
#G61	.	.	G.	C.	C.	C.
#G18	.	.	G.	C.	C.	C.
#G19	.	.	G.	C.	C.	C.
#G17	.	.	G.	C.	C.	C.
#Lt_Y15314	.	.	T.	C.	C.	C.
#Lt_Y15312	.	.	T.	.	C.	C.
#Lt_Y15305	.	.	.	C.	.	.
#G7	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#G34	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#G47	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#Le_AY300036	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#Le_AY153530	G.	G.T.	-T.	.	C.	.
#Le_AY154666	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#Le17	G.	G.TC.	-T.	.	CT.	.
#G42	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#G14	G.	G.TC.	-T.	.	.	.
#G13	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#Lek10	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#G37	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#G35	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#G36	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#G46	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.
#G50	G.	G.TC.	-T.	.	C.	.

#G3 ACATAAGCAC ATACACTTGC TCAACCCACA ACACCCTACC AACAAACACGA ATACCCACAA  
 #G4 .....  
 #G30 .....  
 #G40 .....  
 #G41 .....  
 #G43 .....  
 #G44 .....  
 #G55 .....  
 #G52 .....  
 #G53 .....  
 #G56 .....  
 #G57 .....  
 #G16 .....  
 #G15 .....  
 #LG2 .....  
 #LG4 .....  
 #G2 .....G.....C.C.....CA.....AC.....T.....T.....T.....T.....T.....  
 #G49 .....G.....C.C.....CA.....AC.....T.....T.....T.....T.....T.....  
 #G9 .....G.....TC.C.....CA.....AC.....T.....T.....T.....T.....T.....  
 #G60 .....G.....TC.C.....CA.....AC.....T.....T.....T.....T.....T.....  
 #G48 .....G.....TC.C.....CA.....AC.....T.....T.....T.....T.....T.....  
 #G11 .....G.....TC.C.....CA.....AC.....T.....T.....T.....T.....T.....  
 #G38 .....G.....TC.C.....CA.....AC.....T.....T.....T.....T.....T.....  
 #G5 .....G.....TC.C..G.....CG.....AC.....T.....T.....T.....T.....T.....  
 #G6 .....-.....TC.C..G.....CA.....AC.....T.....T.....T.....T.....T.....  
 #G20 .....G.....TC.C.....CA.....T.....AC.....T.....T.....T.....T.....  
 #G21 .....G.....TC.C.....CA.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G27 .....G.....TC.C.....CA.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G58 .....G.....TC.C.....CA.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G28 .....G.....TC.C.....CA.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G26 .....G.....TC.C.....CA.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G54 .....G.....TC.C.....CA.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G8 .....G.....TC.C..G.....CA.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G1 .....G.....TC.C.....CA.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G29 .....T.....TT.C.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G39 .....T.....TT.C.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G51 .....T.....TT.C.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G45 .....T.....TT.C.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G10 .....T.....TT.C.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G22 .....T.....TT.C..G.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G23 .....T.....TT.C..G.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G25 .....T.....TT.C.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G59 .....T.....TT.C.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G61 .....T.....TT.C.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G18 .....T.....TT.C..G.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G19 .....T.....TT.C..G.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #G17 .....T.....TT.C.....G.....T.....AC.....T.....T.....T.....  
 #Lt\_Y15314 .....-.....T.C.....CA.....T.....AT.....T.....C.G.....T.....  
 #Lt\_Y15312 .....-.....C.C.....CA.....T.....AT.....T.....C.G.....T.....G.....  
 #Lt\_Y15305 .....G-T.....T.C.....CA.....T.....AT.....T.....T.....T.....G.....T.....  
 #G7 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ATT.....  
 #G34 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ATT.....  
 #G47 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ATT.....  
 #Le\_AY300036 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....C.....T.G.....TT.....ATT.....  
 #Le\_AY153530 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ATT.....  
 #Le\_AY154666 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ATT.....  
 #Le17 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ATT.....  
 #G42 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ATT.....  
 #G14 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ATT.....  
 #G13 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ACT.....  
 #Lek10 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ACT.....  
 #G37 .....G-T.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ACT.....  
 #G35 .....G-.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ACT.....  
 #G36 .....G-.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ACT.....  
 #G46 .....G-.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ACT.....  
 #G50 .....G-.....T.....C.A.....A.....T.....TA.....T.....T.....C.....T.G.....TT.....ACT.....

#G3	CCAA--TACA CACCTTAACC AACATCCAGA CATACTTCC TTAATCGATC ATACCCCATC
#G4	.....-.....
#G30	.....-.....
#G40	.....-.....
#G41	.....-.....
#G43	.....-.....
#G44	.....-.....
#G55	.....-.....
#G52	.....-.....
#G53	.....-.....
#G56	.....-.....
#G57	.....-.....
#G16	.....-.....
#G15	.....-.....
#LG2	.....-C..... T.....
#LG4	.....-C..... T.....
#G2	.C.AT...C ..... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G49	.C.AT...C ..... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G9	.C.AT...C ..... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G60	.C.AT...C ..... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G48	.C.AT...C ..... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G11	.C.AT...C ..... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G38	.C.AT...C ..... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G5	.C.AT...C ..... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G6	.C.AT...C ..... A. .... T.T...T..... T.G. .... GA.....
#G20	.C.AT...TC ..... T. .... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G21	.C.AT...TC ..... T. .... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G27	.C.AT...TC ..... T. .... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G58	.C.AT...TC ..... T. .... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G28	.C.AT...TC ..... T. .... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G26	.C.AT...TC ..... T. .... A. .... T.A...Y..... T.G. .... GA.....
#G54	.C.AT...TC ..... T. .... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G8	.C.AT...TC ..... T. .... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G1	.C.AT...TC ..... T. .... A. .... T.A..... T.G. .... GA.....
#G29	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G39	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G51	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G45	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G10	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G22	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G23	.C.AT...C ..T..... T.N...N..... T.N.A..... GA.....
#G25	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G59	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G61	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G18	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G19	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#G17	.C.AT...C ..T..... T.A..... A. .... GA.....
#Lt_Y15314	.C.AT...TC ..... T.A..... A. .... GA.....
#Lt_Y15312	.C.AT...TC ..... T.A..... A. .... GA.....
#Lt_Y15305	.C.AT...TC ..... A. .... T.A..... A. .... GA.....
#G7	....-C..C ..... G.T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G34	....-C..C ..... G.T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G47	....-C..C ..... G.T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#Le_AY300036	....-C..C ..... GT. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#Le_AY153530	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#Le_AY154666	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... GA.....
#Le17	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G42	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G14	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G13	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#Lek10	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G37	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G35	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G36	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G46	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....
#G50	....-C..C ..... T. .... C.A..... G..... A. .... AA.....

