



FACULTADE DE BIOLOXÍA

Dobre Grao en Química e Bioloxía

Traballo Fin de Grao (Bioloxía)

Elena Pazos Linares

Curso académico 2021-2022

**XENÉTICA DA
CONSERVACIÓN DO
LINCE IBÉRICO**

1. RESUMO

O lince ibérico (*Lynx pardinus*, Temminck 1827) é un mamífero da orde Carnivora, familia Felidae, que chegou a ser considerado o félido máis ameazado do mundo mais que, apoiado en ambiciosos programas de conservación, ten experimentado un cambio de tendencia que o sitúa en vías de recuperación. Esta especie, paradigmática para a avaliación do impacto da restrición demográfica en fenómenos que resultan na perda de variabilidade xenética e, en consecuencia, de potencial adaptativo e no incremento da susceptibilidade a entrar en vórtices de extinción, presenta un interese especial de cara á integración da xenética de poboacións no deseño de estratexias de conservación efectivas e extensibles á xestión de especies en situación análoga. Así, neste traballo lévase a cabo unha revisión da bibliografía máis relevante relacionada coa xenética da conservación do lince ibérico, facendo especial fincapé en aspectos básicos da xenética evolutiva.

RESUMEN

El lince ibérico (*Lynx pardinus*, Temminck 1827) es un mamífero del orden Carnivora, familia Felidae, que llegó a ser considerado el félido más amenazado del mundo pero que, apoyado en ambiciosos programas de conservación, ha experimentado un cambio de tendencia que lo sitúa en vías de recuperación. Esta especie, paradigmática para la evaluación del impacto de la restricción demográfica en fenómenos que resultan en la pérdida de variabilidad genética y, en consecuencia, de potencial adaptativo y en el incremento de la susceptibilidad a entrar en vórtices de extinción, presenta un interés especial para la integración de la genética de poblaciones en el diseño de estrategias de conservación efectivas y extensibles a la gestión de especies en situación análoga. Así, en este trabajo se lleva a cabo una revisión de la bibliografía más relevante relacionada con la genética de la conservación del lince ibérico, haciendo hincapié en aspectos básicos de la genética evolutiva.

ABSTRACT

The Iberian lynx (*Lynx pardinus*, Temminck 1827) is a mammal of the order Carnivora, family Felidae, which came to be considered the most endangered felid in the world. With the help of ambitious conservation programs, it has undergone a change of trend that places it on the

road to recovery. This species, paradigmatic for the evaluation of the impact of demographic restriction on phenomena that result in the loss of genetic variability and, consequently, of adaptive potential and in the increase of susceptibility to enter extinction vortices, presents a special interest for the integration of population genetics in the design of effective conservation strategies, extendable to the management of other species in analogous situations. Thus, in this work a review of the most relevant literature related to the genetics of the conservation of the Iberian lynx is carried out, with special emphasis on basic aspects of evolutionary genetics.

2. INTRODUCCIÓN

O lince ibérico (*Lynx pardinus*, Temminck 1827) é un mamífero da orde Carnivora, familia Felidae. No 2002 atravesou o peor momento dun declive poboacional sostido no tempo, quedando limitado a dúas poboacións illadas (Doñana, DON e Serra de Andújar, AND) e tendo desaparecido da práctica totalidade da súa área de distribución orixinal. Desenvolvéronse, en resposta, distintas estratexias pertencentes a un ambicioso plan de conservación.

Segundo aproximacións filoxenómicas o lince ibérico sería unha especie diferenciada, cuxa diverxencia do lince eurasiático e canadense en liñaxes monofiléticas teríase producido de entre hai 1,53 e 1,68 millóns de anos (Fig. 1). O xénero *Lynx* sitúase evolutivamente separado do gato montés e, sucesivamente, doutros félidos (1). Non obstante, atendendo a métodos de análise

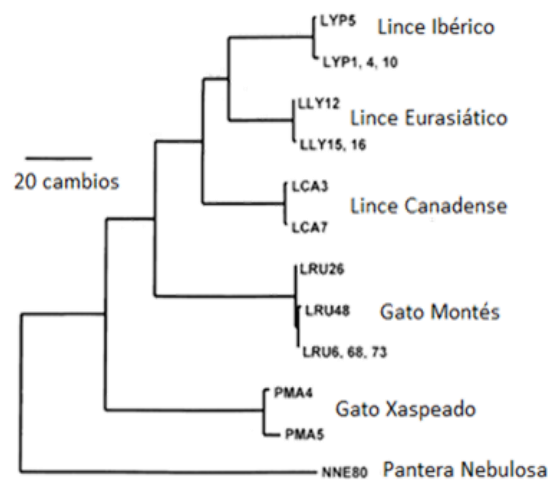


Figura 1. Árbore filoxenética do xénero *Lynx* en relación con outros félidos, construída aplicando métodos de máxima parsimonia, mínima evolución e máxima verosimilitude (1).

aplicados ao xenoma completo, a diverxencia do lince eurasiático sería máis recente (ca. 312,2 mil anos), acompañada dun proceso de fluxo xénico intermitente de longa duración (ata ca. 2,473 mil anos) asociado a un solapamento temporal dos rangos de distribución de ambas especies (2).

Especialista en termos de nicho ecolóxico e trófico, trátase dun animal intimamente ligado ao monte mediterráneo, cuxa densidade poboacional é proporcional á do coello común

(*Oryctolagus cuniculus*). Explícase así a súa preferencia por territorios de alta densidade de bordo entre matogueira e pastos (3), onde a súa presa é máis abundosa. As explotacións forestais de eucalipto e piñeiro son evitadas polo escaso alimento dispoñible, transitándose tan só na etapa dispersiva xuvenil. Así, o nicho trófico constitúese case en exclusiva de coello con independencia do ano, estación e localidade, e as especies que adoptan un rol complementario (aves, ungulados e micromamíferos, entre outros) aparecen con baixa frecuencia, sendo esta mínima no verán, cando o ciclo demográfico anual de coello acada máximos. A densidade mínima de especie presa que non compromete a organización espacial nin estabilidade numérica dunha poboación de lince (requirimentos tróficos) é de 1 coello/ha no outono, época de maior escaseza (4).

