lynxconnect

Metodología para el seguimiento genético no invasivo del lince ibérico

Autores:

José A. Godoy
Estación Biológica de Doñana (EBD, CSIC)

Alejandro Rodríguez
Estación Biológica de Doñana (EBD, CSIC)

José Jiménez
Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos - IREC (CSIC-UCLM-JCCM)

Beneficiario coordinador:

Junta de Andalucía

Socios beneficiarios:

El presente documento ha sido realizado por el Equipo del Proyecto LIFE NATURALEZA Y BIODIVERSIDAD LIFE 19NAT/ES001055 LINXCONNECT: “CREANDO UNA METAPOBLACIÓN GENÉTICA Y DEMOGRÁFICAMENTE FUNCIONAL DE LINCE IBÉRICO (L*ynx pardinus*)”

Table of Contents

1 Antecedentes y objetivos 5

2 Protocolos de campo: Registro de datos y toma de muestras 7

2.1 Conservación y envío de muestras de sangre o tejidos. 8

2.1.1 Sangre. 8

2.1.2 Tejidos solidos obtenidos en necropsias. 8

2.1.3 Registro y envío de muestras de sangre y tejidos. 9

2.2 Toma, conservación y envío de muestras fecales y otras muestras no invasivas. 9

2.2.1 Estrategias de muestreo de heces 9

2.2.2 Toma y registro de muestras fecales. 11

3 Protocolos de laboratorio 12

3.1 Extracción de ADN 12

3.1.1 Extracción de ADN de muestras de sangre o tejido. 12

3.1.2 Extracción de ADN fecal. 12

3.2 Identificación de especie y prueba de amplificabilidad de ADN mitocondrial .. 13

3.3 Prueba de amplificabilidad de ADN nuclear. 13

3.4 Identificación molecular del sexo 14

3.5 Genotipado de SNPs 14

3.5.1 Selección de marcadores. 14

3.5.2 Plataforma de genotipado SNPs. 15

3.5.3 Revisión, evaluación y filtrado de los genotipos 16

4 Análisis de datos genéticos 16

4.1 Asignación de muestras a individuos y compilación de censos 16

4.2 Asignación de parentales y reconstrucción de genealogías 17

4.3 Estimación de ancestría poblacional. 18

4.4 Estimas de consanguinidad individual y parentesco 18

4.4.1 Estimas basadas en pedigrí 18

4.4.2 Estimas basadas en marcadores moleculares 18

4.5 Identificación de migrantes y asignación a su población de origen 19

4.5.1 Basado en asignaciones probabilísticas de individuos a poblaciones 19

4.5.2 Basado en redes de parentesco cercano 19

5 Estimas de parámetros genéticos poblacionales 20

5.1 Diversidad genética y endogamia poblacional 20

5.2 Estructura y flujo génico 20

5.3 Tamaños efectivos poblacionales 21

6 Estimas de densidad y tamaño poblacional con modelos de captura-recaptura espacial (José Jiménez) 21

7 Referencias 23

1 Antecedentes y objetivos

La contracción y el aislamiento de poblaciones pueden provocar cambios en su composición genética con probables consecuencias negativas para su viabilidad. Por un lado, la pérdida de diversidad genética supone una disminución de la capacidad de adaptación a cambios ambientales (i.e. el potencial adaptativo); por otro, la acumulación de consanguinidad y de alelos deletéreos puede afectar negativamente a la reproducción o la supervivencia (i.e. depresión consanguínea). Estos procesos pueden precipitar la extinción de una especie o lastrar su recuperación, incluso cuando las causas que provocaron originalmente el declive hayan desaparecido. Es, por lo tanto, muy importante evaluar el estado genético de las poblaciones de especies amenazadas y, en caso necesario, implementar medidas de gestión que ayuden a preservar la diversidad y minimicen la consanguinidad.

El lince ibérico (*Lynx pardinus* Temminck, 1927) ha sufrido un marcado declive poblacional que ha resultado en dos poblaciones pequeñas y aisladas entre sí. Esta historia demográfica reciente ha conllevado un acusado deterioro genético, que ha afectado también a genes clave en respuesta inmune y al genoma en general, para el que se han registrado signos de extrema erosión genética, incluida la acumulación de alelos deletéreos (Abascal *et al.* 2016; Kleinman-Ruiz *et al.* 2022; Lucena-Perez *et al.* 2021). Esta erosión parece estar detrás de las tasas reducidas de reproducción y supervivencia de los linces de Doñana (Palomares *et al.* 2012), y podría estar relacionada con la alta incidencia de depleción linfoide, glomerulonefritis, epilepsia juvenil y criptorquidismo. Además, se ha demostrado una relación negativa entre consanguinidad y calidad seminal (Ruiz-López *et al.* 2012), y efectos significativos de la ancestría poblacional sobre la reproducción y de la consanguinidad individual sobre la supervivencia en linces cautivos (Cuenca *et al*., en preparación). Los efectos detectados en cautividad se esperan mayores en condiciones de campo, más demandantes. Finalmente, el éxito de los individuos de ancestría mixta, tanto en cautividad como en el campo, aportan indicios adicionales de la ocurrencia de depresión consanguínea en el lince ibérico (Cuenca *et al*., en preparación; López et al., en preparación).

En los últimos años, el lince ibérico está siendo objeto de enormes esfuerzos para su conservación, que incluyen programas de conservación *in situ* y *ex situ,* y que conllevan actuaciones de captura para cría en cautividad, traslados para reforzamiento de poblaciones y liberaciones para reintroducción en áreas de presencia histórica. Una importante parte de los esfuerzos de conservación se dirigen a establecer nuevas poblaciones viables en áreas de presencia histórica, usando como fuente principal los linces producidos por el programa de conservación *ex situ*. Sin embargo, la viabilidad de estas nuevas poblaciones dependerá en buena medida de que se asegure una diversidad genética suficiente y se evite la acumulación de consanguinidad durante los primeros años, al menos hasta que las distintas poblaciones

alcancen un tamaño suficiente y lleguen a estar suficientemente conectadas por dispersión natural (Revilla *et al.* 2015). A la vez, se ha de seguir asegurando el potencial genético de la población cautiva fuente y se ha de completar la restauración genética de las poblaciones silvestres remanentes. Ante esta nueva y más compleja situación, se hace ahora necesario plantear una gestión genética integral del conjunto de la especie, que responda de manera específica a las peculiares necesidades de los distintos tipos de población ahora existentes (Figura 1). Esta gestión genética no puede restaurar la diversidad global perdida definitivamente, pero podrá maximizar la diversidad y minimizar la consanguinidad de cada subpoblación (remanentes, cautivas y reintroducidas) y contribuir así a aumentar las probabilidades de éxito de estos programas y la viabilidad demográfica y genética de la especie.

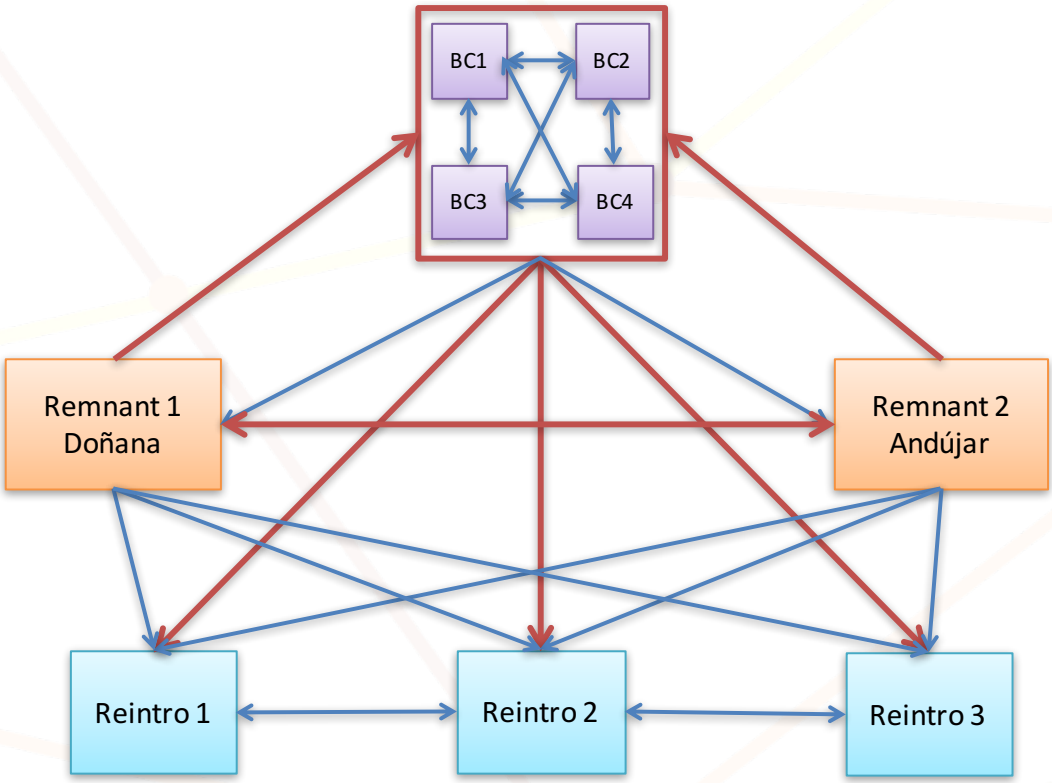


Figura 1. Gestión genética integral del lince ibérico. La situación actual de la conservación de la especie incluye una población cautiva distribuida en cuatro centros (BCx), dos poblaciones silvestres remanentes (Doñana y Andújar) y varias poblaciones reintroducidas (Reintro x). La gestión genética integral de la especie se ocuparía de establecer los cruzamientos y contribuciones óptimas en la población cautiva y de optimizar los traslados de individuos entre centros de cautividad, desde la población cautiva a silvestres (liberaciones para reforzamiento y reintroducción), de poblaciones silvestres a cautivas (reclutamiento de nuevos fundadores para cría en cautividad), y entre poblaciones silvestres (remanentes y reintroducidas) para reforzamiento genético. El objetivo general es maximizar la diversidad y minimizar la consanguinidad en cada población y minimizar la diferenciación genética entre poblaciones.