#G3	CGAGTCAAAT	CCTTTCTTGA	CCATATGCCT	ATCCCCCTCC	CTTGGGAGTC	CCTTGATCTA
#G4	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G30	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G40	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G41	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G43	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G44	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G55	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G52	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G53	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G56	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G57	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G16	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#G15	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
#LG2	.A.	.....C.T	.....A.	.....	.....	.....
#LG4	.A.	.....C.T	.....A.	.....	.....	.....
#G2	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G49	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G9	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G60	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G48	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G11	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G38	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G5	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G6	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G20	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G21	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G27	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G58	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G28	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G26	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G54	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G8	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G1	.A.	.....T.....C.T	.....A.	.....TC	.....A.....A	.....
#G29	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G39	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G51	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G45	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G10	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G22	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G23	.N.	.....T.CC..C.T	....C.CAA..	.....T	.....A.....A	.....N..
#G25	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G59	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G61	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G18	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G19	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G17	.A.	.....T.CC..C.T	....C.C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#Lt_Y15314	.A.	.....C.....C.T	....C.A..	.....T	.....C.....A..	.....
#Lt_Y15312	.A.	.....C.....C.T	....C.A..	.....T	.....C.....A..	.....
#Lt_Y15305	.A.	.....C.....C.T	....C.A..	.....T	.....A.....A	.....
#G7	.....	.....T	.....A..	.....	CCA.T.A..	T...A.....
#G34	.....	.....T	.....A..	.....	CCA.T.A..	T...A.....
#G47	.....	.....T	.....A..	.....	CCA.T.A..	T...A.....
#Le_AY300036	.....	.....T	.....A..	.....	CCA.T.A..	T...A.....
#Le_AY153530	.....	.....T	.....A..	.....	CCA.T.A..	T...A.....
#Le_AY154666	.....	.....T	.....A..	.....	C.A.T.A..	....A.....
#Le17	.....	.....T	.....A..	.....T..	CCA.T.A..	T...A.....
#G42	.....	.....T	.....A..	.....	C.A.T.A..	T...A.....
#G14	.....	.....T	.....A..	.....	CCA.T.A..	T...A.....
#G13	.....	.....T	.....A..	.....	CA.T.A..	T...A.....
#Lek10	.....	.....T	.....A..	.....	CA.T.A..	T...A.....
#G37	.....	.....T	.....A..	.....	CA.T.A..	T...A.....
#G35	.....	.....T	.....A..	.....	CA.T.A..	T...A.....
#G36	.....	.....T	.....A..	.....	CA.T.A..	T...A.....
#G46	.....	.....T	.....A..	.....	CA.T.A..	T...A.....
#G50	.....	.....T	.....A..	.....	CA.T.A..	T...A.....

#G3	CCATCCTCCG
#G4	TGAAACCAGC
#G30	AACCGGCCA
#G40	CCTCGTATCC
#G41	CTCTTCTCGC
#G43	TCCGGGCCA
#G44	.
#G55	.
#G52	.
#G53	.
#G56	.
#G57	.
#G16	.
#G15	.
#LG2	.
#LG4	.
#G2	.
#G49	.
#G9	.
#G60	.
#G48	.
#G11	.
#G38	.
#G5	.
#G6	.
#G20	C.
#G21	C.
#G27	C.
#G58	C.
#G28	C.
#G26	C.
#G54	C.
#G8	C.
#G1	C.
#G29	.
#G39	.
#G51	.
#G45	.
#G10	.
#G22	.
#G23	.
#G25	.
#G59	.
#G61	.
#G18	.
#G19	.
#G17	.
#Lt_Y15314	-
#Lt_Y15312	-
#Lt_Y15305	-
#G7	G.
#G34	G.
#G47	G.
#Le_AY300036	G.
#Le_AY153530	G.
#Le_AY154666	G.
#Le17	NG.
#G42	G.
#G14	G.
#G13	G.
#Lek10	G.
#G37	G.
#G35	G.
#G36	G.
#G46	G.
#G50	G.

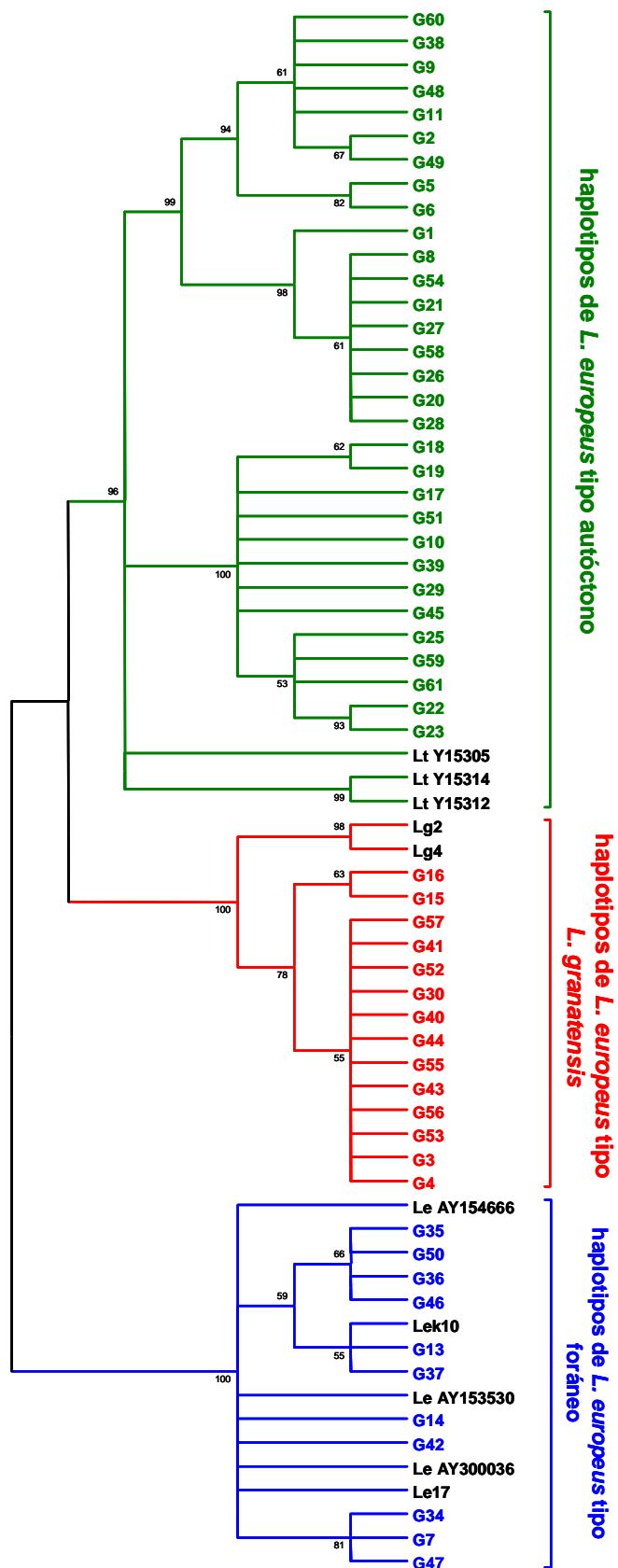
#G3	TCAAACCTT-G	GGGGTTTCTA	GAGTGAAACT	ATAA-----	-----
#G4	.....-	.....	.....	.....	-----
#G30	.....-	.....	.....	.....	-----
#G40	.....-	.....	.....	.....	-----
#G41	.....-	.....	.....	.....	-----
#G43	.....-	.....	.....	.....	-----
#G44	.....-	.....	.....	.....	-----
#G55	.....-	.....	.....	.....	-----
#G52	.....-	.....	.....	.....	-----
#G53	.....-	.....	.....	.....	-----
#G56	.....-	.....	.....	.....	-----
#G57	.....-	.....	.....	.....	-----
#G16	.....-	.....	.....	.....	-----
#G15	.....-	.....	.....	.....	-----
#LG2	.....-	.....	.....	.....	-----
#LG4	.T.....-	.....	.....	.....	-----
#G2	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G49	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G9	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G60	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G48	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G11	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G38	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G5	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G6	.T.G.....-	.....	C.	.....	-----
#G20	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G21	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G27	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G58	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G28	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G26	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G54	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G8	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G1	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G29	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G39	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G51	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G45	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G10	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G22	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G23	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G25	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G59	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G61	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G18	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G19	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#G17	.T.C.....-	.....	C.	.....	-----
#Lt_Y15314	-----	-----	-----	-----	-----
#Lt_Y15312	-----	-----	-----	-----	-----
#Lt_Y15305	-----	-----	-----	-----	-----
#G7	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#G34	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#G47	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#Le_AY300036	.TCC.....-	.....	C.	.....	-----
#Le_AY153530	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#Le_AY154666	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#Le17	.TCT....T.	.....	C..N.....	.....	-----
#G42	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#G14	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#G13	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#Lek10	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#G37	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#G35	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#G36	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#G46	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----
#G50	.TCT.....-	.....	C.	.....	-----

En el árbol 2 se presentan los resultados del análisis filogénético de las secuencias de *L. europaeus* analizadas de la provincia de Guipúzcoa. Este árbol presenta tres grandes grupos o ramas claramente diferenciados:

1.- El grupo “*L. europaeus* tipo autóctono”. En él se confirma la característica introgresión ancestral mitocondrial citada para las poblaciones alavesas de *L. europaeus* por *L. timidus*, en que aparecen los ejemplares G1, 2, 5, 6, 9, 8, 11, 10, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 38, 39, 45, 48, 49, 51, 54, 58, 59, 60 y 61.