A nivel de interaccións interespecíficas non presenta depredadores coñecidos, mais exerce un control sobre predadores troficamente inferiores en calidade de competidores polo alimento que incide positivamente na densidade de coellos (5). Así, o número neto de coellos depredados en áreas con lince é menor que nas áreas sen el, pola conduta evasiva que induce noutros depredadores consumidores de gran número de cazapos. Trátanse de animais territoriais e solitarios, cuxas interaccións entre si son de tipo agresivo para a ocupación dunha área (de 3-4 km²) e no período de celo, con períodos de actividade concentrados no solpor e a noite (3).

No relativo á bioloxía reprodutiva, a etapa de cría ten lugar anualmente e, polo xeral, só do terceiro-cuarto ano de idade ao noveno. A etapa de xestación non supera os dous meses e o tamaño habitual de camada é de tres cachorros, dos que tan só un ou dous sobrevive ata a etapa dispersiva, aos 10 meses de idade. Nesta última a taxa de éxito aproxímase ao 50% (3).

Ao notable declive demográfico que se ten documentado contribúen tanto elementos derivados da actividade humana e factores ecolóxicos como a vulnerabilidade adquirida pola perda de diversidade xenética, que reforza o impacto dos anteriores. A perda e fragmentación de hábitat son dous dos principais factores de extinción aos que se enfrontan as especies actualmente que, no caso do lince ibérico, maniféstanse nos cambios de usos do solo e a progresiva substitución do monte mediterráneo tradicional por espazos de explotación agraria e forestal, unido aos acentuados procesos de desertificación e abandono rural. Por outra banda, a escasa variabilidade dietética xeográfica e temporal limita a capacidade de resposta da especie ante

flutuacións conxunturais da presa (6). Deste modo, as epidemias de mixomatose, unha afección viral introducida que decimou ás poboacións de coello común, están consideradas un dos principais eventos non estocásticos determinantes para o retroceso do lince nos últimos 50 anos (7). Ademais, na poboación de DON tense documentada unha redución da aptitude asociada á depresión consanguínea que afecta tanto á fertilidade dos machos, reducindo o tamaño medio de camada (8), como á mortalidade asociada a patoloxías por esgotamento linfoide e glomerulonefrite (9). Asemade, en condición de especialista posúe unha vulnerabilidade superior a xeneralistas á mudanza de condicións abióticas derivada do cambio climático.

Dentro dun contexto xeneralizado de crise de biodiversidade, o deseño de estratexias de conservación eficaces é crucial para a supervivencia dun número crecente de especies. A comprensión das dinámicas do acervo xénico poboacional e as forzas de cambio evolutivo, combinada cunha mellora da precisión, rapidez e accesibilidade das técnicas de secuenciación masiva, permite desenvolver unha aplicación da xenética ao servizo da conservación (10).

Un tamaño efectivo (N_e) reducido (aquele relevante a efectos de deriva) pode potenciar a deriva xenética, facendo que o seu efecto de cambio errático das frecuencias alélicas sexa suficientemente intenso como para eclipsar o efecto de cambio sistemático que ten a selección direccional, de forma que alelos deletéreos flutúen en frecuencia coma se fosen neutrais acabando por fixarse, por deriva, na poboación. A porcentaxe de heterocigose tamén se ve reducida pola intensificación da consanguinidade, o que moitas veces vén acompañado de depresión consanguínea, especialmente debida á expresión de alelos deletéreos recesivos como consecuencia do incremento da homocigose que causa a consanguinidade. A vulnerabilidade adquirida como consecuencia dos efectos derivados dun N_e reducido prolongado súmase a factores ecolóxicos e conxunturais que tamén levan ao declive demográfico (perda e fragmentación de hábitat, sobreexplotación, competencia con especies invasoras...), reforzándose mutuamente nun bucle de retroalimentación negativa coñecido coma vórtice de extinción. Así, é a sinerxia entre factores ecolóxicos, demográficos, estocásticos e xenéticos a que acaba por condenar estas poboacións a desaparecer (11). Dado que a degradación do material xenético persiste unha vez a causa inicial que levou ao decaemento poboacional é eliminada, incluso se

augmenta temporalmente o número de individuos, é fundamental integrala no deseño de plans de conservación efectivos.

Afortunadamente e grazas ao enorme esforzo investido na recuperación da especie, o declive demográfico rexistrado dende 1950 comezou a reverter no 2004, superando o millar de exemplares no 2020 por vez primeira dende que se efectúa o seguimento e chegando á cifra de 1365 exemplares no 2021. A estratexia articúlase tanto en programas *ex situ* (catro núcleos de cría en cativeiro, con 305 exemplares reintroducidos de 2011 a 2021) como en programas LIFE (activos dende 2002), acompañados de translocacións, recuperación de hábitat e especie presa, entre outros (12). A poboación, que chegou a estar restrinxida a 2 núcleos poboacionais de menos de 100 exemplares en total (DON e AND), na actualidade conforma 13, maioritariamente concentrados en Andalucía e Castela-A Mancha pero tamén presentes en Estremadura e Portugal (12). Segundo a última actualización da IUCN, está calificada de “en perigo”, deixando atrás a categoría de “en perigo crítico” mantida ata 2014 (13).

3. OBXECTIVOS

O obxectivo principal é a revisión sistemática da literatura máis relevante e actualizada publicada na área de interese. A través da mesma, espérase tamén avaliar o grao de variabilidade xenética conservada polo lince ibérico tralo declive demográfico sufrido, elaborar unha descrición da estrutura xenética das poboacións actuais e aportar posibles xustificacións da mesma, estimar o impacto do mantemento de valores de N_e reducidos -deriva, depresión consanguínea, etc.- e recoller as valoracións do éxito relativo e idoneidade das estratexias de conservación implementadas, en función dos informes emitidos.