La gestión genética requiere un conocimiento preciso de la composición genética, e idealmente de la genealogía, de cada una de las poblaciones. Este puede ser obtenido a través de la caracterización genética con marcadores moleculares de muestras obtenidas de manera no invasivas (e.g. excrementos, pelos) (Carroll *et al.* 2018). Las etiquetas genéticas obtenidas de estas muestras permiten identificar, además del propio individuo, a sus padres, hermanos y otros parientes cercanos, lo que aporta información clave sobre la reproducción y permite la reconstrucción de pedigrís. Estos pedigrís capturan la historia de la población, aportan estimas de parámetros demográficos y genéticos y sirven de base para la gestión genética.

El socio EBD-CSIC acumula muchos años de experiencia en el uso de muestras no invasivas para el seguimiento genético del lince ibérico. Trabajos previos han evaluado y optimizado diversos elementos del protocolo, incluida la toma de muestra, la conservación, la extracción del ADN, la selección de marcadores (microsatélites), y los protocolos de genotipado. Igualmente importante en el uso de este tipo de muestras, es la adopción de métodos de análisis de datos que permitan detectar y minimizar los errores de genotipado e incorporar estos errores, incluyendo la identificación individual, la asignación de parentales y las estimas de parentesco. Una falta de rigor en el tratamiento de estos aspectos podría resultar en estimas demográficas y genéticas severamente sesgadas y en recomendaciones de gestión subóptimas.

Algunos aspectos de los protocolos moleculares necesarios para el seguimiento genético del lince ibérico, han sido desarrollados por estudios previos, incluyendo aspectos como la toma de muestras, la extracción de ADN y la selección de nuevos marcadores moleculares tipo SNPs, más eficientes, económicos y poderosos (Kleinman-Ruiz *et al.* 2017; Palomares *et al.* 2011; Ramon-Laca *et al.* 2015). Además, los trabajos previos han permitido generar una base de datos de partida de más de 500 genotipos para 36 marcadores tipo microsatélites y de 330 genotipos para 1490 SNPs, que aportan una buena representación de la variación genética remanente de la especie en el periodo 1990-2014.

A continuación, se propone la metodología de un programa de seguimiento genético de individuos y poblaciones de lince ibérico que sirva de base para la implementación de un programa de gestión genética integral para la especie.

2 Protocolos de campo: Registro de datos y toma de muestras

La gestión genética del lince ibérico requiere un conocimiento preciso de la composición genética, e idealmente del pedigrí, de cada una de las poblaciones involucradas. Para ellos se tomarán muestras para análisis genéticos de los individuos capturados por cualquier motivo o encontrados muertos, que serán enviadas al socio EBD-CSIC para su catalogación, registro y almacenamiento. En el caso de las poblaciones silvestres (remanentes o reintroducidas) este

muestreo oportunista debe ser complementado con un muestreo sistemático de muestras obtenidas de manera no invasivas (e.g. excrementos, pelos) (Carroll *et al.* 2018).

2.1 Conservación y envío de muestras de sangre o tejidos.

Estos procedimientos deben asegurar el mantenimiento de la integridad del ADN durante el almacenamiento y envío de muestras, y evitar la contaminación cruzada entre muestras. Los métodos efectivos para la preservación del ADN en muestras de tejidos incluyen la congelación, la deshidratación y la adición de soluciones, teniendo cada uno sus ventajas e inconvenientes. En base a nuestra experiencia previa proponemos los siguientes métodos para cada una de las muestras posibles:

2.1.1 Sangre.

Una opción conveniente para la conservación de muestras de sangre para análisis genéticos que evita la necesidad de congelación es la mezcla de la sangre recién extraída con soluciones que lisan las células y evitan la degradación del ADN. Una de estas soluciones es el TES (100mM Tris pH 7,5, 100mM EDTA, 2% SDS). La sangre total recién extraída se debe mezclar en una proporción 1:4 con la solución TES. Habitualmente recomendamos tomar por duplicado, dos ml de sangre en ocho ml de TES en tubos de 15 ml. El equipo se compromete a preparar y distribuir tubos con 8 ml de TES a las administraciones, centros de cría y equipos de campo durante la vigencia de este contrato.

Alternativamente, la sangre recién extraída en tubos con heparina o EDTA puede congelarse directamente, pero en este caso debe mantenerse congelada durante su conservación y envío al laboratorio. El mismo procedimiento puede aplicarse a las células que quedan después de la centrifugación para la obtención de plasma, o al coágulo que queda después de la extracción del suero, aunque estas muestras introducen algunas dificultades durante la extracción del ADN que las hacen menos útiles que la sangre mezclada en TES.

2.1.2 Tejidos solidos obtenidos en necropsias.

Cualquier órgano o tejido obtenido de un cadáver puede ser utilizado para la extracción de ADN y posterior caracterización genética. Se ha de tener en cuenta que la cantidad y la integridad del ADN disminuyen rápidamente después de la muerte, por lo que es aconsejable obtener las muestras de animales recién muertos o inmediatamente después que el cadáver es encontrado.

Se recomienda muestrear un trozo de músculo de aprox. 1 cm^3. La muestra se puede congelar inmediatamente si se puede asegurar el mantenimiento de la muestra a una temperatura <

20ºC hasta la recepción en el laboratorio. Alternativamente, el tejido se puede trocear con bisturí en fragmentos de menos de 2 mm^3 y añadir etanol 95% (> 5 ml).

2.1.3 Registro y envío de muestras de sangre y tejidos.

Es importante asociar cada muestra física con la información disponible sobre el individuo. Para ello, se diseñará una plantilla (Anexo I) en formato Excel para la entrada de datos que serán acumulados en una base de datos de muestras mantenida por el laboratorio genético. Estos datos se imprimirán y se remitirán junto con las muestras. A la recepción de éstas se firmará un acuse de recibo que se devolverá al remitente.

2.2 Toma, conservación y envío de muestras fecales y otras muestras no invasivas.

Al emplear muestras no-invasivas es necesario tener en cuenta una serie de inconvenientes que suelen acompañarlas como son la poca cantidad y calidad del ADN que se puede obtener, así como problemas de contaminación y de presencia de inhibidores de la PCR, que pueden limitar su aplicación en determinados estudios (Taberlet *et al.* 1999). Un primer paso importante es la recolección de muestras fecales siguiendo una estrategia adecuada al objetivo que se persigue y unas metodologías que maximicen la probabilidad de obtener un genotipo fiable de esas muestras. Igualmente importante es que cada muestra vaya acompañada de los datos que permitan la obtención de las estimas demográficas y genéticas que se persiguen.

2.2.1 Estrategias de muestreo de heces

La eficacia de un programa de seguimiento genético basado en el genotipado de muestras no invasivas demanda una doble optimización: maximizar la proporción de individuos presentes en la población que son identificados genéticamente y, al mismo tiempo, minimizar el esfuerzo de muestreo.

Maximizar la proporción de linces detectados requiere comprender la relación que existe entre densidad de población, conducta de marcaje y probabilidad de encontrar heces. Actualmente la densidad de población se estima combinando distintas fuentes de información, básicamente la prospección exhaustiva con cámaras trampa de zonas donde se detecta la presencia de la especie, el uso del espacio de algunos individuos determinado a partir de telemetría, y la cartografía de territorios a partir de indicios de reproducción de distinta índole (Lopez-Parra *et al.* 2012; Rueda *et al.* 2021; Sarmento *et al.* 2017). El conocimiento existente de la conducta de marcaje con heces en el lince ibérico es bastante rudimentario, y se limita a señalar características fisiográficas o de hábitat con alta probabilidad de hallar excrementos (Alfaya *et al.* 2020; Burgos *et al.* 2019; Robinson & Delibes 1988), cuya generalidad no se ha comprobado. Algunos estudios piloto relacionan la intensidad de marcaje y la distribución espacial de las marcas con el uso del espacio de los individuos que las producen (Palomares *et*

al. 2011; Rodríguez *et al.* 2009). La probabilidad de encontrar heces depende de la interacción entre densidad de linces y patrón espaciotemporal de la conducta de marcaje y es desconocida. También depende de factores externos como la tasa de degradación del ADN de lince presente en la superficie de los excrementos bajo distintas condiciones ambientales.