2.- El grupo o rama denominada “*L. europaeus* tipo foráneo (no ibérico)” que se corresponde con las secuencias de *L. europaeus* del resto de Europa (Alemania) y a la secuencia del ejemplar obtenido de una granja de cría francesa (Lek10). Estos ejemplares son representativos de poseer un ADN mitocondrial no introgresionado, típico e identificativo de la especie de *L. europaeus* perteneciente a poblaciones del resto de Europa no ibéricas. En este grupo se han encontrado los siguientes individuos: G7, 13, 14, 34, 35, 36, 37, 42, 46, 47 y 50.

3.- El grupo “*L. europaeus* tipo *L. granatensis*”. En este grupo se confirma la introgresión de haplotipos de *L. granatensis* del sur de la Península Ibérica. En este grupo se encuentran los siguientes ejemplares: G3, 4, 15, 16, 30, 40, 41, 43, 44, 52, 53, 55, 56 y 57.



**ÁRBOL 2.-** Árbol filogenético de las poblaciones de *Lepus europaeus* de la provincia de Guipúzcoa obtenido mediante el logaritmo de neighbor-joining con el estimador numérico de sustituciones de Tamura-Nei (1993). Los números indican los valores (en porcentaje) que recibe cada nodo en 1000 réplicas de Bootstrap.

Estas diferencias entre grupos se reflejan en las distancias genéticas (Tabla 4). La divergencia interespecífica obtenida varía entre un 17,7% (*L. europaeus* y *L. granatensis*) y 12,1% (*L. timidus* y *L. granatensis*). Sin embargo, las distancias genéticas diminuyen considerablemente cuando comparamos los distintos grupos obtenidos de sus respectivas especies de referencia. Por ejemplo, el grupo “*L. europaeus* tipo foráneo”, que está caracterizado por una introgresión ancestral por *L. timidus*, su divergencia respecto a esta especie de referencia es de 7,9%. La distancia genética es todavía menor (2,4%) si comparamos el grupo “*L. europaeus* tipo *L. granatensis*” con su especie de referencia (*L. granatensis*). Otro dato a destacar, es que la distancia genética entre las poblaciones de *L. europaeus* ibéricas (Le-Lt) y las no ibéricas (Le) (17,7-17,5%) es igual o ligeramente superior a la distancia que hay entre *L. europaeus* y otra especies (Lg: 16,5-16,7% y Lt: 16,3-16,0%). Además, la distancia genética entre las secuencias de los individuos capturados de *L. europaeus* foráneos y las secuencias de *L. europaeus* no ibéricas (donde está incluida la muestra de la granja francesa) es muy baja (1,5%).

	<b>Le-Lg</b>	<b>Lg</b>	<b>Le-Lt</b>	<b>Lt</b>	<b>Le-Le</b>	<b>Le</b>
<b>Le-Lg</b>		0,008	0,019	0,019	0,025	0,025
<b>Lg</b>	<b>0,022</b>		0,021	0,020	0,026	0,026
<b>Le-Lt</b>	0,128	0,137		0,012	0,025	0,024
<b>Lt</b>	0,117	<b>0,126</b>	<b>0,080</b>		0,025	0,024
<b>Le-Le</b>	0,157	0,165	<b>0,177</b>	0,163		0,004
<b>Le</b>	0,160	<b>0,167</b>	<b>0,175</b>	<b>0,160</b>	<b>0,015</b>	

**Tabla 4.** Distancia genética de Tamura-Nei (1993) para las secuencias de la región control entre grupos de haplotipos mitocondriales de las poblaciones de Guipúzcoa. *Lepus europaeus* está separado en dos grupos: haplotipos tipo autóctonos (Le-Lt), haplotipos tipo foráneo (Le-Le) y los haplotipos tipo “granatensis” (Le-Lg). También están representadas las especies de referencia: *L. granatensis* (Lg), *L. timidus* (Lt) y *L. europaeus* (Le).

### 5.3.- Análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de las poblaciones de *Lepus europaeus* de Vizcaya.

En el caso de Vizcaya se analizaron únicamente 7 muestras, las cuales tras ser procesadas en el laboratorio no se pudo obtener ADN debido a su mal estado de conservación.

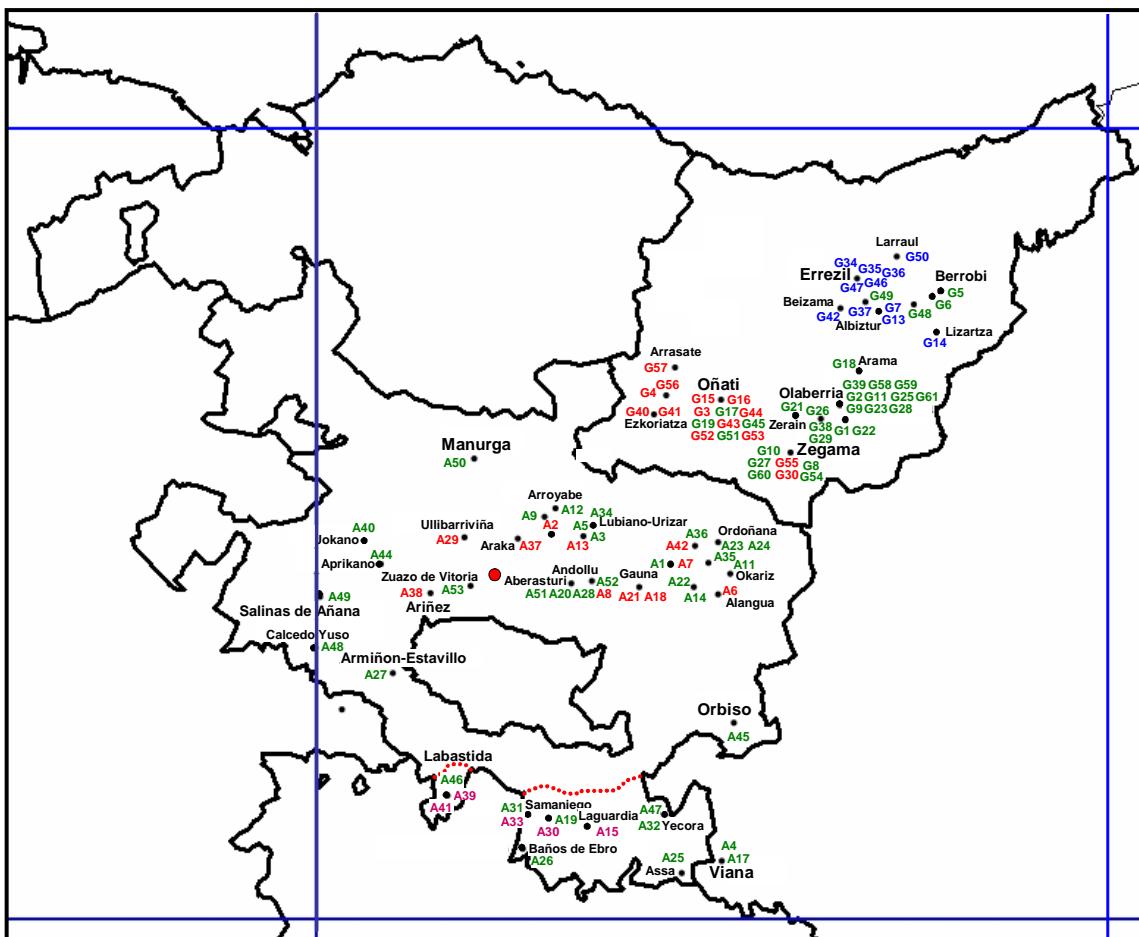
### 5.4.- Frecuencias de los grupos y distribución geográfica de las poblaciones de *Lepus europaeus* y *L. granatensis* de Álava y Guipúzcoa.

