

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS GEOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Variaciones en la distribución y la estructura genética de los lincec
paleárticos y el topillo de Cabrera desde el Pleistoceno Superior**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ricardo Rodríguez Varela

Directores

Cristina Valdiosera Morales
Juan Luís Arsuaga Ferreras

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



Dibujo José A. Valverde

Ricardo Rodríguez Varela

Facultad de Geología

Tesis doctoral 2015

**VARIACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN Y LA ESTRUCTURA
GENÉTICA DE LOS LINCES PALEÁRTICOS Y EL TOPILLO
DE CABRERA DESDE EL PLEISTOCENO SUPERIOR**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE GEOLOGÍA



Variaciones en la distribución y la estructura genética de los linceos paleárticos y el topillo de Cabrera desde el Pleistoceno Superior

Tesis doctoral

Programa de Doctorado Geología e
Ingeniería Geológica por la UCM

RICARDO RODRÍGUEZ VARELA

Directores:

Dra. Cristina Valdiosera Morales
Department of Archaeology
Faculty of Humanities and Social Sciences
La Trobe University, Melbourne

Catedrático Juan Luís Arsuaga Ferreras
Departamento de Paleontología
Facultad de Geología
Universidad Complutense de Madrid

Tesis doctoral presentada por Ricardo Rodríguez Varela, dirigida por el Dr. Juan Luis Arsuaga Ferreras, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid y por la Dra. Cristina Valdiosera Morales, de La Trobe University.

Madrid, octubre del 2015

El doctorando

RICARDO RODRÍGUEZ VARELA

Los directores de Tesis:

Fdo.

Cristina Valdiosera Morales

Fdo.

Juan Luis Arsuaga Ferreras

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis dos directores de tesis, Cristina Valdiosera y Juan Luis Arsuaga, por la gran ayuda y el apoyo que me han dado a lo largo de estos años. Ambos han sido con su siempre inagotable energía y optimismo una fuente de inspiración y un ejemplo de entrega y trabajo a seguir.

Estoy en deuda con todos y cada uno de mis coautores los cuales son parte esencial de esta tesis redactada por artículos y con las siguientes personas y organismos:

Todos mis compañeros del Centro UCM-ISCIH y de la Universidad de Burgos que siempre han estado dispuestos y prestos a ayudarme tanto profesional como personalmente.

Juan Luis Arsuaga, por su constante confianza y apoyo desde el principio de mi tesis, la Fundación de Alcalá, la Fundación Duques de Soria, la Fundación Atapuerca y el Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2010-030127) por su apoyo.

El equipo de Atapuerca y sus codirectores, José Miguel Carretero y los miembros del Portalón con lo que he compartido tantas campañas. Igualmente quiero agradecer a Enrique Baquedano, al equipo de Pinilla del Valle y al resto de yacimientos con los que he tenido la fortuna de trabajar.

Nuria García por su constante ayuda durante mi doctorado y por sus valiosos comentarios sobre la evolución de los lince. Pedro Castaño por su gran trabajo como paleontólogo sin el cual nos encontraríamos sin punto de partida para analizar el ADN de restos de lince en el norte de España.

Maicu Ortega por su impecable trabajo de restauración de todos los fósiles muestreados, mis compañeros de ADN Irene Ureña y Jaime Lira, y a todos mis compañeros del UCM-ISCIH; Ele, Mila, Eva, Álvaro, Asier, Virginia, Marian, Nuria, Noe, Rolf, Adrián, Alex, Almudena, Pantoja, Nacho, Ana Gracia, Fran Gracia, Javier Trueba e Iñaki por su apoyo y ayuda.

Todos los centros en los que he realizado estancias, a Mattias Jakobsson de la Universidad de Uppsala y todo su equipo (en particular Ayca, Pontus, Torsten, Emma y Helena), a Eske Willerslew y Tom Gilbert del Centre for GeoGenetics de la Universidad de Copenhague y su equipo y a la Trobe University.

Love Dalén, Carlos Nores, Anders Götherström, Asier Gómez, Cesar Laplana, Marcello Mannino y David Nogues por sus consejos y fructíferas discusiones.

El CNIO (Dr. Orlando Domínguez y su equipo de secuenciación), por cedernos sus instalaciones para el trabajo postPCR.

Quiero agradecer (más allá del agradecimiento concreto que aparece en cada artículo) a todos aquellos colegas, Museos e instituciones que nos han proporcionado muestras sin las cuales esta tesis no se habría podido desarrollar, en particular a Antonio Sánchez Marco, Pedro Castaños, Manuel Rojo y Marta Moreno por proporcionarme muestras al principio de mi doctorado.

A Cristina, a Colin Smith y al gran Rene Valdiosera por su cariñoso apoyo y ayuda a lo largo de todo mi doctorado.

Por último dar las gracias a Elia Organista, a mis padres, mi hermana y al resto de mi familia por su paciencia y ayuda.

Índice

1. Resumen/Summary	1
1.1 Resumen	1
1.2 Summary	7
2. Antecedentes/Background	13
2.1 Antecedentes	13
2.2 Background	17
3. Introducción	21
3.1 ADN antiguo	21
3.1.1 Antecedentes	21
3.1.2 Autenticación y limitaciones	22
3.2 G. <i>Lynx</i> paleontología	25
3.2.1 Aparición del Género <i>Lynx</i>	25
3.2.2 Evolución de los linceos paleárticos	27
3.3 Linceo ibérico	28
3.3.1 Distribución histórica	28
3.3.2 Estatus	30
3.3.3 Biología	33
3.3.4 Situación genética	34
3.4 Linceo boreal	35
3.4.1 Estatus y distribución histórica	35
3.4.2 Biología	37
3.4.3 Situación genética y filogeografía	38
3.5 Topillo de Cabrera	39
3.5.1 Estatus y distribución histórica	39
3.5.2 Biología	42
3.5.3 Situación genética	42
3.6 Aplicaciones del ADN antiguo en biología de la conservación	43
3.7 Clima y vegetación del Pleistoceno Superior al Holoceno	46
4. Objetivos	49
4.1 Estudio de la variación temporal en la diversidad genética del linceo ibérico y del topillo de Cabrera	49
4.2 Reconstrucción de la distribución histórica en Europa de los linceos paleárticos	50
4.3 Paleofilogeografía del linceo boreal y del topillo de Cabrera	51
5. Métodos	53

5.1 El ADN mitocondrial	53
5.2 ADN antiguo protocolos	55
5.3 Muestreo.....	60
6. Resultados	63
6.1. Artículo I.....	63
6.1.1 Introducción artículo I.....	63
6.1.2 Artículo I.....	65
6.1.3 Conclusiones artículo I.....	77
6.2. Artículo II.....	77
6.2.1 Introducción artículo II	77
6.2.2 Artículo II.....	79
6.2.3 Conclusiones artículo II	93
6.3. Artículo III	93
6.3.1 Introducción artículo III	93
6.3.2 Artículo III	95
6.3.3 Conclusiones artículo III.....	113
6.4. Artículo IV inédito	115
7. Discusión.....	125
8. Conclusiones/Conclusions	133
8.1 Conclusiones	133
8.2 Conclusions.....	135
9. Referencias.....	137
10. Participación en otros artículos publicados durante el desarrollo de la tesis	153

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNa	ADN antiguo
ADNmt	ADN mitocondrial
BP	Before present (antes del presente)
BSA	Bovine serum albumine (albúmina de suero bovino)
cal	Calibrado
dNTPs	Desoxirribonucleótido trifosfato
EHV	Enfermedad hemorrágica vírica
ESU	Evolutionary significant unit (unidad evolutivamente significativa)
<i>et al.</i>	y colaboradores
HPD	Highest posterior density (intervalo de máxima probabilidad posterior)
LGM	Last glacial maximum (último máximo glacial)
m	Metro
mda	Millones de años
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
Ne	Tamaño efectivo de población
NUMT	Copias nucleares de secuencias mitocondriales
°C	Grado centígrado
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
Pk	Proteinasa K
rpm	Revoluciones por minuto
SNP	Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleótido único)
Taq	ADN polimerasa <i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Temperatura de melting (temperatura de hibridación)
µg	Microgramo
µl	Microlitro
UV	Luz ultravioleta

1. Resumen/Summary

1.1 Resumen

VARIACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN Y LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LOS LINCES PALEÁRTICOS Y EL TOPILLO DE CABRERA DESDE EL PLEISTOCENO SUPERIOR

Introducción

El presente trabajo está compuesto por cuatro artículos, tres publicados y uno inédito. En ellos se aborda, mediante el estudio del ADN antiguo (ADNa), aspectos relativos a la paleobiogeografía, la conservación, la filogeografía y las fluctuaciones en la diversidad genética a lo largo del tiempo en distintas especies amenazadas o extintas de la península ibérica (los lince paleárticos; *Lynx lynx* y *Lynx pardinus* y el topillo de Cabrera, *Microtus cabreræ*). En concreto se ha analizado el ADN mitocondrial (ADNmt) de restos asignados a las distintas especies europeas del género *Lynx* así como de subfósiles y ejemplares actuales de topillo de Cabrera de diferentes yacimientos y poblaciones históricas del suroeste de Europa. El análisis del ADNmt de restos de lince ibérico, lince boreal y topillo de Cabrera se realizó con el objetivo de conocer las variaciones de su diversidad genética a lo largo del tiempo y la filogeografía de las poblaciones extintas en relación con las modernas. La importancia de los análisis realizados con restos de lince ibérico y de topillo de Cabrera radica en el carácter endémico y amenazado de ambas especies. Conocer la historia genética de estas especies desde el Pleistoceno Superior puede proporcionar información útil para el manejo de las poblaciones actuales que se encuentran en peligro de extinción. En el caso del lince boreal su interés se centra en confirmar o desmentir su presencia en el pasado en la península ibérica y en conocer la estructura genética de las poblaciones extintas del suroeste de Europa. El análisis de la dinámica de las poblaciones extintas es vital para una mejor comprensión de los patrones filogeográficos de las poblaciones actuales. Por último, la identificación molecular de restos de lince erróneamente clasificados o que no han podido identificarse a nivel específico, ha permitido ampliar el rango de distribución histórico de las dos especies de lince que habitan en Europa en el presente. Tanto las variaciones en el rango de distribución como en la diversidad genética observadas en las especies estudiadas han sido analizadas en el contexto de los principales factores bióticos y/o abióticos susceptibles de influir en dichas especies.

Síntesis de los resultados

1) El análisis del ADNmt, a partir de series cronológicas de restos de lince ibérico y de topillo de Cabrera desde el Pleistoceno Superior a la actualidad, ha permitido conocer las variaciones en la diversidad genética de estas especies a lo largo del tiempo. Estos cambios en la diversidad genética permiten inferir cambios demográficos que pueden ser relacionados con los cambios ambientales y ecológicos que tuvieron lugar en momentos determinados de la historia evolutiva de las citadas especies.

2) La asignación específica de los restos de lince, basada únicamente en el análisis morfométrico de elementos postcraneales, es una tarea difícil y potencialmente puede conducir a errores de identificación. En esta tesis se pretende verificar si el lince ibérico y el lince boreal tenían una distribución geográfica más amplia en el pasado. Para ello se ha realizado un extenso muestreo de subfósiles y especímenes históricos morfométricamente clasificados como lince ibéricos (*Lynx pardinus pardinus*), lince boreales (*Lynx lynx*), *Lynx* sp. y como el comúnmente llamado lince de las cavernas, citado en la literatura como *Lynx spelaeus* o *Lynx pardinus spelaeus*. Los restos de lince muestreados abarcan un amplio intervalo cronológico (desde hace más de 50 000 años hasta la actualidad) y comprenden diferentes regiones de Europa. A partir de los resultados obtenidos se ha redefinido el área de distribución histórica de los lince europeos y se ha podido aportar información sobre la posición filogenética del controvertido conjunto de restos de lince clasificados como *Lynx spelaeus* o *Lynx pardinus spelaeus*.

3) Los resultados obtenidos de los muestreos anteriores han permitido asimismo analizar la estructura filogeográfica de las poblaciones extintas de lince boreal en el suroeste europeo y compararla con la de las poblaciones actuales.

Resultados y conclusiones

Artículo I: **50 000 years of genetic uniformity in the critically endangered Iberian lynx.** (Rodríguez *et al.*, 2011).

En la actualidad el lince ibérico presenta una diversidad genética extremadamente reducida, con una ausencia total de variación en la región control del ADNmt. Generalmente la falta de diversidad genética en especies amenazadas, con tamaños poblacionales pequeños se debe a uno o varios cuellos de botella ocurridos en el pasado. Los cuellos de botella son reducciones drásticas en el tamaño poblacional que suelen conllevar una pérdida de diversidad genética. Estas reducciones poblacionales pueden haber ocurrido recientemente (en tiempos históricos) o, por ejemplo, durante la transición del Pleistoceno al Holoceno. Una reducida diversidad genética en una población determinada se tiende a asociar a una menor probabilidad de supervivencia a

largo plazo. Esto es debido a que las poblaciones con baja diversidad genética no tendrán recursos en su acervo genético para adaptarse a los cambios ambientales futuros.

Con el objetivo de conocer cuando perdió su variabilidad genética el lince ibérico se analizó el ADNmt en restos de lince a lo largo de su distribución histórica en la península ibérica. Sorprendentemente no se ha encontrado ninguna variabilidad en 183 pares de bases (pb) de la región control del ADNmt en los 19 restos de lince ibérico de lo que se pudo obtener ADN. Esta ausencia de diversidad genética es especialmente inesperada ya que la región control es una de las regiones más variables del genoma, las muestras analizadas provienen de yacimientos distribuidos a lo largo de toda la península ibérica y abarcan un rango de edades que comprenden los últimos 50 000 años. Estos 19 individuos presentan exactamente el mismo haplotipo que se encuentra fijado en las poblaciones actuales. La falta de diversidad genética para la región control del ADNmt constatada en los últimos 50 000 años sugiere un tamaño poblacional de lince pequeño y constante a lo largo del tiempo y/o una tasa de mutación muy baja para esta región del genoma. Estos resultados indican que la actual falta de diversidad genética en la región control del ADNmt no es por sí misma una amenaza para la viabilidad del lince ibérico a largo plazo, ya que este felino ha sobrevivido al menos 50 000 años con bajos niveles de diversidad genética en esta parte del genoma. Sin embargo esto no excluye que la pérdida de diversidad genética en regiones del genoma que afectan directamente a su *fitness*, como consecuencia del drástico cuello de botella ocurrido en los últimos 100 años, sí tenga repercusión en la viabilidad de esta especie.

Artículo II: **Ancient DNA evidence of Iberian lynx palaeoendemism.** (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015a).

En este artículo se analizó el ADNmt (parte de la región control y del citocromo *b*) de restos pertenecientes al género *Lynx* morfológicamente clasificados como *Lynx pardinus pardinus*, *Lynx lynx*, *Lynx cf. spelaeus* o *Lynx sp.* sin especificar la especie. Como *Lynx cf. spelaeus* se engloba un conjunto de restos comúnmente conocidos como lince de las cavernas. Este lince extinto, cuya posición filogenética es objeto de debate, habitó el suroeste de Europa durante el Pleistoceno y presentaba un tamaño intermedio entre las dos especies de lince que viven actualmente en Europa. Los análisis del ADNmt realizados en este estudio revelan, por primera vez, que los restos italianos clasificados como lince de las cavernas y lince boreales pertenecen en realidad a lince ibéricos de mayor tamaño que los actuales. Estos resultados junto con los análisis de restos de lince franceses muestran que el lince ibérico habitó durante el Pleistoceno y el Holoceno el norte de Italia y el sur de Francia. Todo lo cual refuerza la conveniencia de que

cualquier asignación a nivel de especie de restos de lince a partir de estudios morfométricos de material postcraneal sea corroborada por estudios genéticos.

Gracias a la identificación mediante el ADNmt se ha permitido incrementar el área de distribución del lince ibérico en el Pleistoceno y ayudar a clarificar la posición filogenética del lince de las cavernas (*Lynx cf. spelaeus*). Los resultados obtenidos no apoyan la clasificación de los lince de las cavernas como una especie diferente de lince. Ni siquiera permiten su catalogación como una subespecie del lince ibérico, ya que los restos clasificados como lince de las cavernas presentan el mismo haplotipo mitocondrial (o varían en una sola transición) que los actuales lince ibéricos (*Lynx pardinus pardinus*). El análisis de varios restos de lince del yacimiento italiano de Arene Candide ha permitido documentar por primera vez, a partir de datos genéticos y dataciones radiométricas, la coexistencia de las dos especies de lince paleárticas en un mismo yacimiento durante el final del Pleistoceno Superior.

Artículo III: **Ancient DNA reveals the identity of the last lynx from northern Spain.** (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015b).

La presencia del lince ibérico en la península ibérica está bien documentada desde el Pleistoceno Medio. Por el contrario, con la excepción de dos cráneos de edad incierta encontrados en simas del País Vasco y de Asturias (Altuna, 1980; Nores, 1999), no hay registros fiables de lince boreales en la península. Esto ha propiciado que muchos investigadores consideraran que el lince boreal no llegó a habitar más allá de los Pirineos. Ante esta opinión generalizada cabe destacar que algunos zoólogos “basándose en la tradición oral y en documentos históricos” defienden la presencia hasta hace apenas un siglo del lince boreal en la cornisa cantábrica (Nores y Vázquez, 1984; Clavero y Delibes, 2013). Sin embargo, debido a la ausencia de restos físicos, como ejemplares disecados o restos arqueo-paleontológicos, no hay ninguna prueba (más allá de los cráneos mencionados) que sea definitiva y concluyente de la presencia del lince boreal al sur de los Pirineos.

Para este trabajo se recuperó y extrajo el ADMmt (parte de la región control y del citocromo *b*) de restos óseos inéditos pertenecientes a un mínimo de 4 individuos procedentes de simas de Asturias y Navarra. Estos restos fueron analizados conjuntamente con restos postcraneales de diferentes yacimientos de la cornisa cantábrica, atribuidos a distintas especies del género *Lynx*, así como con los cráneos identificados como lince boreales encontrados uno en la sima de Pagolusieta y otro en la de la Sierra de Suevo (Altuna, 1980; Nores, 1999). El objetivo de este trabajo es confirmar, por una parte, la presencia del lince en el norte de la península y conocer, por otra, su posición filogeográfica con respecto a los lince boreales actuales. Para esto último se ha procedido a extraer y secuenciar el ADNmt de 8 individuos datados por contexto

estratigráfico en el periodo Atlántico superior de yacimientos daneses. Tanto las secuencias resultantes de los restos de lince de la península ibérica y Dinamarca, como las secuencias de ejemplares también antiguos de Italia y Francia obtenidas en el artículo II, fueron comparadas con las poblaciones modernas (Ruenees *et al.*, 2014).

Gracias a los análisis de ADNmt y a las dataciones directas de radiocarbono se han identificado como lince restos inéditos de Asturias y Navarra, así como se han podido confirmar restos previamente atribuidos al lince boreal en función de caracteres morfométricos. En este estudio se ha corroborado por primera vez genéticamente la presencia del lince boreal en la península ibérica desde la transición del Pleistoceno al Holoceno hasta el siglo XVI. El estudio del registro fósil junto con los resultados obtenidos sugiere una discontinuidad en la especie de lince que habitó en la cornisa cantábrica. Mientras el lince ibérico será el principal habitante de esta región durante la mayor parte del Pleistoceno, el boreal lo relevará durante el Holoceno. El análisis del ADNmt de restos de lince boreales pertenecientes a poblaciones extintas del oeste de Europa ha permitido conocer la estructura filogeográfica de individuos de poblaciones que habitaron el sur de Europa durante el Pleistoceno y el Holoceno. Estos análisis muestran que en el pasado había un mayor flujo genético entre los lince boreales y que la clara estructura genética (siguiendo un gradiente este-oeste) de las poblaciones actuales de lince boreales (Ruenees *et al.*, 2014) no estaba presente en el pasado.

Artículo inédito IV. **Variaciones genéticas temporales y espaciales en el topillo de Cabrera.**

Para este artículo se ha obtenido un fragmento (345 pb) del citocromo *b* de 38 restos de topillo de Cabrera, *Microtus cabreræ*, de edades que van desde el Epimagdaleniense (~12 000 BP) hasta la actualidad. Los restos provienen de yacimientos de la península ibérica y Francia. Los resultados preliminares de los análisis sugieren que esta especie presentaba una mayor diversidad genética en el pasado. Se observa un aumento de la diversidad durante el Neolítico que confirma el aumento poblacional que sugiere el registro fósil. La presencia de los mismos haplotipos en ciertas regiones y yacimientos durante distintos periodos consecutivos (Mesolítico, Neolítico y la Edad de los Metales) sugiere una cierta continuidad poblacional a lo largo de los citados periodos. No se ha encontrado sin embargo ningún haplotipo antiguo en las muestras modernas, lo que sugiere que ha tenido lugar una pérdida de diversidad genética durante los últimos siglos o que se ha producido un reemplazo poblacional. La comparación de los niveles de diversidad genética entre las poblaciones modernas y las que habitaron en el pasado deben, no obstante, tomarse con cautela, debido a que las muestras antiguas analizadas no son sincrónicas, ni siquiera aquellas que pertenecen a un mismo periodo arqueológico. Además hay que tener en cuenta que todavía no hay datos de poblaciones modernas de topillo de Cabrera de muchas

Resumen

regiones de la península ibérica, lo que dificulta la comparación de la diversidad genética y los patrones filogeográficos entre las muestras antiguas y las modernas. A pesar de estas limitaciones los resultados obtenidos son un avance y un punto de partida que permite tener, por primera vez, un conocimiento directo de las variaciones en la estructura y diversidad genética de esta especie en el pasado.

1.2 Summary

GENETIC STRUCTURE AND DISTRIBUTION CHANGES IN THE PALEARCTIC LYNX AND THE CABRERA'S VOLE SINCE THE LATE PLEISTOCENE TO THE PRESENT

Introduction

This thesis consists of four articles, three published and one unpublished. They address, through the study of aDNA different aspects about paleobiogeography, conservation, phylogeography and fluctuations in genetic diversity over time in different endangered or extinct species of the Iberian Peninsula (the Palearctic lynx, *Lynx lynx* and *Lynx pardinus* and Cabrera vole, *Microtus cabrerae*). Mitochondrial DNA (mtDNA) has been analysed from subfossil and historical remains assigned to the different species of the genus *Lynx* as well as subfossils and modern specimens of Cabrera vole. The sampled remains cover a wide chronological range (from over 50 000 years ago to the present) and comprise different regions of the Iberian Peninsula and Europe.

The main goal of this thesis was to investigate changes in genetic diversity and geographic distribution over time from mtDNA analysis of the Iberian lynx, Eurasian lynx and Cabrera vole. The main interest on the Iberian lynx and Cabrera vole was that both are endangered species endemic to the Iberian Peninsula. Revealing the genetic population history of these species through ancient DNA analysis can provide insight into the development of current conservation management of the species. The interest on the Eurasian lynx relied on the role it played within the Iberian Peninsula in the past. Analysing its past population dynamics will help understand the phylogeographic patterns we observe today. Finally morphometrically misidentified lynx remains were reclassified using mtDNA analysis. The correct species designation of the lynx remains under study has expanded the historic range of the two lynx species living in Europe at the present. Changes in distribution range and genetic diversity in the studied species from the Late Pleistocene to the present have been analysed in the context of the main biotic and/or abiotic factors.

Results synopsis

1) The analysis of mtDNA from chronological series of Iberian lynx and Cabrera vole remains from the Late Pleistocene to the present has revealed variations in genetic diversity of these species over time. From these changes in genetic diversity it was possible to infer demographic changes and relate them to environmental and ecological changes at certain time periods of the evolutionary history of these species.

Summary

2) Temporal and geographic variations were investigated in both the Iberian and Eurasian lynx through the analysis of species identification of lynx remains using mtDNA. For this, we analysed lynx remains that had been previously identified at the species level based solely on the morphometric analysis of postcranial elements. The latter is a difficult task and can potentially lead to misidentification. In this thesis the most variable regions of the cytochrome *b* and the control region were analysed on a set of *Lynx* sp. remains. The samples analysed were morphometrically classified as Iberian lynx (*Lynx pardinus pardinus*), Eurasian lynx (*Lynx lynx*), *Lynx* sp. and as *Lynx spelaeus* or *Lynx pardinus spelaeus*. These samples represent different geographic areas and chronologies in the Iberian Peninsula and other parts of Europe.

The results confirm a larger geographical range during the Holocene and the Pleistocene of the extant European lynx. Furthermore this research provided information about the phylogenetic position of the controversial assemblages of remains classified as *Lynx spelaeus* or *Lynx pardinus spelaeus* commonly known as Cave lynx.

3) The results of previous surveys have allowed the analysis of the phylogeographic structure of the extinct populations of the Eurasian lynx in the south Western Europe.

Results and conclusions

Article I: **50 000 years of genetic uniformity in the critically endangered Iberian lynx.** (Rodríguez *et al.*, 2011).

Extant Iberian lynx populations display very low mtDNA variability. Similarly very low levels of variation have been reported in this species using microsatellites (Casas-Marcé *et al.*, 2013). The control region is one of the most diverse parts of the mtDNA. However the Iberian lynx modern populations have no variation in this region with only one haplotype fixed in all extant lynx. Generally, low levels of genetic diversity in threatened species with low population sizes are attributed to ancient or recent bottlenecks. The amount of genetic diversity is related with the ability to adapt to environmental changes and is expected to have a strong impact on its future survival. Low levels of genetic diversity and a small population size are related to inbreeding depression and reducing the long term fitness of the population.

In order to investigate when the Iberian lynx lost its genetic diversity, we analysed 183 bp from the control region of lynx remains from different geographic locations within the Iberian Peninsula. The samples analysed in this study spanned a time range comprising the last 50 000 years.

Surprisingly we did not find any variation. In all our samples we found the same mitochondrial haplotype that it is fixed in the current populations. These results are unexpected because the

control region is considered one of the most variable regions of the genome and the samples analysed here come from different localities and spanning a time range since the Late Pleistocene until historical times.

In the 19 samples where we got positive results we found the same mitochondrial haplotype that it is fixed in the current populations. The lack of variation over the last 50 000 years suggests an unusually low mutation rate in the mtDNA control region and/or a continuously low population size throughout time.

The survival of the Iberian lynx at least 50 000 years with very low levels of mtDNA genetic diversity suggest that this unusual low variability is something intrinsic to the species, rather than the result of recent or historical bottlenecks. This has important conservation genetic implications because means, that modern Iberian lynx are not particularly threatened by its low levels of mitochondrial genetic diversity. However these results do not exclude that the loss of autosomal genetic variation during the last centuries can have a negative effect in the fitness of the species.

Article II: **Ancient DNA evidence of Iberian lynx palaeoendemism.** (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015a).

In this study we analyse the most variable regions of the cytochrome *b* and the control region in the mtDNA on a set of *Lynx* sp. remains from different sites and chronologies in Spain, Italy, and southern France. By genetically profiling these remains we attempt to investigate whether the Iberian lynx has been misidentified with the Eurasian lynx and therefore had a wider distribution in the past. The remains analysed here have been classified as Iberian lynx (*Lynx pardinus pardinus*), *Lynx* cf. *spelaeus*, *Lynx* sp. and/or Eurasian lynx (*Lynx lynx*) based on morphological features and/or body size. Named as *Lynx* cf. *spelaeus* there are a fossil assemblages commonly known as Cave lynx. This extinct lynx inhabited the south western part of Europe during the Pleistocene. The phylogenetic position of this species is still under debate. It has an intermediate body size between both extant Palearctic lynx. Some of the Italian and French remains morphometrically classified as Eurasian lynx or *Lynx* cf. *spelaeus* were reclassified as Iberian lynx, *lynx pardinus pardinus* based on the mtDNA analysis made in this article.

We genetically confirm, for the first time, the presence of the Iberian lynx in France and Italy during the Holocene and Late Pleistocene increasing the past range distribution of the Iberian lynx in southern-central Europe from Iberia to northern Italy.

Our data does not support a different species or subspecies classification of the Italian lynx remains morphometrically classified a *Lynx* cf. *spelaeus*. All the Italian samples

Summary

morphometrically attributed to *Lynx cf. spelaeus* have the same mitochondrial haplotype or vary in only one transition than modern and ancient Iberian lynx from the Iberian Peninsula. Therefore the Iberian lynx existing today in Spain is a palaeoendemic species which had a higher morphological variability during the Late Pleistocene when it also reached a wider distribution area.

Ancient DNA analysis and direct radiocarbon dating shows that both Palaeartic lynx species were present in Arene Candide (north Italy) during the Last Glacial Maximum.

Article III: **Ancient DNA reveals the identity of the last lynx from northern Spain.** (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015b).

The presence of the Iberian lynx in the Iberian Peninsula it is well documented at least since the Middle Pleistocene. In contrast, with the exception of two undated skulls from two pits in the north of Spain (Altuna, 1980; Nores, 1999), there are no records of Eurasian lynx in the Iberian Peninsula. Due to this lack of Eurasian lynx' records it was generally assumed that the Eurasian lynx never inhabited beyond the Pyrenees. However, some zoologists based on historical documentation from previous centuries argue that the Eurasian lynx inhabit the north strip of Spain until only a few centuries ago (Nores and Vázquez, 1984; Clavero and Delibes, 2013). Despite the broad collection of written sources about the historical presence of lynx in Iberia made by Clavero and Delibes, (2013) they do not provide any conclusive evidence or physical remain of Eurasian lynx in Spain.

For this study we recovered and extracted the mtDNA from novel lynx remains belonging to a minimum of four individuals from two pits located in Asturias and Navarra. These remains were analysed together with postcranial lynx remains from different sites located in the Cantabrian strip of Spain and with the skulls previous identified as Eurasian lynx from the pit of Pagolusieta and one pit from Sierra de Suevo (Altuna, 1980; Nores, 1999).

The main goals of this study are; a) To confirm the Eurasian lynx presence in the north of the Iberian Peninsula during historical times. b) To know the phylogeographic position of the ancient extinct Western Europe population in the context of the modern day Eurasian lynx phylogeographic patterns.

DNA was extracted and sequenced from eight lynx Danish remains dated by stratigraphic context to the Late Atlanticum. The sequences obtained from the Eurasian lynx remains from Iberia, Denmark and the ones used in the article II from Italy and France were compared with the modern day Eurasian lynx populations (Ruenees *et al.*, 2014).

Due to the mtDNA analysis and the radiocarbon dates of lynx remains from the Cantabrian strip of Spain it was possible to genetically confirm, for the first time, the Eurasian lynx presence in the north of Spain since the Pleistocene-Holocene transition until a few centuries ago.

The genetic analysis made here together with the paleontological records suggest a lynx species discontinuity between the Late Pleistocene and the Holocene in the Cantabrian strip of the Iberian Peninsula. During the Late Pleistocene the Iberian lynx was the main inhabitant of the north of Spain being replaced by the Eurasian lynx since the Pleistocene-Holocene transition.

The analysis made in this study indicates that the Eurasian lynx has a less clear phylogeographic structure in the past with higher levels of gene flow between populations in historical times.

Article unpublished IV. **Temporal and spatial genetic variations in the Cabrera vole.**

We obtained a fragment (345 bp) of the cytochrome *b* from 38 Cabrera voles, *Microtus cabrerae*, remains with ages with a chronological range from the Epimagdalenian (~12 000 BP) to the present. These remains come from different Iberian and French sites. The preliminary results show that this species has higher levels of genetic diversity in the past. The haplotype continuity observed between some consecutive periods (Mesolithic, Neolithic and Metals Age) suggests population stability during the mentioned periods. However, any ancient haplotype survive in the current Iberian populations. These results suggest that one or more bottlenecks have taken place during historical times, or that there was a population replacement. The obtained data suggest an increase of genetic diversity during the Neolithic with a posterior reduction since this period to the present. In order to see how the haplotypes change through time we built a network that allow to differentiated between samples from different time periods.

The comparisons of genetic diversity and phylogeographic patterns between ancient and modern populations are difficult to interpret due to biases caused by number of samples per geographic location and the different chronologies of the ancient samples. Furthermore it is important to note that some modern Cabrera vole populations from different geographic regions of Iberia were still unanalysed making difficult the comparison of the phylogeographic patterns between ancient and modern populations. In spite of these limitations our results are a starting point for future research and the first approach to study the past genetic diversity of the Cabrera vole.

2. Antecedentes/Background

2.1 Antecedentes

En el transcurso de las últimas décadas numerosos trabajos han mostrado la idoneidad de los análisis de ADN antiguo (ADNa) para resolver cuestiones acerca de la filogeografía, la filogenia y la historia evolutiva de diferentes especies (ej. Hofreiter *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2004; Valdiosera *et al.*, 2007; 2008; Barnett *et al.*, 2014; Dalén *et al.*, 2007; Cooper *et al.*, 2001; Orlando *et al.*, 2003; Lorenzen *et al.*, 2011).

La posibilidad de analizar el ADN de organismos que vivieron hace siglos, incluso milenios, proporciona una ventana al pasado que permite abordar cuestiones que hasta hace unos años se creían fuera de nuestro alcance. Estos análisis, son especialmente útiles en aquellos casos donde la impronta en el genoma de procesos ocurridos hace cientos o miles de años, como migraciones, cuellos de botella, hibridaciones o extinciones, ha quedado enmascarada o diluida por el paso del tiempo. En supuestos como estos, solo el análisis directo del genoma de los organismos que habitaron en el pasado puede arrojar luz sobre los procesos que han dado lugar a la estructura genética que se observa en las poblaciones actuales.

De la paleogenética a la paleogenómica los estudios con ADNa están revolucionando distintas ramas de la biología, como la filogenética o la genómica comparada. Por ejemplo, la secuenciación de parte del genoma de especies extintas como el mamut (Krause *et al.*, 2006; Rogaev *et al.*, 2006; Rohland *et al.*, 2007) o el neandertal (Green *et al.*, 2010) (dos especies icónicas de este emergente campo de la paleontología molecular) han permitido conocer las relaciones filogenéticas que guardan con sus parientes actuales más cercanos, elefantes asiáticos y humanos respectivamente. En la misma dirección la obtención y análisis del genoma completo de homínidos extintos como los denisovanos (Meyer *et al.*, 2012) y el neandertal (Green *et al.*, 2010) ha permitido inferir la hibridación entre nuestros antepasados euroasiáticos y estas especies de humanos con los que cohabitaron durante el Pleistoceno. En los próximos años la genómica comparada de los homínidos extintos recientemente secuenciados, humanos modernos y otros primates promete apasionantes descubrimientos acerca de nuestra naturaleza humana, nuestras enfermedades y, en definitiva, nuestra evolución como especie.

El estudio de la dinámica de poblaciones en el pasado aporta una nueva perspectiva a la hora de comprender procesos evolutivos tales como la especiación o la extinción de organismos, así como las posibles causas que influyeron en dichos procesos (ej. cambios climáticos). A través

del análisis del ADN de poblaciones históricas es posible estimar sus variaciones demográficas a lo largo del tiempo, así como los niveles de flujo genético, averiguar si hubo reemplazos poblacionales o qué relaciones existían entre las distintas poblaciones. Conocer la historia evolutiva de una población ofrece un nuevo punto de vista a la hora de elaborar estrategias de conservación y planes de gestión para poblaciones amenazadas.

El análisis molecular de series cronológicas de organismos de una población permite conocer su microevolución en tiempo real, sin la necesidad de extrapolar los procesos pasados a partir del estudio de la estructura genética de poblaciones que viven en la actualidad. Esto tiene indudables ventajas, ya que procesos evolutivos completamente diferentes pueden haber dejado la misma impronta genética en las poblaciones actuales. Posibilidad está que impide inferir con fiabilidad a partir del estudio de los patrones genéticos de las poblaciones modernas la causa que los han provocado. Por ejemplo, una baja diversidad genética para un determinado marcador molecular en poblaciones actuales podría ser resultado de un cuello de botella, del efecto fundador, de una tasa de mutación muy baja para la región del genoma estudiada o de la fijación de alelos debido a la selección natural. Que dos poblaciones de una especie determinada aisladas geográficamente sean hoy en día genéticamente diferentes puede deberse a que ambas tienen una historia evolutiva diferente, a un efecto de la deriva genética o a la pérdida de las poblaciones intermedias. Estos últimos fenómenos difícilmente podrían ser detectados si no se analizan directamente las poblaciones extintas de esa especie a lo largo de su área de distribución histórica.

El estudio directo de poblaciones extintas da la posibilidad de conocer si dos poblaciones amenazadas y aisladas entre sí han evolucionado de manera independiente; o si, por el contrario, han compartido un pasado común en época reciente. Si dos poblaciones han estado separadas durante muchas generaciones y han desarrollado adaptaciones diferentes, deben conservarse por separado. Sin embargo, si ambas poblaciones han evolucionado juntas hasta época reciente, se abre la posibilidad de manejar dichas poblaciones como una sola. En dicho escenario podría plantearse la translocación de individuos de una población a otra para aumentar la diversidad genética de la población más amenazada o también la reproducción cruzada entre ambas poblaciones (Smulders *et al.*, 2003; Goldstein y DeSalle, 2003; Godoy *et al.*, 2009; Casas-Marcé *et al.*, 2013).

El análisis de la variación genética de una especie y de los cambios en su distribución geográfica a lo largo del tiempo es clave para entender su historia evolutiva. Saber cuándo y por qué una especie ha sufrido un cuello de botella, y conocer si dicho cuello de botella implicó o no un descenso de su variabilidad genética, proporciona información relevante para la gestión de

especies en riesgo de extinción. El estudio interdisciplinar de los cambios espaciotemporales en la composición genética, el clima y la vegetación, permitirá entender mejor cuál fue la respuesta de una población o especie a los distintos fenómenos que han influido en su historia evolutiva. Esta información proporciona modelos que ayudan a predecir el comportamiento de especies en peligro de extinción frente a sus presentes y futuras amenazas (cambio climático, especies invasoras, falta de presas, consanguinidad, pérdida de hábitat, etc.).

Por otro lado, el ADN permite identificar con seguridad especies próximas y/o crípticas, así como resolver ambigüedades taxonómicas de restos fósiles (Shepherd y Lambert, 2008; Copper *et al.*, 1996). La correcta identificación de los restos fósiles a nivel específico es imprescindible para un buen conocimiento de la distribución histórica de una especie. De ahí la idoneidad del análisis del ADN en el caso, por ejemplo, de los linces ibéricos (*Lynx pardinus pardinus*) y los linces boreales (*Lynx lynx*), que no pueden ser diferenciados con fiabilidad a partir de restos óseos, salvo mediante el estudio de cráneos completos (Hemmer, 1993a, b), los cuales rara vez se encuentran en el registro fósil.

2.2 Background

During the last decades numerous studies have shown the suitability of ancient DNA (aDNA) analysis to address questions regarding the phylogeographic, phylogenetic and evolutionary history of different species (e.g. Hofreiter *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2004; Valdiosera *et al.*, 2007; 2008; Barnett *et al.*, 2014; Dalén *et al.*, 2007; Cooper *et al.*, 2001; Orlando *et al.*, 2003; Lorenzen *et al.*, 2011). Ancient DNA analysis are particularly useful in those cases where events that occurred hundreds or thousands of years ago, like migrations, bottlenecks, hybridizations or extinctions, have been masked or diluted in an organism's genome through time. In those cases, only the direct analysis of the genome from organisms that lived in the past can shed light on the processes that have led to the genetic structure observed in present day populations.

From palaeogenetics to palaeogenomics, aDNA studies are revolutionizing different branches of biology, such as phylogenetics and comparative genomics. For example, the sequencing of the genome of extinct species like the mammoth (Krause *et al.*, 2006; Rogaev *et al.*, 2006; Rohland *et al.*, 2007) or the Neanderthal (Green *et al.*, 2010) (two iconic species of this field) have revealed their phylogenetic relationships with their closest living relatives, Asian elephants and modern humans respectively. Similarly, through the sequencing of the complete genome of extinct hominids such as denisovans (Meyer *et al.*, 2012) and Neanderthals (Green *et al.*, 2010) it has been possible to infer hybridization events between our Eurasian ancestors and these human species with whom they cohabited during the Pleistocene. In the coming years, comparative genomic analysis between extinct hominids, modern human genomes and other primates, foresees exciting discoveries about our human nature, our diseases and, ultimately our evolution as species.

The direct study of population dynamics in the past brings a new perspective when it comes to understand evolutionary processes such as speciation or the extinction of organisms, as well as the possible causes influencing these processes (e.g. climate change or human activities). The genetic analysis of ancient populations from different points in time provides information about their demographic fluctuations over time, population replacement, gene flow and levels of genetic diversity. The knowledge of the evolutionary history of a population provides unique and important information to develop conservation strategies and management plans for endangered populations.

The molecular analysis of chronological series of individuals allows us to understand the microevolution of a population or species in real time. If we can go back in time we do not need to infer past processes from the study of the genetic structure of current populations. This has

Background

important advantages, since completely different evolutionary processes may have left the same genetic signal on the current populations. Therefore it is not possible to infer from the modern populations genetic structure the causes that shaped the patterns that we observe today. For example, a low genetic diversity for a given molecular marker in contemporary populations may be the result of a bottleneck, a founder effect, a very low mutation rate or the fixation of alleles due to natural selection.

Ancient DNA can also be used as an important tool for conservation management plans. Two extant populations of the same species geographically isolated can differ genetically due to different causes; a different evolutionary history, the effect of genetic drift or the loss of the intermediate populations. These processes can hardly be detected if we do not analyse directly extinct populations of these species throughout its historic range. The direct study of extinct populations enable us to know if two current isolated populations, have evolved independently or if, instead, have shared a common past in recent times. Two populations that have evolved isolated from each other for many generations and have adapted to their respective environments should be kept separate. On the other hand, if two populations have evolved together until recent times it would be possible to manage these populations as one. Under such scenario, translocation of individuals might be considered from one population to another in order to increase the genetic diversity of the population at risk or to promote interbreeding between the two populations (Smulders *et al.*, 2003; Goldstein and DeSalle, 2003; Godoy *et al.*, 2009; Casas-Marcé *et al.*, 2013).