Para minimizar el esfuerzo de muestreo es preciso predecir con alta probabilidad donde encontrar excrementos con condiciones adecuadas para la obtención de un genotipo, y predecir dónde y cuándo es más probable encontrar muestras producidas por los individuos de interés. Es más probable encontrar muestras en zonas despejadas, sobre todo caminos, que en zonas con alta cobertura herbácea o arbustiva (Robinson & Delibes 1988). Los linces defecan en letrinas que, con independencia de su tamaño, contienen excrementos producidos por varios individuos (Palomares *et al.* 2011; Rodríguez *et al.* 2009), de modo que, si hubiera una limitación en los costes del análisis, es recomendable colectar muestras en letrinas si el objetivo es maximizar el número de individuos detectados. Los resultados preliminares de varias experiencias piloto sugieren que, aplicando un muestreo sistemático de todos los caminos que solapan el área utilizada por varias hembras reproductoras sería posible detectar una fracción elevada de los individuos, sobre todo si el muestreo se replica en distintas estaciones del año. La elección de la estación de muestreo depende de los patrones de reproducción y de dispersión juvenil (Ferreras *et al.* 2023) y de si el objetivo principal del muestreo es inventariar los individuos reproductores o su descendencia. Esta información se ha obtenido en algunos núcleos de la población de linces de Doñana. Por el momento ignoramos hasta qué punto es extrapolable a otros núcleos y poblaciones.

En todos estos aspectos hay margen de mejora para la caracterización y cuantificación de los elementos que afectan al diseño de un programa de seguimiento genético eficaz. Durante el desarrollo de las actuaciones previstas en Lynxconnect se espera avanzar en la comprensión de las relaciones entre patrones espaciotemporales en la conducta de marcaje y la detección de individuos por métodos moleculares y en los factores ambientales que afectan al hallazgo de material genético de suficiente calidad en las muestras fecales, lo que permitiría diseñar estrategias óptimas de muestreo en función de los objetivos.

A continuación se proponen estrategias de muestreo para dos posibles objetivos.

2.2.1.1 Muestreo sistemático de territorios conocidos para censos y gestión genética

Con el estado actual del conocimiento, y con el objetivo de obtener un censo de animales residentes que sirva de base a la gestión genética de la especie, se propone una estrategia de muestreo que consiste en la colecta de al menos 20 excrementos por territorio conocido de lince. Para aumentar la eficacia del genotipado, se favorecerán excrementos con aspecto oscuro y brillante frente a excrementos grisáceos o blanquecinos. Esta estrategia permitiría muestrear con alta probabilidad el animal residente. Esta estrategia se complementaría con un

muestreo sistemático sobre áreas de presencia probable para la detección de nuevos territorios.

2.2.1.2 *Muestreo aleatorio para la estima de densidades y tamaños poblacionales por métodos de captura*

La estima de densidades y tamaños poblacionales mediante modelos de captura-recaptura espacialmente explícitos (SCR) requiere una intensidad de búsqueda mínima, para disponer de datos suficientes, y del registro de los recorridos para modelizar el esfuerzo de muestreo. En base a la experiencia previa se proponen las siguientes:

1. El tamaño mínimo del área muestreada debiera ser al menos dos veces el área de campeo de un macho en la zona de estudio.
2. Las estimas son posibles -en un lugar determinado- con al menos 20 recapturas, y de ellas, 15 recapturas espaciales (el mismo animal en diferentes celdas) (Efford et al., 2004). Aunque en casos extremos se pueden utilizar menos datos, la precisión se va a reducir, y es posible que haya sesgos en las estimas.
3. Se recomienda utilizar datos adicionales para mejorar la precisión en las estimas. Así, por ejemplo, si se dispone de datos GPS de animales radiomarcados o de fototrampeo con identificación individual, en la zona de trabajo y en la época de muestreo, se deben utilizar. En determinados casos, el uso de alguna extensión, como *random thinning*-SCR (Jiménez et al., 2021) puede ser aconsejable.
4. La recogida de muestras dentro de cada zona debe ser homogénea. Debe hacerla personal con un nivel similar de conocimiento de la zona y de la especie.

2.2.2 Toma y registro de muestras fecales.

Nuestros trabajos anteriores se han basado en la recolección de trozos de heces que eran almacenadas en botes conteniendo gel de sílice deshidratante. Una vez en el laboratorio, se colectaba la capa superficial y se sometía a un lavado y posterior centrifugación para intentar recolectar las células intestinales, que servían como material de partida para la extracción de ADN. Trabajos posteriores mostraron la superioridad y mayor conveniencia del uso de hisopos de algodón para recolectar la capa superficial conteniendo las células intestinales (Ramon-Laca *et al.* 2015).

2.2.2.1 *Toma de muestra fecal*

Las muestras fecales se obtendrán mediante el raspado de la capa superficial del excremento, previamente humedecida en tampón PBS (10 mM PO_4^{3-}, 137 mM NaCl y 2.7 mM KCl) con un hisopo de algodón. El hisopo se introduce inmediatamente en 1.5 ml de solución de tampón de lisis (0,1 Tris-HCl pH 8; 0,1 M Na EDTA; 0,01 M NaCl, 0,5 % SDS) en un tubo Eppendrof de 2 ml con tampón de rosca, previamente etiquetado con un código de barras codificando un identificador individual alfanumérico único. Durante la toma de muestras fecales es especialmente importante evitar la contaminación cruzada entre muestras, para lo que se usarán guantes que se desecharán después de manipular cada excremento. Registro de datos de muestras fecales.

El registro de los datos asociados a cada muestra fecal se realizará con la aplicación CyberTracker. CyberTracker es una app gratuita que se debe instalar en teléfonos Android junto con la secuencia (plantilla) diseñada ad hoc para este procedimiento. La secuencia registra: la población, el colector, el recorrido mediante GPS, las observaciones de excrementos, las muestras colectadas y la lectura del código de barra el tubo correspondiente. Para cada muestra se registra: Tipo. (letrina/aislado) y Apariencia (oscuro brillante, oscuro mate, gris, blanquecino). Los datos se guardan en el teléfono y se envían directamente a un servidor dedicado al terminar la sesión, o cuando haya cobertura 4G o WiFi. El servidor permite automatizar tanto el envío y recepción de datos, como las posibles actualizaciones de la secuencia.

Dado que la toma de muestras habitualmente la realizan los técnicos de campo, se ha elaborado instrucciones detalladas del procedimiento de toma de muestras y registro de datos en formato texto (Anexo II) y en formato video (Anexo III).

3 Protocolos de laboratorio

El programa de seguimiento genético generará y actualizará una base de genotipos de referencia obtenidos a partir de muestras de tejidos colectadas en revisiones sanitarias o de necropsias. Estos genotipos constituirán una etiqueta genética individual para el seguimiento de individuos y de la reproducción. Esta base de datos se completará con los genotipos de los nuevos individuos nacidos en la naturaleza e identificados a partir del análisis de excrementos.

Para ello se plantea la siguiente metodología:

3.1 Extracción de ADN

3.1.1 Extracción de ADN de muestras de sangre o tejido.

Para la extracción de ADN de muestras de sangre y tejidos se propone un sistema basado en unión a bolas magnéticas que puede implementarse en un sistema robotizado ya disponible en nuestros laboratorios (Maxwell 16 Promega) (Anexo IV). Alternativamente, para muestras problemáticas se usará el método clásico de extracción orgánica con fenol/cloroformo y precipitación con etanol (Sambrook & Russell 2001) (Anexo V). La calidad del DNA obtenido se estima mediante espectrofotometría y la concentración mediante fluorometría, usando el fluorímetro Qubit 3.0 y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.1.2 Extracción de ADN fecal.

Las muestras no invasivas (excrementos, pelos e hisopos provenientes de ataques) son procesadas de manera individual en un laboratorio especialmente dedicado al manejo de muestras subóptimas, que se mantiene libre de muestras frescas o productos de PCR que puedan convertirse en fuente de contaminación. En el caso de los excrementos, el hisopo

enriquecido en células intestinales se somete a una extracción de ADN siguiendo una el método GuSCN/sílica de HöSS & PääBO (1993) (Höss & Pääbo 1993), adaptado para su implementación en placas de 8x12 muestras. El ADN se eluye en un volumen final de 50 µl y se conserva a -20º C hasta su utilización. En cada tanda de extracción se incluyen al menos cuatro controles negativos (sin añadir muestra) para detectar posibles problemas de contaminación. Para más detalles del protocolo consultar anexo VI.