El grupo “*L. europaeus* y *L. granatensis* tipo autóctono” fue detectado en 60,19% (65 muestras) del total de las muestras analizadas, siendo 67,31% (Le:26, Lg:9) y 53,57% (30) en Álava y Guipúzcoa respectivamente. Los individuos foráneos representan un 15,74% (17) del total. En el caso de *L. europaeus* no afectan a ninguna liebre examinada de Álava y a un 21,43% (12) de las muestras de Guipúzcoa. Para *L. granatensis*, presente únicamente en Álava, se detectaron en 5 individuos foráneos de las 9 muestras analizadas. Finalmente, el grupo “*L. europaeus* tipo *granatensis*” fue encontrado en un 24,07% (26) del total, siendo 23,07% (12) y 25% (14) en Álava y Guipúzcoa respectivamente.

La distribución geográfica de los individuos analizados de las provincias de Álava y Guipúzcoa se muestra en la Figura 1.

En la provincia de Álava se muestra un mapa genético muy completo ya que las muestras facilitadas por ACCA comprenden casi la totalidad de región geográfica. Este mapa genético no muestra ningún patrón geográfico, presentando una distribución heterogénea. No se observa ninguna región en la que se detecten únicamente individuos de *L. europaeus* del tipo autóctono, ya que por todo el rango de distribución de liebre europea se han encontrado individuos de *L. europaeus* tipo *granatensis* y por todo el rango de distribución de liebre ibérica se han encontrado individuos de *L. granatensis* tipo foráneo.

Sin embargo, la provincia de Guipúzcoa si presenta un patrón geográfico en su mapa genético, mostrando tres regiones claramente diferenciadas. En la región noroeste (Oñate, Arrasate, Ezkoriatz y Aretxabaleta) encontramos una cantidad significativa de individuos del grupo *L. europaeus* tipo *granatensis* (12 individuos de un total de 16 individuos analizados). La región sureste (Olaberria, Zerain, Ataun, Idiazabal, Arama) donde el 100% de los individuos analizados son autóctonos. Excepto la localidad de Zegama en la que se han encontrado dos individuos de *L. europaeus* tipo *granatensis*. La región noreste (Errezil, Beizama, Bidania, Albiztur, Larraul, etc) está caracterizada por la elevada presencia de individuos de *L. europaeus* foráneos. Finalmente, la región noroeste de la provincia no ha sido analizada debido a la falta de muestras.



**Figura 1.-** Localización de los ejemplares de *Lepus europaeus* analizados de las provincias de Álava y Guipúzcoa, resaltando los ejemplares autóctonos (verde), los introgresionados con *L. granatensis* (rojo) y los reintroducidos o foráneos (azul).

### 5.5.- Análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de los ejemplares del programa de cría en cautividad.

El conjunto de datos consistió en 480 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial que incluye 187 variables y 130 sitios filogenéticamente informativos de 60 secuencias obtenidas. Adicionalmente al conjunto de datos se añadió como secuencias de referencia: haplotipos de *L. timidus* y *L. europaeus* previamente publicados en bases de datos (GenBank), dos secuencias propias de *L. europaeus* de Alemania (Le17) y de un individuo de una granja de cría francesa (Lek10) y dos secuencias propias correspondientes a haplotipos *L. granatensis* del centro y sur de la Península Ibérica (Lg2 y Lg4).

**Secuencias.-** Secuencias alineadas de los ejemplares de *L. europaeus* y *L.timidus* capturadas para la granja, correspondientes a 480 nucleótidos de la región de control del ADN mitocondrial.

#Le24	ACCCAAAGCT GAAATTCTCT TTAAACTACT CTCTGCTTTC NNCTAATAAN -ATA-TCCAA
#Le35	..... T NN..... A T...-
#Le79	..... T TC..... A T...-
#Le81	..... T TC..... A T...-
#Le69	..... T TC..... A T...-
#Le134	...G....G. ....T..... T TC..... A T...-
#Le140	.....T..... T TC..... A T...-
#Le176	..... T TC..... A T...-
#Le268	..... T TC..R.... A T...-
#Le73	-----T TC..... A T...- N
#Le82	..... T TC..... A T...-
#Lg2	..... T TC..... A T...-
#Lg4	..... T TC..... A T...-
#Le61	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-.T...
#Le76	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-.T...
#Le74	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-.T...
#Le25	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-.T...
#Le80	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-.T...
#Le15	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-.T...
#Le130	---T..... CT.CT.AT.A C.N.-
#Le32	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-.T...
#Le147	-----T..... CT.CT.AT.A C.N.-
#Le11	-----T..... CN.-T.AT.A CTN.-
#Le29	-----T..... CT.CT.AT.A C.N.-
#Le31	-----TC..... NN..... CT.GT-TCA C.N.-
#Le86	..... N..... CT.CN.AT.A C.N.-
#Le27	-----N..... N..... N CT..N.-T.A CNNN-NNN..
#Le146	-----N..... T..... CT.CT.AT.A CNNN-..N.
#Le136	-----N..... TN..... CT.NT.AT.A C.N.-
#Le22	..... NN..... CT..G..C.A C.N.-
#Le23	..... T..... CTNNNG.AT.A C.N.-
#Le219	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le241	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le272	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le246	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le16	-----
#Le160	.....TC..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le102	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le152	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le269	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le222	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le205	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le262	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le36	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le33	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le21	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le26	..... N..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le38	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le62	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le63	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le66	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le67	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le75	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le72	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le78	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le37	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le28	..... NN..... CT.CT.AT.A C.N.-
#Le263	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le265	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Lt_Y15314	-----T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Lt_Y15312	-----T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Lt_Y15305	-----T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le20	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le141	N..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le144	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-N..
#Le138	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le30	..... T..... CT.CT.AT.A C.A.A..
#Le18	-----T..... CT.CT.AT.A C.A.-
#Le34	..... T..... A CT..T.ATGA C...-
#Le132	..... T..... A CT..T.AT.A C...-
#Le_AY300036	-----
#Le_AY153530	-----