The analysis of changes in genetic variation and geographical distribution of a species over time is essential to understanding its evolutionary history. To know when and why a species has suffered a bottleneck (and if this bottleneck involved or not a decline in genetic variability) provides useful information to consider for managing species at risk of extinction. The interdisciplinary study of the spatial and temporal changes in genetic composition, climate and vegetation will enable a better understanding of how was the response of a population or species to the different phenomena that have influenced its evolutionary history (climate, competition with other species, etc.). This information provides models that help to predict the behaviour of endangered species facing its current threats (climate change, invasive species, lack of prey, consanguinity, habitat loss, etc.).

On the other hand, aDNA enables to identify with reliability close and/or cryptic species, as well as to resolve taxonomic ambiguities of fossils (Shepherd and Lambert, 2008; Copper *et al.*, 1996). Correct identification of the fossils at a specific level is essential for a good understanding of the historical distribution of a species. For example, the Iberian lynx (*Lynx pardinus pardinus*)

and the Eurasian lynx (*Lynx lynx*), cannot be differentiated with reliability from skeletal remains, except by studying complete skulls (Hemmer, 1993a, b), which are rarely found in the fossil record.

3. Introducción

3.1 ADN antiguo

3.1.1 Antecedentes

En 1984 Higuchi y sus colaboradores obtuvieron 229 pb de ADNmt de una piel de quagga (*Equus quagga quagga*), demostrando que es posible obtener ADN de una especie extinta hace más de un siglo (Higuchi *et al.*, 1984). El estudio directo del material genético de organismos extintos proporciona información única que no puede ser inferida a partir del análisis del ADN de especies actuales. En el caso del quagga, se demostró que era más próximo a las cebras que a los caballos. En 1986, apenas un par de años después de este trabajo pionero, Kary Mullis descubrió la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986; Mullis y Faloona, 1987). Esta técnica permite hacer múltiples copias de una secuencia de ADN determinada partiendo de una cantidad inicial muy pequeña de moléculas. Gracias a la PCR se aumentó exponencialmente la capacidad para amplificar y secuenciar ADN de diferentes organismos de manera sistemática, provocando una revolución en el campo de la biología molecular. Además, proporcionó la herramienta necesaria para la recuperación y amplificación de secuencias a partir de material orgánico antiguo y degradado. Este tipo de material se caracteriza por tener muy pocas moléculas de ADN endógeno. Sin la amplificación de la PCR las posibilidades de obtener secuencias informativas de organismos que vivieron hace miles de años se reducen drásticamente. La gran cantidad de secuencias generadas, tanto de organismos actuales como extintos hace siglos, se han venido depositando en lugares de almacenamiento públicos como el GenBank o en EMBL, haciendo posible la comparación de secuencias de individuos, poblaciones y especies de distintas épocas y lugares.

Desde sus comienzos con la secuenciación de unos cientos de pb de ADNmt en la década de los 80 (Higuchi *et al.*, 1984; Hagelberg *et al.*, 1989), la disciplina del ADN antiguo no ha dejado de crecer, logrando la secuenciación de genomas mitocondriales completos de organismos extintos hace miles de años (Copper *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2006; Rogaev *et al.*, 2006), primero, y grandes fragmentos de ADN nuclear o incluso genomas completos, poco tiempo después (Poinar *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2006; Noonan *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2010). Este salto cualitativo en la cantidad y antigüedad del número de pb secuenciadas en apenas dos décadas ha sido posible a raíz de la revolución tecnológica de las plataformas de secuenciación (Margulies *et al.*, 2005; Mardis, 2009).

No existe una definición consensuada de la disciplina del ADN_a o paleogenética. Sin embargo, se acepta por la mayoría de los investigadores que esta disciplina englobaría en rasgos generales todo tipo de estudio de las moléculas de ADN a partir de material biológico degradado por el paso del tiempo. El material objeto de estudio puede tener una antigüedad de entre hace unas décadas hasta miles de años. Cualquier material orgánico degradado es una potencial fuente de ADN_a, las más comunes son: dientes, huesos, semillas, pieles, pelo, sedimentos y coprolitos. Estos materiales se pueden obtener de distintos lugares como, por ejemplo, museos, colecciones y yacimientos arqueológico-paleontológicos. A pesar de que la molécula de ADN es relativamente estable, la temperatura y otros factores ambientales influyen en su supervivencia a lo largo del tiempo (Lindahl, 1993). Esto provoca que haya ambientes que resultan más favorables para la preservación del ADN que otros, por ejemplo, los ambientes fríos como la alta montaña, los bloques de hielo, las cuevas o los sedimentos de permafrost son mucho más favorables que los ambientes húmedos y cálidos propios de latitudes tropicales (Smith *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003). A día de hoy el ADN más antiguo recuperado hasta la fecha en latitudes medias proviene de restos de *Ursus deningeri* y de homínidos excavados en la Sima de los Huesos (Atapuerca, Burgos) con edades que rondan los 400 000 años (Valdiosera *et al.*, 2006; Dabney *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2014). Estos resultados han sido posibles debido a que la Sima de los Huesos está situada a unos 30 m de la superficie y en unas condiciones de temperatura y humedad constante que han actuado sobre los fósiles como una nevera natural. Se ha recuperado ADN de edades similares e incluso superiores pero siempre de restos que se han preservado en permafrost en latitudes más altas y climas más fríos (Willerslev *et al.*, 2007; Orlando *et al.*, 2013).

3.1.2 Autenticación y limitaciones

El ADN_a se diferencia del ADN moderno en que se encuentra muy degradado, fragmentado, en poca cantidad y en numerosas ocasiones químicamente modificado. Esto se debe principalmente a la acción de las enzimas endonucleasas y a los microorganismos que comienzan a degradar el ADN inmediatamente después de la muerte del organismo, así como a procesos químicos como la depurinización y la desaminación (Smith *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003). La combinación de estos factores provoca que el ADN_a se encuentre en fragmentos muy cortos (es muy poco frecuente que se puedan obtener secuencias superiores a 200 pb en organismos con decenas de miles de años de antigüedad) (Pääbo *et al.*, 1989; Cooper, 1994), así como que no haya mucho ADN endógeno y que ciertas bases en determinadas posiciones sean propensas a modificarse (Briggs *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2003a; Gilbert *et al.*, 2003b; Hansen *et al.*, 2001; Mitchell *et*

al., 2005; Stiller *et al.*, 2006; Hofreiter *et al.*, 2001; Noonan *et al.*, 2006; Pääbo, 1989; Pääbo *et al.*, 2004). Esto da lugar a que los estudios de ADN presenten una serie de limitaciones, como el ser muy susceptibles a la contaminación, proporcionar poca cantidad de información, el ADN suele encontrarse dañado y además están restringidos por límites temporales y ambientales. Todos estos problemas pueden dar lugar a interpretaciones erróneas de los resultados. Además, debido a la escasez del registro fósil y al gran valor del patrimonio paleo-arqueológico, no abundan las fuentes y son difíciles de conseguir.

A los pocos años de surgir esta disciplina se puso de manifiesto la necesidad de cumplir con unos criterios de autenticación (Cooper y Poinar, 2000; Gilbert *et al.*, 2005; Hofreiter *et al.*, 2001), así como de profundizar en el tipo y causa de los daños *post mortem* que sufre la molécula de ADN (Gilbert *et al.* 2003a, 2003b). Estos criterios de autenticidad, que, si bien varían ligeramente según el tipo de material y la especie de donde se extrae el ADN, presentan unos puntos básicos recomendables en todo estudio de ADN. Es importante destacar que a la lista de criterios de autenticidad debe aplicarse el sentido común con medidas específicas a cada caso particular (Gilbert *et al.*, 2005).

Criterios anticontaminación y de autenticidad:

1. Separación física entre el laboratorio de ADN (de extracción del material antiguo y manipulado de muestras) y el de postPCR (donde se manipula el ADN de las muestras, una vez que ha sido amplificado).
2. Trabajo dentro de campanas de extracción con flujo laminar, uso de doble par de guantes, mascarillas y traje completo en el laboratorio de ADN.
3. Lavado de los utensilios y superficies con hipoclorito de sodio diluido y etanol antes y después de cada experimento.
4. Uso de luz UV durante la noche en el laboratorio de ADN.
5. Monitorizar cada uno de los experimentos con blancos positivos y negativos tanto en las extracciones como en las amplificaciones por PCR.
5. Replicar la secuencia obtenida al menos 2 veces, a partir de diferentes PCRs y diferentes extractos.
6. Nunca extraer ni trabajar con material orgánico moderno en el laboratorio de ADN.
7. Uso de pipetas esterilizadas con puntas con filtro.
8. Cuando se trabaja con ADNmt para evitar la presencia de NUMTs es aconsejable utilizar oligonucleótidos específicos para la especie objeto de estudio, diseñados a partir de

secuencias de ADNmt previamente conocidas. Se recomienda usar varios pares de oligonucleótidos que amplifiquen el mismo fragmento de ADNmt para comprobar la congruencia entre las secuencias amplificadas con distintos oligonucleótidos y reducir así las probabilidades de amplificar NUMTs (Den Tex *et al.*, 2010).

9. Tener siempre en cuenta la naturaleza degradada, la preservación y la antigüedad de la muestra de la que extraemos el ADN antiguo. De forma que reproduzcamos los resultados en un laboratorio diferente si obtenemos secuencias demasiado largas para la edad y lugar de preservación de la muestra.

10. En el caso de la secuenciación masiva (*shot-gun sequencing*) existen además otros criterios que tener en cuenta, como los patrones de daño (ej. se observa en el ADN antiguo un incremento de sustituciones de citosina por timina cerca del final de los fragmentos de ADN) y de fragmentación que sirven para corroborar la naturaleza endógena y antigua del ADN analizado (Briggs *et al.*, 2007; Sawyer *et al.*, 2012; Allentoft *et al.*, 2012).

El ADN sufre constantemente una serie de daños que son reparados en su mayoría por los mecanismos de reparación de la célula durante la vida del organismo. Después de la muerte del organismo dichos mecanismos enzimáticos de reparación dejan de funcionar y la molécula de ADN se va degradando en función del tiempo y de los factores ambientales circundantes.

Los principales procesos de daño *post mortem* son:

DNA Cross-links: Se forman reacciones químicas entre las dos cadenas de ADN o entre la molécula de ADN y otras biomoléculas inhibiendo la PCR (ej. productos de Maillard).

Fragmentación en las cadenas: Las cadenas de ADN se van fragmentando con el paso del tiempo debido a la acción de las nucleasas endógenas, enzimas que cortan las cadenas del ADN (Pääbo, 1989) y a procesos hidrolíticos. Los principales puntos de la molécula del ADN susceptibles al ataque hidrolítico son los enlaces fosfodiéster y los enlaces glicosídicos, que provoca la ruptura de las cadenas de ADN en los primeros y la pérdida de bases en los segundos (depurinización) (Lindahl, 1993; Höss *et al.*, 1996).

Miscoding lesions: Modificación de los nucleótidos debido a procesos químicos que provocan la sustitución de un nucleótido por otro químicamente modificado. El daño más común observado son dos tipos de transiciones nucleotídicas. El tipo I es el cambio de adenina a guanina y de timina a citosina, resultado de la deaminación de adenina a hipoxantina, y el tipo II de citosina a timina y de guanina a adenina, provocado por la deaminación de citosina a uracilo (Gilbert *et al.*, 2003a).

A pesar de las importantes limitaciones de esta disciplina, si se siguen los protocolos de anticontaminación y autenticación citados anteriormente, el ADN es una herramienta fiable y la única forma de conocer la estructura genética de individuos o poblaciones extintos hace décadas o incluso milenios. Tener acceso a la información genética de series cronológicas de individuos localizados temporal y espacialmente permite reconstruir las variaciones en la diversidad genética de una población o especie a lo largo del tiempo. A través de las variaciones temporales en la diversidad genética es posible inferir las fluctuaciones demográficas de las poblaciones estudiadas. Esta información es clave para comprender el impacto de fenómenos ambientales pasados en una población determinada. El estudio de la estructura genética de poblaciones extintas a lo largo del tiempo permite conocer si se han producido reemplazos poblacionales, migraciones o hibridaciones entre distintas poblaciones. Gracias a la información genética que obtenemos de los individuos que vivieron en el pasado es posible abordar diversas cuestiones acerca de la evolución, filogeografía, filogenética, conservación y genómica funcional desde una nueva perspectiva histórica.

3.2 G. *Lynx* paleontología

3.2.1 Aparición del Género *Lynx*

Los principales linajes en los félidos se establecieron en un periodo de tiempo relativamente corto: entre hace 10.8 y 6.2 mda (millones de años). La separación entre el linaje de los lince (género *Lynx*), el ocelote (*Leopardus pardalis*) y el puma (*Puma concolor*) se estima que ocurrió entre hace 8.0 y 6.7 mda (Johnson *et al.*, 2006). El género *Lynx* en la actualidad está compuesto por cuatro especies, dos euroasiáticas (el lince ibérico, *Lynx pardinus* y el boreal, *Lynx lynx*) y dos americanas (el lince canadiense, *Lynx canadensis* y el lince rojo, *Lynx rufus*) (Fig. 1).

Tanto la evolución como el origen geográfico del género *Lynx* son controvertidos. El registro más antiguo de un representante del género *Lynx* estaría entre los 8 a 5.3 mda en Florida, lo que sugiere que este género apareció en Norte América (MacFadden y Galiano, 1981; Martin, 1989). Los datos filogeográficos refuerzan esta hipótesis, ya que los miembros más basales de este grupo, el lince rojo y el lince canadiense, tienen y han tenido siempre una distribución exclusivamente americana. Sin embargo la hipótesis clásica más generalizada entre los paleontólogos apoya un origen africano (Wederlin, 1981; Kurten, 1968).

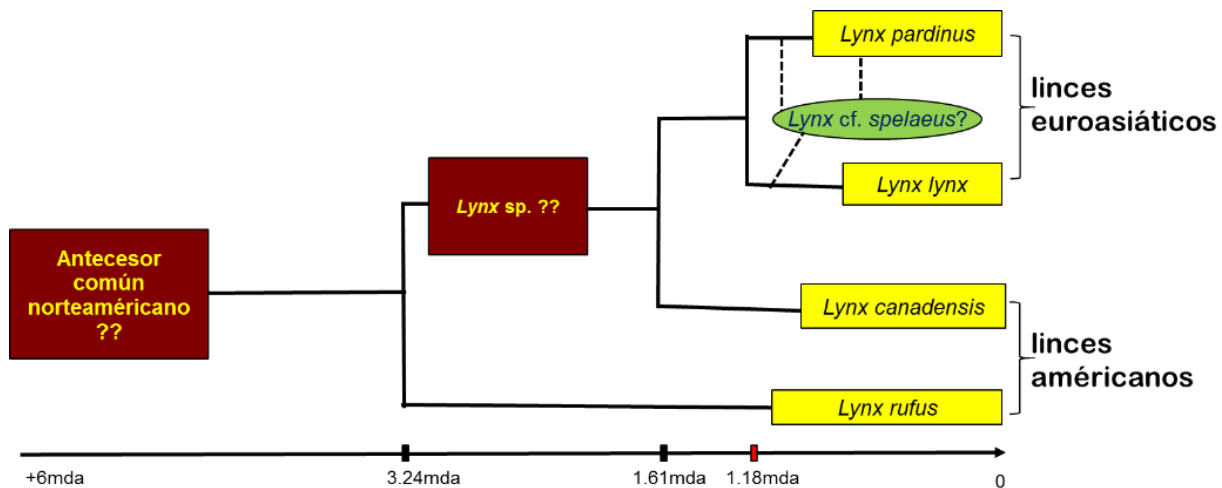


Fig. 1. Filogenia del género *Lynx*. Las edades de divergencia aproximadas entre las distintas especies de lince han sido tomadas de Johnson *et al.* (2006).

El lince rojo fue el primero en diferenciarse del resto en torno a hace 3.24 mda (Wederlin, 1981; Johnson *et al.*, 2006). Los estudios filogenéticos muestran que el lince ibérico está más emparentado con el lince boreal que con las otras dos especies de lince de distribución exclusivamente americana (Johnson *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2006). Estos estudios basados en datos moleculares sugieren que las dos especies de lince paleárticas compartieron un antecesor común que cruzó a través del estrecho de Bering hacia Eurasia entre hace 1.6 y 1.2 mda (Johnson *et al.*, 2006). Tanto estas fechas de la llegada a Eurasia del antecesor de los lince paleárticos como el origen americano del género contrastan con los datos paleontológicos. Por un lado un reciente estudio defiende que la presencia del primer resto de lince ibérico (*Lynx pardinus pardinus*) hallado en la cueva Avenc Marcel (Barcelona) se remonta a 1.6-1.7 mda (Boscaini *et al.*, 2015); por lo tanto, antes de la presunta llegada y diferenciación del antecesor de los lince ibéricos y boreales. Por otro lado, está documentada la presencia en Europa y África de fósiles Pliocenos, clasificados como *Lynx issiodorensis* (Croizet y Jobert, 1828), anteriores a la presunta migración desde América. Así pues, se encuentran fósiles de *Lynx issiodorensis* en el Plioceno tanto en África (Cape Province en el sur África (Hendey, 1974)) como en Europa (Perpignan y Saint-Vallier en Francia, Villaroya y La Puebla de Valverde en España, y Upper Valdarno en Italia (Ficarelli y Torre, 1977; Arribas Herrera y Bernard García, 1994; Kurtén y Crusafont, 1977; Viret, 1954; Kurtén, 1978; Werdelin, 1981)). El *Lynx issiodorensis* es considerado por un gran número de paleontólogos como el antecesor común de las distintas especies de lince actuales (Kurten, 1968; Werdelin, 1981; Ficarelli y Torre, 1977). Según esta teoría los lince habrían surgido en África y migrado a Eurasia donde *Lynx issiodorensis* habrían dado lugar a las 4 especies de lince que habitan en la actualidad. En primer lugar habría aparecido el *Lynx rufus*,

el cual se dispersaría por América. En Europa y Asia el *Lynx issiodorensis* daría lugar al lince ibérico y al boreal, respectivamente. Finalmente, poblaciones asiáticas del lince boreal habrían emigrado a América, dando lugar al *Lynx canadensis* (Werdelin, 1981). Este último punto contrasta con los datos moleculares que indican que el lince boreal está más emparentado con el ibérico que con el canadiense (Johnson *et al.*, 2006).

La controversia sobre el origen y la evolución de los lince no se limita a las diferencias entre los estudios moleculares y paleontológicos. Morales *et al.* (2003), tomando como base material de Layna (Soria), defienden que los restos fósiles pliocenos atribuidos a *Lynx issiodorensis* pertenecen en realidad al género *Caracal*. De ser esto cierto, no habría presencia de lince en el Plioceno de Europa, lo que concuerda con el origen norteamericano y la posterior migración a Eurasia sugerida por los estudios basados en datos moleculares (Johnson *et al.*, 2006). El trabajo de Morales *et al.* (2003) muestra que es necesaria una revisión de la evolución del género *Lynx*, ya que el ampliamente aceptado como antecesor común de las distintas especies de lince actuales *Lynx issiodorensis*, (Croizet y Jobert, 1828; Kurtén y Granqvist, 1987; Kurtén, 1968; Werdelin, 1981; Ficarelli y Torre, 1977) es sospechoso de no pertenecer siquiera al mismo género que sus hipotéticos descendientes (Morales *et al.*, 2003).

3.2.2 Evolución de los lince paleárticos

El lince boreal evoluciona en China y se extiende a Europa, donde aparece en el registro fósil en el Eemian interglaciar (~0.130-0.115 mda) (Kahlke, 1999). Por su parte el lince ibérico en su forma de *Lynx cf. spelaeus* aparece por primera vez de manera inequívoca en Valdemino (norte de Italia) durante la transición del Pleistoceno Inferior al Medio (Ghezzi *et al.*, 2014). Desde entonces es constatada su presencia de manera frecuente en varios lugares del sur de Europa, donde da lugar, con el paso del tiempo, al lince ibérico actual *Lynx pardinus pardinus* (Kurtén y Granqvist, 1987; Werdelin, 1981; Bonifay, 1971; Testu, 2006).

Durante el Pleistoceno Superior y Medio la mayoría de los restos de lince del suroeste Europeo que no pueden ser atribuidos al lince boreal (*Lynx lynx*) son clasificados como *Lynx pardinus spelaeus* (Boule, 1906-1910) o *Lynx spelaea = Lynx spelaeus* (Bonifay, 1971). Este enigmático conjunto de fósiles, comúnmente conocido como lince de las cavernas, tiene un tamaño intermedio entre las dos especies de lince paleárticos actuales y su posición filogenética es objeto de debate (Fig. 2). La mayoría de los especialistas consideran que los restos clasificados como *Lynx pardinus spelaeus* del Pleistoceno Medio son el antecesor directo de los lince ibéricos actuales, mientras que los restos igualmente atribuidos a *Lynx pardinus spelaeus* del

Pleistoceno Superior pertenecen a una subespecie del lince ibérico de mayor tamaño (Kurtén y Granqvist, 1987; Boule 1906-1910; Boule y Villeneuve, 1927; Werdelin, 1981; García y Arsuaga, 1998; García, 2003). Sin embargo, existe otra corriente de autores que consideran que estos conjuntos de fósiles de lince deben clasificarse como *Lynx spelaeus* (Bonifay, 1971), en especial los del Pleistoceno Medio (Testu, 2006), aduciendo que tienen una serie de características únicas que justifican su asignación como especie independiente de la de los dos lince paleárticos actuales (Bonifay, 1971; 1978; Testu, 2006; Lorfèvre, 2009; Ghezzi *et al.*, 2014; Hemmer, 2001). La clasificación de este conjunto de restos de tamaño intermedio entre las dos especies actuales como *Lynx pardinus spelaeus* es probablemente la más aceptada entre los paleontólogos (al menos para restos del Pleistoceno Superior). No obstante, en la literatura, sobre todo en Francia e Italia, aparecen con mayor frecuencia clasificados como *Lynx spelaeus* o *Lynx* cf. *spelaeus*, apoyando su singularidad específica (ej. Bonifay, 1971, 1978; Cassoli y Tagliacozzo, 1994; Grayson, 1994, 1998; Valensi, 1994; Blasco, 1997; Valensi y Psathi, 2004).

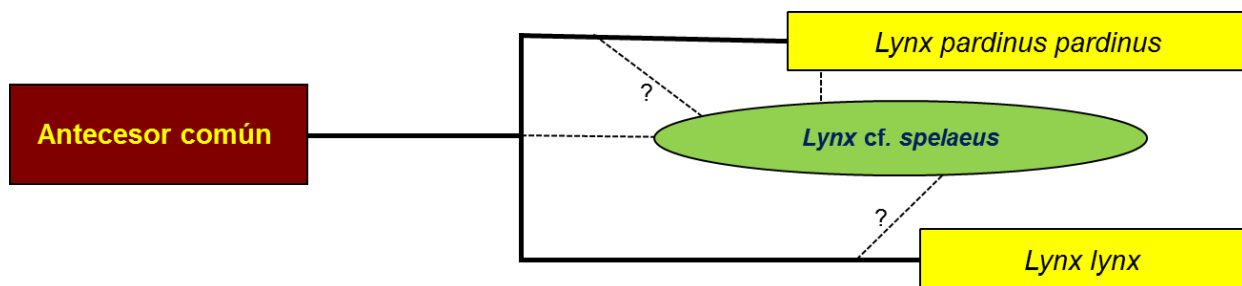


Fig. 2. Esquema donde se representan las posibles relaciones filogenéticas del *Lynx* cf. *spelaeus* = *Lynx pardinus spelaeus* con los lince paleárticos actuales

En este trabajo el conjunto de restos de lince de las cavernas del Pleistoceno Superior, que englobaría a todos los clasificados como *Lynx pardinus spelaeus* / *Lynx spelaeus* / *Lynx spelaea* (la terminación femenina viene de cuando los lince estaban englobados en el género *Felis* por lo que las especies se declinaban en femenino), serán agrupados bajo el término de *Lynx* cf. *spelaeus*.

3.3 Lince ibérico

3.3.1 Distribución histórica

En la actualidad las diferencias, tanto genéticas como ecológicas, entre las dos especies de lince paleárticos están bien documentadas (Beltrán *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2006; Ferrer y Negro, 2004). Sin embargo, hace tan solo unas décadas se consideraba al lince

ibérico como una subespecie del lince boreal. Esto propició que muchos restos fósiles excavados y estudiados antes de que se reconociera al lince ibérico como especie independiente estén clasificados como *Felis lynx* (que por aquel entonces englobaba a ambas especies de lince paleárticas). A la histórica ambigüedad taxonómica hay que sumarle la dificultad de una correcta identificación específica a partir de la morfometría de restos postcraneales. Debido a estas limitaciones en numerosas ocasiones es imposible saber a qué especie de lince se refieren los estudios faunísticos de muchos yacimientos europeos.

El registro fósil sugiere que durante el Pleistoceno Superior el lince ibérico y su principal presa el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) estuvieron ampliamente distribuidos por toda la península ibérica (López-Martínez, 2008; Callou, 2002, 1995). Incluso en la cornisa cantábrica donde se encuentran restos de lince ibérico (ej. Cueva de Morín, Cueva Ermitia, Lezetxiki, Tito Bustillo, Bolinkova, Polvorín, Cueto de la Mina, Urratxa III) (Altuna, 1972, 1976; Castaños, 1982, 1883, 1986, 1993) en los mismo sitios o próximos temporal y espacialmente a yacimientos con restos de conejo (ej. Cueva Oscura de Ania, Tito Bustillo, Bolinkoba, Lezetxiki, La Lluera, Urratxa III) (Álvarez, Sánchez y López, 2007; Altuna, 1976, 1972, 1994; Castaños, 1993; López-Martínez, 2008). Estos registros de conejos, aunque escasos, sugieren la coexistencia de predador y presa durante el Pleistoceno Superior en la cornisa cantábrica (Fig. 3). Desde finales del Pleistoceno prácticamente desaparecen los registros de lince ibéricos en la cornisa cantábrica.

Salvo contadas excepciones (ej. Bonifay, 1971, 1978), durante el Pleistoceno Superior no hay citas de lince ibéricos fuera de la península ibérica (Sommer y Benecke, 2006), al menos *sensu stricto* (*Lynx pardinus pardinus*). Sin embargo, sí hay restos clasificados como *Lynx spelaeus* o/y *Lynx pardinus spelaeus* en la mayor parte del suroeste de Europa, tanto en el Pleistoceno Medio como superior (ej. García 2003; Kurtén y Granqvist, 1987; Ghezzi *et al.*, 2014; Boule, 1906-1919; Boule y Villeneuve, 1927; Bonifay, 1971, 1978; Tagliacozzo y Cassoli, 1993; Cassoli y Tagliacozzo, 1994; Grayson, 1994, 1998; Valensi, 1994; Blasco, 1997; Valensi y Psathi, 2004). Durante el Holoceno, solo desde el principio de este periodo hasta la Edad de Hierro hay citas esporádicas de la presencia del lince ibérico en el sur de Francia (Guilaine *et al.*, 1986; Vigne, 1996; Vigne y Pascal, 2003).

El lince ibérico ha habitado en la península ibérica durante la mayor parte del Cuaternario, adaptándose al bosque de matorrales mediterráneo y a la caza de su principal presa, el conejo europeo (Palomares *et al.*, 2001, 2000; Palomares, 2001; Delibes, 1980; Gil-Sánchez *et al.*, 2006). El confinamiento del conejo en la península ibérica, en la región mediterránea de Francia

y, en ocasiones, en parte de Italia (López-Martínez, 2008; Callou, 2002, 1995) pudo restringir el área de distribución del lince ibérico y favorecer su especialización en esta presa.

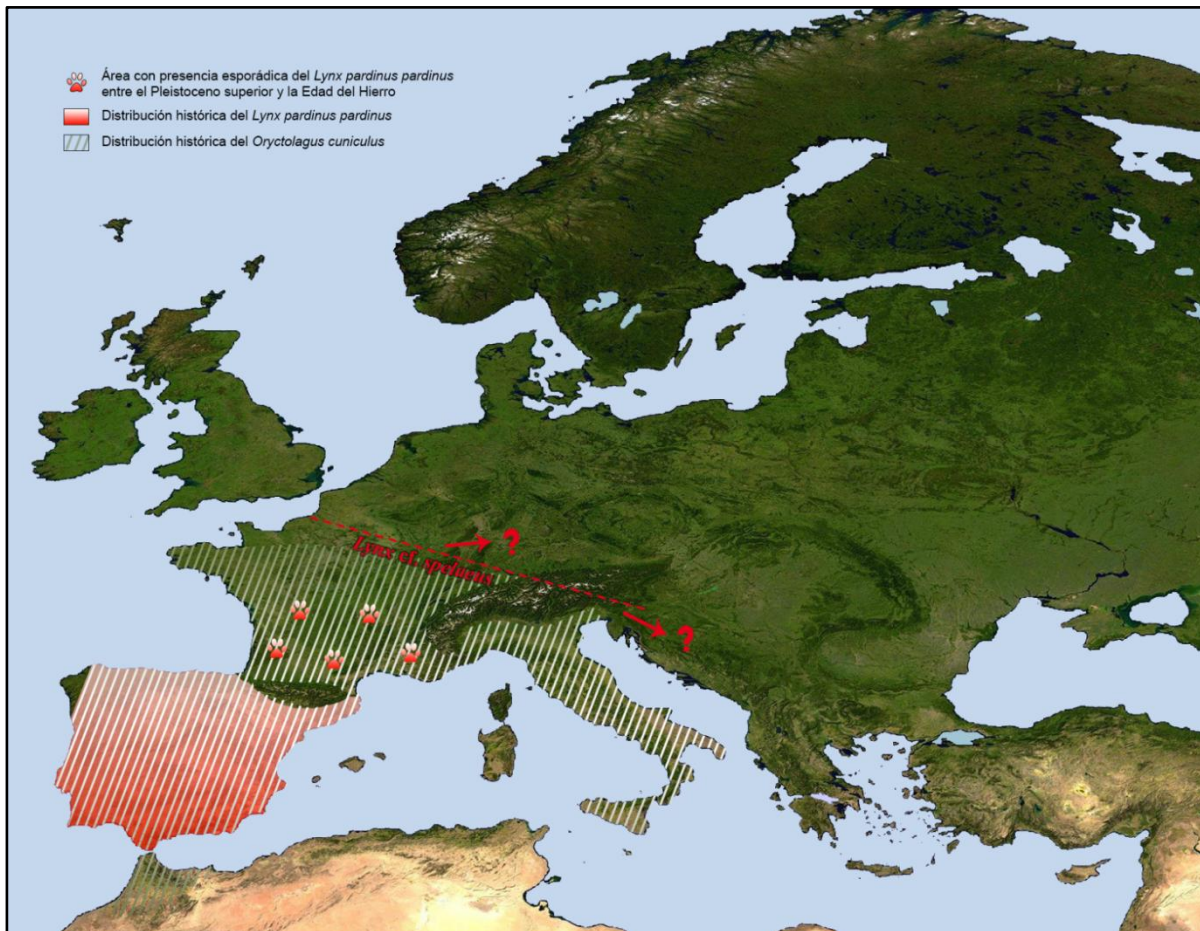


Fig. 3. Máxima distribución histórica del lince ibérico y del conejo europeo desde el Pleistoceno Superior al final de la Edad del Hierro basada en el registro fósil. Los símbolos con huellas representan las zonas aproximadas con presencia esporádica de lince ibérico entre el Pleistoceno Superior y la Edad del Hierro (Guilaine *et al.*, 1986; Vigne, 1996; Vigne y Pascal, 2003; Bonifay, 1971, 1978). El área rayada representa la máxima distribución histórica, entre el Pleistoceno Superior y el final de la Edad de los Metales, del conejo europeo, *Oryctolagus cuniculus* (López-Martínez, 2008; Callou, 2002, 1995). De la línea roja discontinua hacia abajo se representa el área de distribución histórica del *Lynx* cf. *spelaeus* (García, 2003; Kurtén y Granqvist, 1987; Boule 1906-1910; Boule y Villeneuve, 1927; Bonifay, 1971, 1978; Cassoli y Tagliacozzo, 1994; Grayson, 1994, 1998; Valensi, 1994; Blasco, 1997; Valensi y Psathi, 2004).

3.3.2 Estatus

El lince ibérico *Lynx pardinus pardinus* (Temminck, 1827), estuvo catalogado entre el 2002 y el 2015 como especie En Peligro Crítico, y desde mediados del 2015, fruto de la tendencia positiva de sus poblaciones, se ha rebajado su estatus, pasando a ser considerado En Peligro D (IUCN, 2015). Sin embargo, a pesar de que los datos son alentadores, aún está considerado el félido más amenazado del mundo (Nowell y Jackson, 1996) y el carnívoro con más riesgo de extinguirse de Europa (Mallinson, 1978).

Hasta el siglo XX el lince ibérico estuvo ampliamente distribuido por la mayor parte de la península ibérica (Graells, 1897), de donde se le considera endémico. A principios del siglo pasado naturalistas como Cabrera constatan que comienza a ser escaso en la mitad norte (Cabrera, 1914), y disminuyendo desde entonces su rango de distribución y sus poblaciones, con un incremento de esta tendencia durante la última mitad del siglo XX y primeros años del XXI (Rodríguez y Delibes, 1992, 2002; Gil-Sánchez y McCain, 2011). Este férido ha pasado de un tamaño de población estimado de entre 1000 a 1200 lince distribuidos en 48 áreas y 9 poblaciones en el sureste de la península ibérica en 1980 (Rodríguez y Delibes 1992), a su situación más crítica a finales del siglo XX y principios del XXI, con sólo dos poblaciones aisladas entre sí en Doñana y Andújar-Cardena. Se estima que estas poblaciones rondaron entre los 60 y 110 individuos en Andújar-Cardena (al este de Sierra Morena) y entre 24 y 33 individuos en Doñana (Guzmán *et al.*, 2004). En el censo realizado por foto-trampeo en 2002 se estimó la presencia de menos de 100 lince en libertad (<http://www.iberlince.eu>). La fragmentación de su hábitat, la persecución directa y el radical descenso en la población de conejos debido a dos epidemias (la mixomatosis y la enfermedad hemorrágica vírica), se consideran los principales factores responsables de este declive poblacional (Rodríguez y Delibes, 2002; Palomares *et al.*, 2002; Guzman *et al.*, 2004; Delibes-Mateos *et al.*, 2009).

Fordham *et al.* (2013) usaron modelos de nicho ecológico unidos a simulaciones de metapoblaciones con dinámicas de fuente-sumidero, para investigar los efectos combinados del cambio climático, la disponibilidad de presas y el manejo de las poblaciones en la conservación del lince ibérico. Sus resultados predicen que la destrucción del hábitat del lince ibérico durante las próximas décadas, debido al efecto del cambio climático, se producirá a una tasa superior a su capacidad de adaptarse y dispersarse a nuevos hábitats más favorables. Estos investigadores proponen, como solución a su extinción, la reintroducción asistida de esta especie en su rango histórico de distribución. Algunos autores van más allá y sugieren la posibilidad de su introducción en áreas ecológicamente favorables en las que nunca estuvo presente, como Gran Bretaña (Thomas, 2011).

Su naturaleza huidiza, su belleza y su escasez han ayudado a que el lince ibérico se haya convertido en una especie emblemática, símbolo de la lucha por la conservación de la naturaleza. Este depredador es especialmente importante en biología de la conservación porque se considera una especie “paraguas”, ya que al estar en la cima de la pirámide trófica, su protección implica la protección de todo su ecosistema, el monte mediterráneo.

En los últimos años, fruto del gran trabajo multidisciplinar de conservación del proyecto LIFE Iberlince, de numerosas instituciones científicas y de asociaciones conservacionistas, junto con la

mayor implicación de las administraciones locales, estatales y europeas (Simón *et al.*, 2012), se ha conseguido revertir esta tendencia negativa. Desde el 2002 los censos de lince han ido confirmando un claro aumento de las poblaciones (Fig. 4). En la actualidad, el lince ibérico sobrevive solo en dos poblaciones como residente y reproductor, aunque está siendo reintroducido con éxito en varios lugares de su distribución histórica en el marco del programa de conservación LIFE Iberlince (www.iberlince.eu). En el 2014 se liberaron ejemplares de lince en zonas previamente seleccionadas de Portugal, Extremadura y Castilla-La Mancha, a la vez que en las áreas de reintroducción de Andalucía se han liberado también en 2014 9 individuos en Guadalmellato y 9 en Guarrizas.

Evolución de las poblaciones de lince ibérico en Andalucía

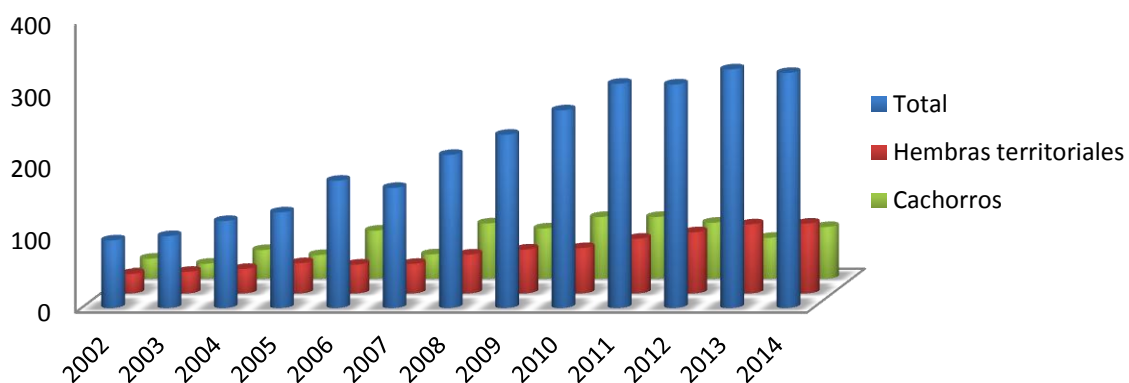


Fig. 4. Censo de poblaciones 2014 de LIFE Iberlince (http://www.iberlince.eu/images/docs/3_InformesLIFE/Informe_censo_2014.pdf).

El aumento de las poblaciones de lince desde el 2002 ha provocado que recientemente la IUCN reduzca, como se afirmaba al comienzo de este apartado, su categoría de riesgo de extinción de “En Peligro Crítico” a “En Peligro D” (IUCN, 2015). Se ha pasado de 27 hembras territoriales en 2002 a 97 en el 2014. El último censo en 2014 estima un total de 327 individuos en Andalucía a lo largo de un área de unos 1355 km² (Fig. 4). En este censo se documenta el éxito de la liberación de 4 machos y 2 hembras de lince procedentes de Sierra Morena en Doñana con el objetivo de reforzar genéticamente esta población. Los ejemplares liberados han tenido varios cachorros desde el 2011 y solo en el 2014, de los 17 cachorros controlados, 9 tenían genética mixta entre la población de Sierra Morena y Doñana. Fruto de la recopilación de datos desde el 2002 se ha podido ver que los atropellos son la principal causa de muerte y una de las principales amenazas para las poblaciones de lince, por lo menos desde el 2002 (Fig. 5). Los investigadores

del proyecto LIFE Iberlince sugieren que este aumento en las muertes por atropello responde tanto a que hay un mayor número de individuos como a las consecuencias indirectas derivadas de la aparición de una nueva cepa de la enfermedad hemorrágica vírica (EHV). Esta enfermedad ha provocado una disminución de las poblaciones de conejo lo cual a su vez ha provocado un descenso de la natalidad de los lince y un aumento de su área de campeo para encontrar alimento lo que aumenta el riesgo de sufrir atropellos (Informe LIFE Iberlince censo 2014).

Causa de la muerte de lince ibérico en Andalucía durante el periodo 2002-2014

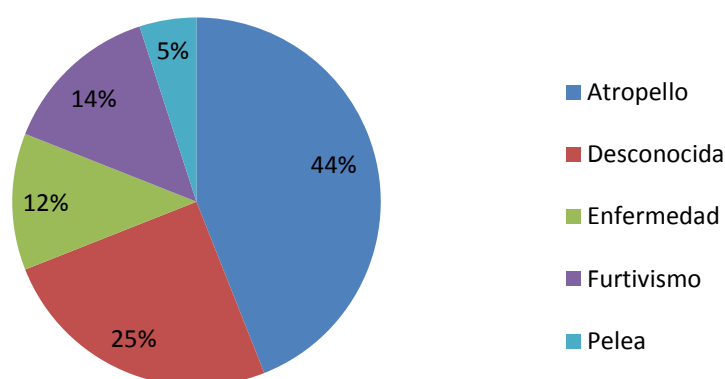


Fig. 5. Censo de poblaciones 2014 de Life Iberlince (http://www.iberlince.eu/images/docs/3_InformesLIFE/Informe_censo_2014.pdf).

3.3.3 Biología

Las hembras de lince ibérico se reproducen entre los 3 a 9 años de edad con un promedio de entre 2 a 4 crías por año, de las que suelen sobrevivir 2 (Palomares *et al.*, 2005).

Este felido requiere un hábitat de matorral mediterráneo con un 40-55% de cobertura y con una alta densidad de conejos (de 1 a 5 conejos por hectárea dependiendo de la estación) (Palomares *et al.*, 2001, 2002). Los individuos juveniles en busca de territorio llegan a recorrer distancias de varias decenas de kilómetros (Palomares *et al.*, 2000; Ferreras, 2001). Esta etapa de dispersión viene determinada por la abundancia de presas y composición de hábitats alrededor de las zonas de cría. El lince es una especie reticente a cruzar amplios espacios abiertos y se ve seriamente afectada por las barreras antrópicas como autopistas y otras infraestructuras (Ferreras, 2001; Ferreras *et al.*, 2004). La alta especialización en la depredación del conejo, se estima que los conejos constituyen entre el 80-99 % de su dieta (Delibes, 1980; Palomares, 2001; Palomares *et al.*, 2001; Gil-Sánchez *et al.*, 2006), hace que su presencia y abundancia sea un factor esencial para la supervivencia del lince. Está bien documentada su estricta dependencia del conejo y cómo las fluctuaciones en las poblaciones de conejos provocan un impacto inmediato en las

poblaciones de lince ibérico (ej. Delibes, 1980; Palomares, 2001; Palomares *et al.*, 2001; Gil-Sánchez *et al.*, 2006).