4. METODOLOXÍA

A estratexia de busca de información abrangue varias liñas principais, entre as que se atopan: o emprego de bases de datos e buscadores científicos (PubMed, Google Scholar, BASE, AGRIS, Greenfile, CINAHL...), facendo uso de palabras chave como “*Lynx pardinus*”, “Iberian lynx”, “drift”, “genetic load”, “purging”, “population genomics”, “conservation” ou “SNPs”; a busca na hemeroteca de revistas especializadas en xenética de poboacións e bioloxía evolutiva,

tales como *Conservation Genetics*, *Molecular Ecology*, *BMC Genomics*, ou *Journal of Heredity*, entre outras; a consulta das páxinas oficiais do Ministerio de Transición Ecolóxica (MITECO), o Proxecto LIFE (Iberlince) e similares; a revisión da produción recente dos grupos de traballo máis activos nesta área (grupos de bioloxía evolutiva e bioloxía da conservación da EBD¹, entre outros) e unha compilación das últimas publicacións de investigadores destacados na materia.

5. RESULTADOS E DISCUSIÓN

5.1. VARIABILIDADE XENÉTICA DAS POBOACIÓNS

Para as poboacións de DON e AND, respectivamente, só foi posible atopar dous haplotipos de 1488 bp, cada un fixado nunha poboación ($H \pm SD = 0.505 \pm 0.016$; $\pi \pm SD = 0.00034 \pm 0.00032$)². Ambas amosan frecuencias xenotípicas que non se desvían significativamente das esperadas no equilibrio de Hardy-Weinberg, o que suxire un sistema de apareamento aleatorio dentro de cada poboación. Os valores de diversidade global son extremadamente baixos, sendo o número medio de alelos tendo en conta ambas poboacións de 3,75 nun rango de 2-11 por locus, cunha heterocigose media observada de 0,387 (valores comprendidos entre 0,003 e 0,774). Estes valores sorprenden por seren moi inferiores aos habituais para especies próximas, coma o lince eurasiático (ver táboa 2), para case todos os valores de diversidade calculados para os loci solapantes entre estudos.

Os valores de diversidade (H) e riqueza alélica (AR) son significativamente inferiores en DON que en AND ($H_{E\ Don} = 0,32$ vs. $H_{E\ And} = 0,46$ e $A_{R-Don} = 2,10$ vs. $A_{R-And} = 3,28$), e explícanse pola historia demográfica particular das poboacións. Así, o baixo número de alelos é consistente ca ocorrencia dun efecto colo de botella causado por eventos recorrentes de drástica diminución no número de individuos, xa que o efecto colo de botella ten un efecto máis notable na perda de alelos que na heterocigose.

¹ Estación Biolóxica de Doñana

² Os valores básicos de diversidade recollidos corresponden aos publicados no 2013. Isto non implica a súa invalidez, xa que a recuperación do número de individuos da especie non vai necesariamente parella coa dos niveis de variabilidade

Os alelos que son exclusivos dunha poboación, aínda que non necesariamente fixados nesta (*i. e.*, alelos privados), son catro veces máis frecuentes en AND que DON ($A_{\text{priv-Don}} = 0,41$ vs. $A_{\text{priv-And}} = 1,58$), a pesares de que a diversidade alélica xeral só é da orde de 1,56 veces maior. Asemade, os alelos privados teñen un peso porcentual considerablemente superior na riqueza alélica global de AND que na de DON (o 19,5% e o 48,3%, respectivamente). Estes datos suxiren un efecto colo de botella e unha taxa de fluxo xénico relativamente baixa. Estes parámetros recóllense, a continuación, na táboa 1, onde se amosan os valores medios de diversidade calculados para unha colección de 36 loci microsatélite dunha submostra de individuos de ambas poboacións, da que foron eliminados aqueles proximamente emparentados, sendo N o tamaño medio de mostra, N_A , número medio de alelos por locus; H_E , heterocigose esperada; H_o , heterocigose observada; A_R , riqueza alélica e N_{Pr} , número de alelos privados (14).

Táboa 1. Variabilidade en poboacións de *L. pardinus* (colección orixinal: 1995-2007). Baseado en (14).

	N	N_A	A_R	H_E	H_o	f	P-valor	N_{Pr}
DOÑANA	26,61	76,00	2,10	0,31	0,31	0,002	0,508	13
ANDÚJAR	35,28	122,00	3,28	0,46	0,46	0,009	0,327	59

Táboa 2. Estimacións de diversidade en *L. pardinus*, contextualizadas coas correspondentes para *L. lynx*. Baseado en (14)

	<i>L. pardinus</i>		<i>L. lynx</i> (Hellborg et al., 2002)		
	DOÑANA	ANDÚJAR	BÁLTICO	FINLANDIA	ESCANDINAVIA
$H_{E\text{promedio}}$	0,29	0,48	0,61	0,62	0,57
$A_{R\text{promedio}}$	2	3,83	5,33	5	5,17

Os niveis de heterocigose estimados por análise de microsatélites son de, aproximadamente, un terzo para o lince ibérico que o eurasiático (36,6%) (102 SNPs/Mb fronte a 279 SNPs/Mb). Os niveis de diversidade da especie son os máis baixos, co coñecemento actual, para calquera organismo avaliado. A perda de variabilidade por deriva ten lugar de forma diferencial dentro do cariotipo, sesgada cara ao cromosoma X. A fracción normalizada de variabilidade do cromosoma X por variabilidade autosómica é, para secuencias interxénicas (menor aínda no caso de codificantes), de 0,35 (erro estándar (SE) = 0,02) e de 0,29 (SE = 0,02) e 0,38 (SE = 0,03) para DON e AND, respectivamente. Estes valores son substancialmente menores cós preditos para a situación de equilibrio, de 0,75 (2).