#Le_AY154666	-----	-----
#Lek10	.....	T. .... A CT.. T. AT. A C. ....
#Le17	.....	T. .... A CT.. T. AT. A C. ....
#Le24	GTANTTTGTC	ACTATTGACA AAAATCNCCN TTAACGCTAT GTAATTGCTG CATTANTGCT
#Le35	...N.....	.....T..N.....G.....N.....
#Le79	...AC....T	.....T..T.....G.....A.....
#Le81	...AC....T	.....T..T.....G.....A.....
#Le69	...AC....T	.....T..T.....G.....A.....
#Le134	...AC....T N.	.....T..T.....G.....G.....A...C
#Le140	...AC....T	.....T..T.....G.....A.....N
#Le176	...AC....T	.....T..T.....G.....A.....
#Le268	...AC....T	.....T..T.....G.....A.....
#Le73	...AC....T	....-T..T.....G.....A.....
#Le82	...AC....T	.....T..T.....G.....A.....
#Lg2	...AC....T	.....T..T.....G.....A.....
#Lg4	...AC....T	.....T..T.....G.....A.....
#Le61	...CC.....	.....TC..C.....G.....G..C
#Le76	...CC.....	.....TC..C.....G.....G..C
#Le74	...CC.....	.....TC..C.....G.....G..C
#Le25	...CC.....	.....TC..C.....G.....G..C
#Le80	...CC.....	.....TC..C.....G.....G..C
#Le15	...CC.....	.....TC..C.....G.....G..C
#Le130	...CC.....	.....NN..C.....N.....G..C
#Le32	...CC.....	.....TC..C.....GG.....G..C
#Le147	...CC.....	.....TC..C.....A.....G..C
#Le11	...C.....T	.....TC..T.....G.....A.....N.....
#Le29	...CN.....	.....TC..C.....A.....A.....N
#Le31	...C.....	.....NC..C.....A.....G.....
#Le86	...CC.....	.....TC..C.....N..G.....G..N
#Le27	...CN.....	.....NC..C.....A.....A..N
#Le146	...CC.....	.....TC..C.....A.....A..C
#Le136	...C.....	.....TC..C.....A.....A..C
#Le22	...CN.....	.....TC..C.....N.....N..C
#Le23	...CN.....	.....TC..C.....N.....N..N
#Le219	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le241	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le272	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le246	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le16	-----	-----
#Le160	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le102	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le152	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le269	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le222	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le205	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le262	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le36	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le33	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le21	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le26	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le38	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le62	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le63	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le66	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le67	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le75	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le72	...CC.....	.....TC..C.....N.....A..C
#Le78	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le37	...CC.....	.....TC..C.....G.....A..C
#Le28	...CC.....	.....TC..C ..N.....G.....-..N
#Le263	...CC.....	.....TC..C .....C..G.....A..C
#Le265	...CC.....	.....TC..C .....C..G.....A..C
#Lt_Y15314	...CC.....	.....TC..C .....G.....G..C
#Lt_Y15312	...CC.....	.....TC..C .....G.....A..C
#Lt_Y15305	...CC.....	.....TC..C .....G.....A..C
#Le20	...CC.....	.....TC..C .....G.....A..C
#Le141	...CC.....	.....TC..C .....GG.....A..C
#Le144	...CC.....	.....TC..C .....G.....A..C
#Le138	...CC..... N.	.....TC..N .....G.....A..NC
#Le30	...CC.....	.....TC..C .....G..G.GGG.....A..C
#Le18	...CC.....	.....TC..C .....N.....A..C
#Le34	...AC.....	...-CAC..T ..T..G.....GA.....A.....
#Le132	...AC.....	...-CAC..T ..T..G.....G.....A.....
#Le_AY300036	-----	-----
#Le_AY153530	-----	-----
#Le_AY154666	-----	-----

#Lek10	...AC.....	....-CAC..T	....T.....	.....G..	....A..
#Le17	...AC.....	....-CAC..T	....T.....	.....G..	....G..
#Le24	CTTCATCCATN	AACATGTATC	TATACTATNA	TTT-CATAAT	CAACATTAGA CCATTCTATG
#Le35	N.....N.....	N.N.....N.....	N.....N.....	N-.....	.....
#Le79	T.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....	.....
#Le81	T.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....	.....
#Le69	T.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....	.....
#Le134	T.....C.....	.....T.....	.....T.....	.....C..	.....
#Le140	T.....C.....	.....T.....	.....T.....	.....	.....
#Le176	T.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....	.....
#Le268	T.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....	.....
#Le73	T.....G.....	.....G.....	.....G..	N-..N..	.....
#Le82	T.....N.....	.....N.....	.....N..	N-..N..	.....
#Lg2	T.....T.....C..	.....T.....	.....T.....	.....	.....
#Lg4	T.....T.....C..	.....T.....	.....T.....	.....	.....
#Le61	T.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....	.....
#Le76	T.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....	.....
#Le74	T.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....	.....
#Le25	T.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....	.....
#Le80	T.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....	.....
#Le15	T.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....	T..
#Le130	T.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....	T..
#Le32	T.....C.....C..	.....C.....	.....C.....	.....	N..
#Le147	T.....G.....G..A..	.....G.....	.....G..	.....	T..
#Le11	N.....C.....N..N..	.....N.....	.....N..	.....	.....
#Le29	N.....C.....N.CN	.....G.....	.....C..	.....	.....
#Le31	.....C.....C.N..	.....G.....	.....A..	NN-.....	A..
#Le86	N.....C.....N.N..	.....NG.....	.....C..	.....	A..
#Le27	N.....G.....A.NA	.....G.....	.....N..	NNT-.....	N..
#Le146	T.....C.....	.....G.....	.....C..	.....	A..
#Le136	T.....C.....	.....N.N..	.....G.....	.....C..	.....
#Le22	T.....C.....	.....N.N..	.....N.....	.....	.....
#Le23	T.....C.....N..	.....N.....	.....C..	NN-.....	.....
#Le219	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le241	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le272	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le246	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le16	-----	-----	-----	-----	-----
#Le160	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le102	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le152	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le269	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le222	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le205	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le262	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le36	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le33	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le21	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le26	T.....C.....	.....N.....	.....C..	.....	.....
#Le38	T.....C.....N..	.....N.....	.....C..	.....	.....
#Le62	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le63	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le66	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le67	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le75	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le72	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le78	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le37	T.....C.....A..	.....G.....	.....C..	.....	.....
#Le28	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le263	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le265	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Lt_Y15314	T.....T.....C..	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Lt_Y15312	T.....T.....C..	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Lt_Y15305	T.....T.....	.....C.....C..	.....C..	.....	.....
#Le20	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le141	T..N..N..C.N..	.....C..	.....C..	.....	.....
#Le144	T.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le138	T.....C.....	.....C.....	.....C..	-.....C..	.....
#Le30	TC.....C.....	.....C.....	.....C..	.....	.....
#Le18	T.....G.....N..	.....CG	.....	.....	N..
#Le34	T.....T.....C..	.....C.....	.....C..	.....	AC..
#Le132	T.....T.....C..	.....C.....	.....C..	.....	AC..
#Le_AY300036	T.....T.....C..	.....C.....	.....C..	.....	AC..
#Le_AY153530	T.....T.....C.C..	.....C..	.....C..	.....	AC..
#Le_AY154666	T.....T.....C..	.....C.....	.....C..	.....	AC..
#Lek10	T.....T.....C..	.....C.....	.....C..	.....	AC..