Estudios sobre las interacciones del lince ibérico y otros depredadores terrestres de menor tamaño, como ginetas, zorros y meloncillos, muestran que cuando los lince están presentes en un territorio estos depredadores aparecen en proporciones muy inferiores a las observadas cuando no hay lince. Esto es debido a que los lince eliminan a otros depredadores de menor tamaño con los que compiten por las mismas presas (Palomares *et al.*, 1996; Palomares y Caro, 1999). Este comportamiento explica que aunque el lince sea un depredador hiperespecializado en los conejos, en territorios donde hay lince las poblaciones de conejos suelen ser más abundantes que en territorios sin lince (Palomares *et al.*, 1995). Por esta razón su presencia favorece las actividades cinegéticas de caza menor controladas y la presencia de otros depredadores amenazados como el águila imperial (*Aquila adalberti*).

3.3.4 Situación genética

El estudio del ADNmt en las poblaciones actuales de lince ibérico muestra que su variabilidad genética es extremadamente baja, con solo dos haplotipos (que difieren en una única posición en el gen ATP-8) fijados cada uno de ellos en una de las dos poblaciones existentes (Johnson *et al.*, 2004; Casas-Marce *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos por Casas-Marce *et al.* (2013) tras el análisis de 36 marcadores de microsatélites apuntan en la misma dirección que el ADNmt, mostrando una diversidad genética muy reducida. Estos niveles de diversidad genética son incluso inferiores a los observados en otras especies de félidos amenazados (Casas-Marce *et al.*, 2013), como los guepardos *Acinonyx jubatus* (Marker *et al.*, 2008), los lince escandinavos *Lynx lynx* (Hellborg *et al.*, 2002), los leones del cráter del Ngorongoro *Panthera leo* (Driscoll *et al.*, 2002; Packer *et al.*, 1991) o los pumas de Florida *Puma concolor coryi* (Driscoll *et al.*, 2002; Roelke *et al.*, 1993).

Las estimaciones teóricas si bien varían según la especie y el autor sugieren un tamaño de población efectiva (N_e), que a su vez se estima en aproximadamente 1/10 de la población total (Frankham, 1995), de entre 500 a 1000 individuos para retener el potencial evolutivo a lo largo del tiempo (Franklin y Frankham, 1998). Los análisis de los microsatélites muestran que la diversidad genética es especialmente baja en la población de Doñana, aislada desde aproximadamente 5 décadas y que ha sobrevivido durante este periodo con un censo de en torno a 50 individuos (Palomares *et al.*, 2011; Godoy *et al.*, 2009). La población de Sierra Morena ha estado conectada con poblaciones cercanas hasta una época más reciente (Palomares *et al.*, 2011)

y ha ido reduciendo paulatinamente su tamaño hasta estabilizarse en torno a los 180 individuos, fruto de las políticas activas de conservación durante los últimos años (Simón *et al.*, 2009). Estas dos poblaciones presentan un significativo grado de diferenciación genética entre ellas por obra del impacto de la deriva genética en poblaciones pequeñas y aisladas. Sin embargo no hay ningún indicio de que las diferencias genéticas entre estas dos poblaciones impliquen diferencias adaptativas a sus respectivos medios. Por ello y dado que el peligro de una alta consanguineidad en cada una de estas poblaciones excede con creces al peligro de la depresión exogámica, ambas poblaciones se están gestionando como una única unidad de conservación (Godoy *et al.*, 2009; Edmands, 2007). La escasa diversidad genética observada en estos marcadores moleculares (ADNmt y microsátélites) se tiende a relacionar con una baja diversidad genética en locus autosómicos sujetos a selección natural y por tanto, implicados en el *fitness* de la especie. Se ha observado en varias especies amenazadas que existe una relación positiva entre la reducción del tamaño poblacional, la pérdida de la diversidad genética y la aparición de altos valores de consanguineidad (Palomares *et al.*, 2012; Frankham, 2002, 2005). Estos factores provocan un efecto negativo directo en el *fitness* de poblaciones amenazadas como las de los lince ibéricos y en su viabilidad a corto y medio plazo (Ruíz-López *et al.*, 2012; Palomares *et al.*, 2012). Las poblaciones aisladas y con un tamaño efectivo (N_e) pequeño son más propensas a la depresión por consanguineidad. Una población con una reducida variabilidad genética tendrá menos capacidad para adaptarse a cambios ambientales por lo que tendrá una mayor probabilidad de extinguirse (Frankham *et al.*, 2002; Frankham y Kingslover, 2004; Keller *et al.*, 1994). Debido a lo anteriormente dicho no es de extrañar que la escasa diversidad genética en el lince ibérico sea una de las principales preocupaciones entre los especialistas encargados del manejo de la especie. Con el objetivo de conservar la especie y de paliar en la medida de lo posible la reducida diversidad genética surgió el programa de translocación de individuos entre las dos poblaciones existentes y el programa de reproducción *ex situ* (Proyecto LIFE Iberlince; Ruíz *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2008; Griffith *et al.*, 1989).

3.4 Lince boreal

3.4.1 Estatus y distribución histórica

El lince boreal *Lynx lynx* (Linnaeus, 1758), es uno de los félidos con el área de distribución más extensa del mundo ocupando en la actualidad la mayor parte del continente euroasiático (Fig. 6). En el pasado su rango de distribución fue todavía mayor, siendo común en todo el sur y centro-

oeste de Europa con la excepción de la península ibérica, donde según la mayoría de investigadores nunca estuvo presente más allá de los Pirineos (Kratochvil, 1968; Breitenmoser *et al.*, 2000; Breitenmoser *et al.*, 2015; Arx *et al.*, 2004).

Salvo algunas excepciones (Altuna, 1980; Sommer y Benecke, 2006), la mayoría de los autores no incluyen la península ibérica dentro del área de distribución del lince boreal. Sin embargo, debido tanto a la tradición oral como a los documentos históricos, se ha sugerido que el lince boreal habitó la cornisa cantábrica hasta época reciente (Nores y Vázquez, 1984). Una meticulosa recuperación de documentos históricos sugiere su presencia en el norte de España, aunque estos estudios no aportan ningún dato concluyente ni prueba física sobre la presencia del lince boreal en la península ibérica (Nores y Vázquez, 1984; Clavero y Delibes, 2013). El hecho de que antiguamente se englobase a ambas especies de lince paleárticas como *Felis lynx* hace que en algunos casos no se sepa a qué especie en particular pertenecen restos arqueopaleontológicos identificados antes de su separación a nivel de especie. Si a esto se le añade la dificultad de una diferenciación segura a partir de criterios morfométricos, entre ambas especies a partir de restos postcraneales, resulta evidente que los registros arqueopaleontológicos deben tomarse con mucha cautela. En la península ibérica solo hay dos registros (en los que se han recuperado los cráneos completos) que pueden considerarse fuera de toda duda como lince boreales. Uno encontrado en la Sima de Pagolusieta en el País Vasco y el otro procedente de una sima en la Sierra de Suevo (Asturias) (Altuna, 1980; Nores, 1999). Estos dos restos no han sido datados y carecen de contexto estratigráfico, por lo que es difícil situarlos temporalmente. Otros restos óseos (fragmentos postcraneales) han sido identificados basándose en su morfometría como lince boreales en Santimamiñe y Urratxa en el País Vasco (Castaños, 1984, 1993) y la Cueva de Rascaño en Cantabria (Altuna, 1981). En la parte francesa de los Pirineos su presencia está mejor documentada, tanto durante el Pleistoceno (ej. Grotte des Moustayous, Grotte du Diable, La Grotte de Labastide) como en el Holoceno (ej. Gouffre de Pène, Gouffre du Col d'Aran, Schatzi) (Clot, 1970, 1983, 1988; Clot y Besson, 1974; Clot y Evin, 1986). Aunque cabe señalar que tampoco existen datos fiables de cuándo se extinguió el lince boreal de los Pirineos.

El lince boreal se extingue en las Islas Británicas durante la Edad Media (Hetherington *et al.*, 2006) y a continuación en las tierras bajas europeas más densamente pobladas (Breitenmoser, 1998). Hace unos 200 años, comienza un intenso proceso de extinciones locales y destrucción de hábitat en el suroeste de Europa primero y en el norte después. En la década de 1950, en la que desapareció del suroeste y centro de Europa, alcanza un mínimo histórico en sus poblaciones. La persecución directa, la disminución de sus presas y la rápida destrucción de su hábitat (deforestación) son los principales factores responsables de este declive poblacional

(Breitenmoser, 1998; Arx *et al.*, 2004). En la segunda mitad del siglo XX la expansión de los bosques, la recuperación sus presas (ej. corzo) y la aplicación de leyes protectoras frenaron esta tendencia negativa. Desde los 70 se han llevado a cabo con éxito diferentes reintroducciones de lince boreales, mayormente procedentes de los Cárpatos, en los Alpes y otras cadenas montañosas de sur y centro de Europa (Fig. 6) (Breitenmoser *et al.*, 2001; Arx *et al.*, 2009).

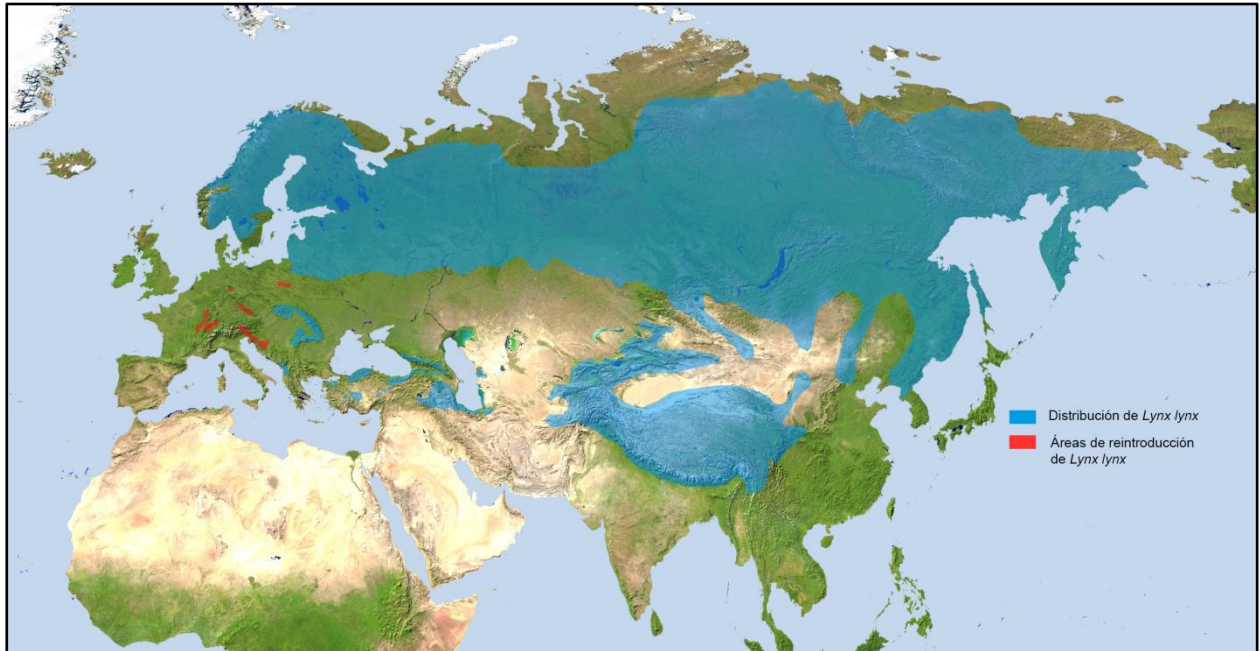


Fig. 6. Distribución actual del *Lynx lynx* modificado de la IUCN (<http://maps.iucnredlist.org> y Arx *et al.* (2009).

En la actualidad el lince boreal, a falta de que se reconozcan o definan oficialmente las diferentes subespecies, está catalogado como especie de preocupación menor por la IUCN (IUCN, 2015). Esta categoría de protección se debe a su amplia distribución y a su relativa abundancia (se estima que existen unos 40 000 individuos). Sin embargo, poblaciones locales en algunos lugares de su distribución se encuentran en retroceso, por lo que una evaluación genética de la especie, así como determinar si hay poblaciones que merezcan ser manejadas de manera independiente (Unidades Evolutivamente Significativas, ESU) debido a posibles adaptaciones específicas, es un requisito indispensable para una correcta gestión de la especie.

3.4.2 Biología

El lince boreal es el tercer gran depredador de Europa en tamaño. En general su hábitat predilecto son áreas boscosas, aunque los lince boreales de Asia central y de regiones muy septentrionales habitan zonas con poca cobertura arbórea.

Durante el periodo reproductivo, que las hembras alcanzan sobre los 2 años, tienen una media de 2-3 crías por camada. Su radio de acción varía entre 25 y 2000 km², dependiendo de la composición del hábitat y del tipo y abundancia de presas (Arx *et al.*, 2004). Sus principales presas son pequeños ungulados y liebres, los primeros con preferencia en toda Europa salvo en el noroeste (Arx *et al.*, 2004). En áreas con baja presencia de ungulados también consume roedores y pájaros. Es una especie más generalista que el lince ibérico en cuanto a la diversidad y frecuencia del tipo de presas consumidas. Estudios de poblaciones de lince realizados con collares de radioseguimiento han demostrado que el lince boreal puede llegar a desplazarse varios cientos de kilómetros, aunque es reticente a cruzar áreas abiertas (Andersen *et al.*, 2005; Schmidt, 1998). Schmidt *et al.* (2011) muestran que factores abióticos como la cobertura y profundidad de la nieve pueden influir notablemente en la capacidad de dispersión de las hembras de lince boreal. Este hecho se ve reflejado en la estructura genética de las distintas poblaciones que ha sido relacionada con la latitud y la profundidad de la superficie nevada (Ratkiewicz *et al.*, 2014).

3.4.3 Situación genética y filogeografía

La extensa área de distribución geográfica del lince boreal provoca que existan grandes diferencias ecológicas y climáticas entre las distintas poblaciones. A esta diversidad de nicho ecológico a nivel interpoblacional hay que añadir la posible diferenciación provocada por los periodos de aislamiento durante las glaciaciones del Pleistoceno. Estos factores podrían haber producido una diferenciación al nivel de subespecie en algunas de las poblaciones de lince boreal a lo largo de su amplia distribución. Sin embargo, recientes estudios genéticos realizados con muestras modernas e históricas de lince boreales (Ratkiewicz *et al.*, 2012; Rueness *et al.*, 2014) contrastan con la separación geográfica y morfológica clásica en 7 subespecies diferentes (Nowell y Jackson, 1996). La discordancia en las clasificaciones basadas en criterios morfológico-geográficos y las que lo hacen en criterios genéticos es relativamente frecuente. Las 32 subespecies de puma clasificadas utilizando criterios geográficos y morfométricos (Neff, 1983; Young y Goldman, 1946) se redujeron a 6 subespecies filogeográficas tomando como base el análisis de ADNmt y de microsatélites (Culver *et al.*, 2000). Este último estudio demostró que no había diferenciación genética significativa entre las 8 subespecies descritas atendiendo a su morfología en América del Norte, lo que propició la translocación de pumas de Texas a las poblaciones en grave riesgo de extinción de Florida. Los datos genéticos de lince boreales basados en el estudio del ADNmt y de microsatélites sugieren una diferenciación entre poblaciones a lo largo del continente euroasiático generada por un aislamiento por distancia

(Ratkiewicz *et al.*, 2012). Rueness *et al.* (2014) puso de manifiesto un patrón de estructura genética a lo largo del eje este-oeste en Eurasia y lo dividió en 3 clados, que se solapan ligeramente: oeste, noreste y sur; siendo este último en que contiene los linajes de lince boreales más antiguos. Se ha estimado que la divergencia de cada uno de los linajes actuales de lince boreal tuvo lugar hace 0.227 mda (HPD = 0.433-0.057), 0.183 mda (HPD = 0.315-0.070) y 0.140 mda (HPD = 0.242-0.050) para el clado sur, noreste y oeste, respectivamente (Rueness *et al.*, 2014). Este patrón de diferenciación genética longitudinal y, en menor medida, latitudinal entre las poblaciones de lince boreal es atribuido a una restricción en el flujo genético entre los anteriormente citados clados (Rueness *et al.*, 2014).

Es importante subrayar que, salvo excepciones (Gugolz *et al.*, 2008), la mayoría de los estudios están basados en muestras modernas o de menos de 150 años de antigüedad (Ratkiewicz *et al.*, 2012; Rueness *et al.*, 2014; Hellborg *et al.*, 2002). Estos estudios no tienen en cuenta las poblaciones que se han extinguido en diferentes regiones del oeste de Europa durante el Pleistoceno y el Holoceno. El estudio directo de los patrones filogeográficos de las poblaciones extintas en el pasado permite una mejor comprensión de las causas que han dado forma a los patrones filogeográficos que se observan hoy en día. Conocer la estructura genética de poblaciones extintas del suroeste y centro de Europa durante y después del LGM puede aportar una valiosa información para la correcta reconstrucción del área de distribución histórica de la especie. Además ayudará a esclarecer desde cuándo están aisladas entre sí las distintas poblaciones actuales y si sería justificable desde una perspectiva histórica hablar de diferentes subespecies.

3.5 Topillo de Cabrera

3.5.1 Estatus y distribución histórica

El registro paleontológico sugiere que el género *Microtus* deriva del género fósil *Allophaiomys*, el cual a su vez descendería de *Mimomys* (Chaline y Graf, 1988; Conroy y Cook, 1999). Los hallazgos paleontológicos indican que *Allophaiomys* se diversificó independientemente en el norte de Eurasia, el centro de Asia y América del Norte (Chaline *et al.*, 1999). El origen del linaje *Allophaiomys* se sitúa entre hace 2.3 y 2.4 mda según restos de *Allophaiomys* hallados en China (Zeng y Zhang, 2000). La mayoría de las especies actuales de *Microtus* no constan en el registro fósil hasta el Pleistoceno Medio, hace de 0.7 a 0.5 mda, y se sugiere que varias especies actuales aparecieron durante la última glaciación (Chaline *et al.*, 1999; Chaline y Graf, 1988).

La hipótesis de una colonización desde Asia en una única oleada independiente hacia Europa y otra hacia América (Chaline *et al.*, 1999; Chaline y Graf, 1988) implicaría una profunda divergencia entre las especies americanas, asiáticas y europeas de *Microtus*. Sin embargo, los estudios moleculares no proporcionan resultados robustos que apoyen una clara y profunda división entre las especies de *Microtus* según su procedencia (Jaarola *et al.* (2004) y apuntan a un escenario en el cual, especies del género *Microtus* colonizaron Europa y América en varios y repetidos eventos independientes siguiendo rutas similares cada vez (Fink *et al.*, 2010).

El topillo de Cabrera (*Microtus cabreræ* Thomas, 1906) al igual que el lince ibérico es una especie endémica y amenazada de la península ibérica. Su área de distribución se ha ido contrayendo desde el Pleistoceno hasta la actualidad (Fig. 7). Tanto en el Pleistoceno como en el Holoceno ocupaba casi toda la península ibérica y el sur de Francia (López-Martínez, 2003; Laplana y Sevilla, 2013). Su antecesor el *Microtus brecciensis* llegó incluso a ocupar el norte de Italia y probablemente la península balcánica (Vuletic, 1953).

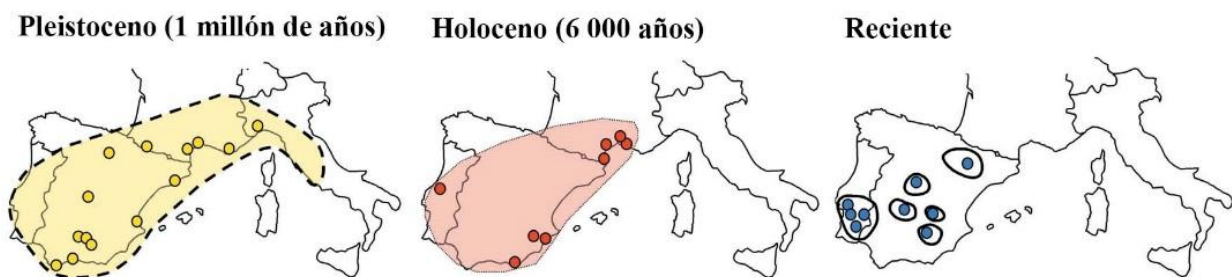


Fig. 7. Distribución de *Microtus cabreræ*, figura modificada de López-Martínez, 2003.

Laplana y Sevilla (2013) hicieron un preciso estudio de las variaciones en la distribución de esta especie desde el MIS5 con base en el registro fósil (Fig. 8). Entre el MIS5 y el MIS3 no se encuentran diferencias relevantes en la extensión del área ocupada por la especie. En el MIS2 ocurre la primera regresión en la distribución de *Microtus cabreræ*. La especie desaparece en el sureste de Francia y en el centro de España, donde había estado presente desde el principio del Pleistoceno Superior. Esta contracción de su rango se atribuye a la caída de la temperatura y de las precipitaciones en este periodo. Durante el principio de Holoceno hay una rápida recolonización de las áreas previamente abandonadas y a lo largo del Neolítico se da un incremento significativo de registros. A continuación se observa un gradual descenso de registros desde el Neolítico hasta el periodo romano, intensificado desde hace unos 200 años en adelante hasta la desaparición final de la especie en el suroeste de Francia y noroeste de Iberia. Esta segunda reducción en las poblaciones de *Microtus* se relaciona con la aridificación de la región mediterránea, que empezó a mediados del Holoceno, incrementándose por la modificación humana del terreno (Laplana y Sevilla, 2013). El topillo de Cabrera es una especie muy

dependiente de su hábitat (zonas húmedas dentro del ecosistema mediterráneo), lo que la hace muy vulnerable a los cambios climáticos y a las actividades humanas como la agricultura (Pita *et al.*, 2014).

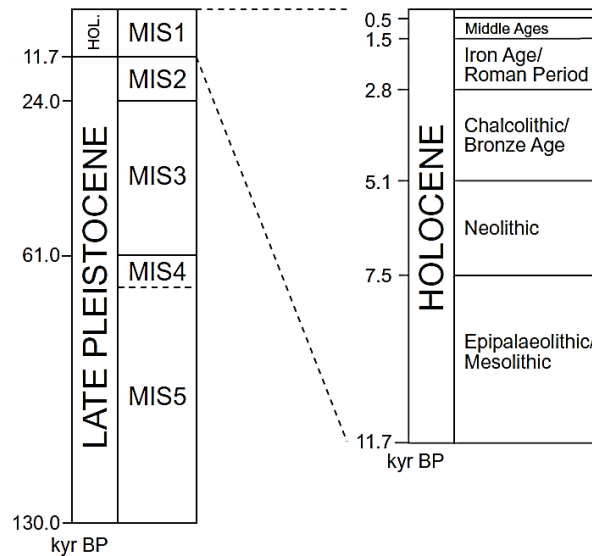


Fig. 8. Imagen tomada de Laplana y Sevilla, 2013 con los intervalos cronológicos utilizados para estudiar las variaciones en la distribución del topillo de Cabrera.

Hoy en día esta especie, clasificada como casi amenazada por la lista roja de la IUCN, está en regresión, relegada a unas cuantas poblaciones aisladas y dispersas por la península ibérica (Fig. 9) (IUCN, 2015; Fernández-Salvador, 2002, 2007; Mira *et al.*, 2008; Garrido-García *et al.*, 2013).

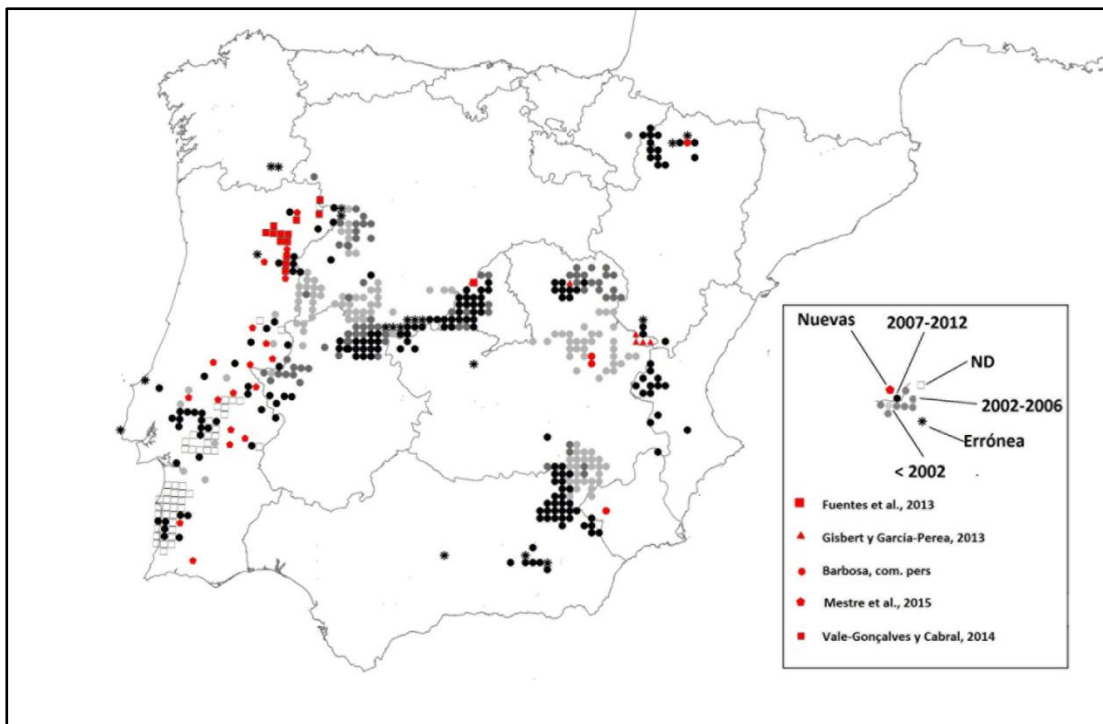


Fig. 9. Imagen tomada de Garrido-García y Soriquer., 2014. Distribución actual de las poblaciones de *Microtus cabrerae*.

3.5.2 Biología

El topillo de Cabrera es una especie mediterránea adaptada a veranos con altas temperaturas. Tiene la capacidad de aumentar su temperatura corporal moderadamente cuando las temperaturas ambientales son altas, reduciendo así el gasto metabólico en termorregulación (Mathias *et al.*, 2003). Sin embargo, no puede sobrevivir en áreas especialmente áridas, ya que necesita la presencia de hábitats con cierta humedad, como manantiales, cursos de agua estacionales o surgencias de agua freáticas que posibiliten la presencia de hierba para su alimentación, incluso en la estación seca (Mira *et al.*, 2008; Pita *et al.*, 2014).

Las colonias de *Microtus cabreræ* oscilan entre los 12 y los 93 individuos por hectárea (Fernández-Salvador, 1998). Se puede reproducir durante todo el año con una media de 4.9 crías (Ventura *et al.*, 1998). Tienen un periodo de gestación de 23 a 24 días. Ambos progenitores construyen un nido y los machos participan en el cuidado de la prole. Las crías alcanzan el tamaño subadulto al cabo de 35 a 45 días (Fernández-Salvador *et al.*, 2001). Debido a sus características reproductivas se engloba dentro de las especies con una estrategia reproductiva tipo *K* (Pita *et al.*, 2014; Fernández-Salvador *et al.*, 2001).

3.5.3 Situación genética

El género *Microtus* presenta una de las mayores tasas evolutivas dentro de los mamíferos, con una elevadísima tasa de especiación. Se estima que las ~70 especies vivas que forman parte de este género en la actualidad surgieron en menos de 2 Mda (Nowak, 1991; Musser y Carleton, 2005; Chaline *et al.*, 1999). De ser esto cierto, implicaría que la tasa de especiación en *Microtus* es de entre 60 a 100 veces más rápida que para el resto de mamíferos (Triant y De Woody, 2006). Este género también presenta una de las mayores tasas de cambios cariotípicos en mamíferos (Maruyama y Imai, 1981; Modi, 1987), variando entre $2n = 17-62$ (Zima y Král, 1984). La gran diversidad genética observada en los *Microtus* contrasta con su homogeneidad fenotípica (Nowak, 1991; Musser y Carleton, 2005). Los genomas de los roedores evolucionan a una tasa superior a la de otros mamíferos y la evolución del ADNmt está correlacionada negativamente con el tamaño corporal y el tiempo generacional, y, positivamente, con la tasa metabólica (Martin y Palumbi, 1993).

El topillo de Cabrera, al igual que otras especies de *Microtus* (Fernández *et al.*, 2001), posee cromosomas sexuales gigantes (Díaz de la Guardia *et al.*, 1978). Es de destacar que esta especie

presenta múltiples copias polimórficas del gen (SRY), localizado en el cromosoma Y en la mayoría de los mamíferos, tanto en machos como hembras (Fernández *et al.*, 2002).

Jaarola *et al.* (2004) tras analizar el citocromo *b* de varias especies de *Microtus* sugieren que el linaje del topillo de Cabrera es muy antiguo o bien ha sufrido una evolución acelerada en este gen. Un estudio más reciente con AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) y marcadores moleculares tanto nucleares como mitocondriales (Fink *et al.*, 2010) confirma la posición basal de esta especie dentro del género *Microtus*, ya que no se agrupa con el clado principal que incluye a las otras especies europeas. Jaarola *et al.* (2004) apoyan incluir al topillo de Cabrera en el subgénero *Iberomys*, del que sería el único representante vivo, en vez de en el subgénero *Agricola* (Zagorodnyuk, 1990 in Musser y Carleton, 2005). Cuenca-Bescós *et al.* (2014) defienden, basándose en criterios biológicos, morfológicos y evolutivos, la singularidad de la línea filogenética que engloba al *Microtus cabreræ* (los extintos, *Microtus huescarensis* del Pleistoceno Inferior y el *Microtus brecciensis* del Pleistoceno Medio). Estos autores proponen que el subgénero *Iberomys* se eleve a la categoría de género.

Las aves rapaces que consumen topillos de Cabrera de manera frecuente regurgitan sus restos óseos en egagrópilas, que aparecen depositados en yacimientos y cuevas. Gracias a ello esta especie escasa en la actualidad es relativamente abundante en el registro fósil, lo que permite tener acceso a un tamaño de muestra mayor que el de la mayoría de los estudios de mamíferos con ADN. Además su elevada tasa evolutiva abre la posibilidad de estudiar el ADN del *Microtus cabreræ* y el de su más inmediato antecesor el *Microtus brecciensis*. Se ofrece así la posibilidad de estudiar *in situ* la evolución de una parte del genoma durante un proceso de especiación, ya que la evolución anagenética de *Microtus brecciensis* a *Microtus cabreræ* tuvo lugar en torno a hace 90 000 años, dentro de los límites factibles para la recuperación de ADN en climas templados. Su mencionada abundancia en el registro fósil y su rápida evolución hacen de este roedor una especie modelo para el estudio de las variaciones genéticas y filogeográficas a lo largo del tiempo.

3.6 Aplicaciones del ADN antiguo en biología de la conservación

La necesidad del ser humano de dividir y clasificar el mundo natural para su estudio y manejo hace imprescindible la definición de términos subjetivos y lleva a hacer distinciones arbitrarias de lo que en numerosas ocasiones es un continuo. No obstante, sin dichas clasificaciones faltarían puntos de partida y difícilmente se podría estudiar y hacerse cargo de la administración responsable de la naturaleza. Por ello desde tiempos históricos la taxonomía ha ocupado un lugar

central en el estudio de las ciencias naturales. En biología de la conservación pronto se hizo necesaria la creación de un concepto para agrupar y diferenciar las unidades poblacionales que merecen un manejo separado y que deben gozar de prioridad con respecto al resto de poblaciones a la hora de planificar su conservación. Dichas unidades se definieron como unidades evolutivamente significativas (ESU) (por sus siglas en inglés *Evolutionary Significant Units*). El concepto de unidad evolutivamente significativa (ESU) ha ido variando desde su aparición. En un primer momento, para considerar a una determinada población como una ESU debía poseer una variación adaptativa significativa, usando para definir dicha variación una serie de criterios extraídos de diferentes técnicas y disciplinas (Ryder, 1986). Waples en 1991 añadió que una ESU debía estar reproductivamente aislada de otras poblaciones y tener adaptaciones diferentes o únicas. El progresivo desarrollo de las técnicas moleculares y el aumento de los marcadores y datos genéticos, así como la necesidad de una definición lo más objetiva y discreta posible, llevó a Moritz en 1994 a definir ESU, centrándose en la estructura poblacional histórica y en su filogenia con respecto al ADNmt, como poblaciones recíprocamente monofiléticas para su ADNmt y que muestran divergencias significativas en sus frecuencias alélicas en *loci* nucleares. Sin embargo, Crandall y colaboradores en el 2000 volvieron a reivindicar el concepto de ESU centrado en un enfoque más multidisciplinar. Para ello tuvieron en cuenta factores tanto genéticos como ecológicos, como la diferenciación de distintas poblaciones en relación con su intercambiabilidad genética y ecológica.

El estudio de poblaciones extintas mediante en ADNa permite conocer las variaciones en la estructura genética de las poblaciones de una especie determinada a lo largo del tiempo. Esto permite inferir desde cuándo poblaciones actuales han estado aisladas, si ha habido poblaciones intermedias o si la presencia de variación genética en una población está ligada a su historia evolutiva y responde a selección positiva o a factores estocásticos como la deriva genética. Toda esta información es de crucial importancia a la hora de definir las diferentes ESU.

Una de las principales aportaciones del ADNa a la biología evolutiva y a la biología de la conservación es la posibilidad de reconstruir directamente la historia evolutiva de una especie sin la necesidad de extrapolar el pasado a partir de la información genética presente (Hofreiter, 2008; Leonard, 2008; Ramakrishnan y Hadly, 2009). Por ejemplo, el estudio de poblaciones extintas antecesoras de poblaciones actuales amenazadas, puede revelar que dos poblaciones aparentemente aisladas en la actualidad estuvieron conectadas en el pasado (Goldstein y DeSalle, 2003). Lo cual implica que la translocación de individuos de una población a otra o la mezcla de ambas poblaciones en programas de reproducción en cautividad puede ser considerada para aliviar la baja diversidad genética de estas poblaciones (ej. el hámster europeo, *Cricetus cricetus*)

(Smulders *et al.*, 2003). Los estudios de ADN que analizan la respuesta de las especies a los cambios climáticos dan las claves para intentar predecir la futura respuesta al calentamiento global de especies amenazadas. Por ejemplo, el estudio del zorro ártico y su respuesta a los ciclos glaciares puso de manifiesto que esta especie no tenía la capacidad de contraerse a la velocidad que lo hacía su hábitat durante los periodos interglaciares (hábitat tracking) (Dalén *et al.*, 2007). La clásica teoría de los refugios glaciares para animales de clima templado sugiere un modelo de contracción y expansión. Durante los periodos fríos las especies de clima templado sufrirían una contracción en su rango de distribución sobreviviendo aisladas en refugios glaciares, principalmente las tres penínsulas del sur de Europa (Iberia, Italia y los Balcanes). Por el contrario, estas mismas especies experimentarían una expansión y recolonización del centro y norte de Europa durante los periodos cálidos (Hewitt, 1996; Taberlet y Bouvet, 1994; Taberlet *et al.*, 1998). El prolongado aislamiento durante las épocas frías en cada uno de sus refugios glaciares provocaría la diferenciación de las poblaciones entre los respectivos refugios. La posterior recolonización del centro y norte de Europa a partir de poblaciones provenientes de uno o varios refugios glaciares, cada una de ellas con sus singularidades genéticas adquiridas durante los años de aislamiento, daría lugar a los patrones filogeográficos que se observan en la actualidad. El oso pardo es una de las especies modelo que se utilizaron para probar esta hipótesis de la contracción/expansión durante los periodos glaciares e interglaciares. A partir de análisis del ADNmt de las poblaciones europeas actuales de osos pardos, Taberlet y Bouvet (1994), demostraron que hay una fuerte estructura filogeográfica entre distintas poblaciones, sugiriendo que es el resultado del aislamiento (falta de conectividad genética) y diferenciación en cada uno de los refugios glaciares mediterráneos, y de la posterior recolonización del resto de Europa. Sin embargo, cuando se analizó el ADNmt de restos fósiles de 4 periodos distintos: pre-LGM, LGM, post-LGM y actual se pudo comprobar que sí hubo flujo genético entre los diferentes refugios en las penínsulas mediterráneas durante periodos pre-LGM (Hofreiter *et al.*, 2004), así como durante periodos de máximo frío como el LGM (Valdiosera *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos a partir del análisis del ADNmt de osos que habitaron desde el LGM hasta la actualidad sugieren un modelo filogeográfico más complejo con mayores niveles de flujo genético. Según él, los actuales patrones filogeográficos en el oso pardo se explican mejor por un aislamiento por distancia provocados por la actividad humana reciente, que por el modelo contracción/expansión y aislamiento en los distintos refugios glaciares (Valdiosera *et al.*, 2007; 2008). Este tipo de estudios aportan una información única sobre el impacto de los cambios ambientales en los organismos y sirven para tener más herramientas a la hora de predecir la respuesta de especies amenazadas a los futuros cambios climáticos.

El éxito de las estrategias de conservación como los programas de reintroducción de especies en peligro tienen más probabilidades de éxito si se tiene en cuenta la distribución histórica de la especie en cuestión (Frankham *et al.*, 2002). Los estudios de restos fósiles son la única fuente de información sobre la distribución histórica de las especies. En concreto los estudios de ADN son la única alternativa para una correcta asignación taxonómica en aquellos restos de especies que no pueden identificarse a partir de estudios morfométricos (Shepherd y Lambert, 2008; Cooper *et al.*, 1996). Un buen conocimiento del área de distribución histórica de especies en peligro tiene importantes consecuencias en las estrategias de conservación, ya que puede revelar hábitats adicionales disponibles para potenciales reintroducciones. La presencia de múltiples poblaciones en especies en peligro de extinción es crucial para reducir el impacto de eventos catastróficos (ej. inundaciones, sequías, epidemias) y vital para la supervivencia de la especie a largo plazo.

3.7 Clima y vegetación del Pleistoceno Superior al Holoceno

En este capítulo se pretende resumir muy brevemente los principales cambios bioclimáticos desde el LGM en el suroeste de Europa, en general, y en la península ibérica, en particular. Y ello con el objetivo de una posterior contextualización, en el marco de las principales fluctuaciones bioclimáticas y las regiones biogeográficas en los últimos ~30 000 años, de las variaciones temporales en la distribución histórica de las especies objeto de estudio en esta tesis.

La península ibérica debido a su heterogeneidad climática, orográfica y, por consiguiente, ecológica es una región con una gran diversidad y riqueza biológica (Benayas, José y Scheiner, 2002). Desde los últimos 20 000 años la separación de la península en dos principales áreas biogeográficas o fitogeográficas se puede, en general, correlacionar con la actualidad. Estas dos regiones biogeográficas se definen en función de rasgos ecológicos, especialmente climáticos, y, en consecuencia, también florísticos y paisajísticos (Castro, 1997). Simplificando, por un lado tendríamos una Iberia eurosiberiana húmeda, fría y sin veranos secos en la cornisa cantábrica, Pirineos, la zona de influencia atlántica de Galicia y del norte de Portugal, y por otro, una Iberia mediterránea más cálida con veranos secos en el resto (Rivas Martínez, 1987) (Fig. 10).

Durante el LGM la temperatura y la precipitación alcanzaron valores mínimos (siendo de media unos 10°C menos durante el verano (Castro, 1997). El norte y centro de Europa estaba dominada por una tundra esteparia, al igual que en el norte de la península ibérica, donde también predominaba un paisaje estepario aunque con presencia esporádica de algún árbol (principalmente *Pinus*). Este periodo de bajas temperaturas se confirma con la presencia de fauna adaptada al frío como el reno (*Rangifer tarandus*) y el mamut lanudo (*Mammuthus primigenius*)

(Álvarez-Lao y García, 2010). La vegetación arbórea sobrevivió a este periodo frío en refugios del sur de Europa (Finlayson y Carrión, 2007; Leroy y Arpe, 2007; Médail y Diadema, 2009). En el periodo Tardiglacial *Pinus*, *Juniperus*, *Betula*, y posteriormente *Quercus* se expandieron hacia el norte a partir de los distintos refugios sobre las formaciones esteparias del Dryas inferior. En el Dryas superior, un periodo frío, se ralentizó esta tendencia durante varios siglos ca. 12 650 y 11 500 cal. años BP, recuperándose al principio del Holoceno, con la expansión de los árboles de angiospermas (*Corylus*, *Alnus*, *Fraxinus*, *Ulmus*, *Acer*, *Abies*, *Fagus*, y *Quercus*), a la par que la fauna eurosiberiana. La región eurosiberiana ibérica durante la transición del Pleistoceno al Holoceno se caracteriza por un incremento de las comunidades dominadas por *Quercus*, en detrimento de los pinares y las estepas (Carrión *et al.*, 2010). A principios del Holoceno se detecta en los registros polínicos un aumento del bosque caducifolio a costa de la flora esteparia (Sánchez-Goñi y d'Errico, 2005), junto con la desaparición de la fauna adaptada al frío (Álvarez-Lao y García, 2010). La expansión de los bosques atlánticos se produjo de manera progresiva durante el periodo Boreal y Atlántico en paralelo a la mejoría climática.