3.2 Identificación de especie y prueba de amplificabilidad de ADN mitocondrial.

Una vez completada la extracción de ADN de las muestras no invasivas se realiza el ensayo diagnóstico de lince ibérico descrito en Palomares et al. (2002) (Palomares *et al.* 2002). Brevemente, se usan cebadores específicos de la especie (DL7F/CR2BR) para amplificar un fragmento de 120 pb de la región control mitocondrial en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una amplificación positiva en esta PCR confirma la asignación de esa muestra a lince ibérico, mientras que una negativa nos indica que esa muestra no tiene ADN suficiente de lince o que pertenece a otra especie. Cuando esto sucede, y para discernir entre estas dos posibles interpretaciones, se realiza una nueva PCR utilizando cebadores no específicos que generan productos de amplificación en un amplio espectro de especies, incluyendo la mayoría de carnívoros ibéricos. El fragmento no específico amplificado es del gen ATP6 de 172 pares de bases (cebadores Atp6_df3/Atp6_dr1) (Chaves *et al.* 2012). En el caso de que esta amplificación sea positiva confirma que se ha conseguido extraer ADN mitocondrial de las muestras y que es amplificable, pero que este no pertenece a lince ibérico. En caso necesario, además de estos dos ensayos se realizan otras dos PCRs con cebadores específicos de otras posibles especies predadoras, zorro y canidos de 227pb y 252pb respectivamente (VvulpesF2/R2 y ClupusF1/R1) (Fernandes *et al.* 2008). (Anexo VII) Con cada tanda de muestras se incluyen controles negativos de extracción y de PCR para detectar posibles problemas de contaminación. Todos los productos de amplificación se analizan por electroforesis en gel de agarosa.

3.3 Prueba de amplificabilidad de ADN nuclear.

Para evaluar la amplificabilidad de ADN nuclear se utiliza un microsatélite fácilmente amplificable (Ip82) (Casas-Marce *et al.* 2013). Aquellas muestras que presentan amplificación positiva en esta prueba se seleccionan para el genotipado posterior. La obtención de un producto de Ip82 con el tamaño esperado en lince ibérico permite una confirmación adicional del diagnóstico de especie, mientras que la obtención de un producto de tamaño superior confirmaría la asignación a otra especie, habitualmente zorro.

3.4 Identificación molecular del sexo

Un primer ensayo para la identificación del sexo de las muestras fecales se basa en la amplificación de en un fragmento del gen de la amelogenina, diseñado para el sexado molecular de felinos (Pilgrim *et al.* 2005) que resulta fiable, rápido y económico. Este gen presenta copias homólogas en el cromosoma X como en el Y, aunque con notables diferencias en la secuencia y estructura del ADN. Los fragmentos amplificados corresponden a un intrón que presenta diferente tamaño en la copia del X y en la Y, por lo que pueden ser distinguidos por electroforesis en gel de agarosa, de modo que los machos presentan dos bandas mientras que en las hembras aparece solo una. Los cebadores propuestos originalmente amplifican correctamente en lince ibérico, pero presenta el inconveniente de que también amplifica ADN de humanos y conejos, principal fuente de contaminación y de contenido alimenticio, respectivamente, en extractos fecales, por lo que se rediseñaron cebadores para excluir la amplificación de estas fuentes (Roques *et al.*, 2014). El ensayo presenta la ventaja adicional de que el fragmento más pequeño, y por lo tanto el más fácilmente amplificado a partir de ADN degradado, es el de ZFY, el específico de macho, lo que minimiza las probabilidades de falsas hembras. No obstante, para una máxima fiabilidad se recomienda hacer cuatro réplicas del ensayo y determinar el sexo a partir del consenso de las cuatro réplicas.

3.5 Genotipado de SNPs

3.5.1 Selección de marcadores.

Los 286 SNPs a genotipar son un subconjunto de los 343 seleccionados por Kleinman et al. (2017) (Anexo VIII). Estos SNPs fueron escogidos por ser los que mayor grado de heterocigosis y menor desequilibrio de ligamiento presentaban para las frecuencias alélicas de la población cautiva. Además, se dispone de dos ensayos para SNPs ligados al sexo, que fueron a partir de las secuencias de los genes SRY (cromosoma Y) y ZF (cromosomas X e Y) de las cuatro especies del género lince, de humanos y de conejo, con el objetivo de hacerlos diagnósticos de sexo y específicos de lince ibérico (Godoy *et al.* 2005).

Para su uso con muestras no invasivas se seleccionó inicialmente un subconjunto de 94 SNPs autosómicos del total de 343. En una fase posterior, se excluyeron los marcadores con tasas altas de fracaso de genotipado y/o tasas de errores, resultando en un panel con altas tasas de eficiencia y fiabilidad en el genotipado y máximamente informativo para la población cautiva. Con este set de 96 SNPs se alcanza un poder de identificación individual de $2.4*10^{-22}$, valor suficiente para realizar análisis de asignación de individuos (asignar los genotipos obtenidos de muestras no invasivas a individuos) y un poder de exclusión del primer parental de $2.4*10^{-09}$ en análisis de paternidad. Este panel se ha mostrado útil también para las poblaciones reintroducidas, que mantienen frecuencias alélicas similares a la población cautiva.

Para las poblaciones remanente de Doñana y Andújar, con frecuencias alélicas distintas a la población cautiva, se podrían seleccionar paneles optimizados para cada de ellas. Además, se podrían diseñar subpaneles de tamaños reducidos (e.g. 24 o 48 SNPs), pero con poder suficiente para la discriminación individual, para un primer escrutinio de individuos en poblaciones que acumulen un número alto de genotipos de referencia y en las que la mayoría de las muestras corresponderán a individuos ya conocidos (recapturas). Aquellas muestras de mejor calidad de las que obtengan con este panel reducido genotipos no observados previamente serán genotipadas para al menos 48 SNPs adicionales para la asignación de parentales, y hasta 286 SNPs para las estimas de parentesco y la estima de parámetros genéticos individuales y poblacionales.

3.5.2 Plataforma de genotipado SNPs.

Para el genotipado de SNPs se usará una tecnología basada en la amplificación específica de alelo con marcadores fluorescentes en una plataforma microfluídica disponible en nuestros laboratorios (Juno y Biomark, Fluidigm Corp., South San Francisco, CA, USA). La tecnología aporta una excelente combinación de propiedades deseables, como la flexibilidad, la eficacia, la sensibilidad y una buena relación coste-beneficio. Permite genotipar tandas de 96 muestras para 96 SNPs utilizando los “Fluidigm 96.96 Dynamic Arrays”, aunque existen otras opciones de formato (48x48; 192x24). La plataforma incluye el software necesario para la llamada automática de genotipos, permitiendo la supervisión posterior por el usuario (Fluidigm SNP Genotyping Analysis Software). Esta plataforma ya está siendo usada para el genotipado de SNPs en lince ibérico con excelentes resultados. Los ensayos son del tipo “SNP-Type” y se ejecutan siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo IX).

El protocolo de genotipado ha de adaptarse a las limitaciones que conllevan las muestras no invasivas (Anexo X). Para ello, se incorporan las modificaciones al protocolo de genotipado descritas por von Thaden *et al* (2017) (von Thaden *et al.* 2017). De forma resumida, se realizan dos reacciones de PCR consecutivas. En la primera, los 96 SNPs se preamplifican en una única reacción con cebadores específicos de locus (reacción STA) para generar cantidades suficientes de molde, que serán usadas en la posterior reacción de genotipado. A continuación, se utilizan cebadores específicos de alelos marcados con fluorescencia para amplificar ambos alelos en una PCR de genotipado independiente para cada marcador. Por último, las señales de fluorescencia de cada reacción se miden al final de la PCR para determinar si el individuo era homocigoto o heterocigoto para ese SNP. Las modificaciones incorporadas incluyen el aumento de la cantidad de ADN en las STA-PCR hasta 3,2 µl (en lugar de 1,25 µl), el aumento del número de ciclos de la STA-PCR de 14 a 28, y la dilución 1:10 (en lugar de 1:100) del producto de la STA-PCR.

Las muestras se analizan junto con cuatro reacciones sin ADN molde (No Template Control, NTC) por placa para controlar posibles casos de contaminación.

3.5.3 Revisión, evaluación y filtrado de los genotipos

El análisis de los SNP se realiza con el software Fluidigm SNP Genotyping Analysis, validando manualmente los diagramas de dispersión generados automáticamente. Aquellos SNPs en los que al menos un NTC se superponga con los grupos de genotipos de las muestras o en los que los grupos de alelos no estén claramente separados entre si se eliminan, ya que las asignaciones de estos loci no son fiables.