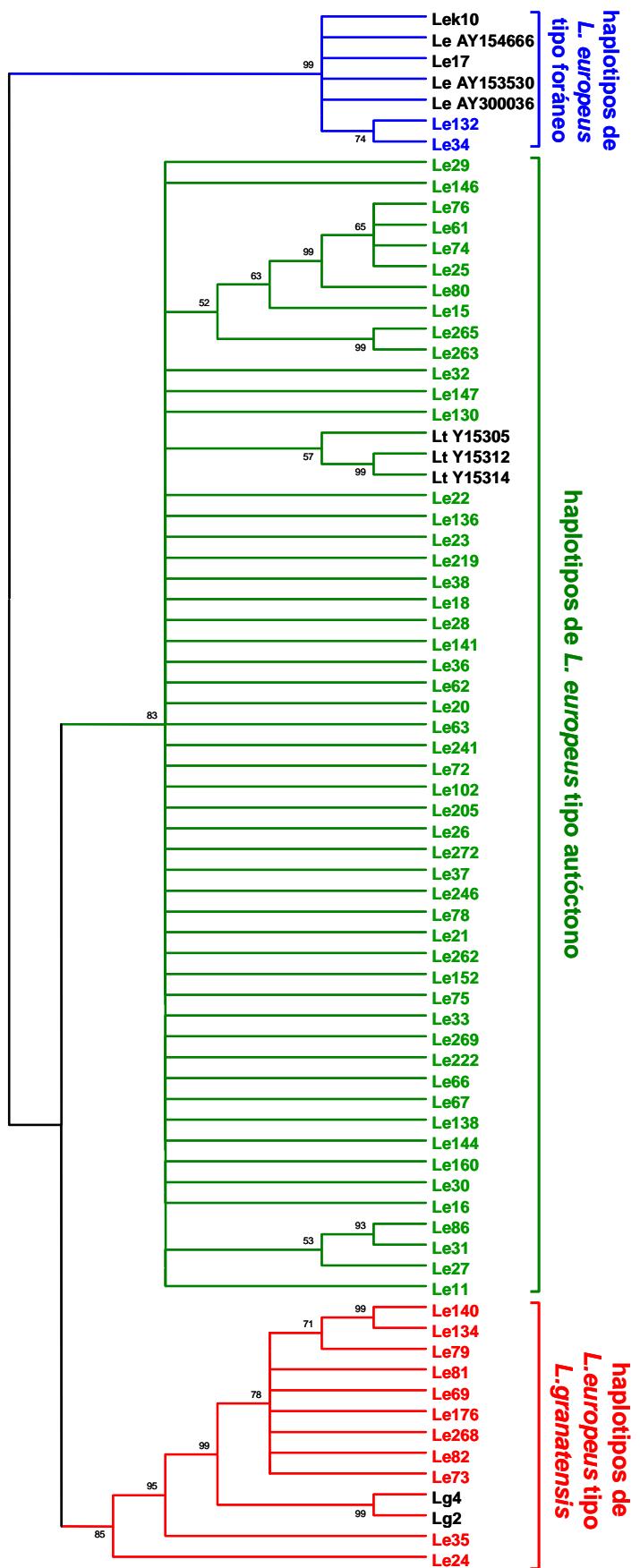
#Le17	T.....T.....C.....C.....-.....AC...
#Le24	TTTAATCGTA CATTAAAACC T-TACCCCCA TGCATATAAG CTAGTACATT CCTGC-TTAA
#Le35	.....-NN.....-.....-
#Le79	.....-.....-.....-.....-
#Le81	.....-.....-.....-.....-
#Le69	.....-.....-.....-.....-
#Le134	.....-.....-.....-.....NC
#Le140	.....-.....-.....-.....-
#Le176	.....-.....-.....-.....-
#Le268	.....-.....-.....-.....-
#Le73	.....G...N.....-.....-.....-.....
#Le82	.....-.....G.N.....N.....-.....
#Lg2	.....T.....-.....-.....-.....
#Lg4	.....T.....-.....-.....-.....
#Le61	.....T.....-.....T.....C.....-.....
#Le76	.....T.....-.....T.....C.....-.....
#Le74	.....T.....-.....T.....C.....-.....
#Le25	.....T.....-.....T.....C.....-.....
#Le80	.....N.....-.....T.....C.....-.....
#Le15	.....T.....-.....T.....C.....C.....-.....
#Le130	.....T.....-.....T.....C.....A.....-.....
#Le32	.....T.....-.....T.....C.....C.....-.....
#Le147	.....T.....-.....T.....C.....C.N.....-.....T.
#Le11	.....C.....T.....N-NT.....C.....N.N.....N
#Le29	.....C.....N-GT.....N.....A.....-.....
#Le31	.....C.....T.....C-CTN.....A.....A.....T.
#Le86	.....C.....-.....T.....C.....-.....
#Le27	.....N.....C.....C-TG.....GCC-----
#Le146	.....N.....C.....N-N.G.....N.....N.....-.....
#Le136	.....C.....N.....N-G.....C.....C.....-.....
#Le22	.....N.....-NGN.....N.....C.....-.....
#Le23	.....N.....N-NNN.....C.....N.....-.....
#Le219	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le241	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le272	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le246	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le16	.....-.....-.....C.....C.....-.....
#Le160	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le102	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le152	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le269	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le222	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le205	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le262	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le36	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le33	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le21	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le26	.....-.....G.....C.....C.....G-.....
#Le38	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le62	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le63	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le66	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le67	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le75	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le72	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le78	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le37	.....-.....G.....C.....C.....-.....T.
#Le28	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le263	.....-.....T.....C.....C.....A.-.....
#Le265	.....-.....T.....C.....C.....A.-.....
#Lt_Y15314	.....-.....T.....C.....C.....-.....
#Lt_Y15312	.....-.....T.....C.....-.....
#Lt_Y15305	.....-.....-.....C.....-.....
#Le20	.....-.....G.....C.....C.....-.....
#Le141	.....-.....G.....GC.....C.....-.....
#Le144	.....-.....G.....C.....C.....-N...
#Le138	.....N-G.....C.....C.....-.....
#Le30	.....-.....G.....C.....N.C.....N.....-.....
#Le18	.....N.....-NN.....N.....-.....
#Le34	.....G.....G.T C--TT.....C.....-.....
#Le132	.....G.....G.T C--TT.....G.....C.....-.....
#Le_AY300036	.....G.....G.T C--TT.....C.....-.....
#Le_AY153530	.....G.....G.T ..-TT.....C.....-.....
#Le_AY154666	.....G.....G.T C--TT.....C.....-.....
#Lek10	.....G.....G.T C--TT.....C.....-.....
#Le17	.....G.....G.T C--TT.....C.....T.....-.....

En el árbol 3 se presentan los resultados del análisis filogenético de todos los individuos analizados de *L. europaeus* capturados para el programa de cría en cautividad. Este árbol presenta dos grandes grupos o ramas claramente diferenciados:

1.- El grupo “*L. europaeus* tipo autóctono”: En él se confirma la característica introgresión ancestral mitocondrial por *L. timidus* citada para las poblaciones de *L. europaeus* del norte peninsular, en que aparecen los ejemplares Le 11, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 61, 62, 63, 66, 67, 72, 74, 75, 76, 78, 80, 82, 86, 130, 136, 138, 141, 142, 144, 146, 147, **169, 179, 181, 192, 197, 198, 199** y **200**. Este grupo de liebres se correspondería con las poblaciones autóctonas ibéricas no provenientes de repoblación de poblaciones foráneas; siendo la base para establecer la población reproductora para futuras repoblaciones.

2.- El grupo “*L. europaeus* tipo *L. granatensis*”, la introgresión detectada se corresponde con ejemplares de *L. granatensis* pertenecientes al centro y sur de la Península Ibérica y no de ejemplares de esta especie en zonas de contacto con *L. europaeus*, que se encuentran en el norte de la Península. Corresponden a Le 24, 35, 69, 73, 79, 81, 82, 134, 140, **194** y **195**. Este grupo necesitaría ampliar su estudio a un nivel de ADN nuclear, para determinar su idoneidad e identificación como ejemplares autóctonos y de esta forma garantizar su uso como población reproductora para futuras repoblaciones.

3.- El otro grupo o rama denominada “*L. europaeus* tipo foráneo” que se corresponde con los ejemplares de *L. europaeus* capturados en el resto de Europa. Estos ejemplares son representativos de poseer un ADN mitocondrial no introgresionado, típico e identificativo de la especie de *L. europaeus* perteneciente a poblaciones del resto de Europa no ibéricas. Junto a este grupo se asocian, sin apenas distinción en su ADN mitocondrial ejemplares de liebres de *L. europaeus* capturadas en País Vasco, Le 34 y Le 132. Este grupo debe ser rechazado para programas de reintroducción ya que no se corresponden con ejemplares autóctonos.