A perda de variabilidade podería estar a ocorrer de xeito diferencial en función do tipo da mesma, debido tanto á actuación da selección equilibradora, en sentido favorable ao mantemento da variabilidade funcional, como á redundancia de certas familias multixénicas. Así, é posible notificar unha retención de diversidade superior á predita segundo as dinámicas de variabilidade neutral para variabilidade funcional ben caracterizada, neste caso a área relativa aos MHC (familia multixénica relacionada co sistema inmune de mamíferos). Os niveis de variación presentados confirman, como é esperado, un menor número de alelos para *Lynx pardinus* que para a súa especie máis próxima (*Lynx lynx*) pero cunha retención importante da variabilidade funcional nucleotídica, aminoacídica e de supertipos. Acorde cos resultados obtidos, incluso en situacións cunha erosión significativa do material xenético parece posible manter valores estables de variación funcional, cuxas dinámicas difiren das seguidas pola variación neutral (15).

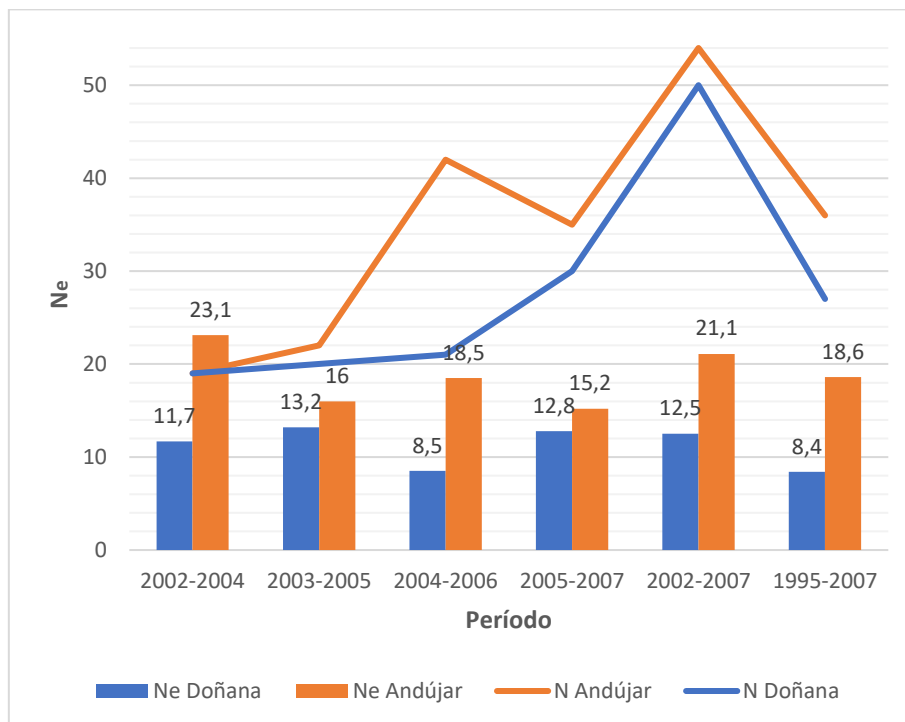


Figura 2. Valores estimados de N e N_e para as poboacións de DON e AND, en períodos comprendidos entre 1995 e 2007. Baseado en (14)

Os valores de N_e calculados para diferentes períodos de tempo comprendidos entre 1995 e 2007 son anormalmente reducidos (figura 2), en especial se se comparan cos valores de tamaño censual para a mesma época. Con todo, observouse unha importante recuperación posterior do número de individuos, o que seguramente se reflecta nun lixeiro incremento de N_e (14).

As consecuencias de presentar un N_e tan reducido proceden, fundamentalmente, da intensificación do efecto de deriva. No relativo aos alelos deletéreos, o seu carácter e o potencial efecto de selección purificadora entran en conflito co comportamento errático da frecuencia alélica que causa a deriva, podendo ser eventualmente eclipsados por esta adoptando un comportamento efectivamente neutral. Isto implica que os alelos deletéreos teñen unha certa probabilidade de acadar a fixación por azar. Aínda que en grao considerablemente menor, a perda de oportunidades de progresión baixo selección positiva de mutacións favorables contribúe, xunto co efecto descrito previamente, ao aumento da diferenciación interpoboacional e á redución da variabilidade e intrapoboacional.

O incremento da consanguinidade que se presume pola redución do número de individuos, ineludible incluso baixo condicións de apareamento aleatorio, é responsable dun descenso da heterocigose e o incremento concomitante da homocigose, en particular a autocigose, é dicir, a reunión no mesmo locus de alelos idénticos por ascendencia. O aumento da probabilidade de expresión de alelos deletéreos recesivos, así como a perda de xenotipos máis aptos por sobredominancia, ocasiona un descenso manifesto da aptitude media da poboación (16). Os efectos desta depresión consanguínea son constatables especialmente no ámbito da mortalidade prerreprodutiva, o descenso da fertilidade, a aparición de malformacións conxénitas ou a predisposición ao desenvolvemento de certas patoloxías, entre outros. O lastre xenético, definido coma a proporción na que difiren a aptitude do xenotipo promedio dunha poboación e a do xenotipo de referencia ou óptimo presente na mesma é, por ende, un indicador da magnitude da depresión consanguínea futura (17).

No caso do lince ibérico téñense documentado claras evidencias de depresión consanguínea afectando especialmente á poboación de DON, referidas a unha relación directa entre a redución da heterocigose e da calidade do esperma dos machos. En certos casos, os individuos poden chegar a presentar tan só un 10% de esperma normal, limitando significativamente a súa fertilidade e suxerindo unha corrección das estimas previas de N_e , que estarían a ser sobreestimadas (18). Existe tamén un deterioro manifesto da efectividade do sistema inmune por esgotamento linfoide (9), relacionado tamén coa predisposición ao desenvolvemento

de glomerulonefrite membranosa que, entre outras patoloxías, estarían detrás dun incremento na taxa de mortalidade (19).