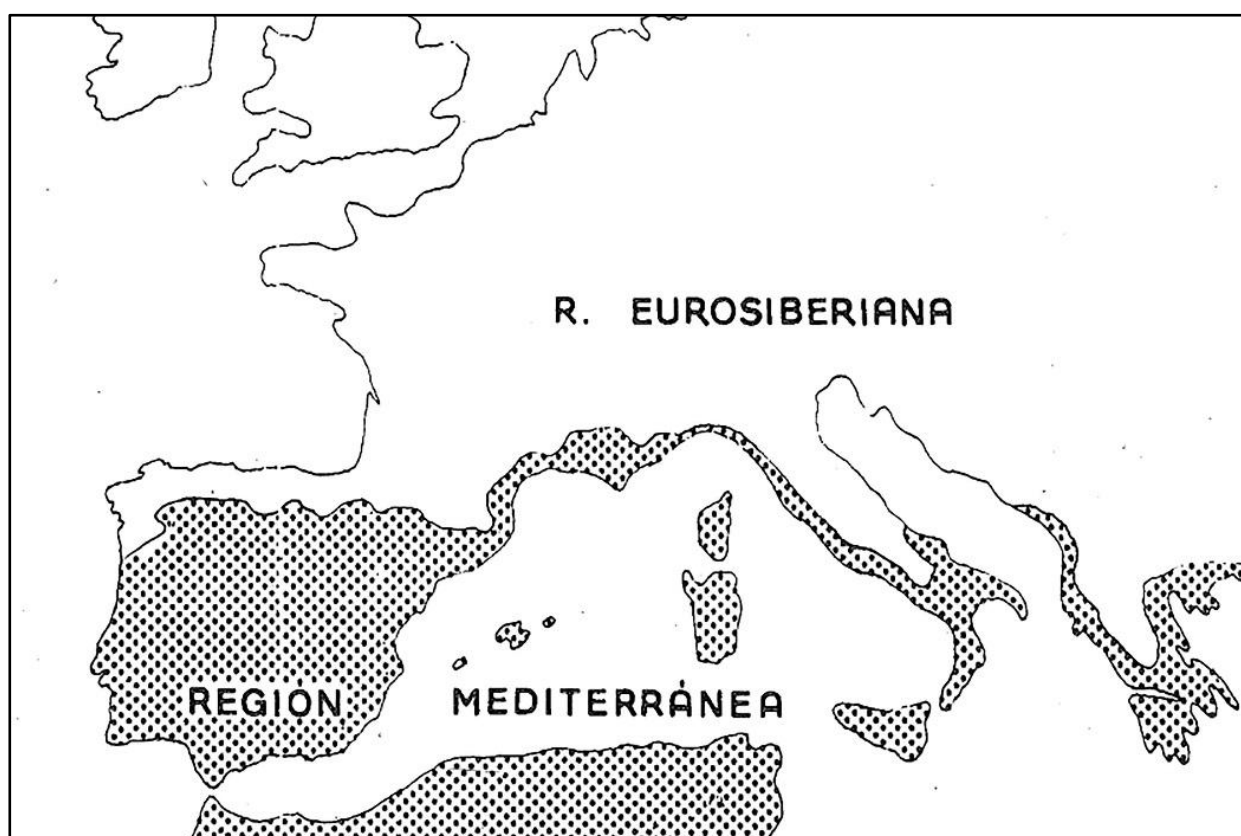


Fig. 10. Regiones biogeográficas de Europa occidental. Modificado de Rivas Martínez, 1987.

Las ocupaciones humanas comienzan a producir un significativo impacto en el paisaje desde mediados del Holoceno debido a actividades como, por ejemplo, la minería, el pastoreo, la agricultura y los incendios provocados (Carrión *et al.*, 2010).

4. Objetivos

El presente trabajo está compuesto por 4 artículos que abordan, mediante el análisis del ADN, las fluctuaciones en la distribución y demografía a lo largo del tiempo en los lincec paleárticos (*Lynx pardinus* y *Lynx lynx*) y el topillo de Cabrera (*Microtus cabreræ*). A partir de estas fluctuaciones se pretende hacer inferencias sobre los procesos que las han provocado, así como conocer cuáles son sus posibles implicaciones en la filogeografía y la conservación de dichas especies.

La inclusión del topillo de Cabrera, *Microtus cabreræ* en esta tesis se debe a que al igual que el lincec ibérico es una especie típicamente mediterránea y endémica de la península ibérica. Ambas especies se encuentran amenazadas y han sufrido una contracción en su área de distribución desde el Pleistoceno Superior como consecuencia de cambios climáticos. Además en ambos casos su situación se ha visto agravada en los últimos tiempos por el impacto directo e indirecto de las poblaciones humanas. El hecho de que el género *Microtus* presente una tasa evolutiva muy superior a la de otros mamíferos, el lincec incluido, permite comparar con la de este último su respuesta a los principales cambios ambientales ocurridos desde el Pleistoceno Superior a la actualidad. Esta comparación es especialmente interesante si tenemos en cuenta que ambas especies siguen una estrategia de reproducción tipo *K* y presentan historias evolutivas similares en cuanto a la contracción de su área de distribución y tipo de hábitat que ocupan.

4.1 Estudio de la variación temporal en la diversidad genética del lincec ibérico y del topillo de Cabrera

El lincec ibérico presenta unos valores de diversidad genética muy por debajo de otras especies amenazadas, tanto para el ADNmt como en marcadores de microsatélites. Las especies amenazadas que en la actualidad sobreviven en poblaciones aisladas con un reducido número de ejemplares, suelen presentar bajos niveles de diversidad genética. Sin embargo, si se analizan las poblaciones de estas especies antes de que estuvieran amenazadas, se observa, por lo general, que en el pasado ocupaban una mayor área de distribución, así como presentaban un mayor tamaño poblacional y una mayor diversidad genética. En el artículo I de esta tesis se pretende averiguar en qué momento se redujo la variabilidad genética del lincec ibérico; si fue durante el radical descenso poblacional ocurrido durante los últimos siglos o tuvo lugar mucho antes, por ejemplo, durante la transición entre el Pleistoceno y el Holoceno. Los objetivos son: a) conocer los factores que han provocado su escasa diversidad genética; b) hacer una estimación de su tamaño

Objetivos

poblacional en el pasado a partir de sus fluctuaciones en la diversidad genética; c) intentar relacionar las variaciones en la diversidad genética a lo largo del tiempo con fenómenos climáticos, antropogénicos y ecológicos.

En el artículo IV integrado en esta tesis se ha analizado la región más variable del citocromo *b* en series cronológicas de restos de topillo de Cabrera para relacionar sus cambios en la diversidad genética con sus extinciones locales en Francia y otras regiones, desde el LGM a la actualidad. El principal objetivo es arrojar luz sobre la causa y forma de dichas extinciones y contestar a las siguientes preguntas: a) ¿Coinciden las variaciones en la diversidad genética con las expansiones y contracciones poblacionales que muestra el registro fósil? b) ¿Sobreviven en las poblaciones actuales los haplotipos que únicamente estaban presentes en yacimientos franceses y en otros yacimientos de regiones donde la especie ha desaparecido? De confirmarse esta última hipótesis podría ser un indicador de “*habitat tracking*”, es decir, que las poblaciones han sido capaces de contraerse con su hábitat a medida que las condiciones ambientales hacían que su área de distribución se redujera.

4.2 Reconstrucción de la distribución histórica en Europa de los lince paleárticos

Con la ayuda del ADNmt se pretende identificar a nivel específico varios restos postcraneales de lince que no se han podido clasificar con fiabilidad mediante criterios morfométricos. La identificación molecular de restos erróneamente clasificados o que no se han podido clasificar a nivel específico permitirá clarificar la distribución histórica del lince ibérico y del lince boreal en Europa (artículo II, artículo III) y responder a las siguientes preguntas:

- A) ¿Son fiables las clasificaciones a nivel específico de lince a partir de restos postcraneales?
- B) ¿Podemos confirmar o desmentir si el lince ibérico habitó en Francia e Italia durante el Pleistoceno y/o el Holoceno? De ser así, ¿eran estos lince genéticamente diferentes de los de la península ibérica?
- C) ¿Cuál es la posición filogenética del lince de las cavernas, *Lynx cf. spelaeus*? ¿Es realmente una especie o subespecie diferente desde el punto de vista de su genoma mitocondrial? ¿Hubo solapamiento en el área de distribución entre las distintas especies de lince?

4.3 Paleofilogeografía del lince boreal y del topillo de Cabrera

A partir del análisis de restos de lince boreales de poblaciones extintas de Italia, España, Francia y Dinamarca se pretende esclarecer la posición filogeográfica que ocupaban las poblaciones históricas de lince boreales en el oeste europeo en relación con las poblaciones actuales. El objetivo es conocer qué especie de lince y durante qué momentos habitó el norte de la península ibérica y relacionar su presencia/ausencia con factores bioclimáticos y regiones biogeográficas (artículo III).

Por su parte, los restos de topillo de Cabrera analizados hasta el momento con cronologías que van desde el Epimagdalenense a la actualidad pretende esclarecer la estructura filogeográfica de esta especie amenazada en el pasado (artículo IV).

5. Métodos

5.1 El ADN mitocondrial

El ADNmt es un genoma circular haploide de aproximadamente 16 000-17 000 pb, compuesto de 22 genes que codifican para 33 ARN transferentes, 2 ARN ribosómicos y 13 ARN mensajeros. Estos ARN mensajeros codifican principalmente proteínas involucradas en el transporte de electrones y en la oxidación fosforilativa, esta última es la responsable de la producción de energía en las células eucarióticas. El ADNmt, salvo contadas excepciones, se hereda por vía materna y no recombina (Ballard y Whitlock, 2004). Debido a una serie de factores, como por ejemplo una menor eficacia en los mecanismos enzimáticos de reparación durante la replicación (Lareu y Salas, 2000; Brown *et al.* 1979), este ADNmt presenta además una mayor tasa de mutación que la media del genoma nuclear (Brown *et al.* 1979; 1982). Estas características hacen que como marcador molecular sea el preferido en los trabajos con ADN, ya que su herencia matrilineal y su ausencia de recombinación facilitan la reconstrucción de filogenias, a lo cual se añade el que su elevado número de copias facilite su recuperación a partir de material degradado. Sin embargo, este marcador también presenta una serie de limitaciones o aspectos que tener en cuenta:

- 1) Hay una gran heterogeneidad en la tasa de mutación a lo largo del genoma mitocondrial, lo que obliga a tener especial cuidado cuando se hacen comparaciones filogenéticas (Ballard y Whitlock, 2004).
- 2) La relaciones filogenéticas inferidas a partir de partes del genoma que no recombinan como el ADNmt pueden estar distorsionadas por el efecto de la selección natural (Frankham, 2012). La composición del ADNmt en distintas poblaciones puede estar influenciada de manera diferencial por el efecto de la selección natural, haciendo difícil las comparaciones entre poblaciones (Ballard y Whitlock, 2004).
- 3) Al heredarse exclusivamente por vía materna, en aquellas poblaciones o especies en las que solo los machos se dispersen, dos poblaciones pueden presentar diferencias significativas en su ADNmt y sin embargo, a causa del flujo genético transmitido por los machos, ambas poblaciones pueden ser homogéneas en cuanto a los *loci* nucleares. Debido a esto, analizar únicamente el ADNmt puede dar una idea equivocada de la composición genética y de la historia evolutiva de las poblaciones estudiadas (Ballard y Whitlock, 2004).

4) El ADNmt proporciona información de un solo gen. La deriva genética o la introgresión pueden llevar a árboles filogenéticos incorrectos si la población fundadora era polimórfica (Ballard y Whitlock, 2004).

Se ha elegido el ADNmt como marcador molecular debido a la antigüedad y degradación de las muestras utilizadas (que disminuyen la probabilidad de amplificar el menos abundante ADN nuclear), así como por las cuestiones que se pretenden abordar. Puesto que no se pretende comparar las relaciones filogenéticas entre diferentes especies, las limitaciones anteriormente citadas no afectan de manera significativa a este estudio. Sin embargo conviene tenerlas presente, por ejemplo en las estimas del N_e a partir de la variabilidad observada en la región control del lince ibérico (artículo I).

En esta tesis el ADNmt se utiliza para: 1) identificar especies; 2) ver cómo ha variado la diversidad genética en esta molécula en las especies estudiadas a lo largo del tiempo; 3) comparar la estructura filogeográfica entre las poblaciones extintas y actuales de lince boreal y de topillo de Cabrera.

Dentro del ADNmt se han estudiado los fragmentos más informativos del gen citocromo *b* y la región control. Estas regiones son las más utilizadas tanto en el campo del ADN_a como en los estudios con ADN actual.

Citocromo *b*: Está involucrado en el transporte de electrones en la cadena respiratoria de la mitocondria. Este gen es uno de los marcadores moleculares más usados, lo que facilita la comparación entre diversas poblaciones y especies. El citocromo *b* es idóneo para la identificación de especies, ya que por lo general presenta un alto grado de congruencia con la clasificación taxonómica de las diferentes especies (Avice y Walker, 1999; Johns y Avice, 1998). Además es lo suficientemente conservador para clarificar relaciones filogenéticas profundas.

La región control es el marcador más elegido para determinar la variación a nivel poblacional, dada su alta tasa de mutación (Aquadro y Greenberg, 1983; Hoelzel y Dover, 1991; Brown *et al.*, 1993; López *et al.*, 1997). Esta región es la única parte significativa del ADNmt no codificadora. Está localizada en mamíferos entre los genes tRNA-Pro y el tRNA-Phe. Contiene los promotores para los transcriptores RNA policistrónicos de los genes de las cadenas pesada y ligera (Jae-Heup *et al.*, 2001). Gracias a la tasa de mutación mucho más elevada de esta región con respecto a otras regiones del ADNmt codificantes, como por ejemplo el citocromo *b*, el análisis de estos dos regiones permite observar las variaciones a diferentes escalas temporales (Brown *et al.*, 1979).

5.2 ADN antiguo protocolos

Al objeto de minimizar el riesgo de contaminación, el laboratorio de ADN del centro mixto UCM-ISCIH está aislado de cualquier posible fuente de contaminación. Para la obtención de los datos generados en esta tesis se aplicaron los criterios de autenticidad descritos en la introducción. Se usaron campanas equipadas con luz ultravioleta (UV) para taladrar las muestras y campanas con luz UV y flujo laminar para realizar la extracción y para preparar las PCRs, junto con todos los procedimientos estándar de esterilización (brocas esterilizadas con ultrasonidos y ácido clorhídrico, luz ultravioleta, guantes, trajes y mascarilla). Nunca se ha trabajado con material moderno de ninguna especie en este laboratorio. Cada 4-5 muestras se utilizó un blanco de extracción negativo y en ocasiones también se usaron blancos positivos. Se amplificaron blancos de PCR en un radio aproximado de 1 a 2 cada 8 muestras. La PCR, la visualización mediante geles de electroforesis, purificación y secuenciación de las muestras positivas se llevó a cabo en el laboratorio del CNIO, que está físicamente separado del laboratorio de ADN. Cada secuencia publicada obtenida ha sido secuenciada un mínimo de tres veces a partir de PCRs diferentes, con el objetivo de tener una secuencia idéntica en al menos tres réplicas de cada muestra. En los casos en los que se encontraron inconsistencias entre réplicas se amplificó y volvió a enviar a secuenciar la misma muestra a partir de una segunda extracción.

El muestreo consiste en una pequeña perforación del ejemplar (broca del número 6 al 10) con un taladro (Dremel), para obtener unos 500 mg de polvo de hueso en el caso de los restos de lince. De los 500 mg, unos 250 mg se utilizan para realizar dos extracciones independientes de ADN y los otros 250 mg se envían al laboratorio de dataciones radiométricas para realizar los análisis de C^{14} . El muestreo se realiza con sumo cuidado, descartando la parte más superficial del hueso o diente e intentando dañar lo menos posible a la pieza, evitando taladrar en zonas diagnósticas o de especial interés. Las muestras de topillo de Cabrera, debido a su pequeño tamaño, rara vez pueden ser datadas directamente. Por ello en este trabajo únicamente se han utilizado muestras cuya edad se conoce por pertenecer a un claro contexto arqueológico y/o por dataciones de C^{14} a partir de fauna asociada.

Se han documentado fotográficamente todos los restos antes del muestreo. En el caso de los dientes de topillo de Cabrera las fotografías se realizaron con una cámara con lupa integrada (Nikon SMZ800).

Métodos

Extracción del ADN.

Para extraer el ADN de su compartimento celular y aislarlo de las sustancias que pueden inhibir la PCR, se debe provocar la lisis de las células, la inactivación de las nucleasas y la separación del ADN del resto de componentes celulares y posibles inhibidores presentes en la muestra. Mediante la purificación se separa el ADN de los restos de proteínas solubles, otros ácidos nucleicos no deseados, lípidos y carbohidratos de sales (aunque como las muestras antiguas suelen estar muy degradadas, la mayoría de los componentes celulares ya han desaparecido). De esta manera podemos separar la extracción de ADN en dos partes digestión y purificación.

Digestión: Fase en la que se aplica un tampón (Tabla 1) para provocar la rotura de las células y liberar el ADN así como para digerir las sustancias que se quieren eliminar o que impiden aislar el ADN. El contenido del tampón de digestión dependerá del tipo de muestra con la que se trabaje.

Tabla 1. El tampón de digestión para 10 muestras de entre 150-200 mg de polvo de hueso o diente.

Añadir	Concentración inicial	Concentración final
11.25 ml	0.5M EDTA pH 8.0	0.45M
310 µl	10 mg/ml proteinase K	0.25 mg/ml
950 µl	dH ₂ O	

El EDTA (Ácido etilen diamino tetra acético) es un agente quelante de iones metálicos como Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺. La descalcificación del hueso facilita el proceso de extracción, ya que el polvo de hueso es demasiado grueso a escala celular para que haya una eficiente extracción del ADN. El ADN tiene una fuerte afinidad por la hidroxiapatita, que debe ser removida para recuperar el ADN inmerso en ella. Por otra parte, los colorantes contaminantes que tienden a precipitar con el ADN y a causar inhibición de la PCR son eliminados con la descalcificación. Además el EDTA inhibe la acción de las nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad y así protege al ADN.

La proteinasa K (PK) se utiliza para degradar e inactivar a las proteínas.

Protocolo de digestión.

- 1) Añadir de entre 1 a 5 ml de tampón de digestión a la muestra dependiendo de la cantidad de polvo a digerir.
- 2) Agitar e incubar durante 24 horas a 55 °C (máxima temperatura de acción de la enzima PK).

Purificación: Fase en la que se aísla el ADN de las otras sustancias. Esta parte de la extracción se puede realizar mediante numerosos métodos diferentes, cada uno de los cuales con sus ventajas e

inconvenientes según la muestra. Ejemplos: phenol-cloroformo, chelex, columnas de sílice, etc. En esta tesis se utilizó el protocolo modificado de Yang *et al.*, 1998, que usa las columnas de sílice y está basado en la afinidad de la molécula de ADN por la sílice, para extraer ADN de huesos y dientes.

Protocolo de purificación.

- 1) Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 min.
- 2) Añadir el sobrenadante a los tubos *centricon microconcentrators* (máximo 4 ml) (Amicon 30kD, Millipore) para su filtrado.
- 3) Centrifugar a 4000 rpm hasta que queden entre 100-150 μ l de extracto concentrado.
- 4) Pipetear el sobrenadante y ponerlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 5) Añadir 5/10 veces el volumen del extracto de PB/PN (Quiagen) y mezclar (ej. 500 μ l tampón a 100 μ l extracto).
- 6) Pipetear la mezcla de muestra y PB/PN tampón en un *minielute spin column tube* (Quiagen) y centrifugarlo durante 1 min a 8000 rpm.
- 7) Tirar el líquido filtrado.
- 8) Repetir pasos 6 y 7 hasta que toda la muestra haya pasado a través del filtro del *minielute spin column tube*.
- 9) Una vez que todo el líquido haya pasado a través de la membrana añadir 720 μ l de PE tampón (Quiagen) al *spin column tube* y centrifugar durante 1 min a 11 000 rpm.
- 10) Desechar el sobrenadante y centrifugar otra vez a 13 000 rpm.
- 11) Quitar la columna y ponerla en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml sin tapa.
- 12) Añadir entre 30 a 100 μ l de EB tampón (Quiagen) (poner la columna de sílice a 37 °C durante 15 min) y centrifugar durante 1 min a 14 000 rpm.
- 13) Pipetear los 30-100 μ l de extracto y guardar en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 μ l.

Amplificación por PCR.

En 1986 Kary Mullis desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) revolucionando la biología molecular. Esta técnica permite producir múltiples copias de un fragmento de ADN previamente elegido gracias a la actividad de las enzimas polimerasas. La amplificación de un fragmento de ADN proporciona múltiples copias, lo que facilita enormemente recuperar ADN altamente degradado o que está presente en muy escasas

Métodos

cantidades. La PCR se basa en la propiedad de las enzimas ADN polimerasas de replicar hebras de ADN a partir de una hebra existente.

Componentes de la reacción de PCR:

1. El extracto de muestra de ADN purificada que se quiere amplificar.
2. Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), que son los componentes de la cadena de ADN que serán la materia prima para la síntesis por parte de la polimerasa de la nueva cadena de ADN complementaria a la ya existente.
3. Enzima ADN polimerasa. Normalmente se usa una Taq polimerasa, que es una enzima ADN polimerasa purificada de la bacteria termófila "*Thermus aquaticus*", y por lo que es estable a altas temperaturas.
4. Un par de oligonucleótidos, que son cada uno de ellos complementarios a una de las dos hebras de ADN de la región inmediatamente adyacente de la secuencia que se quiere amplificar. Son secuencias cortas de entre 17 a 25 pb que son reconocidas por la polimerasa marcando el comienzo de la reacción. Deben de estar enfrentados y no muy alejados entre sí.
5. Iones divalentes, como por ejemplo el Mg, que actúan como cofactores de la ADN polimerasa. El cloruro de magnesio forma complejos solubles con los desoxirribonucleótidos para producir un sustrato reconocible por la polimerasa.
6. Iones monovalentes por ejemplo el K.
7. PCR buffer es una solución tampón que contiene sales que mantienen la mezcla a el pH adecuado para que actúe la ADN polimerasa.
8. Un termociclador que permite calentar y enfriar los tubos con la mezcla de los componentes anteriores invirtiendo la corriente eléctrica.

La cantidad de cada uno de los productos anteriores dependerá del tipo de muestra, los oligonucleótidos utilizados y el fragmento que queramos amplificar. En cada uno de los artículos se detallan las cantidades concretas utilizadas en cada experimento.

La Amplificación del ADN en la PCR se puede dividir en los siguientes pasos:

0. Iniciación:

Aumento de la temperatura hasta entre 94-96 °C durante 1-15 min. Solo para ADN polimerasas que requieren activación por calor.

1. Desnaturalización:

Se calienta la muestra a 93-95 °C para la separación de las dos hebras de ADN.

2. Alineamiento/ Unión al oligonucleótido:

Se necesita que el termociclador baje la temperatura hasta entre 50 y 60 °C durante 20-40 segundos para que el oligonucleótido se pueda unir y alinear a su secuencia complementaria en el ADN molde. La polimerasa se unirá a cada uno de los dos híbridos entre el cebador y la secuencia de ADN molde y empezará a sintetizar la nueva cadena de ADN. Siendo los cebadores los límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

3. Extensión/Elongación de la cadena:

En este paso la temperatura debe subir hasta en 68 y 75 °C dependiendo de la polimerasa utilizada. En este rango de temperaturas es en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los cebadores, que ya se habían alineado. La polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo desoxirribonucleótidos complementarios en dirección 5' a 3'. El tiempo de extensión dependerá tanto de la polimerasa como de la longitud del fragmento que se desea amplificar.

4. Repetición de los pasos del 1 al 3 n veces.

Se pueden llevar a cabo tantos ciclos como sea necesario. Cada una de las moléculas de ADN amplificada puede volver a entrar en el proceso y servir como molde para producir más copias. Se consigue una amplificación de 2^n , siendo n el número de ciclos de reacción.

5. Elongación final:

Esta fase se llevara a cabo a una temperatura de 70 °C durante 5-10 minutos tras el último ciclo de PCR asegurando así que cualquier hebra de ADN sea amplificada.

Visualización de los productos de PCR y secuenciación.

Gracias a la electroforesis, un método en el cual se separan los fragmentos de ADN en función de su tamaño, es posible visualizar el fragmento de ADN amplificado en un gel de agarosa. Mediante esta técnica la mezcla de moléculas de ADN se desplazan por un gel de agarosa gracias a un campo eléctrico. Las moléculas de ADN (con carga negativa debido a sus grupos fosfato) son atraídas al polo positivo. Las moléculas más pequeñas (de menor peso molecular) migran más rápido que las grandes a través del gel de agarosa. Cuando los fragmentos se han separado, como previamente se añade bromuro de etidio u otro marcador al gel o a los productos de PCR que se pretenden visualizar, podrán ser observados mediante luz UV. Ello porque los marcadores empleados como el bromuro de etidio (EtBr) son moléculas con afinidad por el ADN que se intercala entre los pares de bases y que tienen la particularidad de que fluorescen cuando

están unidos al ADN. Al iluminar el gel con luz UV se ven bandas de fluorescencia que corresponden a moléculas de ADN. Hecho que indica según la posición en el gel y con la ayuda de un marcador sintético el tamaño del fragmento amplificado.

Una vez comprobado mediante la electroforesis que se ha amplificado el fragmento de ADN de interés, los productos de PCR se purifican con ExoSAP-It (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante, y se secuencian en las orientaciones *forward* y *reverse* en un automated DNA sequencer (ABI-3730xl) mediante el Big Dye 3.1 sequencing kit (Applied Biosystems). Las secuencias fueron editadas Sequencher v.4. (Genes Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) y alineadas manualmente usando el software MEGA versión 4 y 6 (Tamura *et al.*, 2007; 2013).

5.3 Muestreo

La única manera de distinguir de manera segura, a partir de la morfometría, entre el lince ibérico y el lince boreal es mediante estudios craneométricos (Hemmer, 1993 a, b; Altuna, 1981). Sin embargo, en el registro fósil rara vez se encuentran cráneos completos de estas especies y el material más frecuente son restos postcraneales fragmentados, lo que complica la identificación morfométrica a nivel específico. En esta tesis se pretende verificar si el lince ibérico y el lince boreal tenían una distribución geográfica más amplia en el pasado. Para ello se ha realizado un extenso muestreo de subfósiles y especímenes históricos morfométricamente clasificados como lince ibérico (*Lynx pardinus pardinus*), lince boreal (*Lynx lynx*), *Lynx* sp. y como el comúnmente llamado lince de las cavernas, citado en la literatura como *Lynx spelaeus* o *Lynx pardinus spelaeus*, procedentes de diferentes yacimientos y de trampas naturales de la península ibérica y de otras partes de Europa. Los yacimientos muestreados abarcan desde el Pleistoceno Superior (~50 000 años BP) hasta hace unos siglos.

Muestras artículo I

Para el estudio de la variabilidad del lince ibérico desde el Pleistoceno Superior a la actualidad se muestrearon un total de 51 restos clasificados como lince ibéricos de distintos puntos de su distribución histórica en la península ibérica, abarcando una rango de edades que comprende los últimos 50 000 años.

Muestras artículo II

Con el objetivo de verificar la distribución histórica del lince ibérico se muestrearon 104 restos óseos y dientes pertenecientes a el género *Lynx* de la península ibérica, Francia e Italia (ver

información suplementaria artículo II). Los restos muestreados están clasificado con arreglo a su tamaño como: *Lynx lynx*, *Lynx pardinus*, *Lynx* sp. o *Lynx* cf. *spelaeus*.

Muestras artículo III

Para este artículo se muestrearon un total de 16 restos de lince. Ocho lince de la península ibérica, de los cuales los restos de la Sima de Serpenteko (un mínimo de 3 individuos) en Navarra y el esqueleto completo de Sima de los Cinchos en Asturias son todos ellos restos inéditos (Fig. 11). Ambas simas actuaron como una trampa natural. Es de destacar que la Sima de Cueva de los Cinchos emplazada en la Sierra de Quirós está localizada en torno a los 2000 metros de altura. El cráneo del Pozu'l Lince en la Sierra de Suevo y el esqueleto de la Sima de Pagolusieta, junto con los restos postcraneales de Rascaño, fueron previamente clasificados como *Lynx lynx* basándose en su morfometría (Nores, 1999; Altuna, 1980, 1981). Por último se muestrearon 8 restos de distintos yacimientos daneses datados en el periodo Atlántico superior (ver artículo III).



Fig. 11. Coxales muestreados de Serpenteko (Navarra), pertenecientes a 3 individuos diferentes. Cráneo Sima de los Cinchos (Asturias) (Foto realizada por Diego Álvarez Lao).

Muestras artículo IV

En el caso de lo *Microtus* el muestreo se realizó intentado abarcar la mayor parte de su distribución histórica, tanto en la península ibérica como en Francia. Las muestras, consistentes en dientes de *Microtus*, debido a su reducido tamaño se digirieron directamente en el tampón de digestión mientras que los huesos se redujeron a polvo de hueso mediante N₂ en un Spex 6700 Freezer Mill, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se muestrearon un total de 70 restos de *Microtus cabreræ* de edades que van desde el Pleistoceno Superior a la actualidad.

6. Resultados

6.1. Artículo I

6.1.1 Introducción artículo I

El lince ibérico (*Lynx pardinus*) estuvo ampliamente distribuido a lo largo de la península ibérica hasta principios del siglo pasado. La reducción de su principal presa, el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), su persecución directa junto con la pérdida y la fragmentación de su hábitat provocó una gran reducción en sus poblaciones (Rodríguez y Delibes, 2002). En la actualidad el lince ibérico es el felino más amenazado del mundo (Nowell y Jackson, 1996) y el carnívoro con el mayor peligro de extinguirse de Europa (Mallinson, 1978). Los lince actuales tienen muy poca variabilidad en la región control del ADNmt (Casas-Marce *et al.*, 2013). Bajos niveles de diversidad genética han sido observados también en otros carnívoros amenazados (Valdiosera *et al.*, 2008; O'Brien *et al.*, 1983), lo que suele ser interpretados como el resultado de la existencia de un cuello de botella en el pasado. Una reducción drástica en los niveles de diversidad genética se tiende a relacionar con una reducción del *fitness* de la población, lo que puede llevar a la inviabilidad de la especie a largo plazo (Frankham, 2005).

En este estudio se han obtenido secuencias de la región control del ADNmt de restos de lince desde el Pleistoceno Superior hasta época reciente. Se ha partido de 3 hipótesis para averiguar cuándo tuvo lugar la reducción de la variabilidad genética en el lince ibérico.

1. La pérdida de diversidad genética se produjo durante los últimos siglos coincidiendo y a consecuencia del drástico declive poblacional provocado por las causas antropogénicas anteriormente citadas (descenso de las poblaciones de conejos, destrucción de hábitat, caza, venenos, etc.).
2. La reducción de diversidad genética en el lince se remonta a un hipotético cuello de botella durante la transición entre el Pleistoceno y el Holoceno coincidente con el LGM, al igual que con numerosas especies amenazadas en la actualidad, como el oso pardo ibérico o el guepardo.
3. O, por el contrario, la diversidad del ADNmt fue siempre baja desde el Pleistoceno Superior a la actualidad.

Para comprobar estas hipótesis se muestrearon y dataron por C^{14} restos de lince ibérico de diferentes puntos de la península ibérica con un rango de edades que abarca desde el Pleistoceno

Resultados

Superior (las muestras de Valdegoba han sido indirectamente datadas por radiocarbono en restos asociados en $48\,400 \pm 3300$ años BP sin calibrar (Dalén *et al.*, 2012)) a la actualidad. Asimismo se obtuvo una secuencia homóloga de 183 pb de 19 individuos, muestreados a lo largo de gran parte de la península ibérica y con edades comprendidas entre los últimos 50 000 años. Todas las secuencias obtenidas presentan el mismo haplotipo que se encuentra fijado en los lince actuales, indicando una uniformidad genética en la región control del ADNmt desde al menos mediados del Pleistoceno Superior. Estos resultados contrastan con los obtenidos para otros grandes mamíferos, los cuales generalmente presentan mayores niveles de diversidad genética en el pasado que en la actualidad, produciéndose esta reducción a lo largo de los últimos siglos por la acción de cuellos de botella históricos (Wandeler *et al.*, 2007) o durante la transición del Pleistoceno al Holoceno debido a reemplazos de poblaciones (Hofreiter y Barnes, 2010).

La cantidad de variación genética en una población en equilibrio en una región del genoma neutra viene determinada por la tasa de mutación en el *locus* en cuestión y por el tamaño efectivo de población (N_e). Para examinar qué combinación de tasa de mutación y N_e a largo plazo es compatible con la diversidad observada en la región control del ADNmt (asumiendo que es una región neutra) en los lince modernos y antiguos, se llevó a cabo una serie de simulaciones de coalescencia (Anderson *et al.*, 2005). Se analizó también el tamaño de hembras reproductoras de lince a largo plazo en el intervalo entre dos tasas de mutación: una conservadora, calibrada en base a la divergencia entre el lince ibérico y el boreal y otra más acorde con lo observado en otros félidos, calculada a partir de una serie cronológica de muestras de león de las cavernas y asumiendo un reloj molecular dependiente del tiempo. La primera de 5.57% (95% HPD = 2.44-9.68%) por mda y la segunda de 26% por mda para la región control analizada en este estudio. La falta de variación se explica por un relativamente bajo N_e (con un máximo de 8100-278 N_e de hembras según se utilice la primera o la segunda tasa de mutación) a lo largo de los últimos 50 000 años. Hay que tener en cuenta que si bien las estimaciones varían según la especie el N_e (de machos y hembras), se considera aproximadamente 1/10 del censo total (Frankham, 1995). Las estimaciones acerca del N_e de hembras de lince deben tomarse con cautela debido a la incertidumbre a la hora de estimar la tasa de mutación para la región estudiada y al escaso número de muestras del Pleistoceno analizadas. Sin embargo, si asumimos que las secuencias obtenidas son representativas de la variabilidad de los lince en el pasado y teniendo en cuenta la tasa de mutación estimada para otros carnívoros, el tamaño de la población de lince sería reducido a lo largo de los últimos 50 000 años.

MOLECULAR ECOLOGY

50,000 years of genetic uniformity in the critically endangered Iberian lynx

RICARDO RODRÍGUEZ,^{*1} OSCAR RAMÍREZ,⁺¹ CRISTINA E. VALDIOSERA,^{*‡} NURIA GARCÍA,^{*} FERNANDO ALDA,^{**} JOAN MADURELL-MALAPEIRA,[†] JOSEP MARMI[†], IGNACIO DOADRIO,^{**} ESKE WILLERSLEV,[‡] ANDERS GÖTHERSTRÖM,^{*††} JUAN LUIS ARSUAGA,^{*} MARK G. THOMAS,^{§††} CARLES LALUEZA-FOX[†] and LOVE DALÉN^{*‡‡}

^{*}Centro Mixto, Universidad Complutense de Madrid–Instituto de Salud Carlos III de Evolución y Comportamiento Humanos. Avda. Monforte de Lemos 5, Pabellón 14. 28029 Madrid, Spain, [†]Institute of Evolutionary Biology (CSIC-UIPF). Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona, Spain, [‡]Center for GeoGenetics, Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen, Oster Voldgade 5-7 1350, Copenhagen K, Denmark, [§]Research Department of Genetics, Evolution and Environment, University College London, Gower Street London, WC1E 6BT, UK, ^{††}Institut Català de Paleontologia. Edifici ICP, Campus de la UAB. 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain, ^{**}Department of Biodiversity and Evolutionary Biology, Museo Nacional de Ciencias Naturales CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain, ^{†††}Department of Evolutionary Biology, Uppsala University, Norbyvägen 18, SE-752 36 Uppsala, Sweden, ^{‡‡}Department of Molecular Systematics, Swedish Museum of Natural history, Svante Arrhenius Väg 9-11, PO Box 50007, SE-10405 Stockholm, Sweden.

Abstract

Low genetic diversity in the endangered Iberian lynx, including lack of mitochondrial control region variation, is thought to result from historical or Pleistocene/Holocene population bottlenecks, and to indicate poor long-term viability. We find no variability in control region sequences from 19 Iberian lynx remains from across the Iberian Peninsula and spanning the last 50 000 years. This is best explained by continuously small female effective population size through time. We conclude that low genetic variability in the Iberian lynx is not in itself a threat to long-term viability, and so should not preclude conservation efforts.

Keywords: coalescence, female effective population size, *Lynx pardinus*, mitochondrial DNA, mutation rate

Received 2 April 2011; revision received 23 June 2011; accepted 1 July 2011

Introduction

The Iberian lynx, *Lynx pardinus* (Temminck 1827), classified as a Critically Endangered species (IUCN 2010), is the most endangered carnivore in Europe (Mallinson 1978) as well as the most threatened of the 36 extant species of the family Felidae (Nowell & Jackson 1996). The genus *Lynx* comprises three additional species: the bobcat (*L. rufus*), the Canadian lynx, (*L. canadensis*) and the Eurasian lynx (*L. lynx*). All major felid lineages were established within a relatively short time period spanning 10.8–6.2 Myr before present (Ma BP), and the

split between the genus *Lynx*, the ocelot (*Leopardus pardalis*) and puma (*Puma concolor*) is estimated to have occurred approximately 8.0–6.7 Ma BP (Johnson *et al.* 2006). The geographical origin of the lynx lineage is uncertain. Palaeontological evidence points towards an African origin according to Werdelin (1981) whereas other authors suggest a North American origin (MacFadden & Galiano 1981; Martin 1989). Moreover, phylogeographic evidence has been interpreted as supporting a North American origin for the lynx lineage based on the fact that the most basal members of this group (*L. rufus* and *L. canadensis*) have an American distribution (Johnson & O'Brien 1997; Johnson *et al.* 2006). It has been suggested that at approximately 1.6–1.2 Ma the ancestors of the Eurasian and Iberian lynxes expanded across the Bering land bridge to Eurasia (Johnson *et al.* 2006).

¹Ricardo Rodríguez and Oscar Ramírez contributed equally to this work.

Correspondence: Ricardo Rodríguez, Fax: + 34 91 822 28 55; E-mail: ricardo_eyre@yahoo.es

The Iberian lynx is thought to have been endemic to the Iberian Peninsula during most of the late Quaternary, where it has co-existed with its preferred prey species, the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) (Branco *et al.* 2002; López-Martínez 2008). Although there are records of Iberian lynxes (the subspecies *Lynx pardinus spelaeus*, Boule 1910) in southern France during the Late Pleistocene (Kurtén & Granqvist 1987), there is no evidence of *Lynx pardinus* outside the Iberian Peninsula during the last glacial maximum (LGM) (Sommer & Benecke 2005). The postglacial occurrence of *Lynx pardinus* in France is not fully clear, although some Iberian lynx remains have been reported in France from the Holocene until the Iron Age (Vigne 1986, 1996; Vigne & Pascal 2003).

During the Late Glacial (16 950–11 550 BP), and perhaps even during the Holocene, the Iberian and Eurasian lynxes were sympatric in northern Iberia and France (Altuña 1980, 1981; Vigne & Pascal 2003; Sommer & Benecke 2005). One possible scenario that is consistent with the fossil record is that during the coldest periods, such as the LGM, the Eurasian lynx occupied the north of Iberia whereas the Iberian lynx would contract in range towards the south as a consequence of cold and unfavourable conditions, as well as interspecific competition from the Eurasian lynx. Conversely, during warm periods, the Iberian lynx would expand its distribution towards western, southern and central France.

The Iberian lynx was widely distributed throughout the Iberian Peninsula until about 100 years ago (Graells 1897). However, at the beginning of the twentieth century, it became rare in the north of the Iberian Peninsula (Cabrera 1914). Furthermore, although the main reduction in range and population size began 100 years ago, the Iberian lynx has gone through an even more dramatic decrease in population size during the last 50 years (Rodríguez & Delibes 1992, 2002). The decline of its main prey species, the European rabbit, and the loss and fragmentation of its habitat are thought to be the main reasons for this severe recent reduction (Rodríguez & Delibes 1992, 2002). During the 1980s the population size was estimated at 1000–1200 lynxes distributed in 48 patches and 9 populations in the southwest of the Iberian Peninsula (Rodríguez & Delibes 1992). According to Guzmán *et al.* 2004; the Iberian lynx currently persists in only two isolated populations, Andújar-Cardena in Eastern Sierra Morena with an estimated population size of 60–110 individuals and Doñana with 24–33 individuals. However, its presence has also been reported in other areas of central Spain (Alda *et al.* 2008) and the latest census in 2010 reports a total of 73 individuals in Doñana, with 20 territorial females and 172 in Sierra Morena, with 43 territorial females (<http://www.lifeline.org>).

The mitochondrial DNA (mtDNA) control region is the most variable region of the mitochondrial genome (Aquadro & Greenberg 1983; Hoelzel & Dover 1991; Brown *et al.* 1993; Lopez *et al.* 1997). However, genetic analyses have shown that extant Iberian lynx populations display very low control region variability, with only one haplotype observed throughout its current distribution (Johnson *et al.* 2004). One additional control region haplotype, differing by one mutation from the major haplotype, has been observed in museum specimens from Huelva in the Western Sierra Morena (Johnson *et al.* 2004), but appears to have been lost when the lynx became locally extinct in the Western Sierra Morena. Low levels of genetic variation have been observed in many other endangered carnivores that have gone through recent or historical bottlenecks in population size, e.g. brown bears (*Ursus arctos*; Valdiosera *et al.* 2008), African cheetah (*Acinonyx jubatus*; O'Brien *et al.* 1983), the lions of the Ngorongoro crater (*Panthera leo*; Packer *et al.* 1991) and the Florida panther (*Puma concolor coryi*; Roelke *et al.* 1993). From a conservation perspective, the amount of genetic diversity in a population is expected to have a strong impact on its future survival (Frankham 2002, 2005). When isolated populations become critically small they may become prone to inbreeding depression. A population with low genetic variability may also be at risk of having a reduced capacity to adapt to changing environments, thereby reducing the long-term fitness of the population (Keller *et al.* 1994; Frankham *et al.* 2002; Frankham & Kingslover 2004). All of these factors apply to some extent to the populations of Iberian lynx. During the last decades, considerable conservation efforts have been conducted to avoid further loss of genetic diversity in the Iberian lynx populations from Doñana and Sierra Morena. The two existing populations of Iberian lynx are managed as a single unit. In 2007/2008, the first translocation of a male from Sierra Morena to Doñana was made in order to alleviate its low genetic diversity and to avoid a decrease in population size within the Doñana population (Ruíz *et al.* 2009).

In order to investigate when the decline in mtDNA control region diversity originated in the Iberian lynx, we have analysed control region sequences retrieved from a series of subfossil remains obtained from different geographic locations within the Iberian Peninsula, spanning a time range of approximately the last 50 000 years. Three hypotheses were tested: (i) mtDNA control region variability decreased as a consequence of the severe bottleneck that occurred 50 years ago, (ii) variation was lost much earlier, for example during a bottleneck coinciding with the Pleistocene/Holocene transition, or (iii) mtDNA variability has been low throughout the last 50 000 years.