### **5.6.- Selección de los lugares de reintroducción.**

Antes de la realización de las sueltas, se ha tenido en cuenta la idoneidad del lugar, tanto desde el punto de vista de la capacidad del medio (usos del suelo, presencia de linderos, zonas de refugio, pastizales...), como de la titularidad de los terrenos, la presión de caza, el nivel de organización del colectivo de los cazadores de liebre de la zona, etc.

Asimismo, se ha llevado a cabo un trabajo de gestión que garantizará el éxito de la misma: se ha contactado con los propietarios de los terrenos y se ha obtenido la autorización necesaria para el fin que se persigue, se han instalado cierres de aclimatación, incluido comederos y bebederos, se ha designado un responsable del mantenimiento del cierre y se ha instruido a los responsables del cercado para llevar a cabo el trabajo siguiendo el protocolo establecido.

### **5.7.- Suelta realizadas.**

Durante el periodo de estudio no se han realizado en Guipúzcoa sueltas de liebre encaminadas al establecimiento de una población estable, debido a la falta de la disponibilidad de ejemplares adecuados para la repoblación. No obstante, se han realizado sueltas en 3 lugares diferentes, de ejemplares no aptos para la reproducción en cautividad, que han servido para por un lado testar la idoneidad del método de la suelta; por otro, para la puesta en marcha de una organización adecuada para futuras sueltas, en la que han colaborado tanto el guarderío como el colectivo de cazadores; y por último, para la puesta en marcha de zonas de adiestramiento de perros, por lo que el rastreo con perros servirá para darnos información sobre el éxito de las sueltas.

Las sueltas realizadas en Guipúzcoa han sido las siguientes:

Municipio	Fecha de suelta	Nº liebres	Nº de bajas comprobadas	Éxito de la suelta
Beasain	19/02/2007	5	2	Comprobada la permanencia de liebres hasta mediados de abril
Berastegi	21/06/2007	4	1	Comprobada la permanencia de liebres hasta mediados de julio
Oñati	21/06/2007	4	1	Comprobada la permanencia de liebres hasta finales de agosto.
TOTAL:		13	4	

En Vizcaya en cambio, sí se han realizado sueltas encaminadas al establecimiento de poblaciones reproductoras, las cuales se tabulan a continuación:

Localidad	Fecha de suelta	Nº liebres	Nº de bajas comprobadas
Izpazter	13/09/2006	6	
Górliz	13/09/2006	4	1
Karrantza	21/09/2006	10	2
TOTAL:		20	3

En un futuro próximo, está previsto realizar tanto en Guipúzcoa como en Vizcaya sueltas encaminadas al establecimiento de poblaciones reproductoras, en coherencia con los resultados del estudio genético, sobre la lista de localidades favorables para iniciar las reintroducciones.

### **5.8.- Elaboración de una base de datos.**

Se ha iniciado el diseño de una base de datos con la finalidad de disponer de forma ágil y práctica las principales variables necesarias para la gestión de la especie. Por el momento, se ha diseñado la parte correspondiente a los resultados de los seguimientos, en la que se han introducido los datos de los seguimientos llevados a cabo durante el otoño de 2006 y de primavera de 2007. Ello permite obtener fácilmente un índice Kilométrico de Abundancia para cada lugar de muestreo.

Esta base de datos será completada próximamente, introduciéndose en ella los campos necesarios para recoger los datos referentes a las características de las zonas en que se desarrolla el programa de reintroducción (tipo de cobertura vegetal, usos del suelo...), y las características de las liebres repobladas (número de ejemplares, edad, sexo, nº de identificación, bajas...).

#### 5.9.- Seguimiento de las liebres en la naturaleza.

En los 3 emplazamientos en que se han realizado sueltas en Guipúzcoa, se organizó una serie de rastreos con perros, que fueron llevados a cabo por el colectivo de cazadores del lugar, siguiendo un calendario prefijado. Estos rastreos han posibilitado determinar el éxito de las sueltas en cada uno de los emplazamientos.

En el caso de Vizcaya, ha sido el guardería de la Diputación el encargado de revisar el éxito de las sueltas, mediante la búsqueda de señales y rastros.

En el momento en que se realicen las sueltas encaminadas a establecer nuevas poblaciones reproductoras, se iniciará el seguimiento de las poblaciones en cada emplazamiento, integrándose dentro del seguimiento de poblaciones silvestres que cada Diputación tiene en marcha y que cuenta ya con una metodología establecida (recorridos nocturnos en vehículo todoterreno provisto de focos halógenos móviles...).

### 6.– DISCUSIÓN

Los análisis genéticos a partir del ADNmt de las poblaciones de liebres de CAPV indican claramente tres grupos: ***L. europaeus* tipo autóctono**, ***L. europaeus* tipo *L. granatensis*** y ***L. europaeus* tipo foráneo**.

El grupo “*L. europaeus* tipo autóctono” está caracterizado por presentar una introgresión de *L. timidus*. Esta introgresión ancestral de *L. timidus* ha sido hasta ahora únicamente descrito en las poblaciones ibéricas de *L. timidus* (Alves y col., 2003, Melo-Ferreira y col., 2005). Esta señal evolutiva, que se mantiene en las poblaciones ibéricas, permite identificar a partir del ADNmt a los individuos autóctonos frente a los individuos de la misma especie introducidos desde otras regiones europeas.

En el grupo “*L. europaeus* tipo *L. granatensis*” encontramos en el ADNmt de los individuos de *L. europaeus* una introgresión por *L. granatensis* del centro y sur de la Península Ibérica. En este caso el marcador del ADNmt únicamente puede detectar la introgresión aunque no su grado y origen. Este hecho, hace necesario un estudio adicional a partir de marcadores nucleares (microsatélites) que permitiría discriminar entre un origen ibérico (hibridación natural) o un origen foráneo (hibridación artificial en cautividad) de estos individuos de *L. europaeus*. Por tanto, determinar su idoneidad para ser mantenidos o excluidos en el plan de conservación de las poblaciones autóctonas vascas de liebre europea. El estudio de las poblaciones está pendiente de realizar cuando se consiga la financiación necesaria. Al respecto de esto, hay que señalar que en un estudio preliminar (Estonba y col., 2006) se detectó diferencias nucleares de gran importancia en las poblaciones ibéricas y una importante heterogeneidad entre poblaciones europeas de *L. europaeus*.

El grupo “*L. europaeus* tipo foráneos”, corresponde a los individuos de liebre europea provenientes de translocaciones antropogénicas, debido a la ausencia de diferencias con los haplotipos de *L. europaeus* del resto de Europa y más concretamente a la muestra adquirida en una granja de cría francesa. Se sospecha que la existencia de liebres alóctonas derivada de antiguas repoblaciones durante las décadas de los años ochenta y noventa. Además, hay que tener en cuenta que las poblaciones de liebres autóctonas francesas prácticamente están dadas por desaparecidas debido a su declive poblacional y principalmente a la reintroducción de liebres europeas provenientes de diferentes países de Europa central como Polonia, la antigua República Checa, Rusia, Hungría y Bulgaria (Oliver y Monted, 1971). Estas

reintroducciones en Francia alcanzaron los 200.000 individuos/año en la década de los 70 (Reydellet, 1971). En ese momento, las granjas de cría fueron creadas con reproductores de origen centroeuropeo. Por lo tanto, las repoblaciones ilegales de ejemplares provenientes tanto de granjas de cría francesa como de cualquier otra región europea pueden ser el foco original de la “contaminación” genética en la liebre europea de la CAPV.