Así, a redución rápida e drástica do N_e vén acompañada, neste caso, da aparición de depresión consanguínea, causando un descenso na aptitude xenotípica tanto a nivel individual como poboacional. Porén, é tamén polo aumento de homocigose asociado á consanguinidade que se facilita a expresión de alelos recesivos deletéreos, intensificando ao mesmo tempo a selección negativa contra os mesmos. Este fenómeno de purga xenética diferénciase, en termos de direccionalidade, da deriva, ao contrastar o impacto aleatorio nas frecuencias alélicas desta última coa natureza sistemática da selección. Actuando con preferencia sobre variantes alélicas concretas, a purga tende a amortecer a acumulación de lastre xenético, aínda que o seu alcance está sempre limitado pola potencia do efecto de deriva, ao non ser quen de actuar sobre variantes fixadas pola mesma (17).

A influencia da purga xenética responsabilízase do nivel de lastre atopado trala análise de 20 xenomas completos de *Lynx pardinus* e 28 de *Lynx lynx*, que sería menor do esperado segundo as predicións analíticas habendo no lince ibérico un número de alelos derivados para a mutación con cambio de sentido máis putativamente deletérea un 11% menor que no eurasiático. Este resultado adscribíbase á acción prolongada da selección negativa, erixida como principal axente de contención do lastre en circunstancias onde a consanguinidade eleva as oportunidades de selección contra homocigotos recesivos (17).

Por outra banda, a limitación da selección purificadora respecto da esperada pola intensidade do efecto de deriva faise patente en ítems tales como o aumento da fixación de elementos transpoñibles, SINEs e LINEs, especialmente a favor de sentido (51% de LINEs fixados a favor de sentido vs. 37% de base). A ratio de substitución non sinónimas por sitio sinónimo ($dN/dS = 0,16$) ou a de diversidade (taxa de substitución non sinónima por sitio non sinónimo pola taxa de substitución sinónima por sitio sinónimo, $\pi N/\pi S = 0,286$) tamén son elevadas, comparados cos valores para o devanceiro común e a tartaruga das Galápagos, próximos a $dN/dS = 0,06$ e $\pi N/\pi S = 0,310$ (poboación filoxeneticamente próxima de referencia e poboación baixo un efecto colo de botella e illamento drásticos, respectivamente). Estes resultados son

compatibles cunha relaxación do efecto de selección responsable da existencia de variantes deletéreas segregando a frecuencias moderadas-altas (2).

Para a realización destas estimas, no caso do lince ibérico os marcadores máis empregados son os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), cuxo mapeamento completo mellora en informatividade, calidade e efectividade os STRs (*Short Tandem Repeats*) empregados con anterioridade. Grazas á elaboración de paneis de SNPs autosómicos pódese proceder á identificación individual, asignación de parentais, construción de xenealoxías, estima de graos de parentesco e avaliación do grao de mestura entre poboacións con facilidade, por asociación con patróns específicos de panel. Asemade, son coñecidos 21 marcadores ligados ao sexo (X) cuxa información é complementaria á dos anteriores (20). O uso preferente de SNPs fronte aos STRs xustificano as consecuencias da redución na lonxitude dos fragmentos a analizar (50-70 bp vs. 80-300), a saber: minimización da porcentaxe de erro, posibilidade de emprego de mostras non invasivas e de ADN parcialmente degradado e redución do número de réplicas esixidas. Ao impacto na eficacia e aplicabilidade da técnica que estas teñen súmanse as novas aplicacións mencionadas, de cruciais para a monitorización dos programas de conservación a implementar.

A partires da secuenciación completa de mostras representativas de exemplares de lince ibérico procedentes das distintas poboacións e por comparación dos SNPs solapantes co lince eurasiático, caracterízase a variabilidade retida nas poboacións avaliadas³. Dentro delas, préstase especial atención ás ROHs (*Run of Homocosity*), definidas como rexións do xenoma de homocigose para múltiples sitios contiguos. Estas resultan da herdanza de cada parental de haplotipos idénticos por ascendencia, é dicir, procedentes dun mesmo evento replicativo ocorrido nun devanceiro común dos proxenitores correspondentes, polo que se relaciona coa estima do grao de autocigose individual. En función do tamaño de ventá de SNPs fixado clasifícanse por lonxitude, sendo esta e a súa abundancia informativos da historia demográfica. Os valores descritos permiten calcular o estatístico F_{ROH} , que fai referencia á proporción do xenoma

³ Datos publicados no 2016, referidos aos núcleos de Doñana e Andújar

autosómico contido en ROHs dunha lonxitude mínima e permitindo a diferenciación de subpoboacións en termos de consanguinidade e N_e (21).

Neste caso, o material analizado caracterízase por unha abundancia superior da esperada para os ROHs de alta (>1Mb) e media (100 kb-1Mb) lonxitude, na poboación de DON máis que na de AND. En contraste, non se atoparon diferenzas significativas a nivel individual nos ROH máis curtos (10-100 kb) con independencia da poboación de procedencia, o que localiza a súa orixe nos efectos colo de botella que afectaron á poboación ancestral (2) (Figura 3).

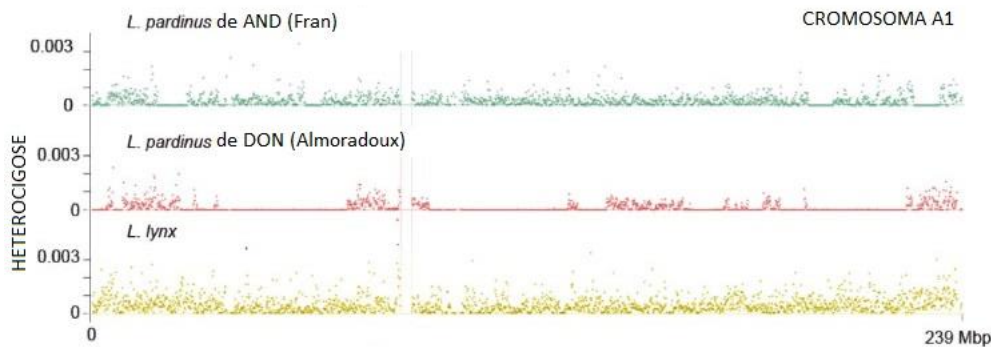


Figura 3. Heterocigose media en ventás non solapadas de 100 kb en lince ibérico de DON, de AND e lince eurasiático, empregando o cromosoma A1 como exemplo ilustrativo.