Materials and methods

Samples and DNA extraction

A total of 51 Iberian lynx (bone and teeth) remains were collected from different localities in Spain, spanning a time range from the Late Pleistocene to the twentieth century (see Fig. 1 and Table 1). Specimens were sampled by grinding into powder using a multitool drill (DREMEL), and 150 mg of this bone/tooth powder was used for DNA extraction using both solvent and silica binding approaches (Yang *et al.* 1998; Leonard *et al.* 2000). A 183 bp fragment of the mitochondrial control region was targeted using two non-overlapping primer pairs for samples 4–19 and for samples 1–3 the same fragment was targeted using four non-overlapping primer pairs (Table 2). All samples that were successfully sequenced were radiocarbon dated using accelerator mass spectrometry (BETA Analytic Limited, London), except for those from recent specimens, where approximate sampling date was available, and samples from Valdegoba, whose age was determined from radiocarbon dates at the University of Oxford obtained from

associated remains (Table 1). For consistency, all radiocarbon dates were recalibrated using the 'Bchron' library (Haslett & Parnell 2008; Parnell *et al.* 2008) within the statistical package "R" (URL: <http://www.R-project.org/>) and the IntCal09 calibration curve (Reimer *et al.* 2009).

In order to minimise the risk of contamination, the samples were divided in three different laboratories for extraction and amplification. Individuals 1–3 were extracted and sequenced at the Institute of Evolutionary Biology (CSIC-UPF), Barcelona (Spain), Individuals 4–15 at the Centro Mixto (ISCIII-UCM) de Evolución y Comportamiento Humanos in Madrid (Spain), and individuals 16–19 at the Center for Geogenetics in Copenhagen (Denmark). DNA amplification was performed in a 25 µL reaction consisting of 1× PCR buffer (Naxo/Qiagen), 1 mM MgCl₂ (Naxo/Qiagen), 0.8 µg/µL of bovine serum albumin (BSA) (Sigma), 0.2 mM dNTPs (Sigma), 0.2 µM of each primer and 4 Units of HotStarTaq DNA Polymerase (Naxo/Qiagen) and 3 µL of DNA extract. Cycling conditions were as follows: a 15 min activation step at 95 °C, followed by 54 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 54 °C, 30 s at 72 °C, with a final extension of

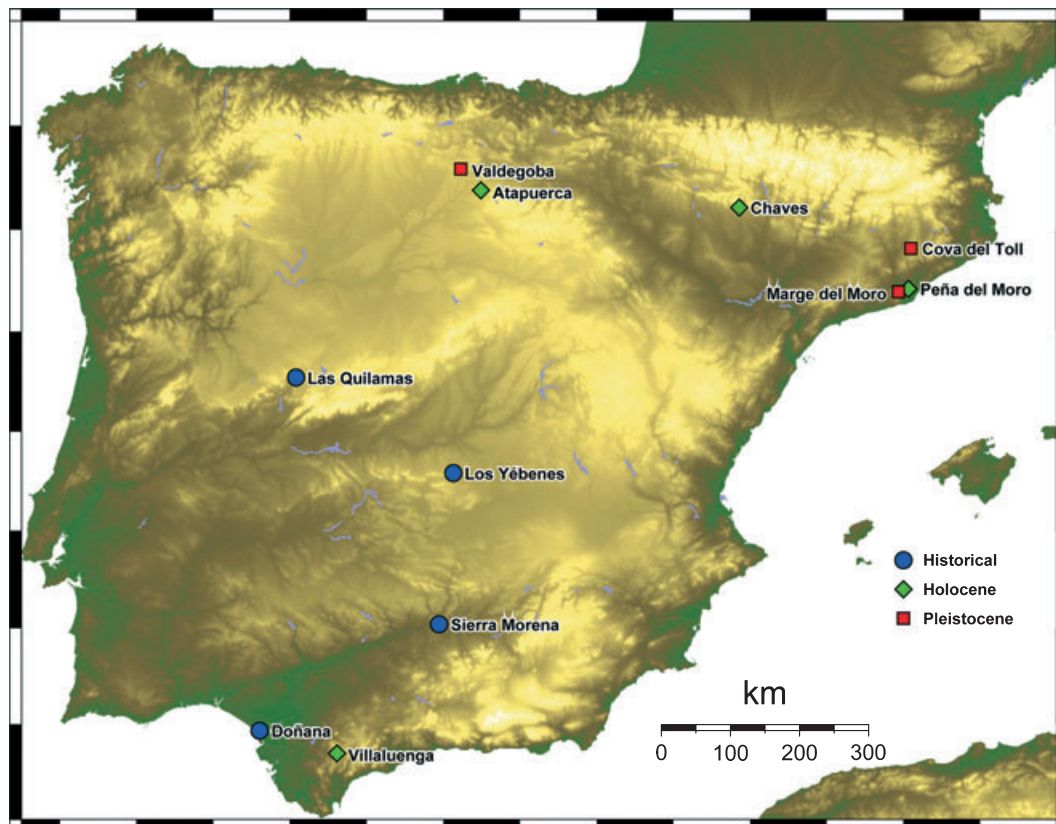


Fig. 1 Geographic locations of sites where samples were successfully amplified and sequenced. The map was generated using GMT software (<http://gmt.soest.hawaii.edu/>) and the ETOPO1 one arc-minute global relief model (Amante & Eakins 2009).

Table 1 Sample number, code, site and museum collection number for each sample

Nº	Code	Site	Collection no.	Age (uncal. BP)	Calibrated age (95% CI)	C14 lab numbers	Year of specimen collection	Exact age of the samples (until 2011)	Generations before 2011)
1	Peña del Moro V1374	Peña del Moro (Barcelona)	Peña del Moro V1374	2 210 ± 40	2 125-2 327	262440	1 955	2 186-2 388	547-597
2	Cova del Toll 9276	Cova del Toll (Barcelona)	Cova del Toll 9276	1 1420 ± 70	13 146-13 425	2 62 442	1 955	13 207-13 486	3 302-3 372
3	Marge del Moro 4201	Marge del Moro (Barcelona)	Marge del Moro 4201	1 7660 ± 90	20 551-21 413	2 62 441	1 856	20 612-21 474	5 153-5 369
4	Doñana22	Doñana (Sevilla)	A595864 (NRM)	NA	NA	NA	1 856	155	39
5	Quilamas26	Las Quilamas (Salamanca)	A585291 (NRM)	NA	NA	NA	1 955	50-155	13-39
6	Portalón46	Portalón (Atapuerca)	Portalón46	4 680 ± 40	5321-5569	2 62 443	1 860-1 950	5 382-5 630	1 346-1 408
7	Yebenes53	Los Yébenes (Toledo)	Yebenes53	NA	NA	NA	1 842	61-151	15-38
8	Sierra Morena 54	Sierra Morena (Jaén)	1842.2.26.1 (NHM)	NA	NA	NA	1 842	169	42
9	Doñana55	Doñana (Sevilla)	1872.10.26.1 (NHM)	NA	NA	NA	1 872	139	35
10	Sierra Morena56	Sierra Morena (Jaén)	1889.8.27.1 (NHM)	NA	NA	NA	1 889	122	31
11	Yebenes57	Los Yébenes (Toledo)	1894.6.11.1 (NHM)	NA	NA	NA	1 894	117	29
12	Doñana58	Doñana (Sevilla)	1895.9.4.1 (NHM)	NA	NA	NA	1 895	116	29
13	Yebenes3AR	Los Yébenes (Toledo)	Yebenes3AR	NA	NA	NA	1 860-2 000	11-151	3-38
14	Doñana4AR	Doñana (Sevilla)	Doñana4AR	NA	NA	NA	1 860-2 000	11-151	3-38
15	Doñana5AR	Doñana (Sevilla)	Doñana5AR	NA	NA	NA	1 860-2 000	11-151	3-38
16	Valdegoba87	Valdegoba (Burgos)	Valdegoba87	4 8400 ± 3300*	44 560 to infinite	OxA-21970	1 960-1 990	44 621-90 000	11 155-22 500
17	Valdegoba89	Valdegoba (Burgos)	Valdegoba89	4 8400 ± 3300*	44 560-infinite	OxA-21970	1 977	44 621-90 000	11 155-22 500
18	Chaves	Chaves (Chaves)	Chaves	6 020 ± 40	6 756-6 885	2 61 610	1 960-1 990	6 817-7 030	1 704-1 758
19	Villaluenga	Villaluenga (Cádiz)	Villaluenga	5 950 ± 40	6 679-6 885	2 61 609	1 990	6 740-6 946	1 685-1 737
20	EBD-1373	Western Sierra Morena	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 977	21-51	5-13
21	EBD-1376	Sierra de Gata	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 960-1 990	34	9
22	EBD-1377	Western Sierra Morena	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 960-1 990	21-51	5-13
23	EBD-1387	Eastern Sierra Morena	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 963	48	12
24	EBD-19299	Eastern Sierra Morena	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 990	21	5
25	EBD-22650	Eastern Sierra Morena	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 994	17	4
26	EBD-23122	Doñana	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 995	16	4
27	EBD-23127	Doñana	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 996	15	4
28	EBD-23223	Eastern Sierra Morena	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 997	14	4
29	EBD-23531	?	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 950-2 000	11-61	3-15
30	EBD-23731	Doñana	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 997	14	4
31	EBD-846	Gredos	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 968	43	11
32	MNCN-5446	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 950-2 000	11-61	3-15
33	MNCN-5449	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 950-2 000	11-61	3-15
34	MNCN-5450	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 989	22	6
35	MNCN-5451	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 974	37	9
36	MNCN-5452	Eastern Sierra Morena	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 979	32	8
37	MNCN-5454	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 975	36	9
38	MNCN-5456	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 950-2 000	11-61	3-15
39	MNCN-5462	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 950-2 000	11-61	3-15

Table 1 (Continued)

N ^o	Code	Site	Collection no.	Age (uncal. BP)	Calibrated age (95% CI)	C14 lab numbers	Year of specimen collection	Exact age of the samples (until 2011)	Generations before 2011)
40	MNCN-5463	Eastern Sierra Morena	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 976	35	9
41	MNCN-5466	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 975	36	9
42	MNCN-5467	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 970-1 974	37-41	9-10
43	MNCN 5468	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 950-2 000	11-61	3-15
44	MNCN 5469	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 950-2 000	11-61	3-15
45	MNCN 5470	Montes de Toledo	From Johnson <i>et al.</i> (2004)	NA	NA	NA	1 950-2 000	11-61	3-15

Sample ages are given as uncalibrated radiocarbon years and calibrated years before present, as well as the exact age of the samples in both years and number of generations (taking into account that 'present' is defined as the year 1950 for radiocarbon dates). * Samples from Valdegoba cave was determined from radiocarbon dates at University of Oxford obtained from an associated bone sample

10 min at 72 °C. Sequences were edited with Sequencher v.4.7 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) and manually aligned using the software MEGA version 4 (Tamura *et al.* 2007). Pleistocene and Holocene samples were sequenced at least three times from three different PCR products in order to obtain a consensus sequence, the historical ones were sequenced two times from different PCR products (Krause *et al.* 2006). From the 19 samples analysed, only Peña del Moro V1374, Cova del Toll 9276 and Villaluenga showed sequence inconsistencies likely caused by PCR misincorporation (C/T changes). However, these errors could be resolved by applying a majority rule consensus approach on the three replicates. The damage does not appear to correlate with specimen age since several of the oldest specimens showed no evidence of damage after three replicates. However, no historical samples (<200 years old) showed any evidence of damage. Generally, high presence of damage in a sequence data set would tend to overestimate diversity levels (Axelsson *et al.* 2008), which is something we did not detect in our study.

Mutation rate estimates and coalescence simulations

A mutation rate was estimated using the program BEAST (Drummond & Rambaut 2007) for the fragment of the control region analysed in this study. This was done using as calibrating point the date of split between the Eurasian lynx and the Iberian lynx; estimated to be 1.18 (95% CI = 0.7-1.98) (Ma BP) (Johnson *et al.* 2006). Two different analyses were performed, one assuming a demographic model of constant population size and the other a Bayesian Skyline Plot. For both analyses 10⁸ permutations were performed with 25% burn in and using a strict clock model. Estimates of the mean rate and 95% highest posterior densities (HPD) were done using two approaches, one with a prior uniform distribution (interval 0.7-1.98 Ma) and the other with the initial value of 1.18 Ma and with a normal distribution adjusting the values so the 95% intervals of the distribution fit with the divergence time intervals.

To examine which combinations of mutation rate and long-term population size are compatible with the observed diversity in the ancient and modern mtDNA control region sequences generated, serial coalescent simulations were performed using the software Bayesian Serial SimCoal (Excoffier *et al.* 2000; Anderson *et al.* 2005) and assuming a constant female effective population size. We considered two datasets; the first consisting of the 19 sequences reported here and the second consisting of those 19 sequences plus the 26 sequences reported by Johnson *et al.* (2004). Consequently, two sets of coalescent simulations were performed to generate homologous datasets consisting of either 19 or 45

Table 2 Primer sequences and product sizes for control region amplicons obtained from samples analysed in this study

Primer Name	Sequence (5'–3')	Sample	Product size (bp)	Region	Reference
CR2F/DL5R	GTGCTTGCCCACTATGTC/ TACAATGCTTAATAATTCAATGGGATT	4–19	134	Control region	This paper/(Palomares <i>et al.</i> 2002)
CR2F/LynxR1	GTGCTTGCCCACTATGTC/ GTGGTTGGTAGTTGATAGG	1–3	114	Control region	This paper/This paper
LynxF2/DL5R	TAAAAACCCCTATCACCATG/ TACATGCTTAATAATTCAATGGGATT	1–3	92	Control region	This paper/(Palomares <i>et al.</i> 2002)
L12F/CR2b_R	TAGTGCTTAATCGTGCATTATA/ CCGGAGCGAGAAGAGGTACA	4–19	133	Control region	(Hellborg <i>et al.</i> 2002)/ (Palomares <i>et al.</i> 2002)
L12F/LynxR168434	TAGTGCTTAATCGTGCATTATA/ TTCTCGAGACCAAGGTGACT	1–3	95	Control region	(Hellborg <i>et al.</i> 2002)/ This paper
Lynx16831F/CR2b_R	GGACCTCAATATCCAGAGGAAG/ CCGGAGCGAGAAGAGGTACA	1–3	86	Control region	(Hellborg <i>et al.</i> 2002)/ (Palomares <i>et al.</i> 2002)

Sample numbers are indicated in Table 1

sequences. For each dataset, 10 000 iterations were performed for each combination of 41 assumed effective female population sizes (N_{ef}) ranging from 10–10 000, and 64 assumed mutation rates (μ) ranging from 0.1 to 30% per million years, giving a total of 26 240 000 simulations for each dataset. Sequences of 183 bp were evolved on coalescent trees assuming a transition bias of 0.96296 and a continuous gamma distribution of mutation rates among sites, of parameter 0.35. Sequences were sampled (either $N = 19$ or $N = 45$) from each coalescent simulation according to the ages or age ranges (in generations, rounded to the nearest generation) presented in Table 1. A generation time of 4 years was assumed (O'Grady *et al.* 2008) and when the age of a sample was provided as a range, or a 95% confidence interval for calibrated radiocarbon dates, sampling times from the coalescent simulation were picked from a uniform distribution bracketed by that range. All ages or age ranges (both historical and radiocarbon) were calculated as before 2011 AD. For the two lynx samples from Valdegoba (Valdegoba87 and Valdegoba89) the radiocarbon dates were out of range for reliable calibration. However, the palaeontological age for these specimens has been estimated to be between 75 000 and 90 000 years (Quam *et al.* 2001). As a conservative measure, we therefore assumed an age range for these samples of between 44 621 (the lower bound of the calibrated radiocarbon date in years before 2011 AD) and 90 000 years (or 11 155–22 500 generations). The proportion of iterations for each combination of N_{ef} and μ that generated diversities equal to, or less than those observed were then collated and plotted as an image using the statistical package 'R' (<http://www.r-project.org>). For simulations considering only the 19 sequences presented here, we calculated the proportion of iterations for each combination of N_{ef} and μ that generated a mean pairwise difference (MPD) equal to zero. For simulations considering the 19 sequences presented here plus the 26 sequences from Johnson *et al.* (2004), we calculated the proportion of iterations for each combination of N_{ef} and μ that generated a MPD equal to or less than 0.0869. This is the MPD of the combined sample of the 19 sequences presented here plus the 26 sequences from Johnson *et al.* (2004), and is the expected MPD for a sample of 45 sequences where only two are variant, both at the same single site. Execution of Bayesian Serial SimCoal was controlled and simulation results were harvested using scripts written in the programming language Python (<http://www.python.org>).

Results and discussion

We successfully amplified and sequenced DNA from 19 individuals (Table 1). A total of 183 bp was recovered

from the control region, corresponding to position numbers 16 392–16 483 and 16 783–16 873 (nucleotide numbers from the reference domestic cat sequence; Lopez *et al.* 1996). Only one haplotype was detected for all 19 samples. This haplotype corresponds to the one present in the contemporary populations.

At equilibrium the amount of genetic variation in a population is determined by the mutation rate and the effective population size. Low levels of genetic variation are often attributed to historical declines in population size due to past climatic and environmental changes, or human-related activities such as over-exploitation or habitat fragmentation (Bouzat *et al.* 1998; Leonard *et al.* 2005; Nyström *et al.* 2006). However, the analysis of modern and historical museum samples from the Morro Bay Kangaroo (*Dipodomys heermanni morroensis*) showed that low levels of genetic diversity were present in this species prior to its recent decline in population size (Matocq & Villablanca 2001). Similarly, a lack of mitochondrial control region diversity pre-dating a twentieth century bottleneck samples has been observed in Scandinavian wolverines (*Gulo gulo*), and it has been suggested that such a long-term low mtDNA diversity could be the result of postglacial founder events (Walker *et al.* 2001).

Our results indicate a lack of mtDNA control region diversity through time, with the same haplotype being observed in our sample over at least the last 50,000 years. This result is in stark contrast to previous

ancient DNA studies on other extant mammals, which generally seem to have had higher levels of genetic variation during the Late Pleistocene than at present (e.g. Barnes *et al.* 2002; Shapiro *et al.* 2004; Dalén *et al.* 2007; Leonard *et al.* 2007; Valdiosera *et al.* 2007, 2008; Campos *et al.* 2010; Hofreiter & Barnes 2010). However, our results are based on only four samples of Pleistocene age. Thus, a more extensive sampling would be needed to further confirm the lack of genetic variability found in Pleistocene populations of Iberian lynx. Moreover, future studies of ancient DNA could be focused on other parts of the mitochondrial genome (e.g. the ATP-8 and cytochrome *b* genes), where some variability has been observed in the contemporary population (Johnson *et al.* 2004; Alda *et al.* 2008). Nevertheless, the fact that Pleistocene and living lynxes share the same control region haplotype supports the hypothesis that the ancient genetic diversity of the Iberian lynx was extremely low.

The Iberian lynx displays some of the lowest levels of mtDNA diversity among felids (Johnson *et al.* 2004). The results presented here strongly indicate that the low mtDNA diversity in the extant populations was not caused by the observed demographic decline in the last 50 years or the hypothesised bottleneck at the Pleistocene/Holocene transition. Instead, the lack of diversity over the last 50 000 years suggests an unusually low mutation rate in the mtDNA control region or a contin-

Probability of getting variation equal to or less than that observed

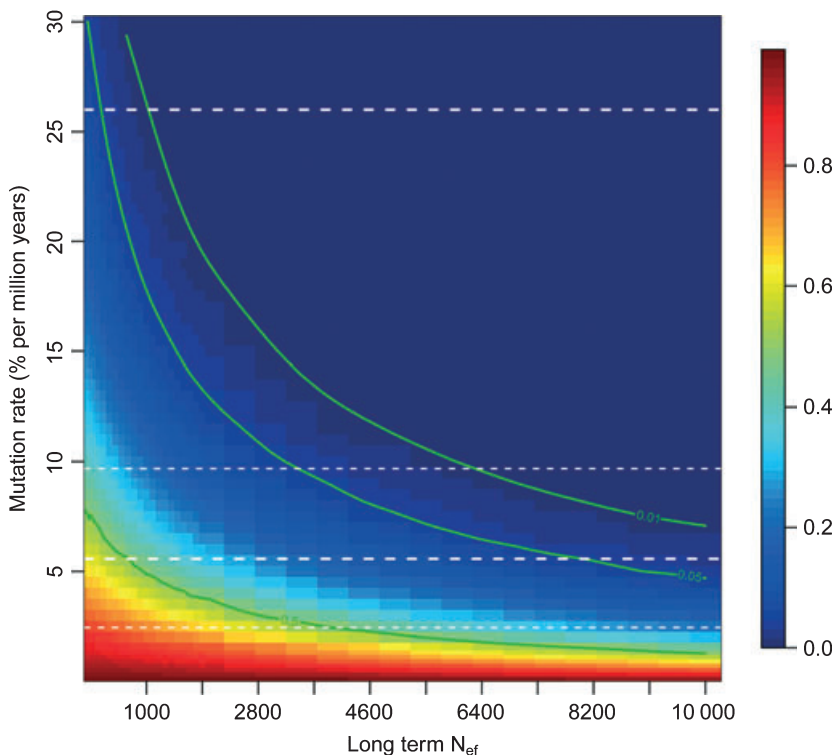


Fig. 2 Probabilities of observing a mean pairwise difference equal to or less than that detected in the 183 bp of Iberian lynx sequences reported in this study (GenBank accession numbers JN122007–JN122008) and Johnson *et al.* (2004), under different combinations of long-term constant female population size (N_{ef}) and mutation rate (μ , in % per million years). The lower thick dashed line indicates the estimated mutation rate for Iberian lynx (thin dashed lines are 95% HPDs), based on the split between *L. lynx* and *L. pardinus* and assuming a constant molecular clock. The upper dashed line shows a mutation rate estimated from a serially sampled cave lion dataset, assuming a time-dependency of the molecular clock (Ersmark E, Orlando L, Barnett R, Barnes I, Stuart A, Lister A, Dalén L (unpublished)).

uously low N_{ef} through time (Fig. 2; Fig. S1, Supporting information). The different approaches to estimate the control region mutation rate using fossil calibration based on the split between the Eurasian and Iberian lynx gave similar results, with an average rate estimate of 5.57% (95% HPD = 2.44–9.68%) per million years. This rate seems to be lower than that reported for other mammals (Shapiro *et al.* 2004; Saarma *et al.* 2007). However, mutation rates of other lynx species do not seem lower than in other felids (e.g. Johnson & O'Brien 1997). It should be noted that the rate reported here was estimated using fossil calibration, and thus might not accurately reflect the intra-specific mutation rate, which may be much higher (Ho *et al.* 2011). Obtaining a correct estimate of the intra-specific mutation rate is important to evaluate the outcome of the simulation presented in this study. The lack of variation found in the Iberian lynx precludes the possibility to estimate the intra-specific mutation rate using internal calibration of the molecular clock (Drummond *et al.* 2002). However, a recent mutation rate estimate for cave lions (*Panthera spelaea*) obtained through internal tip-calibration yielded an estimate of 26% per million years for the control region (Ersmark E, Orlando L, Barnett R, Barnes I, Stuart A, Lister A, Dalén L (unpublished)). Some caution needs to be exercised when comparing mutation rates of lions and lynxes, given the differences in body size and generation time between the two taxa (Bromham & Penny 2003). Nonetheless, the cave lion study provides an indication that the mutation rate in felids may be higher than previously thought (Barnett *et al.* 2009; Ho *et al.* 2011).

Taking these mutation rate estimates into consideration, the results from the simulations suggest that the long-term N_{ef} has been relatively low in the Iberian lynx throughout the last 50 000 years. With a conservative estimate of the mutation rate, without controlling for time dependency of the molecular clock (Ho *et al.* 2005), the simulations suggest a long-term N_{ef} of less than 8100 females (Fig. 2). The higher mutation rate estimate, based on the cave lion internally-calibrated rate, would on the other hand correspond to a maximum long-term N_{ef} of 278 females (Fig. 2). Given the uncertainties in the current data set, both due to the small Pleistocene sample size and the difficulty in estimating a reliable mutation rate, it is difficult to provide a more exact assessment of the past effective population size. However, assuming that our sequence data is representative of the lynx's past diversity and taking into account the mutation rates estimated in other mammals, it seems likely that the effective population size has been comparatively small for several tens of thousands of years.

The Iberian lynx is endemic to the Iberian Peninsula, and seems to have been so throughout most of the spe-

cies' history. The distribution and abundance of the Iberian lynx depends on the presence of its main prey, the European rabbit, which was also present in Iberia during the last glacial maximum (Branco *et al.* 2002; Rodríguez & Delibes 2002). The inferred small N_{ef} may thus be a consequence of both the species' endemism as well as its staple prey species dependence. The lack of observed mtDNA genetic diversity over at least 50 000 years indicates that it is not in itself a threat, nor is it a proxy for a threat to the long-term viability of the Iberian lynx. However, the geographic range and the population size have collapsed in recent decades, and today the Iberian lynx only persists in some small areas in central and southern Spain. While it is difficult to assess at what point loss of autosomal genetic variation will preclude long-term viability, we argue that the lack of modern mtDNA variation should not impede conservation activities.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the Sociedad de Ciencias de Aranzadi, Miguel Nebot, NHM London and NRM Stockholm for kindly providing lynx material and the Fundación General de la Universidad de Alcalá, Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2010-030127), Proyecto de Investigación Arqueológica del Valle Alto del Lozoya, the Fundación Duques de Soria, the Fundación Atapuerca, the Swedish Research Council and the European Union through a Marie Curie Fellowship for financial support. O.R. and C.L.-F. were supported by a grant from the MICINN (BFU2009-06974) of Spain.

References

- Alda F, Inogés J, Alcaraz L, Oria J, Aranda A, Doadrio I (2008) Looking for the Iberian lynx in central Spain: a needle in a haystack? *Animal Conservation*, **1**, 297–305.
- Altuna J (1980) Hallazgo de un Lince Nordico (*Lynx lynx* L. Mammalia) en la Sima de Pagolusietta, Gorbea (Vizcaya). *Munibe. Sociedad de Ciencias Naturales Aranzadi (San Sebastian)*, **3/4**, 317–322.
- Altuna J (1981) Restos oseos de yacimiento prehistorico del Rascaño. *Centro de Investigacion y Museo de Altamira Monografias*, **3**, 223–269.
- Amante C, Eakins BW (2009) ETOPO1 1 Arc-Minute Global Relief Model: procedures, data sources and analysis. *NOAA Technical Memorandum NESDIS NGDC-24*, 19.
- Anderson CNK, Ramakrishnan U, Chan YL, Hadly EA (2005) Serial SimCoal: A population genetic model for data from multiple populations and points in time. *Bioinformatics*, **21**, 1733–1734.
- Aquadro CF, Greenberg BD (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, **103**, 287–312.
- Axelsson E, Willerslev E, Gilbert MTP, Nielsen R (2008) The effect of ancient DNA damage on inferences of demographic histories. *Molecular Biology Evolution*, **25**, 2181–2187.

- Barnes I, Matheus P, Shapiro B, Jensen D, Cooper A (2002) Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science*, **295**, 2267–2270.
- Barnett R, Shapiro B, Barnes I *et al.* (2009) Phylogeography of lions (*Panthera leo* ssp.) reveals three distinct taxa and a Late Pleistocene reduction in diversity. *Molecular Ecology*, **18**, 1668–1677.
- Bouzat JL, Lewin HA, Paige KN (1998) The ghost of genetic diversity past: historical DNA analysis of the greater prairie chicken. *The American Naturalist*, **152**, 1–6.
- Branco M, Monnerot M, Ferrand N, Templeton AR (2002) Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian Peninsula reconstructed from the nested glade and mismatch analyses. *Evolution*, **56**, 792–803.
- Bromham L, Penny D (2003) The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 216–224.
- Brown JR, Beckenbach AT, Smith MJ (1993) Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 326–341.
- Cabrera A (1914) *Lynx pardellus* Miller. In: *Fauna Ibérica. Mamíferos*, pp. 207–210. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Campos PF, Willerslev E, Sher A *et al.* (2010) Ancient DNA analyses exclude humans as the driving force behind late Pleistocene musk ox (*Ovibos moschatus*) population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **107**, 5675–5680.
- Dalén L, Nyström V, Valdiosera C *et al.* (2007) Ancient DNA reveals lack of postglacial habitat tracking in the arctic fox. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **104**, 6726–6729.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W (2002) Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics*, **161**, 1307–1320.
- Excoffier L, Novembre J, Schneider S (2000) SIMCOAL: a general coalescent program for the simulation of molecular data in interconnected populations with arbitrary demography. *Journal of Heredity*, **91**, 506–509.
- Frankham R (2005) Genetics and extinction (Review). *Biological Conservation*, **126**, 131–140.
- Frankham R, Kingslover JG (2004) Response to environmental change: adaptation or extinction. In: (eds Ferrier R, Dieckman U, Couvet D), pp. 85–100. *Evolutionary Conservation Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Graells MP (1897) *Felis pardina* (Temminck). *Fauna mastodológica ibérica. Memorias Real Academia Ciencias*, **XVII**, 224–229.
- Guzmán JN, García F, Garrote G, Ayala R, Iglesias C (2004) *El lince ibérico (Lynx pardinus) en España y Portugal. Censo diagnóstico de sus poblaciones*. Dirección General para la Biodiversidad, Madrid.
- Haslett J, Parnell A (2008) A simple monotone process with application to radiocarbon-dated depth chronologies. *Journal of The Royal Statistical Society Series C-Applied Statistics*, **57**, 399–418.
- Hellborg L, Walker CW, Rueness EK *et al.* (2002) Differentiation and levels of genetic variation in northern European lynx (*Lynx lynx*) populations revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. *Conservation Genetics*, **3**, 97–111.
- Ho SY, Phillips MJ, Cooper A, Drummond AJ (2005) Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1561–1568.
- Ho SY, Lanfear R, Phillips MJ *et al.* (2011) Bayesian estimation of substitution rates from ancient DNA sequences with low information content. *Systematic Biology*, **60**, 366–375.
- Hoelzel AR, Dover GA (1991) Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology and Evolution*, **8**, 475–493.
- Hofreiter M, Barnes I (2010) Diversity lost: are all Holarctic large mammal species just relict population? *BMC Biology*, **8**, 46.
- IUCN (2010). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 12 September 2010.
- Johnson WE, O'Brien SJ (1997) Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *Journal of Molecular Evolution*, **44**, 98–116.
- Johnson WE, Godoy JA, Palomares F *et al.* (2004) Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *Journal of Heredity*, **95**, 19–28.
- Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J *et al.* (2006) The Late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science*, **311**, 73–77.
- Keller LF, Arcese P, Smith JNM, Hochachka WM, Stearns SC (1994) Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature*, **372**, 356–357.
- Krause J, Dear PH, Pollack JL *et al.* (2006) Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature*, **439**, 724–727.
- Kurtén B, Granqvist E (1987) Fossil pardal lynx (*Lynx pardina spelaea* Boule) from a cave in southern France. *Annales Zoologici Fennici*, **24**, 39–43.
- Leonard JA, Wayne RK, Cooper A (2000) Population genetics of Ice Age brown bears. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **97**, 1651–1654.
- Leonard JA, Vilà C, Wayne RK (2005) Legacy lost: genetic variability and population size of extirpated US gray wolves (*Canis lupus*). *Molecular Ecology*, **14**, 9–17.
- Leonard J, Vilà C, Fox-Dobbs K, Koch LP, Wayne RK, Valkenburgh BV (2007) Megafaunal extinctions and the disappearance of a specialized wolf ecomorph. *Current Biology*, **17**, 1146–1150.
- Lopez JV, Cevario S, O'Brien SJ (1996) Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (Numt) in the nuclear genome. *Genomics*, **33**, 229–246.
- Lopez JV, Culver M, Stephens JC, Johnson WE, O'Brien SJ (1997) Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 277–286.
- López-Martínez N (2008) The lagomorph fossil record and the origin of the European rabbit. In: *Lagomorph biology evolution*,

- ecology and conservatio* (eds Alves PC, Ferrand N, Hackländer K). pp. 27–46, Springer, Berlin.
- MacFadden BJ, Galiano H (1981) Late Hemphillian cat (Mammalia, Felidae) from the Bone Valley Formation of central Florida. *Journal of Paleontology*, **55**, 218–226.
- Mallinson J (1978) Lynxes. European lynx (*Lynx lynx*) and pardel lynx (*Lynx pardina*). In: *The shadow of extinction: Europe's Threatened Wild Mammals*. pp. 141–148, MacMillan, London.
- Martin LD (1989) Fossil history of the terrestrial Carnivora. In: *Carnivore Behaviour, Ecology, and Evolution* (ed Gittleman JL). pp. 536–568, Cornell University Press Ithaca, New York.
- Matocq MD, Villablanca FX (2001) Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern? *Biological Conservation*, **98**, 61–68.
- Nowell K, Jackson P (1996) *Wild Cats: Status Survey and Conservation Action Plan*, IUCN publications. Burlington Press, Cambridge.
- Nyström V, Angerbjörn A, Dalén L (2006) Genetic consequences of a demographic bottleneck in the Scandinavian arctic fox. *Oikos*, **114**, 84–94.
- O'Brien SJ, Wildt DE, Goldman D, Merrill CR, Bush M (1983) The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science*, **221**, 459–462.
- O'Grady JJ, Reed DH, Brook BW, Frankham R (2008) Extinction risk scales better to generations than to years. *Animal Conservation*, **11**, 442.
- Packer C, Pusey AE, Rowley H, Gilbert DA, Martenson J, O'Brien SJ (1991) Case study of a population bottleneck – lions of the Ngorongoro Crater. *Conservation Biology*, **5**, 219–230.
- Palomares F, Godoy JA, Piriz 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.
- Parnell AC, Haslett J, Allen JRM, Buck CE, Huntley B (2008) A flexible approach to assessing synchronicity of past events using Bayesian reconstructions of sedimentation history. *Quaternary Science Reviews*, **27**, 1872–1885.
- Quam RM, Arsuaga JL, de Castro JMB *et al.* (2001) Human remains from Valdegoba Cave (Huermeces, Burgos, Spain). *Journal of Human Evolution*, **41**, 385–435.
- Reimer PJ, Baillie MGL, Bard E *et al.* (2009) Intcal09 and Marine09 Radiocarbon Age calibration curves, 0–50,000 years Cal Bp. *Radiocarbon*, **51**, 1111–1150.
- Rodríguez A, Delibes M (1992) Current range and status of the Iberian lynx *Felis pardina* Temminck, 1824 in Spain. *Biological Conservation*, **61**, 89–196.
- Rodríguez A, Delibes M (2002) Internal structure and patterns of contraction in the geographic range of the Iberian lynx. *Ecography*, **25**, 314–328.
- Roelke ME, Martenson JS, O'Brien SJ (1993) The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida Panther. *Current Biology*, **3**, 340–350.
- Ruiz G, López M, Fernández L, Franco JA, López G, Simón MA (2009) Short communication on the first Iberian lynx translocation from Sierra Morena to the Doñana population. In: *Iberian Lynx ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach* (eds Vargas A, Breitenmoser C, Breitenmoser U). pp. 445–447, Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.
- Saarma U, Ho SYW, Pybus OG *et al.* (2007) Mitogenetic structure of brown bears (*Ursus arctos* L.) in north-eastern Europe and a new timeframe for the formation of brown bear lineages. *Molecular Ecology*, **16**, 401–413.
- Shapiro B, Drummond AJ, Rambaut A *et al.* (2004) Rise and fall of the Beringian steppe bison. *Science*, **306**, 1561–1565.
- Sommer RS, Benecke N (2005) Late Pleistocene and Holocene development of the felid fauna (Felidae) of Europe: a review. *Journal of Zoology*, **216**, 7–19.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).
- Valdiosera CE, García N, Anderung C *et al.* (2007) Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Molecular Ecology*, **16**, 5140–5148.
- Valdiosera CE, Garcia-Garitaigoitia JL, Garcia N *et al.* (2008) Surprising migration and population size dynamics in ancient Iberian brown bears (*Ursus arctos*). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **105**, 5123–5128.
- Vigne JD (1986) *Le problème de l'interprétation des restes de repas en milieu funéraire vu au travers des ensembles fauniques de deux sites stratifiés: Can Pey (Montferrer, Pyrénées Orientales) et Capula (Lévie, Corse) Actes du Colloque Anthropologie Physique et Archéologie*. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- Vigne JD (1996) La faune des vertébrés. In: *Le Laouret et la Montagne d'Alaric à la fin de l'âge du Bronze. Un hameau abandonné entre Floure et Monze (Aude)* (ed Gasco J), pp. 197–239. Centre d' Anthropologie, Toulouse.
- Vigne JD, Pascal M (2003) Le Lynx pardelle *Lynx pardinus* (Temnick, 1827). In: *Evolution de la Faune de Vertébrés en France Métropolitaine depuis le début de l'Holocène. Invasions et Extinction* (eds Pascal M, Lorvelec O, Vigne JD, Keith P, Clergeau P). pp. 87–89, National de la Recherche Agronomique, Museum National d'Histoire Naturelle de Paris.
- Walker CW, Vila C, Landa A, Linden M, Ellegren H (2001) Genetic variation and population structure in Scandinavian wolverine (*Gulo gulo*) populations. *Molecular Ecology*, **10**, 53–63.
- Werdelin L (1981) The evolution of lynxes. *Annales Zoologici Fennici*, **18**, 37–71.
- Yang D, Eng B, Wayne J, Dudar J, Saunders S (1998) Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silicabased spin columns. *American Journal of Physical Anthropology*, **105**, 539–543.

R.R.: Ancient DNA, phylogeography and conservation genetics.
 O.R.: Ancient DNA and conservation genetics. C.E.V.: Phylogeography, ancient DNA, paleogenomics and conservation genetics. N.G.: Palaeobiology, evolution and ecology of carnivores. F.A.: Rabbit hemorrhagic disease virus, molecular epidemiology and molecular evolution. J.M.-M.: Paleontology and evolution. J.M.: Paleontology and evolution. I.D.: Biodiversity and evolutionary biology. E.W.: Ancient DNA and paleogenomics. A.G.: Ancient DNA techniques development and cattle domestication. J.L.A.: Evolutionary history of hominids. M.G.T.: Genetic anthropology. C.L-F: Ancient DNA, paleogenomics and human evolution. L.D: Ancient DNA, evolution and ecology of mammoths.

Data accessibility

DNA sequences for the two non-overlapping fragments have been deposited in GenBank under accession numbers JN122007–JN122008. Details regarding individual samples are available in Table 1.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 Probabilities of observing no variation in the nineteen date-stamped samples of 183bp sequence reported in this

study under different combinations of long-term constant female population size (N_{ef}) and mutation rate (in % per million years). The lower thick dashed line indicates the estimated mutation rate for Iberian lynx (thin dashed lines are 95% HPDs), based on the split between *L. lynx* and *L. pardinus* and assuming a constant molecular clock. The upper dashed line shows a mutation rate estimated from a serially sampled cave lion dataset, assuming a time dependency of the molecular clock (Ersmark E, Orlando L, Barnett R, Barnes I, Stuart A, Lister A, Dalén L, unpublished).

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Supplementary Information

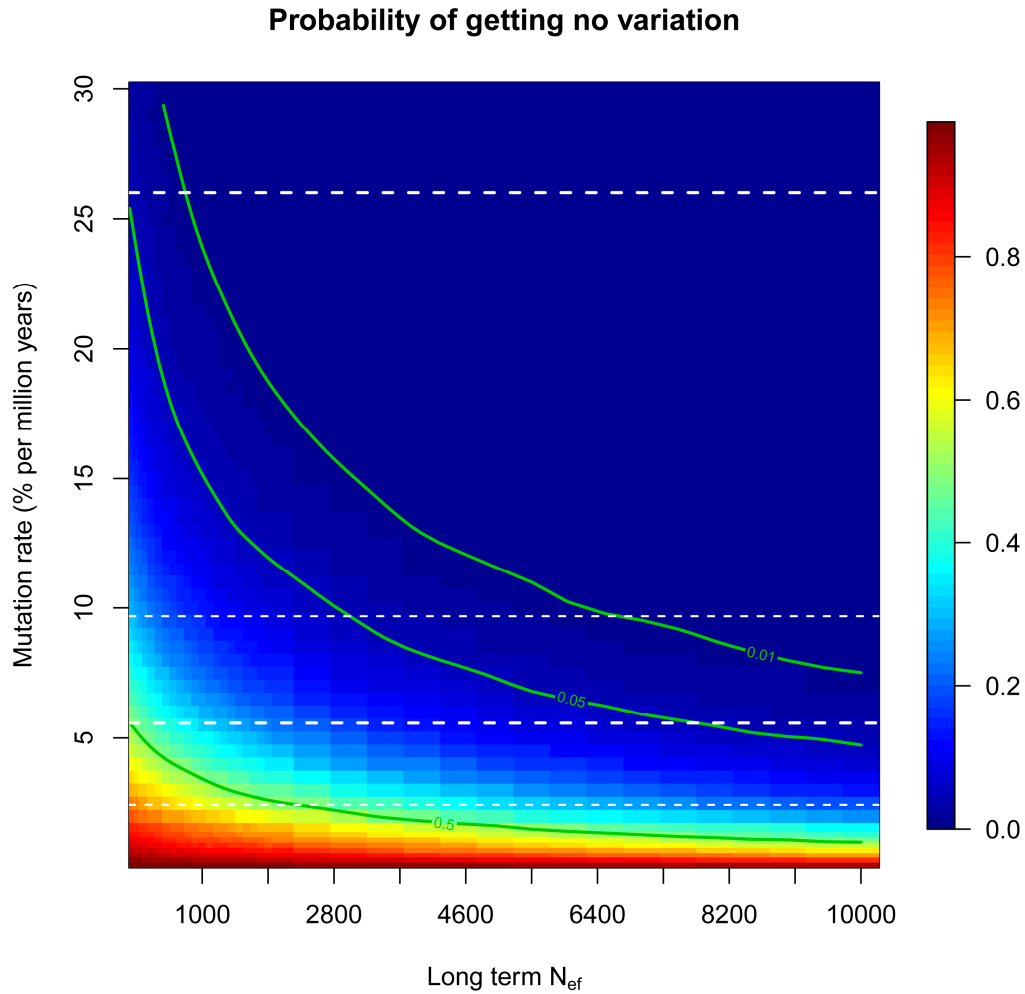


Fig. S1 Probabilities of observing no variation in the nineteen date-stamped samples of 183bp sequence reported in this study under different combinations of long-term constant female population size (N_{ef}) and mutation rate (μ , in % per million years). The lower thick dashed line indicates the estimated mutation rate for Iberian lynx (thin dashed lines are 95% HPDs), based on the split between *L. lynx* and *L. pardinus* and assuming a constant molecular clock. The upper dashed line shows a mutation rate estimated from a serially sampled cave lion dataset, assuming a time-dependency of the molecular clock (Ersmark *et al. in prep.*).