Para facilitar la llamada de genotipos y mejorar el análisis de agrupamiento, se incorporan bibliotecas de genotipos de referencia de ensayos previos, que normalmente deben incluir muestras de buena calidad y ambos tipos de homocigotos. Los genotipos incompletos, es decir, con menos del 85% de los loci tipados, se descartan, ya que el no amplificar una gran cantidad de loci se asocia con una fiabilidad del genotipo muy baja.

4 Análisis de datos genéticos

4.1 Asignación de muestras a individuos y compilación de censos

Los genotipos obtenidos a partir de muestras no invasivas se comparan entre ellos y con los genotipos de los individuos candidatos de referencia en nuestra base de datos utilizando el software Cervus 3.0 (Kalinowski *et al.* 2007), que lleva a cabo comparaciones por pares entre todos los genotipos individuales y devuelve valores para Probabilidad de identidad y probabilidad de identidad entre hermanos (pID y pIDsib, respectivamente) para las coincidencias perfectas observadas. Paralelamente, se realizan las mismas comparaciones con el paquete de R allelematch (Galpern *et al.* 2012). Esta herramienta permite el uso de grandes conjuntos de datos que contienen múltiples muestras de cada individuo (una situación común en la genética de la conservación, particularmente en aplicaciones de muestreo no invasivo de vida silvestre). Además, incorpora explícitamente el análisis de datos faltantes y puede tolerar discrepancias de alelos creadas por errores de genotipado, permitiendo la agrupación de varios genotipos a un mismo individuo, incluso en presencia de errores y estimando el número de errores permitidos para las agrupaciones.

Teniendo en cuenta esto, se asignan a un individuo de referencia todas aquellas muestras cuyo genotipo presenta entre 0 y el número máximo de discrepancias calculado con Allelematch. En aquellos casos en los que varias muestras presentan un mismo genotipo pero este no sea compatible con ninguno de los individuos de referencia se crea un nuevo individuo,

temporalmente con identidad desconocida, y se añade a la base de datos de referencia de genotipos. Por último, aquellas muestras que presentan un porcentaje de loci tipados mayores del 85% pero que no se agrupan con ninguna otra se replican. Si el nuevo genotipo no presenta incompatibilidades con el obtenido previamente se crea un nuevo individuo y se añade a la base de datos de referencia de genotipos. En estos casos, consideramos que no es necesario replicar las muestras ya que la probabilidad de que, por errores de genotipado, dos muestras distintas presenten el mismo genotipo es prácticamente nula y por tanto consideramos estas asignaciones como fiables.

En aquellos casos en los que se presentan incompatibilidades la muestra se genotipa dos veces más y se obtiene un genotipo consenso de las tres réplicas. Para ello se desarrolló un script de R personalizado que sigue los mismos criterios que el programa GIMLET 1.3.3 (Probability method =1) (Valière 2002), pero que modifica los homocigotos con una sola observación a “No call”. El genotipo consenso generado se compara entonces con la base de datos de genotipos de referencia.

Los genotipos obtenidos se almacenarán en una base de datos relacional junto con información de individuos y muestras que se integrarán en el laboratorio online para el seguimiento y la gestión genética de la especie (a desarrollar en la Acción A.7). Esta base de datos de genotipos es dinámica y en ocasiones, muestras asignadas inicialmente a un individuo desconocido podrán asignarse eventualmente a un lince de identidad conocida cuando este lince se genotipe a partir de muestras de tejido.

4.2 Asignación de parentales y reconstrucción de genealogías.

Para la asignación de parentales se usarán los programas Cervus, COLONY y Sequoia. Cervus utiliza la verosimilitud para asignar la paternidad al candidato más verosimil, permitiendo la posibilidad de que los genotipos de los padres y la descendencia puedan contener errores y determinando a través de la simulación el nivel de confianza en las paternidades que asigna (Kalinowski *et al.* 2010). COLONY implementa un método de máxima verosimilitud para asignar camadas y paternidad conjuntamente, utilizando genotipos multilocus (Jones & Wang 2010). Este último programa ya fue utilizados para la reconstrucción de la genealogía de la población de Doñana a partir de genotipos de microsatélites (Lucena-Perez *et al.* 2018). El paquete Sequoia (Huisman 2017) es una herramienta poderosa para reconstruir con precisión el pedigrí completo de poblaciones silvestres utilizando marcadores SNP. Sequoia asigna padres, agrupa a medio hermanos que comparten un padre no muestreado y asigna abuelos a hermanastros. Las asignaciones se realizan después de considerar las probabilidades de todas las posibles relaciones de primer, segundo y tercer grado entre los individuos focales, así como la de no estar relacionado. El programa permite usar un archivo de historia de vida donde se incluyen las identificaciones, el sexo, el año de nacimiento y el año de

muerte, permitiendo delimitar el conjunto de padres candidatos para cada individuo a partir de una distribución de probabilidad a priori de la edad de reproducción.

4.3 Estimación de ancestría poblacional.

La alta diferenciación genética entre las dos poblaciones de lince ibérico remanentes permite la inferencia de la proporción de la ancestría individual en cada una de ellas a partir de datos moleculares. Es también posible clasificar los individuos en categorías de mezcla. Para lo primero se puede usar el programa ADMIXTURE en la modalidad de análisis supervisado, en la que se definen a priori los individuos puros que se usan para definir cada una de las posibles ancestrías (Alexander *et al.* 2009). Para lo segundo, el programa NewHybrids (Anderson & Thompson 2002) determina la probabilidad de que los individuos pertenezcan a seis clases diferentes de mezcla según la ascendencia del individuo, incluyendo individuos puros de Doñana y Sierra Morena, F1, F2, y retrocruzamientos con individuos puros de Doñana y de Sierra Morena.

4.4 Estimas de consanguinidad individual y parentesco

4.4.1 Estimas basadas en pedigrí

Tradicionalmente, el parentesco se ha inferido/estimado a partir de genealogías. En este contexto, la coancestría se define como la probabilidad de muestrear aleatoriamente dos alelos idénticos por descendencia (IBD) de dos individuos. Esto significa la probabilidad de heredar dos copias del mismo alelo de un ancestro común. La coancestría genealógica es un concepto probabilístico y, por tanto, expresa la relación esperada para infinitos loci independientes, aunque existe cierta variación en torno al valor esperado para cualquier grado particular de relación. Siempre que se conozca (con precisión) el pedigrí de la población, la coancestría genealógica se puede calcular fácilmente siguiendo reglas de probabilidad clásicas (Falconer & Mackay 1996). Las estimas de parentescos y consanguinidad a partir de una genealogía conocida se pueden obtener de diversos programas, incluido PMx (Lacy *et al.* 2012). Para obtener unas estimas puramente genealógicas se habrá de eliminar o reducir el peso a cero de la matriz empírica entre fundadores.

4.4.2 Estimas basadas en marcadores moleculares

Cuando no se dispone de genealogía, la información molecular se puede utilizar para estimar el parentesco entre individuos y la consanguinidad individual. En contraste con el concepto de coancestría genealógica, el parentesco molecular/coancestría expresa el valor realizado para los loci genotipados, es decir, el resultado observado del muestreo mendeliano aleatorio en la transmisión de alelos de padres a hijos. En consecuencia, es una medida de la coancestría realizada en los loci genotipados y es una medida más precisa de la coancestría promedio en todo el genoma que el valor genealógico esperado cuando el número de marcadores es lo suficientemente grande. Sin embargo, el parentesco molecular refleja la identidad por estado (IBS); es decir, dos individuos comparten el mismo alelo, no necesariamente porque se heredan de un ancestro común reciente y, por lo tanto, se han propuesto algunos estimadores. para recuperar la IBD a partir de la IBS. El programa RELATED (Pew *et al.* 2015), que es una implementación R de COANCESTRY (Wang 2011) permite calcular varios estimadores de parentesco y consanguinidad a partir de genotipos moleculares, incluidos estimadores basados en momentos (e.g. Ritland) y en probabilidades (e.g. TrioML). Dado que el rendimiento de diferentes estimadores depende de las características específicas del conjunto de datos utilizado, conviene realizar una evaluación de los distintos estimadores del parentesco entre pares de individuos utilizando las simulaciones implementadas en RELATED y calculando medias y desviaciones estándar de las estimaciones y compararlas con los valores esperados.

4.5 Identificación de migrantes y asignación a su población de origen

4.5.1 Basado en asignaciones probabilísticas de individuos a poblaciones

Cuando las poblaciones están suficientemente diferenciadas genéticamente, los genotipos individuales pueden asignarse a la población en la que son más probables de acuerdos con las frecuencias alélicas poblacionales. Este tipo de método se implementa en el programa GENECLASS2 (Piry *et al.* 2004), que utiliza genotipos de individuos de poblaciones de referencia y estima la probabilidad de asignación mediante simulaciones. Utilizando algoritmos de remuestreo de Monte Carlo, el programa calcula la probabilidad de que cada individuo sea residente en la población donde fue muestreado o descienda de un dispersor en la generación anterior. La asignación se realiza utilizando la relación de la probabilidad calculada a partir de la población donde se tomó la muestra del individuo sobre el valor de probabilidad más alto entre todas las poblaciones muestreadas.