5.2. HISTORIA DEMOGRÁFICA E ESTRUTURA XÉNICA POBOACIONAL

Os coeficientes medios de consanguinidade son, atendendo aos valores de ROH, diferentes ($F_{\text{ROH-DON}} = 0,32$; $F_{\text{ROH-AND}} = 0,16$) e consistentes cun menor tamaño poboacional de DON dende que ambas quedaron illadas (2). Estes valores resaltan especialmente nun marco no que o coeficiente individual de consanguinidade resultante do emparellamento máis próximo posible (asociado a un cruzamento parental-descendencia) sería de $F = 0,25$ e no que os emparellamentos están a producirse de xeito aleatorio. Atendendo á abundancia relativa de ROHs de distinta lonxitude estímase que as dúas poboacións remanentes de lince na súa etapa crítica (DON e AND) permaneceron illadas de forma efectiva dende 1900-1950 ata 2007 (inicio de traslocacións), un mínimo de 14 xeracións que chega a 40 no caso de DON (22). As evidencias documentadas de elevada depresión consanguínea e dun posible vórtice de extinción na máis afectada (DON) (8) son coherentes con estes resultados.

Existen outros parámetros que reforzan a idea dunha elevada diferenciación entre as dúas poboacións ($F_{st} = 0,22$). DON amosa aproximadamente a metade da diversidade global que AND, explicable pola adopción dun rol periférico na estrutura xenómica histórica acompañado dun N_e moi reducido (ca. 20 individuos) e un illamento prolongado no tempo (ca. 200 anos, 40 xeracións). En contraste, a poboación de Montes de Toledo formaba un clúster case panmíctico coa de AND cun papel pivotante na metapoboación, o que as convertía no reservorio principal de variabilidade e restrinxindo a erosión xenómica desta última ao período máis recente (22). Deste modo, a variación xenómica na actualidade atópase fortemente estruturada. A progresión histórica da estrutura xénica represéntase na figura 4, onde resalta a traxectoria de AND en calidade de herdeira única do clúster ancestral e drástico efecto colo de botella experimentado nos 2000, que se relaciona coa perda de alelos (non tanto de heterocigose) mencionada no apartado de variabilidade (22).

O resultado da delicada confrontación selección purificadora-deriva depende, en gran medida, da historia demográfica da especie, polo que a reconstrución dun trazado que identifique os eventos máis intensos e o intervalo de tempo no que se teñen producido é fundamental para explicar e asignar a procedencia da erosión xenómica que se aprecia na actualidade, cuxa orixe non se corresponde en exclusiva coas circunstancias máis recentes (1). Neste caso, a partir da análise de áreas asociadas ao citocromo b e á rexión de control do xenoma mitocondrial e de marcadores microsátélites de restos fósiles procedentes de distintas zonas sureuropeas, así como a consulta dos rexistros censuais máis recentes, foi posible reconstruír a historia demográfica da especie (22).

A análise da variación mitoxenómica máis antiga indica que se trata dunha especie paleoendémica que, durante o Holoceno

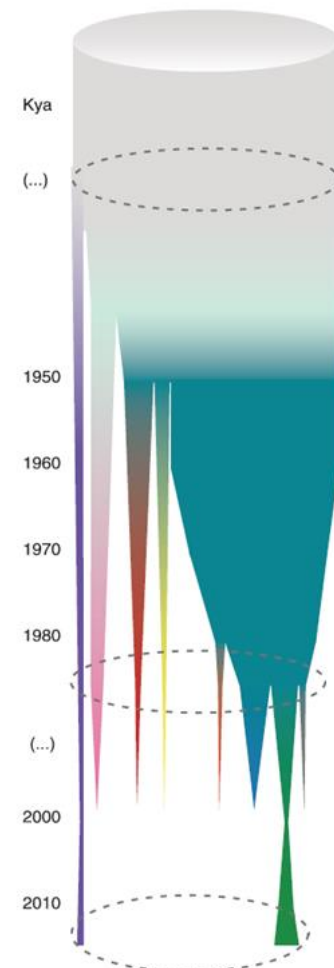


Figura 4. Reconstrución da evolución da estrutura xénica desde a etapa ancestral ata a contemporánea, a modo de cilindro que sofre fragmentacións sucesivas. Identifícase, pola cor violeta, a poboación de Doñana e pola verde, Andújar, xunto con outras xa extintas (22).

e o Pleistoceno tardío, gozou dunha distribución alén da península, na zona mediterránea sureuropea (23), cun patrón de variabilidade que, sendo máis elevado ca nunca, era xa significativamente menor có doutros mamíferos. A súa historia demográfica posterior estaría marcada por catro efectos colo de botella principais, dos que o primeiro e o segundo estarían asociados a cadanseus períodos glaciares, provocando a separación do lince ibérico do eurasiático. Entre eles, etapas con condicións climáticas máis solícitas estiveron acompañadas dun aumento do rango de distribución de ambas especies, que volvería solaparse explicando o fluxo xénico que se reporta nesta etapa. Hai uns 400 anos experimentaríase o terceiro declive poboacional intenso, compartido con outras especies europeas e presumiblemente asociado á expansión da agricultura, o desenvolvemento industrial e o incremento da presión antrópica sobre o medio natural. O drástico declive experimentado no século XX está, como se sostén na literatura, fundamentalmente asociado á persecución humana e a infeccións virais sufridas pola súa especie-principal (2).