6.1.3 Conclusiones artículo I

La ausencia de diversidad genética en los últimos 50 000 años solo se puede explicar, bien por un tamaño poblacional pequeño a lo largo del tiempo, bien por una tasa de mutación inusualmente baja. Las simulaciones indican que, incluso asumiendo una tasa de mutación conservadora, el tamaño de la población de lince sería relativamente bajo.

La distribución y abundancia del lince ibérico depende de la presencia de su principal presa el conejo europeo, el cual también estaba presente en la península durante el LGM (Rodríguez y Delibes, 2002; Branco *et al.*, 2002). El bajo tamaño poblacional inferido podría ser consecuencia tanto del carácter endémico de la especie como de su gran dependencia por el conejo europeo. Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que el tamaño poblacional de los lince siempre fue relativamente bajo. Sin embargo, el tamaño de la población de lince en el pasado estaría muy por encima del censo actual e, incluso, serían superiores a los tamaños poblacionales previos al declive observado durante los últimos siglos.

Los bajos niveles de diversidad genética en la región control del ADNmt observados durante los últimos 50 000 años sugieren que la baja diversidad genética en esta parte del genoma no es, en sí misma, una amenaza para la supervivencia a largo plazo de la especie. Ahora bien estos resultados no excluyen que la pérdida de diversidad genética, como consecuencia del drástico cuello de botella ocurrido en los últimos siglos en regiones del genoma que afectan a su *fitness*, sí tenga repercusión en la viabilidad de esta especie.

6.2. Artículo II

6.2.1 Introducción artículo II

La dificultad de una identificación a nivel de especie con arreglo a criterios morfométricos a partir de material postcraneal del género *Lynx* hace que potencialmente se pueda incurrir en errores de identificación. En este trabajo se ha analizado un total de 335 pb de las partes más variables de la región control y del citocromo *b* (ADNmt) en una serie de restos de lince. Estos restos morfométricamente clasificados como *Lynx pardinus*, *Lynx lynx*, *Lynx* sp., además de como una especie extinta comúnmente denominada lince de las cavernas (*Lynx* cf. *spelaeus*) provienen de diferentes yacimientos de España, Italia y Francia. Las muestras analizadas abarcan un rango de edades que va desde el Pleistoceno Superior a la actualidad. El objetivo de este

Resultados

trabajo era conocer si restos de lince ibérico fuera de la península ibérica se han podido confundir con el lince boreal y si, por tanto, tuvo un rango de distribución mayor en el pasado. Además se intentaba aportar información acerca de los restos del Pleistoceno Superior clasificados como *Lynx cf. spelaeus*.

Los resultados obtenidos muestran claramente que los restos de lince clasificados a partir de su gran tamaño como *Lynx cf. spelaeus* e incluso como *Lynx lynx* del yacimiento italiano de Arene Candide (norte de Italia) se agrupan, fuera de toda duda, dentro del linaje de los lince ibérico de la península ibérica (*Lynx pardinus pardinus*). De manera similar, restos franceses y del norte de España clasificados como *Lynx sp.*, sin especificar la especie, pertenecen en base a su ADNmt al linaje ibérico. Gracias a las dataciones por C^{14} se ha podido constatar que ambas especies de lince paleárticos, el ibérico y el boreal, cohabitaron durante el Pleistoceno Superior en Arene Candide.



Contents lists available at ScienceDirect

Quaternary Science Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/quascirev

Ancient DNA evidence of Iberian lynx palaeoendemism



Ricardo Rodríguez-Varela ^{a, b, **}, Antonio Tagliacozzo ^c, Irene Ureña ^a, Nuria García ^{a, b},
Evelyne Crégut-Bonnoure ^{d, g}, Marcello A. Mannino ^e, Juan Luis Arsuaga ^{a, b},
Cristina Valdiosera ^{f, a, *}

^a Centro Mixto, Universidad Complutense de Madrid – Instituto de Salud Carlos III de Evolución y Comportamiento Humanos, Avda. Monforte de Lemos 5, 28029 Madrid, Spain

^b Departamento de Paleontología, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^c Soprintendenza al Museo Nazionale Preistorico Etnografico ‘L. Pigorini’, Sezione di Paleontologia del Quaternario e Archeozoologia, P.le Marconi 14, 00144 Roma, Italy

^d Muséum Requiem, 67, rue Joseph Vernet, 84000 Avignon, France

^e Department of Human Evolution, Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Germany

^f Department of Archaeology, Environment and Community Planning Faculty of Humanities and Social Sciences, La Trobe University, Melbourne, VIC 3086, Australia

^g UMR 5608 TRACE (UTM), Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2014

Received in revised form

13 November 2014

Accepted 14 January 2015

Available online 18 February 2015

Keywords:

Iberian lynx

Ancient DNA

Eurasian lynx

Mitochondrial DNA

Palaeoendemism

ABSTRACT

The Iberian lynx, endemic to the Iberian Peninsula, is the most threatened carnivore in Europe and the most endangered felid in the world. Widely distributed throughout Iberia during the Pleistocene and Holocene it is now confined to two small populations in southern Spain. Lynx species differentiation, based solely on morphological analysis from skeletal traits, is a difficult task and can potentially lead to misidentification. In order to verify whether Iberian lynx had a wider geographical distribution in the past, we successfully sequenced 152 base pairs (bp) of the cytochrome *b* gene and 183 bp of the mitochondrial control region in 20 Late Pleistocene and Holocene fossil remains of *Lynx* sp. from southern Europe. Our results confirm the presence of Iberian lynx outside the Iberian Peninsula demonstrating that this is a palaeoendemic species that had a wider distribution range in southern Europe during the Holocene and the Late Pleistocene. In addition, we documented the presence of both Palaeartic extant lynx species in the Arene Candide (north Italy) site during the Last Glacial Maximum.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Iberian lynx, *Lynx pardinus pardinus* (Temminck 1827), is one of the few large carnivores that still survive in Europe. It is considered the most threatened species of the family Felidae (Nowell and Jackson, 1996) and has been listed as critically endangered since 2002 (IUCN, 2012). This species is believed to be endemic to the Iberian Peninsula. It is in this region where it has

survived as a specialist species adapted to Mediterranean scrubland habitat and to its main prey species, the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) (Delibes, 1980; Palomares et al., 2000, 2001; Palomares, 2001; Gil-Sánchez et al., 2006). During the last 200 years the Iberian lynx has suffered a drastic decrease in population size as well as in range distribution (Rodríguez and Delibes, 1992, 2002; Gil-Sánchez and McCain, 2011). Currently, the only two resident populations inhabit in southern Spain, Doñana and Sierra Morena (Fig. 1). The latest census in 2013 reports a total of 332 individuals in Andalucía (<http://www.iberlynce.eu>). In the light of forecast climate change, research on wildlife conservation strategies has explored the possibility of establishing programmes of human assisted colonisation (Griffith et al., 1989; Thomas, 2011). These programmes aim to introduce (or re-introduce) individuals of climate-threatened populations to locations that are predicted to be more favourable in the longer-term future (Thomas, 2011; Fordham et al., 2013).

* Corresponding author. Department of Archaeology, Environment and Community Planning Faculty of Humanities and Social Sciences, La Trobe University, Melbourne, VIC 3086, Australia.

** Corresponding author. Centro Mixto, Universidad Complutense de Madrid – Instituto de Salud Carlos III de Evolución y Comportamiento Humanos, Avda. Monforte de Lemos 5, 28029 Madrid, Spain. Fax: +34 91 822 28 55.

E-mail addresses: ricardo_eyre@yahoo.es (R. Rodríguez-Varela), C.Valdiosera@latrobe.edu.au (C. Valdiosera).

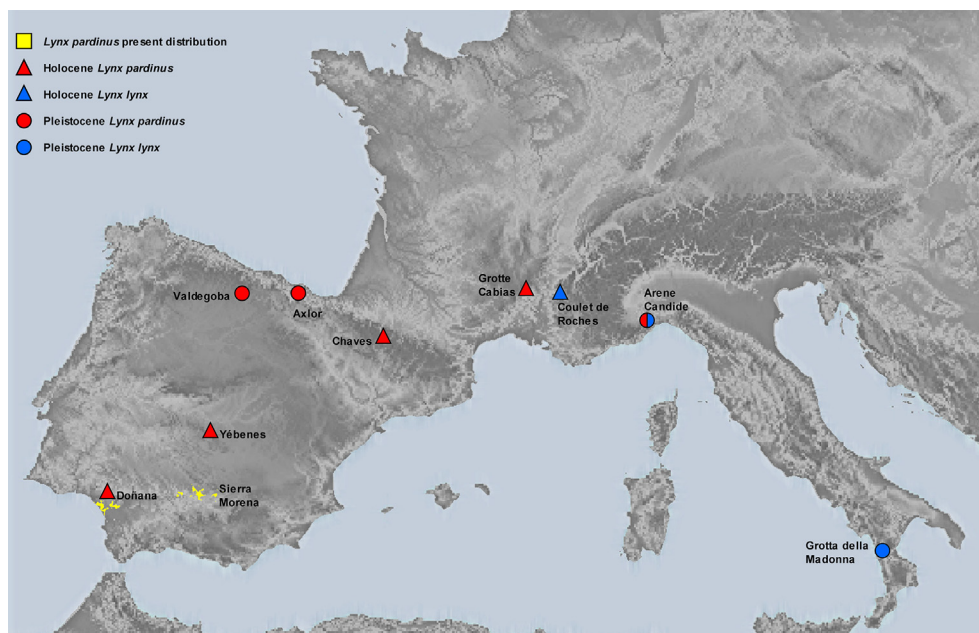


Fig. 1. Geographic location of sampled sites. The yellow areas represent the extant Iberian lynx populations (<http://www.iberlynce.eu>). Circles and triangles show the geographic location of sampled sites in which positive DNA results allowed for the genetic identification of the lynx remains. The red and blue triangles represent Holocene fossil remains that were genetically identified as *Lynx pardinus pardinus* and *Lynx lynx*, respectively; the red and blue circles represent Pleistocene lynx remains genetically identified as *Lynx pardinus pardinus* and *Lynx lynx*, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

There is not a clear record of Iberian lynx (*L. pardinus pardinus*) outside the Iberian Peninsula during the Last Glacial Maximum (LGM) at approximately 23,000–16,000 BP (Sommer and Benecke, 2006; Sommer and Nadachowski, 2006). However, there are a few Iberian lynx (*L. pardinus pardinus*) remains in southern France during the Holocene until the Iron Age (Guilaine et al., 1986; Vigne, 1996; Vigne and Pascal, 2003). The larger Eurasian lynx (*Lynx lynx*), on the other hand, is present in most parts of the Eurasian continent. The genetic and ecological differentiation between both Palearctic lynx species is well documented (Beltrán et al., 1996; Ferrer and Negro, 2004; Johnson et al., 2004, 2006). Interestingly, most of the Late Pleistocene lynx remains found in France that have not been classified as Eurasian lynx have been attributed to the extinct “cave lynx” (*Lynx pardinus spelaeus* Boule, 1910) which has an intermediate size between the Eurasian lynx and the extant Iberian lynx (Boule, 1906, 1910; Boule and Villeneuve, 1927; Kurtén and Granqvist, 1987). There is a general agreement that this Late Pleistocene *L. pardinus spelaeus* is an Iberian lynx subspecies (Boule, 1906, 1910; Boule and Villeneuve, 1927; Werdelin, 1981; Kurtén and Granqvist, 1987). However, it is often found in the literature that Late Pleistocene lynx remains from southern Europe are referred to only as *Lynx spelaea* resulting in confusion about the specific taxonomic position of these Late Pleistocene fossils assemblages (e.g. Bonifay, 1971, 1978; Cassoli and Tagliacozzo, 1994; Grayson, 1994, 1998; Valensi, 1994; Blasol, 1997; Valensi and Psathi, 2004). There are, however, a few exceptions where Late Pleistocene lynx remains have been classified as Iberian lynx (*L. pardinus pardinus*) in France (Bonifay, 1971, 1978) and *Lynx cf. pardinus* in Italy (e.g. Tagliacozzo and Cassoli, 1993).

Given the presence of Iberian lynx in southern France during the Holocene, and the potential misidentification between *Lynx* sp. in France and Italy, it is possible that the Iberian lynx, currently endemic to the Iberian Peninsula, had a wider geographical distribution in the past.

The cytochrome *b* and the control region in the mitochondrial DNA (mtDNA) are the preferred genetic markers in most population

genetics and phylogeographic studies. The cytochrome *b* gene is favoured for species identification because it generally shows a high degree of congruence with the taxonomical boundaries between different species (Johns and Avise, 1998; Avise and Walker, 1999). Moreover, it is conservative enough to clarify deep phylogenetic relationships. The control region is generally the marker of choice to determine genetic variation at a population level given its high mutation rate (Aquadro and Greenberg, 1983; Hoelzel and Dover, 1991; Brown et al., 1993; Lopez et al., 1997).

In this study we analyse the most variable regions of the cytochrome *b* and the control region in the mtDNA on a set of *Lynx* sp. remains from different sites and chronologies in Spain, Italy, and southern France. By genetically profiling these remains we attempt to investigate whether the Iberian lynx has been misidentified with the Eurasian lynx and therefore had a wider distribution in the past. The remains analysed here have been classified as Iberian lynx (*L. pardinus pardinus*), *Lynx cf. spelaea*, *Lynx* sp. and/or Eurasian lynx (*L. lynx*) (see Table 1) based on morphological features and/or body size (Tagliacozzo and Cassoli, 1993; Cassoli and Tagliacozzo, 1994).

2. Methods

2.1. Samples and DNA extraction

One hundred and four samples (bone and tooth) were collected from different localities of Spain, Italy and France spanning a time range from the Late Pleistocene to recent times (see Table 1 and Table S1 and S2). Specimens were sampled by grinding into powder using a multitool drill (Dremel). Samples of approximately 150 mg of powder were used for DNA extraction using silica-binding approaches (Yang et al., 1998). All the pre amplification steps were performed at the ancient DNA lab in the Centro Mixto (ISCIII-UCM) de Evolución y Comportamiento Humanos in Madrid (Spain). A 183 bp of the mitochondrial control region and 152 bp fragment of the cytochrome *b* gene were targeted using six non-overlapping primer pairs (Table S3). Two repetitive sequences (RS2) and (RS3)

Table 1
Sample information and GenBank accession numbers of individuals with successful ancient DNA sequencing and published samples used in the Minimum Spanning Networks. Samples that were not generated in this study are indicated with the appropriate reference. Dates are provided as calibrated radiocarbon dates of the material (see Table S1 for direct radiocarbon dates and laboratory codes), year of specimen collection or archaeological context.

Network haplotypes			Sample code or reference	Morphometrical classification	Molecular classification	Site	Archaeological date/Radiocarbon calibrated age 2s BP prob % BP/Year specimen collection	Accession numbers: control region/cytochrome <i>b</i>
Fig. 2A control region and cytochrome <i>b</i>	Fig. 2B control region	Fig. 2C cytochrome <i>b</i>						
9	6	8	CdR8501	<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx lynx</i>	Coulet des Roches (France)	8171–8000 95.4%	KJ210010/KJ210014
			CdR5548	<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx lynx</i>	Coulet des Roches (France)	7564–7431 95.4%	
7	4	8	GMP6	<i>Lynx</i> sp.	<i>Lynx lynx</i>	Grotta della Madonna (Italy)	Epigravettian	KJ210012/KJ210014
6	3	8	GMP7	<i>Lynx</i> sp.	<i>Lynx lynx</i>	Grotta della Madonna (Italy)	12,896–12,697 95.4%	KJ210011/KJ210014
			AC6	<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	18,351–17,986 95.4%	
8	5	10	AC19	<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	27,708–27,298 95.4%	KJ210013/KJ210015
			AC14	<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	27,618–27,165 95.4%	
			Arene 10484	<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	27,556–27,100 95.4%	
5	1	4	Arene 10485	<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Arene Candide (Italy)	25,170–24,480 95.4%	JN122007, JN122008/KJ210016
			AC17	<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Arene Candide (Italy)	24,958–24,305 95.4%	
			AC18	<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Arene Candide (Italy)	25,192–24,499 95.4%	
4	2	4	Axlulna	<i>Lynx</i> sp.	<i>Lynx pardinus</i>	Axlor (Vizcaya, Spain)	Mousterian	KJ210009/KJ210016
			AC12	<i>Lynx cf. spelaea</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Arene Candide (Italy)	Gravettian	
			AC4	<i>Lynx cf. spelaea</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Arene Candide (Italy)	18,770–18,475 95.4%	
2	1	1	Cabias	<i>Lynx</i> sp.	<i>Lynx pardinus</i>	Grotte Cabias (Lirac, Gard, France)	3867–3697 95.4%	JN122007, JN122008/KJ210017
			Yebenes3AR	<i>Lynx pardinus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Los Yébenes (Toledo, Spain)	Year of specimen collection 1860–2000	
			Doñana4AR	<i>Lynx pardinus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Doñana (Sevilla, Spain)	Year of specimen collection 1860–2000	
			Chaves	<i>Lynx pardinus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Chaves (Huesca, Spain)	6960–6748 95.4%	
1	1	5	Valdegoba87	<i>Lynx pardinus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Valdegoba (Burgos, Spain)	Indirect Age (uncal. BP) 48,400 ± 3300 ^a	JN122007, JN122008/KJ210019
3	1	6	Valdegoba89	<i>Lynx pardinus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Valdegoba (Burgos, Spain)	Indirect Age (uncal. BP) 48400 ± 3300 ^a	JN122007, JN122008/KJ210018
NA	1	NA	Casas-Marce et al., 2013	NA	<i>Lynx pardinus</i>	Doñana and Sierra Morena (Spain)	Modern	KF561247/NA
NA	1	NA	Rodríguez et al., 2011	NA	<i>Lynx pardinus</i>	Iberian Peninsula	Ancient	JN122007, JN122008/NA
6, 9–20	3, 5–26	8, 9	Rueness et al., 2014	NA	<i>Lynx lynx</i>	See ref	Modern	EU818842–EU818889/ EU818890–EU818893
NA	NA	8, 7	Johnson et al., 2004	NA	<i>Lynx lynx</i>	See ref	Modern	NA/AY499324–AY499327
NA	NA	1–3	Alda et al., 2008	NA	<i>Lynx pardinus</i>	Iberian Peninsula	Modern	NA/AY499320–AY499323
NA	NA	1	Fernandes et al., 2008	NA	<i>Lynx pardinus</i>	Iberian Peninsula	Modern	NA/EF689047–EF689048
NA	NA	8	Masuda et al., 1994	NA	<i>Lynx lynx</i>	See ref	Modern	NA/D28902

^a Samples from Valdegoba cave were determined from radiocarbon dates at University of Oxford obtained from an associated bone sample.

in the Eurasian lynx control region were excluded from this study due to its high rate of heteroplasmy (Hoelzel et al., 1994; Hellborg et al., 2002; Sindčić et al., 2012).

All samples that were successfully sequenced were radiocarbon dated using accelerator mass spectrometry (Beta Analytic, Miami Florida) with the following exceptions; samples Valdegoba87 and Valdegoba89 whose age was determined from radiocarbon dates obtained from associated material (Quam et al., 2001), samples AC12, GMP6 and Axlulna were dated by archaeological context (Cassoli and Tagliacozzo, 1994; Baldeón, 1999) and finally for

samples Yebenes3AR and Doñana4AR we estimated an approximate age (Rodríguez et al., 2011) (Table 1 and Table S1). Radiocarbon dates were calibrated using the OxCal 4.2 software (Bronk Ramsey, 2009) and the INTCAL13 calibration curve (Reimer et al., 2013).

2.2. PCR amplifications

DNA amplification was performed in a 25 µl reaction consisting of 1 × PCR buffer (Invitrogen), 1 mM MgSO₄ (Invitrogen), 0.8 µg/µl of

bovine serum albumin (BSA) (Sigma), 0.2 mM dNTPs (Sigma), 0.2 μ M of each primer, 0.5 U of High Fidelity Platinum Taq (Invitrogen) and 2 μ l of DNA extract. Cycling conditions were as follows: a 2 min activation step at 94 °C, followed by 54 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 54 °C, 30 s at 68 °C, with a final extension of 7 min at 68 °C. Amplicons were purified using ExoSAP-It (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions and directly sequenced in forward and reverse orientations on an automated DNA sequencer (ABI-3730xl) using the Big Dye 3.1 sequencing kit (Applied Biosystems). Sequences were edited with Sequencher v.4.7 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) and manually aligned using the software MEGA version 6 (Tamura et al., 2013).

2.3. Validation of DNA results

All samples were sequenced at least three times for each fragment from three different PCR products in order to obtain a consensus sequence based on a minimum of three identical replicates. In samples where we found sequence inconsistencies among the three replicates, likely caused by PCR misincorporation or damage due to DNA degradation, an additional extraction and amplification was performed and sequenced in order to obtain a majority rule consensus approach. One negative extraction control as well as one negative PCR control (no DNA extract) was used for every four samples in each reaction. It is important to mention, that no Eurasian lynx have previously been handled in our ancient DNA facilities, moreover, DNA fragments of any lynx species of the cytochrome *b* have never been amplified in this lab.

The presence of nuclear pseudogenes (NUMTs) in ancient sequences cannot be discarded due to the low copy number of nuclear DNA in ancient samples (Den Tex et al., 2010). However, consistency among the different replicates of each fragment per individual and the absence of multiple bands in the electrophoresis gels in each of our PCR products, combined with the use of species specific primers designed to amplify targeted mtDNA sequences of the Iberian and/or Eurasian lynx (Table S3), increases the probability of avoiding NUMTs (Den Tex et al., 2010). Moreover, the Iberian lynx DNA sequences of the cytochrome *b* were translated and showed no evidence of frame shift mutations, mutations causing an inappropriate stop codon or mutations resulting in non-synonymous amino acid substitutions. Altogether, our data fulfils most of the criteria required to discard the presence of NUMTs in ancient sequences proposed by Den Tex et al. (2010).

2.4. Minimum-spanning network

Three minimum-spanning networks (MSN) based on pairwise differences among haplotypes were constructed with three different data sets using Arlequin software (ver 3.1) (Fig. 2, Table 1) (Excoffier et al., 2005). The first data set consisted of concatenated control region and cytochrome *b* ancient sequences (324 bp) generated in this study and previously published (Rodríguez et al., 2011), in addition to Eurasian lynx modern sequences available in the Genbank (Fig. 2A, Table 1). Modern Iberian lynx sequences are not included in this data set because the ones publically available did not cover the regions of interest, both for the control region and cytochrome *b* for the same individual. For the second data set we used only control region sequences (179 bp) from this study and previously published ones (Rodríguez et al., 2011), together with modern Iberian and Eurasian lynx sequences available in the Genbank (Fig. 2B, Table 1). Finally, in the last dataset we used only cytochrome *b* sequences (140 bp) generated in this study and modern sequences available in the Genbank (Fig. 2C, Table 1). Genetic species differentiation of Eurasian and Iberian lynx was estimated using the first dataset (Table 1, Fig. 2A) by calculating a

fixation index (Fst) wherein the significance was tested over 90,000 permutations using Arlequin software (ver 3.1) (Excoffier et al., 2005).

3. Results

From a total of one hundred and four samples analysed in this study, we obtained 20 samples from nine different sites (see Fig. 1) that yielded the complete targeted mitochondrial DNA sequence, which involved 335 bp of total length, comprising two fragments of the control region and two fragments of the cytochrome *b* (Table S3). These 20 samples were included for downstream analysis and for species identification (Table 1, Fig. 2). We were able to identify genetically these 20 individuals that had previously been classified as Iberian lynx (*L. pardinus pardinus*), *Lynx cf. spelaea*, Eurasian lynx (*L. lynx*), or *Lynx sp.* based on morphometric analysis. No DNA was detected in any of the extraction and PCR negative controls. The remaining 84 samples were discarded given that they failed to produce amplifiable DNA for all four fragments used in this study (Table S2). Samples (P5953-RS-458-158 and 458F-158-RS) from L'Abri Soman (Italy) and (GMP1) from Grotta della Madonna (Italy) were identified as Eurasian lynx after a blast search (e-value: $1e^{-34}$, indent: 97%) based on one single fragment of the control region and one of the cytochrome *b*. Similarly, sample (Rad.-d.UIII.D4 Linx lynx) from Urratxa (Vizcaya, Spain) was identified as Iberian lynx based on two fragments of the control region. However, these results were replicated only one time as they failed to yield positive results for the remaining fragments and were not included in the analysis (Table S2).

We consistently observed in the three minimum spanning networks a clear haplotype distribution forming two distant groups. The first group comprises all modern and ancient Eurasian lynx individuals whereas the second one comprises the modern and ancient Iberian lynx (Table 1, Fig. 2). Interestingly, samples Arene 10485, AC17, AC18 (Arene Candide, Northern Italy) and Cabias (Southern France) previously classified as Eurasian lynx and *Lynx sp.* cluster within the Iberian lynx lineage (Table 1, Fig. 2). Moreover, the samples (AC12 and AC4) classified as *Lynx cf. spelaea* fell also within the Iberian lynx lineage (Table 1, Fig. 2). In addition, we identified six Iberian lynx from different sites (Axlor, Los Yébenes, Doñana, Chaves, Valdegoba) of the Iberian Peninsula and eight Eurasian lynx from France and Italy (Coulet des Roches, Grotta della Madonna, Arene Candide) (Fig. 1). These samples span a time range from the Late Pleistocene to recent times (Table 1).

We observed a significant differentiation ($F_{st} = 0.93506$, $P = 0.005$) when testing for genetic distance between the samples that were genetically identified as Iberian lynx and the ones identified as Eurasian lynx.

For the Iberian lynx only one new mitochondrial control region haplotype was found in samples AC4 and AC12 (accession number KJ210009) differing by one transition from the unique mitochondrial control region haplotype that has been fixed in the Iberian Peninsula lynx population during the last 50,000 years (accession number JN122007–JN122008) (Rodríguez et al., 2011). It is unlikely that this transition was due to DNA damage given that it was present in all four independent PCR amplifications made from different extracts. In the cytochrome *b* region analysed in this study for the Iberian lynx, we found three novel haplotypes in addition to one already available in the Genbank (accession number KJ210017). One haplotype corresponds to samples Axlor, Arene 10485, AC12, AC4, AC17 and AC18 (accession number KJ210016), the second one to sample Valdegoba89 (accession number KJ210018) and a third haplotype to Valdegoba87 (accession number KJ210019). All polymorphic sites in these four haplotypes resulted in synonymous amino acid substitutions.

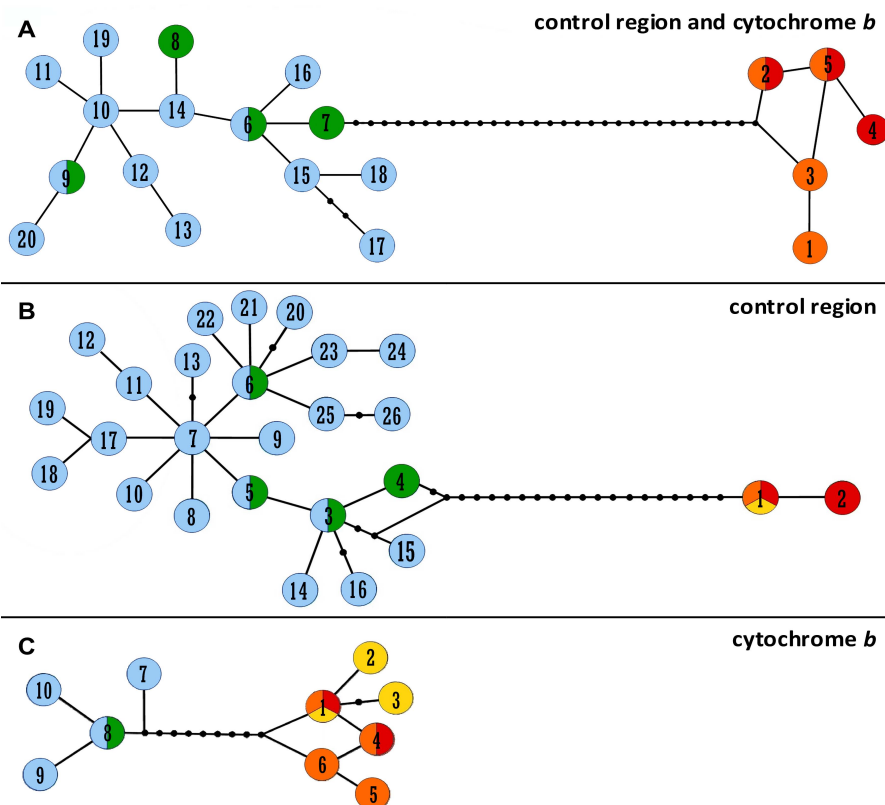


Fig. 2. Minimum Spanning Network. Haplotype distribution of European and Iberian lynx samples is depicted in this network where colour shows genetic identification of the species. Blue: modern *Lynx lynx*, green: ancient *Lynx lynx* (this study), yellow: modern *Lynx pardinus pardinus* from Spain, orange: ancient *Lynx pardinus pardinus* from Spain (this study and previously published) and red: ancient *Lynx pardinus pardinus* samples from France and Italy (this study). Missing haplotypes are shown with a black dot. Refer to Table 1 for haplotype and sample identification. A. Control region and cytochrome *b* concatenated sequences (324 bp). B. Control region sequences (179 bp). C. Cytochrome *b* sequences (140 bp).

4. Discussion

The molecular identification of five Late Pleistocene lynx remains from Arene Candide (northern Italy) (Arene 10485, AC12, AC4, AC17, and AC18) as Iberian lynx (*L. pardinus pardinus*) and dated between $24,820 \pm 350$ cal BP to $18,620 \pm 150$ cal BP, is to our knowledge, the first clear evidence of this species in Italy using a genetic approach. These lynx remains were previously assigned to the species Eurasian lynx (*L. lynx*) or *Lynx* cf. *spelaea* because their size exceeds the range of modern and Late Pleistocene Iberian lynx (*L. pardinus pardinus*) (Table 1, Fig. 3) (Cassoli and Tagliacozzo, 1994). It is interesting to note, that some of these lynx remains (AC17, AC18 and Arene 10485) have an even larger body size than the average of *L. pardinus spelaeus* (Fig. 3) (Cassoli and Tagliacozzo, 1994). Similarly we identified as Iberian lynx one Holocene specimen (Cabias) previously assigned to *Lynx* sp. from Cabias cave in southern France and radiocarbon dated to 3780 ± 90 cal BP (Fig. 3, Table 1).

Regardless, their body size we confirm the presence of the Iberian endemic species *L. pardinus pardinus* in southern France and northern Italy during the Holocene and Late Pleistocene. This conclusion is based on the position of the Italian and French samples within the Iberian lynx lineage, the consistency of two highly divergent groups (Iberian and Eurasian) throughout our three Minimum Spanning Networks (Fig. 2) and the high F_{st} value between the two groups. This high fixation index value corroborates the clear differentiation observed between the two European lynx

species in our haplotype networks (Fig. 2) (Beltrán et al., 1996; Johnson et al., 2004, 2006). The evident genetic distance confirms that samples Arene 10485, AC12, AC4, AC17, AC18 from Italy and Cabias in France correspond to the Iberian lynx lineage. We find no support for a subspecies classification of these fossils as they share the same haplotype or differ only by one transition from modern and ancient Iberian lynx (*L. pardinus pardinus*) from Iberia (Fig. 2, Table 1). Our results suggest that during the Late Pleistocene the Iberian lynx occupied a wider distribution area and that the difference in body size could be the result of a higher morphological variation within species, rather than subspecies differentiation. Different studies have shown that some lynx species can modify their size in order to adapt to different biotic and abiotic factors. For example, the widely distributed bobcat (*Lynx rufus*) shows a significant geographic variation in body size due to different environmental conditions: in colder environments, at high latitudes and high elevations bobcats are larger (Wiggington and Dobson, 1999). On the other hand the Canada lynx (*Lynx canadensis*) body size is inversely related to population density (Yom-Tov et al., 2007). Other felids like the American puma (*Puma concolor*) also show significant geographic variability in body size with pumas with larger size occurring more distant from the Equator. This body size variability is attributed to differences in latitude and food habits (Iriarte et al., 1990; Gay et al., 1996). The large size observed in the Arene Candide Iberian lynx from Italy may be explained by the intra-specific size plasticity of some felids. There is no evidence that Late Pleistocene Iberian lynx outside Iberia might have had a



Fig. 3. Lynx fossil remains analysed from the sites of Arene Candide (Italy), Axlor (Spain) and Cabias (France). Samples AC18, AC17 and Arene 10485 (Arene Candide) genetically identified in this study as *Lynx pardinus pardinus* were morphometrically classified as *Lynx lynx* given the larger body size when compared to *Lynx pardinus spelaeus* (Cassoli and Tagliacozzo, 1994). Samples AC19, AC14, Arene 10484 and AC6 (Arene Candide) were morphometrically classified as *Lynx lynx* (Cassoli and Tagliacozzo, 1994) and this was confirmed through genetic identification in this study. Samples AC4 and AC12 (Arene Candide) classified as *Lynx cf. spelaea* (Cassoli and Tagliacozzo, 1994) and Axlulna (Axlor) and Cabias classified as *Lynx* sp. were genetically identified as *Lynx pardinus pardinus* in this study. The 4 cm scale refers only to samples to the left of (and including) AC4, all others are with respect to the 2 cm scale. See also Table 1 for other details.

different diet than modern Iberian lynx (see below). Therefore, we suggest that the variation in body size are the result of adaptation to different environments, in this case, possibly to colder environments associated to the LGM period according to the radiocarbon dates obtained from these lynx fossils (Table 1). During this period of time, this geographic region would have a colder climate than the temperate conditions in the Iberian Peninsula. However, further studies and a more extensive sampling in France and other regions are required to test this hypothesis.

Surprisingly for the Iberian lynx we found more variability in the cytochrome *b* than in the usually more diverse control region. This variability had already been observed in previous studies (Alda et al., 2008). However, it is in contrast with the lack of diversity found by Casas-Marce et al. (2013) in extant populations. In order to verify the authenticity of this variation, we confirmed that each polymorphism found in this study for the cytochrome *b* resulted in synonymous amino acid substitutions. Moreover, these results were replicated over three times from independent DNA extracts. We suggest further studies to explain the observed higher variability in the cytochrome *b*.

A stable and durable coexistence of two sister species with different ecological requirements in the same area it is not a common phenomenon in nature. However, an overlap in their distribution areas is frequent and it is not uncommon to observe sporadic episodes of hybridisation (Schwartz et al., 2004). In this study we confirm through ancient DNA analysis and direct radiocarbon dating that both Palaeartic lynx species were present in Arene Candide (north Italy) during the Late Pleistocene (Cardini, 1947; Cassoli and Tagliacozzo, 1994). The four Iberian lynx samples from Arene Candide analysed here were radiocarbon dated between $18,622 \pm 147$ and $24,845 \pm 346$ cal BP and the four Eurasian lynx samples between $18,168 \pm 182$ and $27,503 \pm 205$ cal BP (Fig. 4, Table 1). Surprisingly the Eurasian lynx AC6 has been dated to $18,168 \pm 182$ cal BP and was found in the same stratigraphic level (P2) than the Iberian lynx sample AC12. These data suggest a potential coexistence between both lynx species in Arene Candide during the LGM (Fig. 4) (Cardini, 1947; Cassoli and Tagliacozzo, 1994). The remaining lynx specimens from Arene Candide were not included in this study in order to preserve the specimens or because they failed to give positive results (Table S2).

The potential coexistence of both lynx species in North Italy provides an alternative interpretation of the Arene Candide Iberian

lynx fossils presenting a larger body size than current and ancient Iberian lynx from Iberia. Since mtDNA is maternally inherited, these few individuals with an Iberian lineage could potentially represent hybrids. The Iberian lynx genetically identified in Arene Candide are to our knowledge the most eastern evidence of the species distribution and it is known that hybridisation is more likely to occur at the range edge where two different species can form contact zones. This scenario would not be unprecedented since a similar case has been reported for the bobcat and the Canada lynx in America (Schwartz et al., 2004). Hybridisation, however, can only be tested with ancient nuclear DNA studies. Due to the age and preservation of the samples it is difficult to know to what extent it is achievable to recover informative DNA to test for hybridisation. Nonetheless, improved DNA extractions for ancient DNA (Dabey et al., 2013) combined with Next Generation Sequencing techniques opens up the possibility to test this in the future. Alternatively, the use of microsatellites has successfully been applied to detect hybridisation in extant lynx species (Schwartz et al., 2004) and a similar approach has also been applied to extinct species through ancient DNA techniques (Allentoft et al., 2011).

The earliest specimen of Iberian lynx at Arene Candide, genetically identified in this study, was found in the same level (P9) (Fig. 4) in which its main prey species, the European rabbit (*O. cuniculus*), appeared for first time (Cassoli and Tagliacozzo, 1994). It is interesting to note that these two commonly described as Mediterranean temperate species are present in Arene Candide during a period of maximum cold in a non-analogue Mediterranean environment. It is therefore likely that this area (northern Italy and south-east France) as other central European areas served as glacial refugia for both the European rabbit and the Iberian lynx as it has been suggested for other temperate species (Deffontaine et al., 2005; Sommer and Nadachowski, 2006; Valdiosera et al., 2007; for a review see; Schmitt and Varga, 2012). The palaeontological records suggest that the Late Pleistocene distribution of the Iberian lynx extended as far as the European rabbit did (Bonifay, 1978; Kurtén and Granqvist, 1987; Tagliacozzo and Cassoli, 1993; Cassoli and Tagliacozzo, 1994; Valensi, 1994; Callou, 1995, 2002; Fiore et al., 2004; Valensi and Psathi, 2004; López-Martínez, 2008; Tagliacozzo et al., 2011). During warmer periods, the expansion of Mediterranean vegetation favoured the European rabbit to occupy areas as far as southern-central France and Italy (Callou, 1995, 2002; López-Martínez,

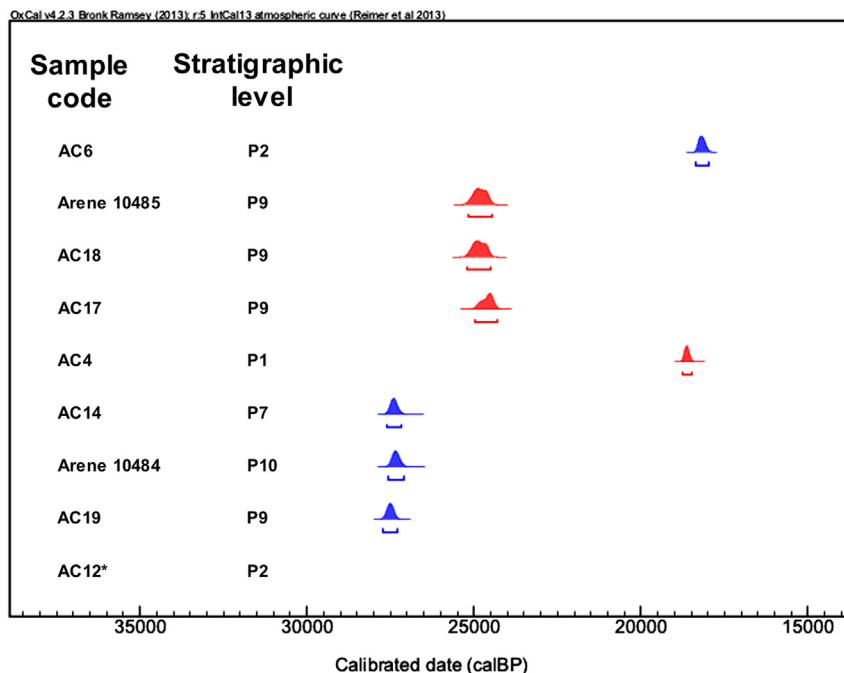


Fig. 4. Calibrated radiocarbon dates and stratigraphic levels of lynx bones from Arene Candide. In red, *Lynx pardinus pardinus* samples and in blue *Lynx lynx* samples. * This sample dates to the Gravettian period according to archaeological context. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2008) potentially allowing the Iberian lynx to track its prey following the same paths. The presence of the European rabbit in most of the sites in which the Iberian lynx was found e.g. Gabasa, Arene Candide, Valdegoba, Terrasses de la Riera dels Canyars (Cassoli and Tagliacozzo, 1994; Blasco, 1997; Quam et al., 2001; Rosado-Méndez et al., 2014) support the hypothesis that the current Iberian lynx dependence on the European rabbit (Delibes, 1980; Palomares, 2001; Palomares et al., 2001; Gil-Sánchez et al., 2006) started at least in the Late Pleistocene. The Iberian lynx could have reached as far as south Italy (personal comm. Tagliacozzo), but genetic analysis of lynx remains from this area have failed to yield positive DNA results in this study. To further confirm this, more individuals from this area should be genetically profiled by using more novel and improved DNA extraction methods (Dabey et al., 2013).

The survival of Iberian lynx, now restricted to the Iberian Peninsula, would be the result of a long contraction process that began by the end of the Late Pleistocene and continued throughout the Holocene. A possible explanation for the range contraction of the Iberian lynx from the Italian Peninsula and southern France to Iberia is that this species has been contracting following the extinction of the European rabbit (Callou, 2002, 1995; López-Martínez, 2008), in addition to, interspecific resource and habitat competition with the Eurasian lynx. The sporadic presence of Iberian lynx during the Holocene in France could be the result of punctual expansion events from the Iberian Peninsula or, alternatively, the last remnant Iberian lynx population that survived beyond the Pyrenees.