Esta práctica tiende a reemplazar el “pool” de genes autóctono y a reducir la variabilidad genética (Flux, 1983; Pérez-Suárez y col., 1994; Pierpaoli y col., 1999, Kasapidis y col., 2005), amenazando potencialmente la variabilidad de dicha especie a largo plazo y afectando a los núcleos de liebres europeas ibéricas que aún viven en libertad pertenecientes a las poblaciones históricas. Por consiguiente, la exclusión de estas poblaciones y/o individuos procedentes de la repoblación ilegal, es un factor importante para mantener la integridad genética de las poblaciones de liebres europeas autóctonas de la CAPV, siendo el ADNmt la herramienta molecular más útil para la conservación y control de repoblaciones en esta región.

El alcance del problema de contaminación genética puede ser importante a juzgar por el número de localidades en las que se ha detectado la presencia de liebres alóctonas y por el número significativo de individuos presentes en ellas.

Las liebres alóctonas de *L. europaeus* no ibéricas detectadas pertenecen principalmente al noreste de Guipúzcoa. En Álava (Arkaute) se han encontrado dos individuos foráneos, de los capturados para el programa de cría en cautividad, a pesar de que en el mapa genético no se detectó ninguno. Por tanto, estas zonas en principio deben ser rechazadas para los programas de reintroducción de liebre autóctona, ya que no sería efectivo debido a la presencia de liebres foráneas.

Las zonas determinadas como aptas o favorables para la creación y refuerzo de las poblaciones de liebre europea autóctona están caracterizadas por la ausencia total de liebres europeas foráneas y la existencia, a su vez, de núcleos poblacionales autóctonos. Estas condiciones únicamente se ha detectado en la zona sureste de la provincia de Guipúzcoa, más concretamente en las localidades de Olaberria, Zerain, Idiazabal y Ataun.

Por otro lado, la distribución heterogénea de las poblaciones de *L. granatensis* autóctonas y foráneas del sur de Álava, dificulta poder establecer criterios para la creación de un plan de mantenimiento de las poblaciones de liebre ibérica autóctona.

En conclusión, a partir de los datos moleculares (ADNmt) obtenidos en este estudio, únicamente se puede establecer como zona apta para repoblaciones de liebre europea autóctona el sureste de Guipúzcoa (Olaberria, Zerain, Idiazabal y Ataun). Es necesario nuevas muestras de la zona centro y noroeste de dicha provincia para completar su mapa genético. Sin embargo, no se puede proporcionar ninguna zona idónea de la provincia de Álava, debido a la heterogeneidad que confiere la presencia de individuos introgresionados con *L. granatensis*, cuyo origen no se puede determinar con el ADNmt como herramienta molecular. Por tanto, se debe realizar un estudio más exhaustivo a partir de marcadores nucleares (microsatélites), que definiría si el origen de estas liebres europeas es natural o artificial, por tanto ser mantenidas o excluidas respectivamente en el plan de conservación. También es imprescindible obtener muestras de Vizcaya para establecer un criterio con el fin de realizar un plan de conservación y para completar el mapa genético de la CAPV,

Finalmente, en este estudio hemos hecho importantes progresos en el conocimiento de las poblaciones de liebres de la CAPV a nivel molecular. Sin embargo, es necesario poder completar el mapa genético con mayor número de muestras de localidades de las tres provincias, principalmente Vizcaya y noroeste de Guipúzcoa, así como, completar esta base de datos con un estudio más exhaustivo a partir de marcadores nucleares (microsatélites).

### **Referencias bibliográficas de interés:**

- Alves, P. C., N. Ferrand, F. Suchentrunk, D. J. Harris. 2003. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. Molecular Phylogenetics and Evolution, 27, 70-80.
- Alonso-Campos, G., Gutiérrez-Illán, J y Palacios, F. 2004. Spatial niche and map of potential distribution of the brown hare (*Lepus europaeus* Pallas) in the north of the Iberian Peninsula. 2<sup>nd</sup> World Lagomorph Conference, Vairao, Portugal. Abstracts, pg. 119.
- Estonba, A., Solís, A., Iriondo, M., Sanz-Martín, M.J., Pérez-Suárez, G., Markov, G. & F. Palacios (2006). The genetic distinctiveness of the three Iberian hare species: *Lepus europaeus*, *L. granatensis*, and *L. castroviejoi*. Mammalian Biology.
- Halanych, K.M., J.R. Demboski, B.J. van Vuuren, D.R. Klein, T.J. Robinson and J.A. Cook (1999). Cytochrome b phylogeny of North American hares and jackrabbits (*Lepus, lagomorpha*) and the effects of saturation in outgroup taxa. *Mol. Phylogen. Evol.* 11(2): 213-221
- Koh H.S., T.Y. Chun, H.S. Yoo, Y.Zhang, J. Wang, M. Zhang and C. Wu (2001). Mitochondrial cytochrome b gene sequence diversity in Korean Hare, *Lepus coreanus*, Thomas (Mammalia, Lagomorpha). *Biochem. Genet.* 39 (11-12): 417-429
- Melo- Ferreira, J., P. Boursot, F. Suchentrunk, N. Ferrand, P. C. Alves. 2005. Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology* 14: 2459-2464.
- Moritz, C. and D.M. Hillis (1996). Molecular systematics: Context and controversial, pag. 1- 12. In Hillis, D.M.; C. Moritz and B.K.Mable (eds) *Molecular Systematics*, 2<sup>nd</sup> edn., Sinauer Associates, Massachusetts.
- Oliver, B. y P. Monet (1971) Les races de lièvres et leurs aptitudes, pag : 69-71 . En : *Comment créer et conduire un élevage de lièvres*. Oliver, B. y P. Monet (eds). La Maison Rustique. Paris
- Palacios, F., Estonba, A., Pérez-Suárez, G., Alonso-Campos, G., Sanz, A., y Galán, L. (2004). Report on the restoration program of the Cantabrian population of brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in the Basque Country. 2<sup>nd</sup> World Lagomorph Conference, Vairao, Portugal. Abstracts, pg. 64.
- Peréz-Suárez, G., F. Palacios and P. Boursot (1994) Speciation and paraphyly in western Mediterranean Hares (*Lepus castroviejoi*, *L. europaeus*, *L. granatensis*, and *L. capensis*) revealed by mitochondrial DNA phylogeny. *Biochem. Genet.* 32: 423-437.
- Pérez-Suárez G., M.J. Sanz-Martín, R.C. Soriguer, Fernández A. (2004). Detection of specimens hare (*Lepus europaeus* and *Lepus granatensis*) reintroduced in the Navarre (Spain) region on the basis of variation in ANDmt. 2<sup>nd</sup> World Lagomorph Conference, Vairao, Portugal. Abstracts, pg. 115.
- Pierpaoli, M., F. Riga, V. Trocchi and E.Randi (1999) Species distinction and evolutionary relationships of Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Ecol.* 8: 1805-1817.
- Reydellet, M. (1971). L'élevage du lièvre problème d'actualité internationale ou la France montre l'exemple, pag. : 15-18. En : *Comment créer et conduire un élevage de lièvres*. Oliver, B. y P. Monet (eds). La maison Rustique. Paris
- Sanz, M.J. y G. Pérez-Suárez. (2004). "Estudio de la variabilidad de la región de control (D-loop) del ADN mitocondrial en poblaciones de liebres de la Península Ibérica (*Lepus europaeus*, *Lepus granatensis*, *lepus castraviejoi*)" XIX Jornadas Argentinas de Mastozoología. Puerto Madryn (Argentina).

Sanz-Martín, M.J. (2006) "Filogenia molecular de las liebres ibéricas (*Lepus castroviejoi*, *Lepus europaeus*, *Lepus granatensis*) a partir del ADN mitocondrial" Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá (Madrid).

Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markets for population biology. *TREE* 15:199-2001.

Thulin C.G., M. Isaksson and Tegelström (1997). The origin of Scandinavian mountain hares (*Lepus timidus*). *Gibier Faune Sauvage, Game Wildt.* 14(3): 463-475.