En síntese, a reconstrución da estrutura xenómica histórica indica que a perda de poboacións cun papel pivotante para a metapoboación (*e. g.*, Montes de Toledo), con niveis de variabilidade parellos aos da poboación ancestral, puido ter acelerado a perda de diversidade, historicamente máis baixa en poboacións periféricas como DON (22). Así, por causas que fan alusión tanto ao rol da poboación dentro da estrutura xenómica histórica como á historia demográfica, sumados a fenómenos recentes de illamento e declive poboacional, a caracterización xeral de DON é de alta erosión e depresión consanguínea, mentres que AND é máis semellante xeneticamente á poboación ancestral, aínda que tamén cunha evidente e recente perda de variabilidade. Estes valores foron, e son, de grande utilidade á hora de trazar as traslocacións e seleccionar os parentais adecuados para os programas de cría en cativeiro (24).

5.3. ESTRATEXIAS DE CONSERVACIÓN

A escalada na crise de biodiversidade leva a que numerosas especies, cunha poboación fragmentada de N_e reducido, sexan estremadamente susceptíbeis a fenómenos de perda de variabilidade e, por ende, de potencial adaptativo. Este non é recuperable de forma natural e compromete a supervivencia da especie incluso tralo cese da presión primaria causante do declive,

polo que a xestión e conservación da biodiversidade require a incorporación dun enfoque xenético para ser efectiva (25).

Os programas de conservación *ex situ* ou de cría en catividade son cruciais para a recuperación dalgunhas especies e válidos para mitigar a perda de diversidade mediante a selección deliberada de individuos procedentes de xenealoxías menos representadas. O seu éxito está ligado á dispoñibilidade dun coñecemento profundo da historia demográfica e á monitorización da variabilidade xenética actual (25). No caso do lince ibérico, o programa *ex situ* (en marcha dende 2003, aínda que iniciando a fase de reintrodución no 2010 (24)) está considerado un éxito no sentido demográfico e xenético, ao ser quen de reter a meirande parte da variabilidade inicial de ambas poboacións mantendo uns niveis de consanguinidade baixos (26). A conservación das poboacións *in situ* tamén se guía polo obxectivo de maximizar o N_e da poboación fundadora e xestionar de forma eficiente o fluxo xénico (25).

A depresión consanguínea resultante da acumulación de lastre xenético mitígasese de modo natural pola purga (17) e o rescate xenético. Este defínese coma unha recuperación da poboación pola aparición de individuos xeneticamente únicos, portadores de alelos non representados na poboación e cuxa descendencia ten máis probabilidades de ter unha aptitude superior aos parentais (27). No caso do lince, esta estratexia lévase a cabo dende o 2007 mediante a traslocación de individuos e tentando recuperar a conectividade entre poboacións (28).

Entre outras estratexias emerxentes pódese mencionar a edición xénica para mellorar cuestións adaptativas en ecosistemas cambiantes e os vectores xenéticos para o control de especies invasoras, mais a aplicabilidade destas últimas está aínda en estudo ou en debate previo, ético e político (25).

Inicialmente, o escaso éxito que as estratexias de conservación estaban a experimentar atribuíuse á falla de confianza no asesoramento científico, o desenvolvemento de plans de protección fragmentarios, curtopracistas (<5 anos) e a pequena escala e á ausencia de programas de seguimento que avaliasen o grao de éxito acadado (29). Porén, grazas aos esforzos investidos en programas de conservación dos últimos anos (tanto *ex* coma *in situ*) (28), mellor deseñados e asesorados, combinados coa concienciación social, a restauración de hábitat e das poboacións de

coello e á labor investigadora, estase a experimentar unha mellora significativa nas tendencias demográficas. Esta mesma levou á desclasificación coma especie “en perigo crítico” para pasar a “en perigo” pola IUCN no ano 2014 (13) e á superación, por vez primeira dende que se levan a cabo rexistros, da barreira do millar de exemplares no 2020 (12). Con todo, cómpre deixar patente a necesidade de manter as reintroducións, translocacións e os esforzos de conservación *in situ* xa que, no seu defecto, os modelos demográficos que implementan un maior realismo biolóxico devolven unha perspectiva radicalmente distinta, apuntando á extinción entre 35 e 50 anos. Isto está intimamente relacionado coa resposta da especie e da súa presa principal ás consecuencias do cambio climático, restrinxida pola vulnerabilidade adquirida pola erosión xenómica. Cobra vital importancia no deseño de plans de conservación a consideración non só da dispoñibilidade de especie-presa, as características do nicho ecolóxico e a conectividade da metapoboación, senón tamén o cambio climático e o seu impacto sobre os anteriores (30).

6. CONCLUSIÓNS

Os baixos valores de N_e dos períodos críticos para a especie determinaron parte da grande perda de variabilidade que presenta a especie, patente nos baixos valores de heterocigose e riqueza alélica. Asemade, existen evidencias de depresión consanguínea afectando á fertilidade e mortalidade prerreprodutiva, máis graves na poboación de DON. É de esperar que a perda de variabilidade veña acompañada dunha redución do potencial adaptativo que faga á especie máis sensible a eventos aleatorios, polo debe ser obxecto dunha consideración especial incluso no caso de que o número de exemplares siga a experimentar unha recuperación.

A perda de variabilidade e a acumulación de recesivos débese tanto ao rol das poboacións na estrutura xenómica pasada como á historia demográfica ancestral e recente, e é en base a esta información que se establecen os criterios de selección de individuos para a cría *ex situ* e o rescate xenético. Sería interesante, por tanto, a súa actualización, para incluír os novos núcleos poboacionais estables e monitorizar o impacto das traslocacións e reintroducións sobre a variabilidade. Por outra banda, a confrontación das dinámicas de deriva e purga xenética e as súas magnitudes relativas é responsable das observacións en canto a lastre xenético e depresión

consanguínea. Isto fai crucial, por tanto, a súa comprensión para asegurar a efectividade dos plans de conservación e a recuperación de potencial adaptativo.