Ancient DNA has proven to be a powerful tool in the fields of conservation and evolutionary biology as it allows the direct reconstruction of a species history without the need for extrapolation from present day data to understand past events (Hofreiter, 2008; Leonard, 2008). For example, the study of extinct populations can reveal that two apparent isolated populations were connected in the past (Goldstein and DeSalle, 2003) and therefore,

translocation of individuals or mixing of populations through captive breeding can occur to alleviate a population's low levels of genetic diversity (e.g. the common European hamster, *Cricetus cricetus*) (Smulders et al., 2003). The impact of climate change on a species and its response to it will provide useful information on its behavioural patterns and this can be used to predict the species response to present and future climate changes (Dalén et al., 2007).

Conservation strategies, such as re-introduction programs, are more likely to succeed if the historic distribution of an endangered species is taken into account (Frankham et al., 2002). Ancient DNA studies provide a unique source of information about a species' past distribution and boundaries that cannot be identified in the fossil record through a morphological approach (Cooper et al., 1996; Shepherd and Lambert, 2008). Delineating the past geographic distribution of a species has important consequences for conservation strategies as it can reveal additional suitable habitats for potential re-introduction. Having multiple populations will decrease the overall impact of catastrophic events (e.g. droughts, floods, diseases), which is crucial for the long-term survival of the species. Some authors have suggested that in a matter of decades, the current habitat of the Iberian lynx will no longer be suitable for the species due to climate change. It is argued that this will occur at a rate beyond its capacity to adapt and disperse to more favourable habitats with viable prey carrying capacity to sustain a lynx population (Fordham et al., 2013). It is for this reason, that it is argued that increasing the dispersal capacity of endangered species will possibly be the most efficient climate adaptation strategy for conservationist to control extinction rates (Thomas, 2011). In Spain, lynx from captive breeding programmes are already being reintroduced to its past historical range (Vargas et al., 2008). This study demonstrates that the Iberian lynx geographic distribution extended to regions of southern France and as far as northern Italy during the Pleistocene and Holocene. Thus, reintroduction of Iberian lynx into these or other areas could be a possible conservation strategy in the long term, provided that there is suitable habitat in

these areas and the presence of sufficient and sustainable populations of European rabbits, the Iberian lynx's main prey species. However, the plausibility of such a strategy would need thorough consideration by specialists in the area of wild life conservation management.

5. Conclusion

Our results show a temporal overlapping between both Palaeo- arctic lynx species in Arene Candide (Italy) during the Late Pleistocene and, genetically, confirm that the species Iberian lynx, originally suggested to be endemic to the Iberian Peninsula, had a larger geographical range during the Pleistocene and the Holocene (Van den Brink, 1970, 1971, 1973).

Molecular methods applied to palaeontology have significant implications for understanding and reconstructing a species' history. In the last three years, for the Iberian lynx alone, ancient DNA analyses have demonstrated firstly that the extremely low levels of mitochondrial genetic diversity of this felid are not the main cause of endangerment for this species (as previously thought), as it has been demonstrated that they have carried these low levels of genetic diversity for at least 50,000 years (Rodríguez et al., 2011). Secondly, ancient DNA analysis in the present study demonstrates the misidentification of the species (based on morphology or due to taxonomic uncertainties), revealing that in the past it had a larger range distribution and that the endemism of the Iberian lynx to Iberia is only a recent phenomenon.

Data accessibility

DNA sequences are available at GenBank under accessions KJ210009–KJ210013 for control region and KJ210014–KJ210019 for cytochrome *b*.

Acknowledgements

This research was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), Project N° CGL2009-12703-C03-03, R.R-V was funded by a pre-doctoral grant from the MICINN (BES-2010-030127) and C.V. was funded by a Marie Curie Intra-European Fellowship-FP7-People-PIEF-GA-2009-255503 and by the Transforming Human Societies RFA fellowship from La Trobe University. We would like to thank the Archaeological Museum of Bilbao, Museum of Banyoles, Sociedad de Ciencias de Aranzadi, Buho-Zarzamora excavation, Museum of Barcelona, Museum of Huesca, Diego Garate, Juliá Maroto, Joan Daura, Montserrat Sanz and Lourdes Montes for kindly providing lynx specimens, the CNIO for Post PCR laboratory facilities, Ivana Fiore for providing fossil lynx photographs and María Cruz Ortega, for helpfully assisting in fossil restoration of the sampled material.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.quascirev.2015.01.009>.

References

Alda, F., Inogés, J., Alcaraz, L., Oria, J., Aranda, A., Doadrio, I., 2008. Looking for the Iberian lynx in central Spain: a needle in a haystack? *Anim. Conserv.* 1, 297–305.

Allentoft, M.E., Oskam, C., Houston, J., Hale, M.L., Gilbert, M.T.P., Rasmussen, M., Spencer, P., Jacomb, C., Willerslev, E., Holdaway, R.N., Bunce, M., 2011. Profiling the dead: generating microsatellite data from fossil bones of extinct megafauna – protocols, problems, and prospects. *PLoS One* 6, e16670.

Aquadro, C.F., Greenberg, B.D., 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103, 287–312.

Awise, J.C., Walker, D., 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 992–995.

Baldeón, A., 1999. El Abrigo de Axlor (Bizkaia, País Vasco). *Munibe* 51, 9–121.

Beltrán, J.F., Rice, J.E., Honeycutt, R.L., 1996. Taxonomy of the Iberian lynx. *Nature* 379, 407–408.

Blasco, M.-F., 1997. In the pursuit of game: the Mousterian cave site of Gabasa I in the Spanish Pyrenees. *J. Anthr. Res.* 53, 177–217.

Bonifay, M.-F., 1971. Carnivores quaternaires du Sud-Est de la France. *Mem. Mus. Nat. Hist. Nat., Nouv. Ser., A XXI fasc. 2.*

Bonifay, M.-F., 1978. Le gisement de la Baume de Valorgues à Saint-Quentin-la-Poterie (Gard). (Paléolithique supérieur final et Epipaléolithique) II. La grande faune. *Gall. Préhist.* 21 (1), 123–142.

Boule, M., 1906. Les grottes de Grimaldi, vol. 1(4). Imprimerie de Monaco, pp. 237–362.

Boule, M., 1910. Géologie et paléontologie (suite). Monaco. In: Villeneuve, L. de, Boule, M., Verneau, R., Cartailhac, E. (Eds.), *Les grottes de Grimaldi (Baousé-Roussé)*, vol. 1, pp. 157–236.

Boule, M., Villeneuve, L. de, 1927. La Grotte de l'Observatoire à Monaco, vol. 1. Archives de l'Institut de Paléontologie Humaine, Paris, p. 113.

Bronk Ramsey, C., 2009. Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon* 51 (1), 337–360.

Brown, J.R., Beckenbach, A.T., Smith, M.J., 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.* 10, 326–341.

Callou, C., 1995. Modification de l'aire de répartition du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) en France et en Espagne, du Pléistocène à l'époque actuelle: État de la question. *Anthropozoologica* 21, 95–114.

Callou, C., 2002. De la garenne au clapier: étude archéozoologique du Lapin en Europe occidentale. *Mem. Mus. Nat. Hist. Nat. (Fr.)* 189, 1–358.

Cardini, L., 1947. Gli strati mesolitici e paleolitici della Caverna della Arene Candide. *Riv. Studi. Liguria anno XII (1–3)*, 3–11 (1946).

Casas-Marce, M., Soriano, L., López-Bao, J.V., Godoy, J.A., 2013. Genetics at the verge of extinction: insights from the Iberian lynx. *Mol. Ecol.* 22, 5503–5515.

Cassoli, P.F., Tagliacozzo, A., 1994. I macromammiferi dei livelli tardopleistoceni delle Arene Candide (Savona, Italia): considerazioni paleontologiche e archeozoologiche. *Quat. Nova* 4, 101–262.

Cooper, A., Rhymer, J.D., James, H.F., Olson, S.L., McIntosh, C.E., Sorenson, M.D., Fleischer, R.C., 1996. Ancient DNA and island endemics. *Nature* 381, 484.

Dabey, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M.T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., Garcia, N., Pääbo, S., Arsuaga, J.L., Meyer, M., 2013. A complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultra-short DNA fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (39), 15758–15763.

Dalén, L., Nyström, V., Valdiosera, C., Germonpre, M., Sablin, M., Turner, E., Angerbjörn, A., Arsuaga, J.L., Götherström, A., 2007. Ancient DNA reveals lack of postglacial habitat tracking in the arctic fox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6726–6729.

Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J.B., Michaux, J.R., 2005. Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Mol. Ecol.* 14, 1727–1739.

Delibes, M., 1980. Feeding ecology of the Spanish lynx in the Coto Doñana (Huelva, Spain). *Acta Theriol.* 25, 309–324.

Den Tex, R.-J., Maldonado, J.E., Thorington, R., Leonard, J.A., 2010. Nuclear copies of mitochondrial genes: another problem for ancient DNA. *Genetica* 138, 979–984.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47–50.

Fernandes, C., Ginja, C., Pereira, I., Tenreiro, R., Bruford, M., Santos-Reis, M., 2008. Species-specific mitochondrial DNA markers for identification of non-invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. *Conserv. Genet.* 9, 681–690.

Ferrer, M., Negro, J.J., 2004. The near extinction of two large European predators: super specialists pay a price. *Conserv. Biol.* 18, 344–349.

Fiore, I., Pino-Uria, B., Tagliacozzo, A., 2004. L'exploitation des petits animaux au Paléolithique supérieur-Mésolithique en Italie: l'exemple de la Grotta del Santuario della Madonna de Praia a Mare (Cosenza, Italie). In: Brugal, J.P., Desse, J. (Eds.), *Petits animaux et sociétés humaines. Du complément alimentaire aux ressources utilitaires*, XXIV Rencontres Internationales d'archéologie et d'histoire d'Antibes, Antibes 23–25 octobre 2003. APDCA, Antibes, pp. 417–430.

Fordham, D.A., Akçakaya, H.R., Brook, B.W., Rodríguez, A., Alves, P.C., Civantos, E., Triviño, M., Watts, M.J., Araújo, M.B., 2013. Adapted conservation measures are required to save the Iberian lynx in a changing climate. *Nat. Clim. Change* 3, 899–903.

Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Gay, S.W., Best, T.L., 1996. Relationships between abiotic variables and geographic variation in skulls of pumas (*Puma concolor*: Mammalia, Felidae) in North and South America. *Zool. J. Linn. Soc.* 117 (3), 259–282.

- Gil-Sánchez, J.M., Ballesteros-Duperon, E., Bueno-Segura, J.F., 2006. Feeding ecology of the Iberian lynx *Lynx pardinus* in eastern Sierra Morena (southern Spain). *Acta Theriol.* 51, 85–90.
- Gil-Sánchez, J.M., McCain, E.B., 2011. Former range and decline of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) reconstructed using verified records. *J. Mammal.* 92, 1081–1090.
- Goldstein, P.Z., DeSalle, R., 2003. Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. *Mol. Ecol.* 12, 1993–1995.
- Grayson, D.K., Delpech, F., 1994. The evidence for Middle Palaeolithic scavenging from Couche VIII, Grotte Vaufray (Dordogne, France). *J. Archaeol. Sci.* 21, 359–375.
- Grayson, D.K., Delpech, F., 1998. Changing diet breadth in the early Upper Paleolithic of southwestern France. *J. Archaeol. Sci.* 25, 1119–1129.
- Griffith, B., Scott, J.M., Carpenter, J.W., Reed, C., 1989. Translocation as a species conservation tool: status and strategy. *Science* 245, 477–480.
- Guilaine, J., Rencoule, G., Vaquer, J., Passelac, M., Vigne, J.D., 1986. Carsac une agglomération protohistorique en Languedoc. Centre d'Anthropologie des Sociétés Rurales, Toulouse.
- Hellborg, L., Walker, C.W., Rueness, E.K., Stacy, J.E., Kojala, I., Valdmann, H., Vila, C., Zimmerman, B., Jakobsen, K.S., Ellegren, H., 2002. Differentiation and levels of genetic variation in northern European lynx (*Lynx lynx*) populations revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. *Conserv. Genet.* 3, 97–111.
- Hoelzel, A.R., Dover, G.A., 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Mol. Biol. Evol.* 8, 475–493.
- Hoelzel, A.R., Lopez, J.V., Dover, G.A., O'Brien, S.J., 1994. Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *J. Mol. Evol.* 39, 191–199.
- Hofreiter, M., 2008. Long DNA sequences and large data sets: investigating the Quaternary via ancient DNA. *Quat. Sci. Rev.* 27, 2586–2592.
- Iriarte, J.A., Redford, K.H., Franklin, W.L., Johnson, W.E., 1990. Biogeographic variation of food habits and body size of the American puma (*Felis concolor*). *Oecologia* 82, 185–190.
- IUCN, 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. Downloaded on 05 October 2012. www.iucnredlist.org.
- Johns, G.C., Avise, J.C., 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1481–1490.
- Johnson, W.E., Eizirik, E., Pecon-Slatery, J., Murphy, W.J., Antunes, A., Teeling, E., O'Brien, S.J., 2006. The Late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science* 311, 73–77.
- Johnson, W.E., Godoy, J.A., Palomares, F., Delibes, M., Fernandes, M., Revilla, E., O'Brien, S.J., 2004. Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *J. Hered.* 95, 19–28.
- Kurtén, B., Granqvist, E., 1987. Fossil pardel lynx (*Lynx pardina spelaea* Boule) from a cave in southern France. *Ann. Zool. Fenn.* 24, 39–43.
- Leonard, J.A., 2008. Ancient DNA applications for wildlife conservation. *Mol. Ecol.* 17, 4186–4196.
- Lopez, J.V., Culver, M., Stephens, J.C., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., 1997. Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 14, 277–286.
- López-Martínez, N., 2008. The lagomorph fossil record and the origin of the European rabbit. In: Alves, P.C., Ferrand, N., Hackländer, K. (Eds.), *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation*. Springer, Amsterdam, The Netherlands, pp. 26–47.
- Masuda, R., Yoshida, M.C., Shinyashiki, F., Bando, G., 1994. Molecular phylogenetic status of the iriomote cat *Felis iriomotensis*, inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. *Zool. Sci.* 11, 597–604.
- Nowell, K., Jackson, P., 1996. *Wild Cats: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN Publications. Burlington Press, Cambridge.
- Palomares, F., 2001. Vegetation structure and prey abundance requirements of the Iberian lynx: implications for the design of reserves and corridors. *J. Appl. Ecol.* 38, 9–18.
- Palomares, F., Delibes, M., Ferreras, P., Fedriani, J.M., Calzada, J., Revilla, E., 2000. Iberian lynx in a fragmented landscape: pre-dispersal, dispersal and post-dispersal habitats. *Conserv. Biol.* 14, 809–818.
- Palomares, F., Delibes, M., Revilla, E., Calzada, J., Fedriani, J.M., 2001. Spatial ecology of Iberian lynx and abundance of European rabbits in southwestern Spain. *Wildl. Monogr.* 148, 1–36.
- Quam, R.M., Arsuaga, J.L., Bermúdez de Castro, J.M., Díez, J.C., Lorenzo, C., Carretero, J.M., García, N., Ortega, A., 2001. Human remains from Valdegoba Cave (Huermeles, Burgos, Spain). *J. Hum. Evol.* 41, 385–435.
- Reimer, P.J., Bard, E., Bayliss, A., Beck, J.W., Blackwell, P.G., Ramsey, B.C., Buck, C.E., Cheng, H., Edwards, R.L., Friedrich, M., Grootes, P.M., Guilderson, T.P., Haffidason, H., Hajdas, I., Hatté, C., Heaton, T.J., Hoffman, D.L., Hogg, A.G., Hughen, K.A., Kaiser, K.F., Kromer, B., Manning, S.W., Niu, M., Reimer, R.W., Richards, D.A., Scott, E.M., Southon, J.R., Staff, R.A., Turney, C.S.M., van der Plicht, J., 2013. IntCal13 and Marine13 radiocarbon age calibration curves 0–50,000 years cal BP. *Radiocarbon* 55 (4), 1869–1887.
- Rodríguez, A., Delibes, M., 1992. Current range and status of the Iberian lynx *Felis pardina* Temminck, 1824 in Spain. *Biol. Conserv.* 61, 189–196.
- Rodríguez, A., Delibes, M., 2002. Internal structure and patterns of contraction in the geographic range of the Iberian lynx. *Ecography* 25, 314–328.
- Rodríguez, R., Ramírez, O., Valdiosera, C.E., García, N., Alda, F., Madurell-Malapeira, J., Marmi, J., Doadrio, I., Willerslev, E., Götherström, A., Arsuaga, J.L., Thomas, M.G., Lalueza-Fox, C., Dalén, L., 2011. 50,000 years of genetic uniformity in the critically endangered Iberian lynx. *Mol. Ecol.* 20, 3785–3795.
- Rosado-Méndez, N.Y., Lloveras, L., Daura, J., Nadal, J., Sanz, M., 2014. Predator agents and Leporid accumulations: the case of Terrasses de la Riera dels Canyars (Gavà, Barcelona, Spain). *J. Archaeol. Method. Theory* 1–26.
- Rueness, E.K., Naidenko, S., Trosvik, P., Stenseth, N.C., 2014. Large-scale genetic structuring of a widely distributed carnivore – the Eurasian Lynx (*Lynx lynx*). *PLoS One* 9 (4), e93675. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093675>.
- Schmitt, T., Varga, Z., 2012. Extra-Mediterranean refugia: the rule and not the exception? *Front. Zool.* 9, 22.
- Schwartz, M.K., Pilgrim, K.L., McKelvey, K.S., Lindquist, E.L., Claar, J.J., Loch, S., Ruggiero, L.R., 2004. Hybridization between Canada lynx and bobcats: genetic results and management implications Canada lynx. *Conserv. Genet.* 6, 349–355.
- Shepherd, L.D., Lambert, D.M., 2008. Ancient DNA and conservation: lessons from the endangered kiwi of New Zealand. *Mol. Ecol.* 17, 2174–2184.
- Sindčić, M., Gomerčić, T., Galov, A., Polanc, P., Huber, Đ., Slavica, A., 2012. Repetitive sequences in Eurasian lynx (*Lynx lynx* L.) mitochondrial DNA control region. *Mitochondrial DNA* 23 (3), 201–207.
- Smulders, M.J.M., Snoek, L.B., Booy, G., Vosman, B., 2003. Complete loss of MHC genetic diversity in the common hamster (*Cricetus cricetus*) population in The Netherlands. Consequences for conservation strategies. *Conserv. Genet.* 4, 441–451.
- Sommer, R.S., Benecke, N., 2006. Late Pleistocene and Holocene development of the felid fauna (Felidae) of Europe: a review. *J. Zool.* 269, 7–19.
- Sommer, R.S., Nadachowski, A., 2006. Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mamm. Rev.* 36, 251–265.
- Tagliacozzo, A., Cassoli, P.F., 1993. La macrofaune del l'Abri Soman (Val d'Adige – Italie). *Preist. Alp.* 28, 181–192.
- Tagliacozzo, A., Zeppleri, F., Fiore, I., Spinapoliche, E., Lucchese, A.D., 2011. Archaeozoological evidence of subsistence strategies during the Gravettian at Riparo Mochi (Balzi Rossi, Ventimiglia, Imperia – Italy). *Quat. Int.* 252, 142–154.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipi, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Thomas, C.D., 2011. Translocation of species, climate change, and the end of trying to recreate past ecological communities. *Trends. Ecol. Evol.* 26, 216–221.
- Valdiosera, C.E., García, N., Anderung, C., Dalén, L., Crégut-Bonnouere, E., Kahlke, R.D., Stiller, M., Brandström, M., Thomas, M.G., Arsuaga, J.L., Götherström, A., Barnes, I., 2007. Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Mol. Ecol.* 16, 5140–5148.
- Valensi, P., 1994. Les grands mammifères de la grotte du Lazaret, Nice. Etude paléontologique et biostratigraphique des Carnivores. Archéozoologie des grandes faunes (PhD thesis). National Museum of Natural History, Paris.
- Valensi, P., Psathi, E., 2004. Faunal exploitation during the Middle Palaeolithic in South-eastern France and North-western Italy. *Int. J. Osteoarchaeol.* 14, 256–272.
- Van den Brink, F.-H., 1973. Distribution and speciation of some carnivores – 2. *Mamm. Rev.* 3, 85–95.
- Van den Brink, F.-H., 1970. Distribution and speciation of some carnivores. *Mamm. Rev.* 1, 67–78.
- Van den Brink, F.-H., 1971. Le lynx pardelle en France. *Bull. Soc. Sci. Nat. Nîmes* 51, 109–117.
- Vargas, A., Sanchez, I., Martinez, F., Rivas, A., Godoy, J.A., Roldan, E., Simon, M.A., Serra, R., Perez, M.J., Ensenat, C., Delibes, M., Aymerich, M., Sliwa, A., Breitenmoser, U., 2008. The Iberian lynx *Lynx pardinus* conservation breeding program. *Int. Zoo. Yearb.* 42, 190–198.
- Vigne, J.D., 1996. La faune des vertébrés. In: Gasco, J. (Ed.), *Le Laouret et la Montagne d'Alaric à la fin de l'âge du Bronze. Un hameau abandonné entre Floure et Monze (Aude)*. Centre d'Anthropologie, Toulouse, pp. 197–239.
- Vigne, J.D., Pascal, M., 2003. Le Lynx pardelle *Lynx pardinus* (Temnick, 1827). In: Pascal, M., Lorvelec, O., Vigne, J.D., Keith, P., Clergeau, P. (Eds.), *Evolution de la faune de Vertébrés en France métropolitaine depuis le début de l'Holocène. Invasions et extinctions*. Institut National de la Recherche Agronomique, Centre National de la Recherche scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, pp. 87–89.
- Werdelin, L., 1981. The evolution of lynxes. *Ann. Zool. Fenn.* 18, 37–71.
- Wigington, J.D., Dobson, F.S., 1999. Environmental influences on geographic variation in body size of western bobcats. *Can. J. Zool.* 77, 802–813.
- Yang, D., Eng, B., Wayne, J., Dudar, J., Saunders, S., 1998. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica based spin columns. *Am. J. Phys. Anthropol.* 105, 539–554.
- Yom-Tov, Y., Yom-Tov, S., MacDonald, D., Yom-Tov, E., 2007. Population cycles and changes in body size of the lynx in Alaska. *Oecologia* 152, 239–244.

Table S1. List of samples that yielded positive results including the original collection number or excavation code, the uncalibrated BETA

Code	Collection nº or excavation code	Morphometrical species classification	Site	Calibrated age 2s prob % the dates were calibrated using the OxCal 4.2 software and the INTCAL13	Age (uncal. BP) BETA Conventional Radiocarbon Age	BETA Measured radiocarbon date	Archaeological age or indirect datation *	C14 lab numbers	Year of specimen collection
Cabias	Grotte Cabias Collection museum, right humerus	<i>Lynx</i> sp.	Grotte Cabias (Lirac, Gard, France)	3867-3697 95.4%	3510 ± 30 BP	3420 ± 30 BP	NA	Beta - 347619	NA
CdR8501	CdR8501	<i>Lynx lynx</i>	Coulet des Roches (France)	8171-8000 95.4%	7260 ± 40 BP	7170 ± 40 BP	NA	Beta - 330095	NA
CdR5548	CdR5548	<i>Lynx lynx</i>	Coulet des Roches (France)	7564-7431 95.4%	6590 ± 30 BP	6480 ± 30 BP	NA	Beta - 330094	NA
AC19	P13	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	27708-27298 95.4%	23240 ± 110 BP	23140 ± 110 BP	NA	Beta - 347617	NA
GMP6	GMP6	<i>Lynx</i> sp.	Grotta della Madonna de Praia a Mare (Italy)	NA	NA	NA	Epigravettian	NA	NA
GMP7	GMP7	<i>Lynx</i> sp.	Grotta della Madonna de Praia a Mare (Italy)	12896-12697 95.4%	10910 ± 50 BP	10810 ± 50 BP	NA	Beta - 349954	NA
AC14	P43	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	27618-27165 95.4%	23090 ± 110 BP	23000 ± 110 BP	NA	Beta - 349962	NA
Arene 10484	P31	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	27556-27100 95.4%	23010 ± 110 BP	22910 ± 110 BP	NA	Beta - 330093	NA
AC4	P15	<i>Lynx cf. spelaea</i>	Arene Candide (Italy)	18770-18475 95.4%	15350 ± 60 BP	15270 ± 60 BP	NA	Beta - 347615	NA
AC6	P2	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	18351-17986 95.4%	14960 ± 50 BP	14870 ± 50 BP	NA	Beta - 376426	NA
AC12	P16	<i>Lynx cf. spelaea</i>	Arene Candide (Italy)	NA	NA	NA	Gravettian	NA	NA
AC17	P26	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	24958-24305 95.4%	20450 ± 80 BP	20350 ± 80 BP	NA	Beta - 349963	NA
AC18	P26	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	25192-24499 95.4%	20630 ± 90 BP	20530 ± 90 BP	NA	Beta - 347616	NA
Axlulna	Ax7D.60.130.125	<i>Lynx</i> sp.	Axlor (Vizcaya, Spain)	NA	NA	NA	Mousterian	NA	NA
Valdegoba87	Vb87-rev-sup	<i>Lynx pardinus</i>	Valdegoba (Burgos, Spain)	NA	NA	NA	48400 ± 3300* Age (uncal. BP)	OxA-21970	NA
Valdegoba89	Vb89K13	<i>Lynx pardinus</i>	Valdegoba (Burgos, Spain)	NA	NA	NA	48400 ± 3300* Age (uncal. BP)	OxA-21970	NA
Yebenes3AR	Aranzadi 326.3	<i>Lynx pardinus</i>	Los Yébenes (Toledo, Spain)	NA	NA	NA	Historical sample	NA	1860-2000
Doñana4AR	Aranzadi 326.2	<i>Lynx pardinus</i>	Doñana (Sevilla, Spain)	NA	NA	NA	Historical sample	NA	1860-2000
Chaves	CH92 14C-1A65	<i>Lynx pardinus</i>	Chaves (Huesca, Spain)	6960-6748 95.4%	6020 ± 40 BP	5930 ± 40 BP	NA	Beta - 261610	NA
Arene 10485	P28	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)	25170-24480 95.4%	20610 ± 90 BP	20510 ± 90 BP	NA	Beta - 325047	NA

Table S2. List of samples that failed to yield positive results for all four DNA fragments analysed in this study including the original collection

Collection Nº/ Excavation code	Morphometrical species classification	Site
MR. 4. 01. 716 EXPosicion (lince 3)	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Aven de la Terranc. Aiguize (Gard) (France)
M19-10 1 EXPosicion (lince 4)	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	La 'Adaouste (France)
MR4.04.585 Vallesquaine	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Vallesquaine (France)
MR4.04.584 Vallesquaine	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Vallesquaine (France)
MR4.04.583 Vallesquaine	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Vallesquaine (France)
Auz2.C. 903129 Auzières 2. Concha 8	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Les Auzières (Méthamis, Vaucluse, France)
Montferrand (Saint-Mathieu de Trévières, Hérault)	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Montferrand (France)
Aubais left humerus	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Aubais (France)
Aven de Vaugrand (Saint-Médières, Gard)	<i>Lynx</i> sp.	Vaugrand (France)
Baume Longue (Dions, Gard) MR 4. 002.420	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Baume (France)
10260 M4	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)
14231 TM	<i>Lynx lynx</i>	Grotta della Madonna (Italy)
P17	<i>Lynx</i> sp.	Arene Candide (Italy)
P17	<i>Lynx</i> sp.	Arene Candide (Italy)
P26	<i>Lynx</i> sp.	Arene Candide (Italy)
P15	<i>Lynx</i> sp.	Arene Candide (Italy)
P12	<i>Lynx</i> sp.	Arene Candide (Italy)
P18	<i>Lynx</i> sp.	Arene Candide (Italy)
LIVS P4	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)
P21	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)
S12	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)
P47	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)
P25	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)
MES LIV4	<i>Lynx lynx</i>	Arene Candide (Italy)
AC21	<i>Lynx</i> sp.	Arene Candide (Italy)
AC22	<i>Lynx</i> sp.	Arene Candide (Italy)
P5953-RS-458-158	<i>Lynx</i> sp.	L'Abri Soman (Italy)
458f-158-RS	<i>Lynx lynx</i>	L'Abri Soman (Italy)
RS 461i 151	<i>Lynx lynx</i>	L'Abri Soman (Italy)
RS458 158 P5952	<i>Lynx lynx</i>	L'Abri Soman (Italy)
SB13239 534 P5916	<i>Lynx lynx</i>	Grotta Maggiore di San Bemandino (Italy)
P6375	<i>Lynx lynx</i>	Grotta di Fumane (Italy)
P6374	<i>Lynx lynx</i>	Grotta di Fumane (Italy)
RF72 116c	<i>Lynx lynx</i>	Grotta di Fumane (Italy)
RF92	<i>Lynx lynx</i>	Grotta di Fumane (Italy)
FB7 P1133	<i>Lynx</i> sp.	Grotta del Fossellone (Italy)
P2722	<i>Lynx</i> sp.	Grotta Romanelli (Italy)
GMP1	<i>Lynx lynx</i>	Grotta della Madonna de Praia a Mare (Italy)
GMP2	<i>Lynx lynx</i>	Grotta della Madonna de Praia a Mare (Italy)
GMP3	<i>Lynx lynx</i>	Grotta della Madonna de Praia a Mare (Italy)
GMP4	<i>Lynx</i> sp.	Grotta della Madonna de Praia a Mare (Italy)
GMP5	<i>Lynx</i> sp.	Grotta della Madonna de Praia a Mare (Italy)

Artículo II

Collection Nº/ Excavation code	Morphometrical species classification	Site
GMP8	<i>Lynx</i> sp.	Grotta della Madonna de Praia a Mare (Italy)
GMP9	<i>Lynx</i> sp.	Grotta della Madonna de Praia a Mare (Italy)
S.9L.III.12.1339 Linx Linx	<i>Lynx lynx</i>	Santimamiñe (Vizcaya, Spain)
S.9L III Linx Linx	<i>Lynx lynx</i>	Santimamiñe (Vizcaya, Spain)
Fal. 1ª S.IV Linx Linx	<i>Lynx lynx</i>	Santimamiñe (Vizcaya, Spain)
Mt.IV i. S.VIII Linx Linx	<i>Lynx lynx</i>	Santimamiñe (Vizcaya, Spain)
Fragmentos de canino	<i>Lynx lynx</i>	Santimamiñe (Vizcaya, Spain)
8.III.490	<i>Lynx pardinus</i>	Bolinkoba (Vizcaya, Spain)
B.V M1i lynx	<i>Lynx pardinus</i>	Bolinkoba (Vizcaya, Spain)
Rad.d. UIII. D4 Linx linx	<i>Lynx lynx</i>	Urratxa III (Vizcaya, Spain)
P.118.2540	<i>Lynx pardinus</i>	Polvorin (Vizcaya, Spain)
Lek.L4.10	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Lezica (Vizcaya, Spain)
Lek2C.12	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Lezica (Vizcaya, Spain)
Lek2C.11	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Lezica (Vizcaya, Spain)
L.8i25 G.	<i>Lynx</i> or <i>Felis</i>	Cueva Lumentxa (Vizcaya, Spain)
L.7G.30	<i>Lynx</i> sp.	Cueva Lumentxa (Vizcaya, Spain)
L.8F.60	<i>Lynx</i> sp.	Cueva Lumentxa (Vizcaya, Spain)
GA 1.68220.109.(34)	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
GA12A.351.311	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
GA1.48.170.13	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
GA1.4A.19?	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
Ga12C325.387	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
Ga1213'347-318	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
Ga12C302.76	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
Ga1.1C202.168	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
Ga1.3X277.34	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
Gal 3D'230.8	<i>Lynx pardinus spelaeus</i>	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)
ARBV4137	<i>Lynx pardinus</i>	Cova L'Arbreda (Gerona, Spain)
ERV3739	<i>Lynx pardinus</i>	Cova dels Ermitons (Gerona, Spain).
ARBB5-EB	<i>Lynx pardinus</i>	Cova L'Arbreda (Gerona, Spain)
ARB.D2BD	<i>Lynx pardinus</i>	Cova L'Arbreda (Gerona, Spain)
M11066	<i>Lynx pardinus</i>	Mollet (Gerona, Spain)
TC'07-N24-I-803	<i>Lynx pardinus</i>	Terrasses de la Riera dels Canyars (Barcelona, Spain)
TC'07-P24-I-3622	<i>Lynx pardinus</i>	Terrasses de la Riera dels Canyars (Barcelona, Spain)
TC'07-M24-I-2091	<i>Lynx pardinus</i>	Terrasses de la Riera dels Canyars (Barcelona, Spain)
TC'07-K18-I-5213	<i>Lynx pardinus</i>	Terrasses de la Riera dels Canyars (Barcelona, Spain)
PG-2008/01/119	<i>Lynx pardinus</i>	Buho (Segovia, Spain)
PG-2010/0V50	<i>Lynx pardinus</i>	Zarzamora (Segovia, Spain)
CF'92 G8/V/29 Z=80	<i>Lynx pardinus</i>	Foradada (Valencia, Spain)
CF'94 F6/VI Z=85	<i>Lynx pardinus</i>	Foradada (Valencia, Spain)
CF'92 G8/V/28 Z=80	<i>Lynx pardinus</i>	Foradada (Valencia, Spain)
AntForCat	<i>Lynx pardinus</i>	Cova Foradada (Tarragona, Spain)

Table S3 Primer sequences and product sizes for mitochondrial amplicons obtained from samples analysed in this study

Primer Name	Sequence (5'-3')	Species	Product size (bp)	Region	Reference
CR2F/DL5R	GTGCTTGCCAGTATGTC/ TACATGCTTAATATTCATGGGATT	<i>Lynx lynx</i> / <i>Lynx pardinus</i>	93 pb / 92 pb	control region	Rodríguez et al., 2011/ (Palomares et al., 2002)
LI2F/CR2b_R	TAGTGCTTAATCGTGCATTATA/ CCGGAGCGAGAAGAGGTACA	<i>Lynx lynx</i> / <i>Lynx pardinus</i>	91 pb	control region	(Hellborg et al., 2002)/ (Palomares et al., 2002*)
Cito1F / Cito1R	CCATCGTTGTATTTCAACTAC/ CATCATGCTGAAATATTGGATG	<i>Lynx lynx</i>	79 pb	cytochrome <i>b</i>	This paper
NewF1 / Cito2R	CTAATCCTACAGATCCTCACC/ GATTCAGCCGTAGTTAACG	<i>Lynx lynx</i>	74 pb	cytochrome <i>b</i>	This paper
Cito1F / CPAR1R	CCATCGTTGTATTTCAACTAC/ CATCATGCTGAAATATTAGATGG	<i>Lynx pardinus</i>	78 pb	cytochrome <i>b</i>	This paper
CPAR2F / Cito2R	CCTAATCCTACAAATCCTTACC/ GATTCAGCCGTAGTTAACG	<i>Lynx pardinus</i>	74 pb	cytochrome <i>b</i>	This paper

* Palomares, F., Godoy, J.A., Piriz, A., O'Brien, S.J., Johnson, W.E., 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Mol. Ecol.* 11, 2171–2182.

6.2.3 Conclusiones artículo II

Los resultados del análisis del ADNmt revelan, por primera vez, que los restos de lince de las cavernas italianas analizados en este trabajo pertenecen en realidad a lince ibéricos de mayor tamaño que los actuales. Estos resultados, junto con los análisis de restos de lince franceses, muestran que el lince ibérico habitó durante el Pleistoceno y el Holoceno el norte de Italia y el sur de Francia. Este estudio ha permitido incrementar el área de distribución del lince ibérico en el Pleistoceno y clarificar la posición filogenética del lince de las cavernas (*Lynx cf. spelaeus* o *Lynx pardinus spelaeus*). Los resultados obtenidos no apoyan la clasificación de los lince de las cavernas como una especie diferente de lince, ni siquiera como una subespecie del lince ibérico, ya que los restos clasificados como lince de las cavernas presentan el mismo haplotipo mitocondrial que los actuales lince ibéricos (*Lynx pardinus pardinus*). Este artículo además documenta por primera vez, basándose en datos genéticos y dataciones radiométricas, la coexistencia de las dos especies de lince europeas en un mismo yacimiento en el Norte de Italia durante el Pleistoceno Superior.

6.3. Artículo III

6.3.1 Introducción artículo III

La mayoría de los investigadores coinciden en que el lince boreal, *Lynx lynx*, no llegó a ocupar la península ibérica más allá de los Pirineos (Kratochvil, 1968; Breitenmoser *et al.*, 2000; Breitenmoser *et al.*, 2015; Arx *et al.*, 2004). Sin embargo la presencia de lince boreal, *Lynx lynx*, en la cornisa Cantábrica ha sido desde hace décadas objeto de debates y especulaciones. Su presencia histórica fue sugerida en todo el norte de España con base en documentos históricos, aunque desafortunadamente no se ha podido aportar ninguna prueba física (Nores y Vázquez, 1984; Clavero y Delibes, 2013). En cuanto al registro fósil sí hay al menos dos cráneos descubiertos hasta la fecha que se pueden atribuir sin miedo a equivocarse al *Lynx lynx*: uno encontrado en la Sima de Pagolusieta en el País Vasco y el otro procedente de una sima en la Sierra de Suevo (Asturias) (Altuna, 1980; Nores, 1999). Además se han descrito como pertenecientes a *Lynx lynx* restos postcraneales en varios yacimientos vascos (ej. Santimamiñe, Urratxa III) y en Rascaño (Cantabria), aunque como se vio en el artículo II esas identificaciones deben tomarse con cautela (Castaños, 1984, 1993; Altuna, 1981). En este artículo se ha secuenciado un fragmento de 337 pb del ADNmt (región control y citocromo *b*) para identificar

Resultados

ocho linceos procedentes de diferentes regiones de la cornisa Cantábrica datados por radiocarbono para este estudio. Cinco de ellos, son restos inéditos hasta la fecha, recuperados de trampas naturales. El objetivo es conocer la distribución del lince ibérico y del lince boreal en el norte de la península ibérica. Además se secuenciaron ocho linceos boreales procedentes de dos yacimientos daneses que, en combinación con los datos de este y otros estudios publicados en los que se secuenciaron los mismos fragmentos del ADNmt de individuos modernos y antiguos, permitirán conocer los patrones filogeográficos de esta especie en el pasado y compararlos con los actuales.

Los análisis de ADNmt, junto con las dataciones por C14, han permitido confirmar la presencia de linceos boreales en el norte de la península ibérica desde la transición del Pleistoceno al Holoceno hasta, como mínimo, el siglo XVI. Los patrones filogeográficos de las poblaciones actuales de linceos boreales muestran un patrón filogeográfico con una clara diferenciación este-oeste y en menor medida norte-sur (Ruenees *et al.*, 2014). Esto llevó a los citados autores a diferenciar las actuales poblaciones en 3 clados que se solapan ligeramente: noreste, sur y oeste. Cuando incluimos en los análisis filogeográficos nuestras poblaciones extintas de linceos boreales del norte de España, Francia, Italia y Dinamarca, observamos que en el pasado el lince boreal tuvo una estructura filogeográfica más compleja, con un mayor flujo genético entre poblaciones. Este hecho queda de manifiesto por la presencia de linceos boreales ibéricos en los tres clados propuestos por Ruenees *et al.* (2014).

Ancient DNA reveals past existence of Eurasian lynx in Spain

R. Rodríguez-Varela^{1,2}, N. García^{1,2}, C. Nores³, D. Álvarez-Lao⁴, R. Barnett⁵, J. L. Arsuaga^{1,2} & C. Valdiosera^{1,6}

1 Centro Mixto, Universidad Complutense de Madrid–Instituto de Salud Carlos III de Evolución y Comportamiento Humanos, Madrid, Spain

2 Departamento de Paleontología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

3 INDUROT, University of Oviedo, Oviedo, Spain

4 Departamento de Geología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

5 Centre for GeoGenetics, Natural History Museum of Denmark, Copenhagen, Denmark

6 Department of Archaeology, Environment and Community Planning Faculty of Humanities and Social Sciences, La Trobe University, Melbourne, Vic., Australia

Keywords

Ancient DNA; Eurasian lynx; past distribution; phylogeography; Iberian lynx.

Correspondence

Ricardo Rodríguez-Varela, Centro Mixto, Universidad Complutense de Madrid–Instituto de Salud Carlos III de Evolución y Comportamiento Humanos, Avenida Monforte de Lemos 5, 28029 Madrid, Spain.
Email: ricardo_eyre@yahoo.es

Editor: Jean-Nicolas Volff

Received 9 February 2015; revised 13 July 2015; accepted 16 July 2015

doi:10.1111/jzo.12289

Abstract

The known distribution of the Iberian lynx *Lynx pardinus* within the Iberian Peninsula since the Middle Pleistocene and the lack of reliable records of Eurasian lynx *Lynx lynx* in this region have led to the assumption that the Iberian lynx was the sole inhabitant of Iberia. In this study, we identified ancient mitochondrial DNA (a total of 337 base pairs from the control region and cytochrome *b*) from eight northern Iberian lynx remains as Eurasian lynx. These results confirm the presence of Eurasian lynx in northern Iberia from the Pleistocene/Holocene boundary until just a few centuries ago. The paleontological record and our data indicate a population replacement of the Iberian lynx by the Eurasian lynx during the Pleistocene/Holocene transition in the Cantabrian cornice of Spain. Phylogeographic patterns of Late Pleistocene and Holocene Eurasian lynx from Iberia, France, Italy and Denmark show that this felid had a more complex phylogeographic history in the past than modern day populations suggest.