4.5.2 Basado en redes de parentesco cercano

En los casos en los que la diferenciación genética entre poblaciones es insuficiente para la asignación probabilística a poblaciones, la construcción de redes de parentesco aporta una alternativa para la identificación de eventos de migración. Para ello se determina un valor umbral por encima del cual todos los pares de individuos (díadas) se consideran parientes de

primer orden. Para visualizar la relación entre individuos en el espacio se construye una red de parentesco con el programa GEPHI (Bastian *et al.* 2009) utilizando individuos como nodos y los valores de parentesco como espesor de conector. Los nodos se representan según la ubicación geográfica de los individuos con el complemento GeoLayout y luego se superpone la red en un mapa.

5 Estimas de parámetros genéticos poblacionales

5.1 Diversidad genética y endogamia poblacional

Para cada población estimaremos las tasas de heterocigosidad observadas (H_O), heterocigosidad esperada (H_E), riqueza alélica por locus (AR) y el coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) usando el paquete 'diveRsity' (Keenan et al. 2013) en R . Se calcularán valores para cada locus e intervalos de confianza basado en remuestreos bootstraps y se reportarán las medias e intervalos de confianza del 95% construidos a partir de la desviación estándar de todos los loci. La riqueza alélica media por locus también se estimará con rarefacción para posibilitar la comparación entre muestras de distinto tamaño.

5.2 Estructura y flujo génico

La estructura poblacional se estudiará mediante técnicas de agrupamiento no jerárquico que no asumen modelos subyacentes, como el Análisis de Componentes Principales (PCA) y enfoques basados en modelos bayesianos como el implementado en los programas SRTUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) y ADMIXTURE (Alexander *et al.* 2009). Este método agrupa los genotipos asignándolos de manera probabilística a uno de K grupos por similitud molecular y minimizando el desequilibrio de ligamiento y de Hardy-Weinberg, o conjuntamente a dos o más conglomerados si el genotipo indica una mezcla de patrones moleculares. Unos de los resultados posibles es una gráfica de barras, en donde cada individuo está representado por una línea vertical, que está dividida en K segmentos coloreados según la probabilidad de pertenencia estimada de ese individuo en cada uno de los K clústeres inferidos. Hay también distintas estrategias que pueden usarse para inferir el número más probable de clústeres, aunque el análisis de un número creciente de clústeres puede ser útil para visualizar y entender las relaciones jerárquicas entre grupos.

El análisis de estructura también incluirá la estima de índices de diferenciación entre poblaciones (Fst) y de distancias genéticas basadas en el parentesco promedio, que serán especialmente útiles para la gestión genética (Objetivo 3).

El análisis de la estructura genética se realizará utilizando SambaR, una herramienta que automatiza y simplifica el control de calidad y los análisis genético poblacionales a partir de datos de SNPs bialélicos. SambaR llama a funciones de paquetes de R existentes (incluidos adegenet, ape, LEA, poppr, pcadapt y StAMPP), e incorpora nuevas herramientas implementadas exclusivamente en SambaR (de Jong *et al*. 2021).

Además, se estimará el nivel de flujo génico contemporáneo entre las distintas poblaciones mediante BAYESASS+, un método bayesiano que estima tasas recientes de migración entre poblaciones a partir de la asignación de individuos o sus descendientes a poblaciones distintas a las que nacieron (Wilson & Rannala 2003).

Finalmente, se usará KINDISPERSE para estimar los parámetros de dispersión a partir de la distribución espacial de parientes cercanos (Jasper *et al.* 2022)

5.3 Tamaños efectivos poblacionales

El tamaño efectivo de la población (Ne) es el tamaño de una población que se aparea aleatoriamente de tamaño constante con igual proporción de sexos y una distribución de Poisson de tamaños de familia que: i) daría como resultado la misma tasa media de endogamia, o ii) la misma tasa de alelo varianza de frecuencia que la observada en la población. Por lo tanto, Ne puede usarse para predecir los cambios genéticos debidos a la deriva genética aleatoria que sufrirá una población si las condiciones permanecen iguales. Ne suele ser más pequeño que el tamaño del censo por un factor que en los linces se ha estimado entre 0,3 y 0,6.

El tamaño efectivo de cada una de las poblaciones se estimará a partir de los datos moleculares, utilizando los niveles de desequilibrio de ligamiento en una sola muestra mediante el programa LDNe (Waples & Do 2008). Con los tamaños efectivos de cada población y las estimas de tasas de migración se podrá calcular el tamaño efectivo metapoblacional y compararlo con el objetivo global a largo plazo de Ne=500 (Pacin *et al.* 2023)

6 Estimas de densidad y tamaño poblacional con modelos de captura-recaptura espacial

La captura-recaptura se considera el método de referencia o *gold standard* (Gimenez *et al.,* 2018; Hickey & Sollmann, 2018; Sollmann *et al*., 2013a) para estimar los tamaños de población de las especies, y singularmente las especies elusivas o de baja probabilidad de detección. La incorporación de la información espacial a los modelos de captura-recaptura ha dado lugar a los modelos de captura-recaptura espacialmente explícitos (SCR) (Borchers and Efford, 2008;

Efford, 2004; Efford *et al*., 2004; Royle & Young, 2008) que son una evolución natural de los primeros, y que superan sus limitaciones principales: 1) la heterogeneidad en la detección derivada de la ubicación de los animales respecto a las trampas, y 2) permiten la estima de densidades sin recurrir a cálculos o asunciones externas al proceso de modelado.

El fundamento teórico de los modelos SCR es que la probabilidad de detectar un animal en el espacio con un detector determinado (por ejemplo, una cámara trampa) depende de tres parámetros:

1. La distancia euclídea ($d = \|x - s\|$) desde el lugar donde se ha ubicado el detector x hasta el centro de actividad del animal s. Ese centro de actividad sería asimilable al centro del área de campeo.
2. La detectabilidad "basal" del detector (p_0). Es la detectabilidad que tendría el detector si su ubicación coincidiera espacialmente con el centro de actividad.
3. Un parámetro descriptor de cómo varía la detectabilidad con la distancia al centro de actividad del animal (σ). Este parámetro va a ser descriptivo del movimiento del animal, y estará relacionado así con el tamaño de su área de campeo.

Ninguno de estos tres parámetros es conocido, pero se asume el tercer parámetro (σ), que relaciona la detectabilidad y la distancia al centro de actividad, se puede describir por una función seminormal negativa (algunos autores utilizan también una exponencial negativa como alternativa). Con el cálculo simultáneo de estos tres parámetros se obtiene la probabilidad p de que allí se encuentre un centro de actividad para cada punto del espacio:

$$p(\mathbf{x}, \mathbf{s}) = p_0 \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2}\|\mathbf{x} - \mathbf{s}\|^2\right)$$

Así, con SCR no se obtiene un escalar, como se obtenía con la captura-recaptura no espacial, sino que se obtiene una información para cada punto del espacio. La integración de estas probabilidades en la zona de estudio nos permite obtener la ubicación más probable de los centros de actividad, y por tanto, el tamaño poblacional de la especie en el área de estudio.

Las asunciones básicas de SCR son:

1) Cierre demográfico y geográfico durante el estudio. No hay muertes ni nacimientos el periodo de estudio. No obstante, la presencia de transeúntes se puede modelizar en SCR (Chandler *et al*., 2021).
2) Los centros de actividad están aleatoriamente distribuidos en el espacio, y el movimiento de los animales es independiente entre ellos. Esto significa que las especies gregarias incumplen esta premisa. Pese a ello, se ha modelizado también en SCR (Jiménez *et al*., 2023).
3) La detección de un individuo en una ocasión determinada es independiente de cualquier detección en otra ocasión, o lo es lo mismo, no existe *happy-trap* ni *shy-trap*.

En general, el incumplimiento de alguna asunción(es) debe controlarse mediante métodos de estima de bondad del ajuste, y en su caso, tenerse en cuenta en el modelado.

Los métodos SCR se han extendido a especies que están parcialmente marcadas (de forma artificial o natural) y que permite el reconocer y diferenciar de una pequeña parte de los individuos (los marcados) y diferenciar además los no-marcados. Estos modelos son los de marcaje-re-avistamiento espacialmente explícitos (Kane *et al*., 2014; Sollmann *et al*., 2013b), y se conocen como SMR. Se han empleado con numerosas especies previo marcaje (Jiménez *et al*., 2017a, 2017b, 2019b). También se ha desarrollado una extensión de SMR que permite modelizar la ausencia de reconocimiento en el animal marcado (Jiménez *et al*., 2019a). Por último, los métodos SCR se han enriquecido con extensiones que permiten trabajar con identificación parcial (Augustine *et al*., 2020, 2019, 2018; Augustine & Royle, 2015) e incluso con una asignación mecanicista de la identidad (Jiménez *et al*., 2021).