As estratexias de conservación son eficaces e están a experimentar resultados positivos, combinando a abordaxe dos factores ecolóxicos responsables do declive cos xenéticos derivados do mesmo (rescate xenético por translocacións, reintroducións apoiadas en programas *ex situ*, etc.). O caso do lince é un exemplo extensible a especies en situación análoga de que o resultado da loita por saír dun vórtice de extinción está supeditado ao seu deseño integral, considerando o enfoque ecolóxico, xenético e a afectación do cambio climático a todos os anteriores. Tendo isto en conta resulta aconsellable manter e actualizar os esforzos realizados ata o momento, lembrando o carácter especialista da especie, a súa redución de potencial adaptativo, as previsións específicas en canto a cambio climático para a súa potencial área de distribución e a efectividade dos programas implementados.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Johnson, W. E.; *et al.* Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *Journal of Heredity*. **2004**, 95 (1). 19-28.
2. Abascal, F.; *et al.* Extreme genomic erosion after recurrent demographic bottlenecks in the highly endangered Iberian lynx. *Genome Biology*, **2016**, 17 (251).
3. Rodríguez, A. Lince ibérico - *Lynx pardinus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L. M., Salvador, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. **2004**. <http://www.vertebradosibericos.org/>
4. Aldama, J. J.; Beltran, J. F.; Delibes, M. Energy expenditure and prey requirements of free-ranging Iberian lynx in southwestern Spain. *The Journal of Wildlife Management*. **1991**, 55 (4). 635-641.
5. Palomares, F.; *et al.* Positive effects on game species of top predators by controlling smaller predator populations: an example with lynx, mongooses, and rabbits. *Conservation Biology*. **1995**, 9, (2) 295-305.

6. Ferrer, M.; Negro, J. J. The near extinction of two large European predators: super specialists pay a price. *Conservation Biology*. **2004**, 18 (2). 344-349.
7. Rodríguez, A; Delibes, M. Internal structure and patterns of contraction in the geographic range of the Iberian lynx. *Ecography*. **2002**, 25 (3) 314-328.
8. Palomares, F.; *et al.* Possible extinction vortex for a population of Iberian lynx on the verge of extirpation. *Conservation Biology*. **2012**, 26 (4). 689-697.
9. Peña, L.; *et al.* Histopathological and immunohistochemical findings in lymphoid tissues of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. **2006**, 29(2), 114-126.
10. Caballero, A. *Genètica de la conservació: l'aplicació dels conceptes de l'evolució a la conservació de la diversitat biològica*. Mètode Popular Science Journal. Universitat de Valencia, **2013**.
11. Frankham, R.; Ballou, J. D.; D. A. Briscoe. **2010**. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
12. MITECO, República Portuguesa, Grupo de trabajo del lince ibérico. *Censo del lince ibérico en España y Portugal, 2021*. **2021**.
13. Rodríguez, A.; Calzada, J. **2015**. *Lynx pardinus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2015*: e.T12520A50655794.
14. Casas-Marce, M.; Soriano, L.; López-Bao, J. V.; Godoy, J. A. Genetics at the verge of extinction: Insights from the Iberian lynx. *Molecular Ecology*. **2013**, 22 5503-5515.
15. Marmesat, E., *et al.* Retention of functional variation despite extreme genomic erosion: MHC allelic repertoires in the lynx genus. *BMC Evolutionary Biology*, **2017**, 17, 158.
16. Futuyma, D.; Kirkpatrick, M. *Evolution*. s.l.: Sinauer, 2017.
17. Kleinman-Ruiz, D.; *et al.* Purging of deleterious burden in the endangered Iberian lynx. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2022**, 119(11).
18. Ruiz-López, M. J.; *et al.* Heterozygosity-fitness correlations and inbreeding depression in two critically endangered mammals. *Conservation Biology*. **2012**, 26(6) 1121-1129.

19. Jiménez, M. A.; *et al.* Membranous glomerulonephritis in the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **2008**, *121*(1), 34-43.
20. Kleinman-Ruiz, D.; *et al.* Novel efficient genome-wide SNP panels for the conservation of the highly endangered Iberian lynx. *BMC Genomics*, **2017**, *18*, 556.
21. Ceballos, F. C., *et al.* Assessing Runs of Homozygosity: a comparison of SNP array and whole genome sequence low coverage data. *BMC Genomics*. **2018**, *19*(1).
22. Casas-Marce, M.; *et al.* Spatiotemporal dynamics of genetic variation in the Iberian lynx along its path to extinction reconstructed with ancient DNA. *Molecular Biology and Evolution*. **2017**, *34*(11), 2893-2907.
23. Rodríguez-Varela, R.; *et al.* Ancient DNA evidence of Iberian lynx palaeoendemism. *Quaternary Science Reviews*. **2015**, *112*, 172-180.
24. Vargas, A., Sánchez, I., Godoy, J., Roldán, E., Martínez, F. & Simón, M. (eds). **2007**. Plan de Acción para la cría en cautividad del lince ibérico: Cuarta edición. MITECO.
25. Segelbacher, G.; *et al.* New developments in the field of genomic technologies and their relevance to conservation management. *Conservation Genetics*. **2022** *23*, 217-242.
26. Kleinman-Ruiz, D.; *et al.* Genetic evaluation of the Iberian lynx ex situ conservation programme. *Heredity*. **2019**, *123*, 647-661.
27. Ralls, K.; *et al.* Genetic rescue: A critique of the evidence supports maximizing genetic diversity rather than minimizing the introduction of putatively harmful genetic variation. *Biological Conservation*, **2020**, 251.
28. Grupo de trabajo del Lince Ibérico. MITECO. Conferencia Sectorial de Medio Ambiente. *Estrategia para la conservación del lince ibérico II (Lynx pardinus)*. **2008**.
29. Palomares, F.; *et al.* Assessment of the Conservation Efforts to Prevent Extinction of the Iberian Lynx. *Conservation Biology*. **2011**, *25*, 4-8.
30. Fordham, D. A., *et al.* Adapted conservation measures are required to save the Iberian lynx in a changing climate. *Nature Climate Change*, **2013**, *3*, 899-903.