Pese a estos avances, los métodos SCR estaban ligados a dispositivos detectores fijos en el espacio. Mollet *et al*. (2015) y López-Bao *et al*. (2018) aplicaron métodos SCR a recorridos en busca de indicios, segmentando el espacio en celdas, y asignando las muestras a los centroides. Estas muestras se identificaban con técnicas genéticas. Otra novedad es que no se hacían réplicas temporales, sino que la replicabilidad era meramente espacial. Ello posibilitaba utilizar una distribución de Poisson en vez de la distribución Binomial utilizada para los historiales de captura con réplicas temporales. Precisamente Milleret *et al*. (2018) acotaron el uso de SCR con recorridos, especificando una forma de muestreo tal que el tamaño de celda permitiera que un mismo animal pudiera aparecer en muestras en varias celdas.

En estas condiciones la combinación de la aplicación de métodos SCR (en todas sus extensiones) y muestreos genéticos no invasivos, son una metodología plenamente aplicable a cualquier especie. En el caso del lince resulta especialmente sencilla, ya que los grupos familiares son habitualmente pequeños y no inducen sesgo en las estimas (Bischof *et al.,* 2020) y no es preciso diseñar modelos complejos, como sería en el caso del lobo (Jiménez *et al*., 2023). No es tampoco necesario un conocimiento completo de los patrones de marcaje en cada caso, ya que la heterogeneidad es fácil de detectar y modelizar. Obviamente se precisa una intensidad de búsqueda mínima, para disponer de datos suficientes, y del registro de los recorridos para modelizar el esfuerzo de muestreo.

7 Referencias

Abascal F, Corvelo A, Cruz F*, et al.* (2016) Extreme genomic erosion after recurrent demographic bottlenecks in the highly endangered Iberian lynx. *Genome Biology* **17**, 251.

Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research* **19**, 1655-1664.

Alfaya P, de Pablo CTL, de Agar PM, Alonso G (2020) Assessing the influence of ecological interaction patterns among habitat types on species distribution: studying the Iberian lynx (Lynx pardinusTemminck 1827) in central Spain. *Landscape Ecology* **35**, 1923-1944.

Anderson EC, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* **160**, 1217-1229.

Augustine, B.C., Royle, J.A., 2015. SPIM: Package contains MCMC algorithms in R and (some) Rcpp for various Spatial Partial Identity Models.

Augustine, B.C., Royle, J.A., Kelly, M.J., Satter, C.B., Alonso, R.S., Boydston, E.E., Crooks, K.R., Rooks, K.R., 2018. Spatial capture-recapture with partial identity: an application to camera traps. Ann. Appl. Stat. 12, 67–95. https://doi.org/10.1214/17-AOAS1091

Augustine, B.C., Royle, J.A., Linden, D.W., Fuller, A.K., 2020. Spatial proximity moderates genotype uncertainty in genetic tagging studies. Proc. Natl. Acad. Sci. 117, 17903–17912. https://doi.org/10.1073/pnas.2000247117

Augustine, B.C., Royle, J.A., Murphy, S.M., Chandler, R.B., Cox, J.J., Kelly, M.J., 2019. Spatial capture–recapture for categorically marked populations with an application to genetic capture–recapture. Ecosphere 10, e02627. https://doi.org/10.1002/ecs2.2627

Bastian M, Heymann S, Jacomy M (2009) Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media* **3**, 361-362.

Bischof, R., Dupont, P., Milleret, C., Chipperfield, J., Royle, J.A., 2020. Consequences of ignoring group association in spatial capture–recapture analysis. Wildlife Biol. 2020, 1–10. https://doi.org/10.2981/wlb.00649

Borchers, D.L., Efford, M.G., 2008. Spatially explicit maximum likelihood methods for capture-recapture studies. Biometrics 64, 377–385. https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2007.00927.x

Burgos T, Virgos E, Valero ES*, et al.* (2019) Prey density determines the faecal-marking behaviour of a solitary predator, the Iberian lynx (Lynx pardinus). *Ethology Ecology & Evolution* **31**, 219-230.

Carroll EL, Bruford MW, DeWoody JA*, et al.* (2018) Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods. *Evolutionary Applications*, in press.

Casas-Marce M, Soriano L, López-Bao JV, Godoy JA (2013) Genetics at the verge of extinction: insights from the Iberian lynx. *Molecular Ecology* **22**, 5503-5515.

Chandler, R.B., Crawford, D.A., Garrison, E.P., Miller, K. V., Cherry, M.J., 2021. Modeling abundance, distribution, movement, and space use with camera and telemetry data. Ecology 0, 1–15. https://doi.org/10.1002/ecy.3583

Chaves PB, Graeff VG, Lion MB, Oliveira LR, Eizirik E (2012) DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. *Molecular Ecology Resources* **12**, 18-35.

de Jong MJ, de Jong JF, Hoelzel AR, Janke A (2021) SambaR: An R package for fast, easy and reproducible population-genetic analyses of biallelic SNP data sets. *Mol Ecol Resour* **21**, 1369-1379.

Efford, M.G., 2004. Density estimation in live-trapping studies. Oikos 106, 598–610. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13043.x

Efford, M.G., Dawson, D.K., Robbins, C.S., 2004. DENSITY: Software for analysing capture-recapture data from passive detector arrays. Anim. Biodivers. Conserv. 27, 217–228.

Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*, 4th edn. Longman, Harlow, England.

Fernandes CA, Ginja C, Pereira I*, et al.* (2008) Species-specific mitochondrial DNA markers for identification of non-invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. *Conservation Genetics* **9**, 681-690.

Ferreras P, Rodríguez A, Delibes M (2023) Iberian Lynx (*Lynx pardinus* Temminck, 1827). In: *Handbook of the Mammals of Europe* (eds. Hackländer K, Zachos FE), in press. Springer, Cham, Switzerland.

Galpern P, Manseau M, Hettinga P, Smith K, Wilson P (2012) Allelematch: an R package for identifying unique multilocus genotypes where genotyping error and missing data may be present. *Molecular Ecology Resources* **12**, 771-778.

Gimenez, O., Cam, E., Gaillard, J.M., 2018. Individual heterogeneity and capture–recapture models: what, why and how? Oikos 127, 664–686. https://doi.org/10.1111/oik.04532

Godoy JA, Palomares F, Píriz A (2005) Genotipaje no invasivo de lince ibérico - Informe final, p. 151. Convenio de Colaboración Ministerio de Medio Ambiente-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Unpublished report.

Hickey, J.R., Sollmann, R., 2018. A new mark-recapture approach for abundance estimation of social species. PLoS One 13, e0208726. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208726

Höss M, Pääbo S (1993) Silica based method of DNA extraction from ancient bone. *Nucleic Acids Research* **21**, 3913-3914.

Huisman J (2017) Pedigree reconstruction from SNP data: parentage assignment, sibship clustering and beyond. *Mol Ecol Resour* **17**, 1009-1024.

Jasper ME, Hoffmann AA, Schmidt TL (2022) Estimating dispersal using close kin dyads: The kindisperse R package. *Molecular Ecology Resources* **22**, 1200-1212.

Jiménez, J., Augustine, B.C., Linden, D.W., Chandler, R.B., Royle, J.A., 2021. Spatial capture–recapture with random thinning for unidentified encounters. Ecol. Evol. 11, 1187–1198. https://doi.org/10.1002/ece3.7091

Jiménez, J., Cara, D., García-Dominguez, F., Barasona, J.A., 2023. Estimating wolf (Canis lupus) densities using video camera traps and spatial capture–recapture analysis. Ecosphere 14, e4604. https://doi.org/10.1002/ecs2.4604

Jiménez, J., Chandler, R.B., Tobajas, J., Descalzo, E., Mateo, R., Ferreras, P., 2019a. Generalized spatial mark–resight models with incomplete identification: An application to red fox density estimates. Ecol. Evol. 9, 4739–4748. https://doi.org/10.1002/ece3.5077

Jiménez, J., Higuero, R., Charre-Medellín, J.F., Acevedo, P., 2017a. Spatial mark-resight models to estimate feral pig population density. Hystrix, Ital. J. Mammal. Online 28, 208–213. https://doi.org/10.4404/hystrix-28.2-12141

Jiménez, J., Nuñez-Arjona, J.C., Mougeot, F., Ferreras, P., González, L.M., García-Domínguez, F., Muñoz-Igualada, J., Palacios, M.J., Pla, S., Rueda, C., Villaespesa, F., Nájera, F., Palomares, F., López-Bao, J.V., 2019b. Restoring apex predators can reduce mesopredator abundances. Biol. Conserv. 238, 108234. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108234

Jiménez, J., Nuñez-Arjona, J.C., Rueda, C., González, L.M., García-Domínguez, F., Muñoz-Igualada, J., López-Bao, J.V., 2017b. Estimating carnivore community structures. Sci. Rep. 7, 1–10. https://doi.org/10.1038/srep41036

Jones OR, Wang JL (2010) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* **10**, 551-555.

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**, 1099-1106.

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2010) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment (vol 16, pg 1099, 2007). *Molecular Ecology* **19**, 1512-1512.

Kane, M.D., Kelly, M.J., Ford, W.M., 2014. Estimating population size , density, and occupancy of lions (Panthera leo), leopards (P. pardus), and servals (Leptailurus serval) using camera traps in the Niokolo Koba National Park in Senegal, West Africa. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Keenan K, McGinnity P, Cross TF, Crozier WW, Prodohl PA (2013) diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution* **4**, 782-788.

Kleinman-Ruiz D, Lucena-Perez M, Villanueva B*, et al.* (2022) Purging of deleterious burden in the endangered Iberian lynx. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2110614119.

Kleinman-Ruiz D, Martinez-Cruz B, Soriano L*, et al.* (2017) Novel efficient genome-wide SNP panels for the conservation of the highly endangered Iberian lynx. *BMC Genomics* **18**, 556.

Lacy RC (1993) VORTEX: A computer simulation model for Population Viability Analysis. *Wildlife Research* **20**, 45-65.

Lacy RC, Ballou JD, Pollak JP (2012) PMx: software package for demographic and genetic analysis and management of pedigreed populations. *Methods in Ecology and Evolution* **3**, 433-437.

López-Bao, J.V., Godinho, R., Pacheco, C., Lema, F.J., García, E., Llaneza, L., Palacios, V., Jiménez, J., 2018. Toward reliable population estimates of wolves by combining spatial capture-recapture models and non-invasive DNA monitoring. Sci. Rep. 8, 2177. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20675-9

Lopez-Parra M, Fernandez L, Ruiz G*, et al.* (2012) Change in demographic patterns of the Donana Iberian lynx Lynx pardinus: management implications and conservation perspectives. *Oryx* **46**, 403-413.

Lucena-Perez M, Kleinman-Ruiz D, Marmesat E*, et al.* (2021) Bottleneck-associated changes in the genomic landscape of genetic diversity in wild lynx populations. *Evolutionary Applications* **14**, 2664-2679.

Lucena-Perez M, Soriano L, López-Bao JV*, et al.* (2018) Reproductive biology and genealogy in the endangered Iberian lynx: Implications for conservation. *Mammalian Biology* **89**, 7-13.

Milleret, C., Dupont, P., Brøseth, H., Kindberg, J., Royle, J.A., Bischof, R., 2018. Using partial aggregation in spatial capture recapture. Methods Ecol. Evol. 9, 1896–1907. https://doi.org/10.1111/2041-210X.13030

Mollet, P., Kéry, M., Gardner, B., Pasinelli, G., Royle, J.A., 2015. Estimating population size for capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) with spatial capture-recapture models based on genotypes from one field sample. PLoS One 10, 129020. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129020

Pacin C, Garrote G, Godoy JA (2023) Evaluation of the genetic viability of metapopulation scenarios for the Iberian lynx. *Animal Conservation*.

Palomares F, Godoy JA, López-Bao JV*, et al.* (2012) Possible extinction vortex for a population of Iberian lynx on the verge of extirpation. *Conservation Biology* **26**, 689-697.

Palomares F, Godoy JA, Píriz A, O'Brien SJ, Johnson WE (2002) Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the *Iberian lynx*. *Molecular Ecology* **11**, 2171-2182.

Palomares F, Soto C, López-Bao JV*, et al.* (2011) Estudio de las poblaciones de carnívoros del Parque Nacional de Doñana usando métodos no invasivos. In: *Proyectos de investigación en parques nacionales 2007-2010* (eds. Ramírez L, Asensio B), pp. 253-276. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid.

Pew J, Muir PH, Wang J, Frasier TR (2015) related: an R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. *Molecular Ecology Resources* **15**, 557-561.

Piry S, Alapetite A, Cornuet JM*, et al.* (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**, 536-539.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.

Ramon-Laca A, Soriano L, Gleeson D, Godoy JA (2015) A simple and effective method for obtaining mammal DNA from faeces. *Wildlife Biology* **21**, 195-203.

Revilla A, Rodríguez C, Godoy JA, Casas-Marcé M (2015) Asistencia técnica para el análisis de viabilidad espacialmente explícito de posibles escenarios de reintroducción de lince ibérico en España. Contrato de asistencia técnica número 23.683 de Tragsatec con la Estación Biológica de Doñana (CSIC), p. 170. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) y Estación Biológica de Doñana (CSIC).

Robinson IH, Delibes M (1988) The Distribution of Feces by the Spanish Lynx (Felis-Pardina). *Journal of Zoology* **216**, 577-582.

Rodríguez A, Godoy JA, López-Bao JV, Palomares F (2009) Marcaje con heces y organización espacial en el lince ibérico, 74.

Roques S, Furtado M, Jacomo AT*, et al.* (2014) Monitoring jaguar populations Panthera onca with non-invasive genetics: a pilot study in Brazilian ecosystems. *Oryx* **48**, 361-369.

Royle, J.A., Young, K. V., 2008. A hierarchical model for spatial capture recapture data. Ecology 89, 2281–2289. https://doi.org/10.1890/07-0601.1

Rueda C, Jiménez J, Palacios MJ, Margalida A (2021) Exploratory and territorial behavior in a reintroduced population of Iberian lynx. *Scientific Reports* **11**, 14148.

Ruiz-López MJ, Gañán N, Godoy JA*, et al.* (2012) Heterozygosity-Fitness Correlations and Inbreeding Depression in Two Critically Endangered Mammals. *Conservation Biology* **26**, 1121-1129.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY).

Sarmento P, Carrapato C, Eira C, Silva JP (2017) Spatial organization and social relations in a reintroduced population of Endangered Iberian lynx Lynx pardinus. *Oryx*, 1-12.

Sollmann, R., Gardner, B., Chandler, R.B., Shindle, D.B., Onorato, D.P., Royle, J.A., O'Connell, A.F., 2013a. Using multiple data sources provides density estimates for endangered Florida panther. J. Appl. Ecol. 50, 961–968. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12098

Sollmann, R., Gardner, B., Parsons, A.W., Stocking, J.J., Mcclintock, B.T., Simons, T.R., Pollock, K.H., O'Connell, A.F., 2013b. A spatial mark-resight model augmented with telemetry data. Ecology 94, 553–559. https://doi.org/10.1890/12-1256.1

Taberlet P, Waits LP, Luikart G (1999) Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 321-325.

Taylor HR (2015) The use and abuse of genetic marker-based estimates of relatedness and inbreeding. *Ecology and Evolution* **5**, 3140-3150.

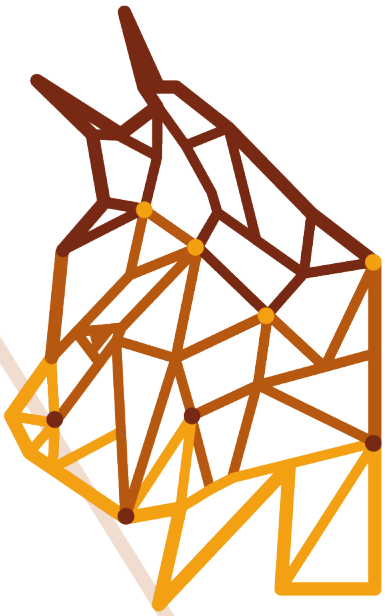
Valière N (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* **2**, 377-379.

von Thaden A, Cocchiararo B, Jarausch A*, et al.* (2017) Assessing SNP genotyping of noninvasively collected wildlife samples using microfluidic arrays. *Scientific Reports* **7**.

Wang JL (2011) COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* **11**, 141-145.

Waples RS, Do C (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* **8**, 753-756.

Wilson A, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* **163**, 1177-1191.



lynxconnect

Beneficiario coordinador:

Junta de Andalucía

Socios beneficiarios:

adenex

artemisan FUNDACIÓN

CBD-Hábitat

Castilla-La Mancha
Consejería de Desarrollo Sostenible

Castilla-La Mancha
Consejería de Fomento de la Junta de Comunidades

cimbal

Estación Biológica Doñana CSIC

DIPUTACIÓN DE BADAJOZ

JUNTA DE EXTREMADURA
Dirección General de Movilidad e Infraestructuras Viarias

Región de Murcia

JUNTA DE EXTREMADURA
Consejería para la Transición Ecológica y Sostenibilidad

FomeCam

FOTEX

ICNF
Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Infraestruturas de Portugal

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE TRANSPORTES, MOVILIDAD Y AGENDA URBANA

MINISTERIO PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA Y EL RETO DEMOGRÁFICO
ORGANISMO AUTÓNOMO PARQUES NACIONALES

WWF