Introduction

The Eurasian lynx *Lynx lynx* (Linnaeus, 1758) has been widespread across Europe since the Eemian interglacial (*c.* 130–115 kya) (Kurtén, 1968; Werdelin, 1981). It diverged from the Iberian lynx *c.* 1.18 million years ago (Ma) and has since developed a clear genetic and ecological differentiation (Ferrer & Negro, 2004; Johnson *et al.*, 2006). It became extinct in the Middle Ages in Britain (Hetherington, Lord & Jacobi, 2006) followed by a gradual decrease in population size over the next few centuries in all densely populated European lowlands (Breitenmoser, 1998). However, it is during the last 200 years that its reduction intensified, leading to frequent local extinctions at the beginning of the 20th century, when this felid disappeared from most parts of southern, western and central Europe (Breitenmoser, 1998; Arx *et al.*, 2004). The main causes of local extinctions were habitat loss (e.g. deforestation), direct persecution, competition and the diminishing of its main prey species in western Europe; the roe deer (Breitenmoser, 1998; Arx *et al.*, 2004). By the end of the

20th century, stricter conservation strategies as well as protection laws together with the recovery of its natural prey significantly curbed the rate of local extinctions. Moreover, since the 1970s, there have been a series of successful reintroduction programmes of Eurasian lynx from the Carpathian Mountains into the Alps and other mountain ranges in western and central Europe (Breitenmoser *et al.*, 2001). Given its wide range, spanning from western Europe to eastern Asia (Supporting Information Figure S1), the Eurasian lynx has been listed as ‘Least Concern’ by the IUCN (IUCN Red List of Threatened Species, 2015).

With the exception of the Iberian Peninsula, the presence of the Eurasian lynx is well documented in Europe since the Late Pleistocene (Kratovich, 1968; Breitenmoser *et al.*, 2000, 2015; Arx *et al.*, 2004). There is, however, a great deal of speculation about the historical presence of Eurasian lynx or even the coexistence of Iberian and Eurasian lynx in the northern strip of Spain (Cantabrian Range, Basque country and Pyrenees) based on historical documentation from previous centuries (Nores & Vázquez, 1984). In 2013, Clavero and Delibes made

a meticulous collection of written sources about the historic distribution of lynx species in the Iberian Peninsula; however, this study does not provide any conclusive evidence or physical remains of Eurasian lynx in Iberia. Morphological differentiation between large Pleistocene Iberian lynx and Eurasian lynx from postcranial remains is a difficult and unreliable task; this difficulty can be overcome with genetic analysis (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). In the Iberian Peninsula, only two lynx remains (both skulls) are attributed with high confidence to the Eurasian lynx: La Sima de Pagolusieta in the Basque country and Pozu'l Lince in Asturias (Altuna, 1980; Nores, 1999). These specimens have not been directly dated and lack stratigraphic context, therefore it is difficult to draw any significant conclusion about their presence in this region from a temporal perspective. Other fossil remains have been classified as Eurasian lynx based on the size of postcranial bone fragments in Santimamiñe and Urratxa III in the Basque country (Castaños, 1984, 1993) and Rascaño in Cantabria (Altuna, 1981). In the French part of the Pyrenees, the presence of Pleistocene (e.g. Grotte des Moustayous, Grotte du Diable, La Grotte de Labastide) and historical (e.g. Gouffre de Pène, Gouffre du Col d'Aran, Schatzi) Eurasian lynx is clearer (Beaufort, 1965; Clot, 1970, 1983, 1988; Clot & Besson, 1974; Clot & Evin, 1986). Nonetheless, there are no reliable dates for the time of extinction of the Eurasian lynx in this region.

Recent genetic studies on modern and historical samples (Ratkiewicz *et al.*, 2012; Rueness *et al.*, 2014) are not in concordance with the geographical and morphological separation of the Eurasian lynx into seven different subspecies (Nowell & Jackson, 1996). The current Eurasian lynx genetic data, based on mitochondrial DNA (mtDNA) and microsatellites, suggest a population differentiation across the Eurasian continent due to isolation by distance (Ratkiewicz *et al.*, 2012). Rueness *et al.* (2014) observed a pattern of genetic structuring along the west-east axis of Eurasia and divided it into three slightly overlapping clades, west, north-east and south, with the latter comprising most of the ancient Eurasian lynx lineages. The time since the most recent common ancestor of the south, north-east and west clades has been estimated in ~ 0.227 , ~ 0.183 and ~ 0.140 Ma, respectively (Rueness *et al.*, 2014). This observed pattern was explained as the result of restricted gene flow between the previously mentioned clades (Rueness *et al.*, 2014). It is important to highlight that most of the studies based on modern and/or historical samples do not take into account populations that went extinct during the Pleistocene and Holocene (e.g. western Europe). The direct study of the phylogeographic patterns of extinct Pleistocene and Holocene European lynx populations allows us to have a more complete understanding of the causes that shaped the phylogeographic patterns that we observe today (Gugolz *et al.*, 2008).

Genetic analyses of ancient remains are a powerful tool to identify cryptic species and allow us to determine at a species level postcranial fragments where species identification is not possible with classical morphometric methods (Shepherd & Lambert, 2008; Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). Here, we use mtDNA markers (control region and cytochrome *b*) to identify eight lynx fossils recovered from different regions across northern Spain. In combination with direct radiocarbon dates

of the fossil remains, the DNA was used to explore the past distribution of Iberian and Eurasian lynx in northern Iberia (Fig. 1). In addition, we sequenced eight Eurasian lynx from Denmark and combined with data from other DNA studies (both ancient and modern) conducted phylogeographic analyses to gain insight into the factors (human driven or natural events) that shaped the current geographic and genetic distribution of the Eurasian lynx in Europe.

Materials and methods

Sample collection and dating

We analysed eight lynx remains from five different sites of northern Spain (Fig. 1) and eight from Denmark (this study) together with modern and ancient lynx data from previous studies (Rueness *et al.*, 2014; Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). The Danish samples were dated by archaeological context (Winge, 1900; Hatting, Holm & Rosenlund, 1973; Andersen & Johansen, 1986), whereas all the Iberian samples with the exception of LynxARA were radiocarbon dated using accelerator mass spectrometry (Beta Analytic, Miami, FL, USA) and calibrated using the OxCal 4.2 software (Bronk Ramsey, 2009) and the INTCAL13 calibration curve (Reimer *et al.*, 2013) (Supporting Information Table S1).

Sampling, DNA extraction and amplification

Sixteen bone and teeth remains were sampled. Samples of *c.* 150 mg of bone or tooth powder were used for DNA extraction using a silica-binding method (Yang *et al.*, 1998). All the pre-amplification steps were performed at the ancient DNA lab in the Centro Mixto (ISCI-UCM) in Madrid (Spain). A total of 337 base pairs (bp) of four non-overlapping fragments of the mtDNA belonging to the cytochrome *b* gene and to the control region were obtained (Table 1).

PCR amplifications

Up to 2 μL of DNA extract was used in a 25 μL reaction consisting of 1X PCR buffer (Naxo, Tartu, Estonia), 1 mM MgCl_2 (Naxo), 0.8 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ of bovine serum albumin (BSA) (Sigma, St Louis, MO, USA), 0.2 mM dNTPs (Sigma), 0.2 μM of each primer and 4 U of HotStarTaq DNA Polymerase (Naxo). Cycling conditions were performed as in Rodríguez *et al.* (2011). Amplicons were purified using ExoSAP-It (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) following the manufacturer's instructions and directly sequenced in forward and reverse orientations on an automated DNA sequencer (ABI-3730xl) using the Big Dye 3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were edited with Sequencher v.4. (Gene codes, Ann Arbor, MI, USA) and manually aligned using the software MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Authenticity of the results

All fragments were sequenced from different PCR amplifications at least three times and when inconsistencies between

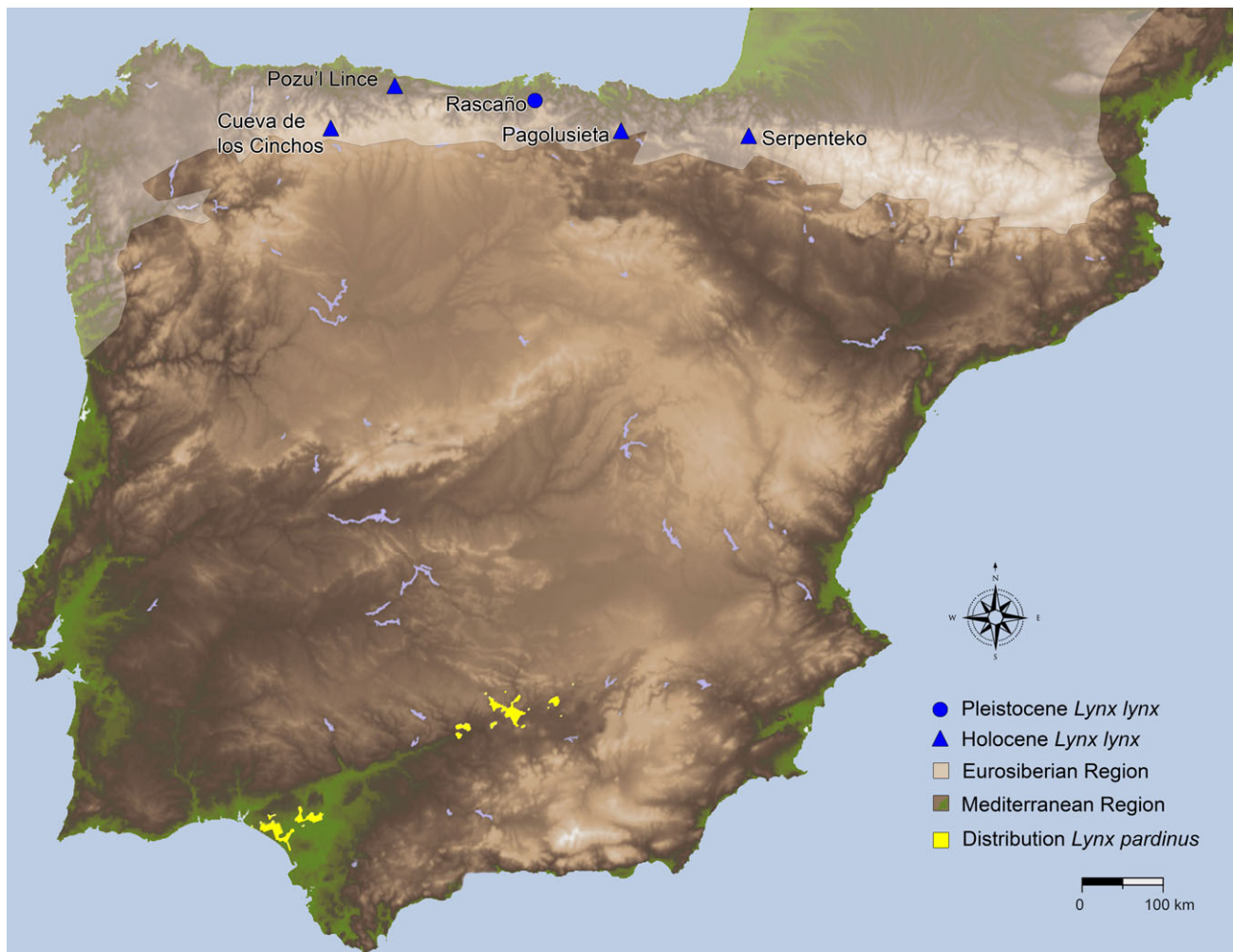


Figure 1 Geographic location of Iberian sampled sites in which genetic analyses allowed for the species identification of the lynx remains in this study. The map is divided in two biogeographic regions: Eurosiberian in the north strip and Mediterranean in the rest (Rivas–Martínez, 1987). Triangles = sites with Holocene fossil remains identified as *Lynx lynx*, circles = sites with Pleistocene/Holocene boundary lynx remains identified as *L. lynx*. The yellow areas represent the extant Iberian lynx populations (<http://www.iberlynce.eu>).

Table 1 Primer sequences and product sizes for mitochondrial amplicons obtained from samples analysed in this study

Primer name	Sequence (5'–3')	Product size (bp)	Region	References
CR2F/DL5R	GTGCTTGCCCAGTATGTC/TACATGCTTAATATTCATGGGATT	93/94	Control region	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2011)/ (Palomares <i>et al.</i> , 2002)
LI2F/CR2b_R	TAGTGCTTAATCGTGCATTATA/CCGGAGCGAGAAGAGGTACA	91	Control region	(Hellborg <i>et al.</i> , 2002)/ (Palomares <i>et al.</i> , 2002)
Cito1F/Cito1R	CCATCGTTGTATTTCAACTAC/CATCATGCTGAAATATTGGATG	79	Cytochrome <i>b</i>	(Rodríguez-Varela <i>et al.</i> , 2015)
NewF1/Cito2R	CTAATCCTACAGATCCTCACC/GATTCAGCCGTAGTTAACG	74	Cytochrome <i>b</i>	(Rodríguez-Varela <i>et al.</i> , 2015)

replicates were found an additional extraction and amplification was performed in order to obtain at least three identical amplicons from each fragment. One negative extraction control and one negative PCR control (no DNA extract) were included to detect contamination for every four samples in each reaction.

No modern Eurasian lynx has been handled in our post PCR DNA facilities.

Species-specific primers were designed to amplify previously known mtDNA sequences of the Eurasian lynx. Moreover, the cytochrome *b* sequences analysed here were translated and no

evidence of frame shift mutations or mutations causing an inappropriate stop codon was found, suggesting that our sequences are free of nuclear mitochondrial DNA sequences (NUMTs) (Den Tex *et al.*, 2010).

Minimum spanning networks

In order to observe changes in haplotype distribution through time two statistical parsimony networks for heterochronous DNA sequence data were constructed, with two different datasets (Fig. 2a,b). Both datasets consisted of ancient and modern Eurasian lynx sequences generated in this study and the equivalent fragment of other sequences available in GenBank from Rueness *et al.* (2014) and Rodríguez-Varela *et al.* (2015) (sequences with gaps, deletions and/or uncertainties were excluded). The first dataset consisted of control region sequences (184 bp) and the second dataset consisted of concatenated control region and cytochrome *b* sequences (325 bp). We used, with each dataset separately, the script TempNet (Prost & Anderson, 2011) in R (R Development Core Team, 2008) to construct a statistical parsimony network for two time periods. The time range is given in calibrated years BP and years to 2014, respectively (27708–319 years BP and <150 years) (Fig. 2a,b, Supporting Information Table S1). One base insertion detected in sample SerpCoxal2m was treated as one substitution.

Phylogenetic analysis

We built two Bayesian phylogenetic trees (one with each dataset used for the networks) to compare the position of our ancient sequences with the current phylogeographic patterns described by Rueness *et al.* (2014) and with Iberian and Eurasian lynx from previous studies (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). Substitution models were compared with maximum likelihood tests using the Bayesian information criterion within MEGA v6 (Tamura *et al.*, 2013). Bayesian phylogenetic trees were generated under the Hasegawa–Kishino–Yano molecular evolution model for the control region dataset (Fig. 2c) and the Hasegawa–Kishino–Yano + gamma model of sequence evolution for the control region and cytochrome *b* concatenated sequences dataset (Fig. 2d) using MrBayes software (ver 3.2) (Ronquist *et al.*, 2012). A Bobcat *Lynx rufus* from GenBank was used as an out-group. The Bayesian analyses were based on 7500 trees sampled over 10 000 000 generations (sample frequency 1/1000 and burn-in value 2500).

Results

DNA identification and radiocarbon dates

We successfully recovered part of the mtDNA (184 bp of the control region and 153 bp of the cytochrome *b*) of 16 lynx remains from the Iberian Peninsula and Denmark. From these, eight belonged to at least seven different lynx individuals from northern Spain. The remaining eight fossils corresponded to lynx specimens from Denmark (see Supporting Information

Table S1). The eight lynx remains from the north of the Iberian Peninsula were genetically identified as Eurasian lynx. These samples, except LLAR1 (Altuna, 1980), Ra.105 (Altuna, 1981) and Sueve (Nores, 1999), are novel and unpublished lynx fossils. The samples from Serpenteko (Serpcoxal1g, Serpcoxal2m, Serpcoxal3p), Sima Pagolusieta (LL1AR), Rascaño (Ra.105), Cueva de los Cinchos (Cueva de los Cinchos) and Pozu'l Lince (Sueve) were radiocarbon dated to 10569.5 ± 126.5 cal BP, 412 ± 93 cal BP, 2943.5 ± 88.5 cal BP, 2972.5 ± 94.5 cal BP, 11917.5 ± 164.5 cal BP, 1751.5 ± 112.5 cal BP and 4705 ± 124 cal BP, respectively. All the samples (except SerpCoxal1g) were classified as *L. lynx* based on three identical replicas consisting of 184 bp of the control region and 153 bp of the cytochrome *b*. We assigned one GenBank accession number per haplotype for the control region (KP748522–KP748526) and another one for the cytochrome *b* (KP748521). The sample SerpCoxal1g from Navarra was identified as *L. lynx* based on 91 bp of the control region and the 153 bp of the cytochrome *b*; however, it was not included in the analysis because one of the control region fragments could not be retrieved.

Phylogeography

The two trees and networks show similar topology with the control region dataset (Fig. 2a,c) and with the control region and cytochrome *b* concatenated sequences dataset (Fig. 2b,d). The haplotype networks and the phylogenetic trees clearly show how the ancient Iberian samples from extinct populations are distributed in all three clades described by Rueness *et al.* (2014) whereas all the Italian samples and one Danish fell exclusively in the south clade. All Danish samples, except one (111/1945-3), and the French ones cluster within the west clade variation as expected. Surprisingly, the only ancient sample that fell in the north-east Clade is Sueve from Pozu'l Lince (Asturias, Spain) (Fig. 2, Supporting Information Table S1).

Discussion

Our results confirm the presence of Eurasian lynx in the north of the Iberian Peninsula since the Pleistocene/Holocene boundary until a few centuries ago (Altuna, 1980, 1981). In particular, the sample Serpcoxal2m from Serpenteko was dated to the 16th century (412 ± 93 cal BP) confirming the historical presence of the Eurasian lynx in the northern region of Spain (Nores & Vázquez, 1984; Clavero & Delibes, 2013).

The scarce palaeontological records of Eurasian lynx and the lack of museum specimens and historical individuals suggest that this felid was always very rare in the Iberian Peninsula (Clavero & Delibes, 2013). Its potentially low population size and the lack of a reliable date for its extinction make it difficult to speculate on the possible causes of its disappearance. No significant changes in vegetation have been reported in the area in the past few centuries except for those related to human activities such as an increase in deforestation from the

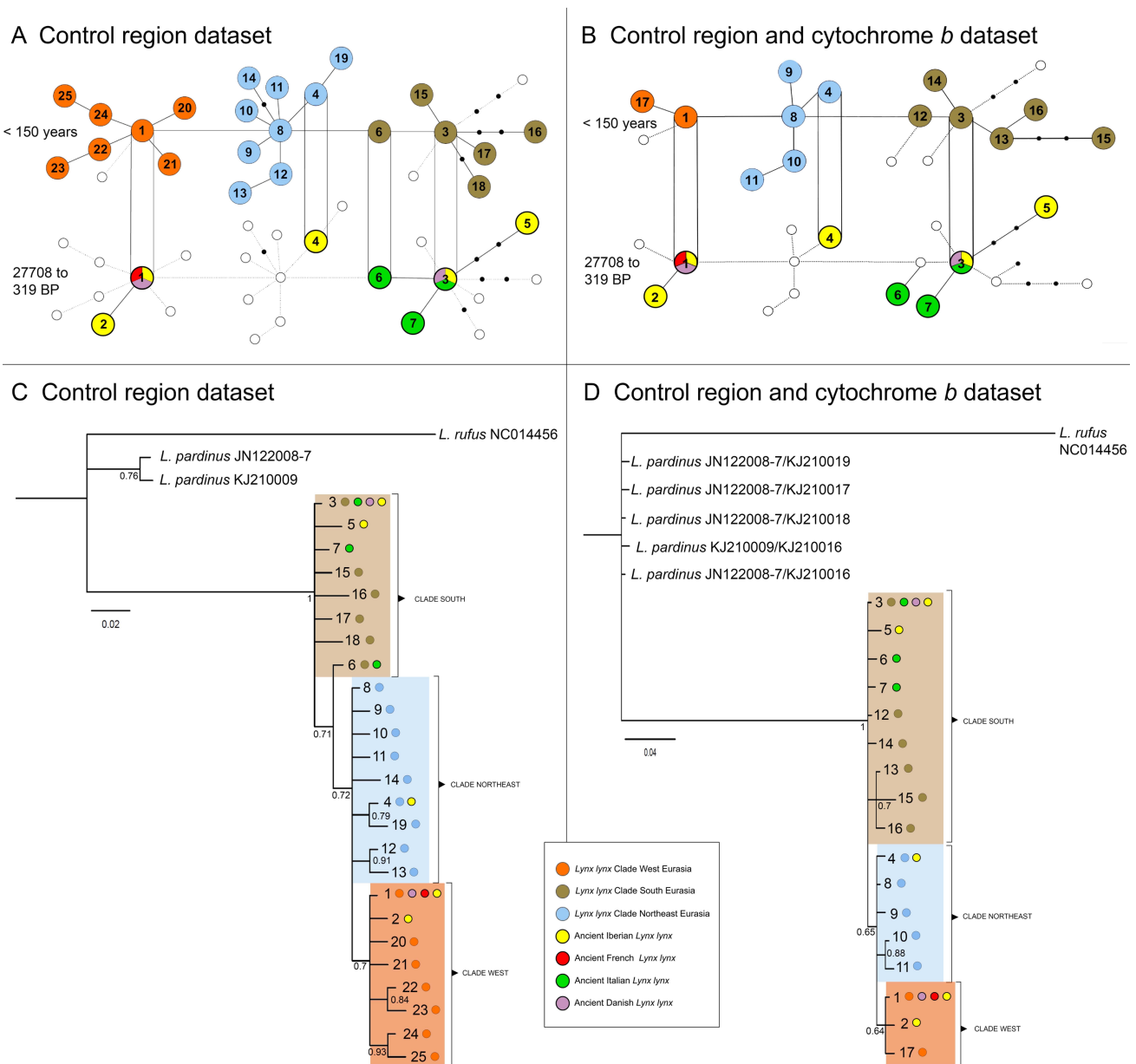


Figure 2 Haplotype distribution of Palearctic lynx samples, where orange = west clade, blue = north-east clade, and brown = south clade (Rueness *et al.*, 2014); yellow: ancient *Lynx lynx* from Iberia (this study), red: ancient *L. lynx* from France (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015), violet: ancient *L. lynx* from Denmark (this study), and green: ancient Italian *L. lynx* (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). Circle with thick borders represent ancient haplotypes and circles with thin borders represent modern haplotypes. Numbers within circles (networks) and on tip of branch (trees) represent unique haplotypes (see Supporting Information Table S1 for details). (a, b) Statistical parsimony network for two time periods (27708–319 years BP and <150 years). Each branch represents one mutational step, and black circles represent missing haplotypes. Haplotypes missing only in one particular time period are shown as white ellipses. (c, d) Bayesian phylogeny performed by using ancient and modern Eurasian and Iberian lynx sequences generated in this and previous studies (Rueness *et al.*, 2014; Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). Posterior probabilities are shown under the nodes. (a, c) Generated with the control region sequences dataset (184 bp) and (b, d) with the control region and cytochrome b concatenated sequences dataset (325 bp).

Roman period until the 20th century in Asturias (Manuel, Díaz-Fernández & Gil, 2003). Therefore, human pressure and habitat loss seem to be the most plausible causes of this local extinction (Torrente, 1997).

There is a lynx species discontinuity between the Late Pleistocene and the Holocene in the Cantabrian strip of the Iberian Peninsula. The fossil record suggests that during the Late Pleistocene most of the lynx fossils from the Cantabrian

strip of Spain belong to the Iberian lynx (e.g. Cueva de Morín, Cueva Ermitia, Lezetxiki, Tito Bustillo, Bolinkova, Polvorin, Cueto de la Mina) (see Supporting Information Table S2). These fossils were classified as Iberian lynx based on body size. These individuals fall outside the Eurasian lynx variation and therefore can be attributed to the Iberian lynx with high confidence (Altuna, 1972, 1976; Castaños, 1982, 1983, 1986). The misidentification occurs with Pleistocene Iberian lynx remains showing a larger size than the current Iberian lynx and are thus erroneously identified as Eurasian lynx (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). This is the case of some remains suggested to be Eurasian lynx or classified only as *Lynx* sp. due to their large size, for example, Urratxa III, Axlor, Arene Candide (Altuna, 1972; Castaños, 1986, 1993; Cassoli & Tagliacozzo, 1994), and later identified as Iberian lynx based on genetic analyses (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). In contrast, we find evidence based on genetic analysis and radiocarbon dates suggesting the Eurasian lynx was the main inhabitant of the Cantabrian strip of the Iberian Peninsula since the Pleistocene/Holocene boundary until, at least, the 16th century. The Eurasian lynx sample from Rascaño (Ra105) in Cantabria radiocarbon dated for this study to 11917.5 ± 164.5 cal BP is to our knowledge the earliest occurrence of a Eurasian lynx beyond the Pyrenees (Fig. 1). Our results support the hypothesis that the expansion of the Eurosiberian forest biota during the Pleistocene/Holocene transition (Carrión *et al.*, 2010) allowed this late immigrant from Asia (Werdelin, 1981) to spread into the Cantabrian strip of Spain. The Eurasian lynx colonization of south-western Europe may have driven the Iberian lynx below the northern strip of Iberia where it has survived as a relict (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015).

The coexistence of both Palearctic lynx species is documented in Arene Candide (north Italy) during the Late Pleistocene (Cassoli & Tagliacozzo, 1994; Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). In the Iberian Peninsula, the presence of Iberian lynx in Holocene sites from the north of Spain, for example, Chaves, Portalón, Peña del Moro (Rodríguez *et al.*, 2011), suggests that both species have lived close to each other. However, in spite of living in neighbouring areas in the north of Spain, the present data suggest that both lynx species have inhabited in different biogeographic regions (for description of biogeographic regions, see Rivas-Martínez, 1987). During the Holocene, the Eurasian lynx inhabited the Eurosiberian Atlantic zone of the Iberian Peninsula (Pyrenees, Basque country and the Cantabrian Mountains), while the Iberian lynx remained in the Mediterranean and sub-Mediterranean zones coinciding with the habitat of its main prey species, the European rabbit (Fig. 1) (Callou, 1995, 2002; Palomares, 2001; Gil-Sánchez, Ballesteros-Duperon & Bueno-Segura, 2006). The present data and the fossil record suggest that the biogeographic regions and prey occurrence determine the distribution of both European lynx species in Iberia.

Radio tracking studies have shown that the Eurasian lynx has the ability to migrate several hundreds of kilometres although it is reticent to cross open areas (Schmidt, 1998). However, Schmidt, Ratkiewicz & Konopinski (2011) pointed out that abiotic climate gradients such as snow cover could

strongly influence the dispersal capacity of female lynx. Therefore, biotic and abiotic factors could have reduced the dispersal capacity of Eurasian lynx reducing the distribution overlap between both species of lynx in the north of Iberia.

The presence of Spanish samples in the three clades described by Rueness *et al.* (2014), the position of the Danish sample 111/1945-3 within the south clade and the presence of the north-east clade in historical samples from Italy (Gugolz *et al.*, 2008) and Suevo in Pozu'l Lince (Spain) (Fig. 2, Supporting Information Table S1) indicate that this felid had a less clear phylogeographic structure with higher levels of gene flow between populations in the past. We suggest that further studies and a more extensive sampling of ancient Eurasian lynx all over the Eurasian continent are required in order to understand the current and past phylogeographic structures of the Eurasian lynx.

Ancient DNA studies can provide useful information about the presence of cryptic species in areas where due to human pressure or natural reasons these species has become extinct (Shepherd & Lambert, 2008; Rodríguez-Varela *et al.*, 2015). Furthermore, studying the genetic structure of ancient populations and the phylogenetic relationships with their modern counterparts is important for appropriate management and conservation strategies such as translocation or reintroduction of individuals (Smulders *et al.*, 2003). This is of particular relevance if the time of population divergence is not known or when isolation occurred (Goldstein & DeSalle, 2003; Valdiosera *et al.*, 2007, 2008). In this study, we provide the first solid evidence of the presence of Eurasian lynx in the northern strip of Iberia, based on genetic analysis and radiocarbon dates, from the Pleistocene/Holocene boundary until only a few centuries ago.

Acknowledgements

This research was supported by Ministerio de Economía y Competitividad, Project No. CGL2012-38434-C03-01. R.R.-V. was funded by a pre-doctoral grant from the MICINN (BES-2010-030127) and by the Fundación Atapuerca and C.V. was funded by a Marie Curie Intra-European Fellowship FP7-People-PIEF-GA-2009-255503 and by the Transforming Human Societies RFA Fellowship from La Trobe University. We would like to thank the Museo de Geología de la Universidad de Oviedo, Roberto Ontañón, Adriana Chauvin, the MUPAC, Eske Willerslev, the Natural History Museum of Denmark, the Sociedad de Ciencias de Aranzadi, Arantxa Aramburu, Asier Izaguirre, Juantxo Agirre, Antonio Rodríguez, Diego Garate, Joseba Ríos, Federación de Espeleología del Principado de Asturias, the Spéléo-Club du Nord Vaudois, Isidoro Raposo, Etienne Fardel, Asociación Deportiva Espeleológica Castrillón, Raquel Rodríguez González, Jesús Sánchez Fuster, Manuel Calvo Temprano, Dirección General de Recursos naturales de la Consejería de Agricultura y Recursos Autóctonos del Gobierno de Asturias for providing samples. Finally, we would like to thank the CNIO for Post PCR Laboratory facilities and María Cruz Ortega for helpfully assisting in fossil restoration of the sampled material.

References

- Altuna, J. (1972). Fauna de Mamíferos de los yacimientos prehistóricos de Guipúzcoa. *Munibe* **24**, 1–464.
- Altuna, J. (1976). Los Mamíferos del yacimiento prehistórico de Tito Bustillo (Asturias). In *Excavaciones en la cueva de Tito Bustillo (Asturias): Trabajos de 1975*: 149–194. Moure, J.A. & Cano, M. (Eds). Oviedo: Instituto de Estudios Asturianos.
- Altuna, J. (1980). Hallazgo de un lince nórdico (*Lynx lynx*. Mammalia) en la sima de Pagolusieta, Gorbea (Vizcaya). *Munibe* **32**, 317–322.
- Altuna, J. (1981). Restos óseos del yacimiento prehistórico del Rascaño. In *El Paleolítico superior de la cueva del Rascaño (Santander)*: 221–269. González Echegaray, J. & Barandiarán, I. (Eds). Santander: Museo Nacional y Centro de Investigación de Altamira.
- Andersen, S.H. & Johansen, E. (1986). Ertebølle revisited. *J. Dan. Archaeol.* **5**, 31–61.
- Arx, M., Breitenmoser-Würsten, C., Zimmermann, F. & Breitenmoser, U. (2004). *Status and conservation of the Eurasian Lynx (Lynx lynx) in Europe in 2001*: Bern: KORA.
- Beaufort, F. (1965). Lynx des Pyrénées, *Felis* (L.) *Lynx lynx* (L.). *Mammalia* **29**, 598–601.
- Breitenmoser, U. (1998). Large predators in the Alps: the fall and rise of Man's Competitors. *Biol. Conserv.* **83**, 279–289.
- Breitenmoser, U., Breitenmoser-Würsten, C., Okarma, H., Kaphegyi, T., Kaphegyi-Wallmann, U. & Müller, U.M. (2000). The action plan for the conservation of the Eurasian Lynx (*Lynx lynx*) in Europe. In *Nature and Environmental Series No. 112*: Strasbourg: Council of Europe Publishing.
- Breitenmoser, U., Breitenmoser-Würsten, C., Carbyn, L. & Funk, S. (2001). Assessment of carnivore reintroductions. In *Carnivore conservation*: 241–281. Gittleman, J.L., Funk, S.M., McDonald, D. & Wyne, R.K. (Eds). Cambridge: Cambridge University Press.
- Breitenmoser, U., Breitenmoser-Würsten, C., Lanz, T., von Arx, M., Antonevich, A., Bao, W. & Avgan, B. (2015). *Lynx lynx*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. www.iucnredlist.org (accessed 7 August 2015).
- Bronk Ramsey, C. (2009). Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon* **51**, 337–360.
- Callou, C. (1995). Modification de l'aire de répartition du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) en France et en Espagne, du Pléistocène à l'époque actuelle: État de la question. *Anthropozoologica* **21**, 95–114.
- Callou, C. (2002). De la garenne au clapier: étude archéozoologique du Lapin en Europe occidentale. *Mem. Mus. Nat. Hist. Nat. (Fr.)* **189**, 1–358.
- Carrión, J.S., Fernández, S., González-Sampériz, P., Gil-Romera, G., Badal, E., Carrión-Marco, Y., López-Merino, L., López-Sáez, J.A., Fierro, E. & Burjachs, F. (2010). Expected trends and surprises in the Lateglacial and Holocene vegetation history of the Iberian Peninsula and Balearic Islands. *Rev. Palaeobot. Palynol.* **162**, 458–476.
- Cassoli, P.F. & Tagliacozzo, A. (1994). I macromammiferi dei livelli tardopleistoceni delle Arene Candide (Savona, Italia): considerazioni paleontologiche e archeologiche. *Quaternaria Nova* **4**, 101–262.
- Castaños, P. (1982). Estudio de los macromamíferos del yacimiento prehistórico de Cueto de la Mina Asturias. *Bol. Inst. Estud. Asturianos* **105–106**, 43–86.
- Castaños, P. (1983). Estudio de los Macromamíferos del yacimiento prehistórico de Bolinkoba (Abadiño-Vizcaya). *Kobie* **13**, 261–298.
- Castaños, P. (1984). Estudio de los Macromamíferos de la Cueva de Santimamiñe (Vizcaya). *Kobie* **14**, 235–318.
- Castaños, P. (1986). Los macromamíferos del Pleistoceno y Holoceno de Vizcaya. Tesis Doctoral, Bilbao.
- Castaños, P. (1993). Estudio de los macromamíferos de la cueva de Urratxa III (Orozco, Bizkaia). *Kobie* **20**, 87–107.
- Clavero, M. & Delibes, M. (2013). Using historical accounts to set conservation baselines: the case of Lynx species in Spain. *Biodivers. Conserv.* **22**, 1691–1702.
- Clot, A. (1970). Le gouffre de Pène, commune de Montégut (Hautes-Pyrénées), Description et Faune. *Bull. Soc. Ramond* **105**, 35–42.
- Clot, A. (1983). Le Lynx des Moustayous (Saint-Pé-de-Bigorre, Hautes-Pyrénées). *Bull., Centre Aturien Rech. sous Terre* **4**, 88–94.
- Clot, A. (1988). Faune magdalénienne de la grande grotte de Labastide (Hautes-Pyrénées, France). *Munibe* **40**, 21–44.
- Clot, A. & Besson, J.P. (1974). Nouveaux restes osseux de Lynx dans les Pyrénées. *Bull. Soc. d'Hist. Naturelle de Toulouse* **110**, 157–169.
- Clot, A. & Evin, J. (1986). Gisements naturels pléistocènes et holocènes des cavités des Pyrénées Occidentales françaises: inventaire et datages ¹⁴C. *Munibe* **38**, 185–194.
- Den Tex, R.-J., Maldonado, J.E., Thorington, R. & Leonard, J.A. (2010). Nuclear copies of mitochondrial genes: another problem for ancient DNA. *Genetica* **138**, 979–984.
- Ferrer, M. & Negro, J.J. (2004). The near extinction of two large European predators: super specialists pay a price. *Conserv. Biol.* **18**, 344–349.
- Gil-Sánchez, J.M., Ballesteros-Duperon, E. & Bueno-Segura, J.F. (2006). Feeding ecology of the Iberian lynx *Lynx pardinus* in eastern Sierra Morena (Southern Spain). *Acta Theriol.* **51**, 85–90.
- Goldstein, P.Z. & DeSalle, R. (2003). Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. *Mol. Ecol.* **12**, 1993–1995.
- Gugolz, D., Bernasconi, M.V., Breitenmoser-Würsten, C. & Wandeler, P. (2008). Historical DNA reveals the phylogenetic position of the extinct Alpine lynx. *J. Zool. Lond.* **275**, 201–208.
- Hatting, T., Holm, E. & Rosenlund, K. (1973). En pelsjägerboplads fra Stenaldet. *Kaselot* **10**, 13–21.
- Hellborg, L., Walker, C.W., Rueness, E.K., Stacy, J.E., Kojola, I., Valdmann, H., Vila, C., Zimmermann, B., Jakobsen, K.S. & Ellegren, H. (2002). Differentiation and levels of genetic

- variation in northern European lynx (*Lynx lynx*) populations revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. *Conserv. Genet.* **3**, 97–111.
- Hetherington, D.A., Lord, T.C. & Jacobi, R.M. (2006). New evidence for the occurrence of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in medieval Britain. *J. Quat. Sci.* **21**, 3–8.
- IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 12 May 2015.
- Johnson, W.E., Eizirik, E., Pecon-Slattery, J., Murphy, W.J., Antunes, A., Teeling, E. & O'Brien, S.J. (2006). The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science* **311**, 73–77.
- Kratochvil, J. (1968). History of the distribution of the lynx in Europe. *Acta Sci. Nat. Brno.* **2**, 1–50.
- Kurtén, B. (1968). *Pleistocene mammals of Europe*: London: Weidenfeld & Nicholson.
- Manuel, C., Díaz-Fernández, P. & Gil, L. (2003). *Tercer inventario Forestal nacional 1997-2006. La transformación histórica del paisaje forestal en Asturias*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- Nores, C. (1999). *¿Es el Lobo Cerval un lince Boreal (Lynx lynx)?* Actas de las IV Jornadas Españolas de Conservación y Estudio de Mamíferos SECEM, Segovia: 87.
- Nores, C. & Vázquez, V.M. (1984). Datos sobre la presencia del lince en Asturias desde el siglo XVIII. *Acta Biol. Mont.* **4**, 361–370.
- Nowell, K. & Jackson, P. (1996). *Wild cats*: Cambridge, UK: The Burlington Press.
- Palomares, F. (2001). Vegetation structure and prey abundance requirements of the Iberian lynx: implications for the design of reserves and corridors. *J. Appl. Ecol.* **38**, 9–18.
- Palomares, F., Godoy, J.A., Piriz, A., O'Brien, S.J. & Johnson, W.E. (2002). Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Mol. Ecol.* **11**, 2171–2182.
- Prost, S. & Anderson, C.N.K. (2011). TempNet: a method to display statistical parsimony networks for heterochronous DNA sequence data. *Methods Ecol. Evol.* **2**, 663–667.
- R Development Core Team (2008). *R: a language and environment for statistical computing*: Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0, (<http://www.R-project.org>).
- Ratkiewicz, M., Matosiuk, M., Kowalczyk, R., Konopinski, M.K., Okarma, H., Ozolins, J., Männli, P., Ornicans, A. & Schmidt, K. (2012). High level of population differentiation in Eurasian lynx at the edge of the species western range in Europe revealed by mitochondrial DNA analysis. *Anim. Conserv.* **15**, 603–612.
- Reimer, P.J., Bard, E., Bayliss, A., Beck, J.W., Blackwell, P.G., Ramsey, B.C., Buck, C.E., Cheng, H., Edwards, R.L., Friedrich, M., Grootes, P.M., Guilderson, T.P., Hafliadason, H., Hajdas, I., Hatté, C., Heaton, T.J., Hoffman, D.L., Hogg, A.G., Hughen, K.A., Kaiser, K.F., Kromer, B., Manning, S.W., Niu, M., Reimer, R.W., Richards, D.A., Scott, E.M., Southon, J.R., Staff, R.A., Turney, C.S.M. & van der Plicht, J. (2013). IntCal13 and Marine13 Radiocarbon Age Calibration Curves 0–50,000 Years cal BP. *Radiocarbon* **55**, 1869–1887.
- Rivas-Martínez, S. (1987). *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. ICONA, Serie Técnica. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- Rodríguez, R., Ramírez, O., Valdiosera, C.E., García, N., Alda, F., Madurell-Malapeira, J., Marmi, J., Doadrio, I., Willerslev, E., Götherström, A., Arsuaga, J.L., Thomas, M.G., Lalueza-Fox, C. & Dalén, L. (2011). 50,000 years of genetic uniformity in the critically endangered Iberian lynx. *Mol. Ecol.* **20**, 3785–3795.
- Rodríguez-Varela, R., Tagliacozzo, A., Ureña, I., García, N., Crégut-Bonnoure, E., Mannino, M.-A., Arsuaga, J.L. & Valdiosera, C. (2015). Genetic evidence of Iberian lynx palaeoendemism. *Quat. Sci. Rev.* **112**, 172–180.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **61**, 539–542.
- Rueness, E.K., Naidenko, S., Trosvik, P. & Stenseth, N.C. (2014). Large-Scale Genetic Structuring of a Widely Distributed Carnivore – The Eurasian Lynx (*Lynx lynx*). *PLoS ONE* **9**, e93675.
- Schmidt, K. (1998). Maternal behaviour and juvenile dispersal in the Eurasian lynx. *Acta Theriol.* **43**, 391–408.
- Schmidt, K., Ratkiewicz, M. & Konopinski, M.K. (2011). The importance of genetic variability and population differentiation in the Eurasian lynx *Lynx lynx* for conservation, in the context of habitat and climate change. *Mamm. Rev.* **41**, 112–124.
- Shepherd, L.D. & Lambert, D.M. (2008). Ancient DNA and conservation: lessons from the endangered kiwi of New Zealand. *Mol. Ecol.* **17**, 2174–2184.
- Smulders, M.J.M., Snoek, L.B., Booy, G. & Vosman, B. (2003). Complete loss of MHC genetic diversity in the common hamster (*Cricetus cricetus*) population in The Netherlands. Consequences for conservation strategies. *Conserv. Genet.* **4**, 441–451.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729.
- Torrente, J.P. (1997). La chasse aux grands carnivores dans les Asturies au XVIIIe siècle. Les papeletas de fieras (billets de bêtes sauvages). *Hist. Soc. Rurales.* **8**, 163–186.
- Valdiosera, C.E., García, N., Anderung, C., Dalén, L., Crégut-Bonnoure, E., Kahlke, R.-D., Stiller, M., Brandström, M., Thomas, M.G., Arsuaga, J.L., Götherström, A. & Barnes, I. (2007). Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Mol. Ecol.* **16**, 5140–5148.
- Valdiosera, C.E., García-Garitaigoitia, J.L., Garcia, N., Doadrio, I., Thomas, M.G., Hänni, C., Arsuaga, J.L., Barnes, I.,

- Hofreiter, M., Orlando, L. & Götherström, A. (2008). Surprising migration and population size dynamics in ancient Iberian brown bears (*Ursus arctos*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5123–5128.
- Werdelin, L. (1981). The evolution of lynxes. *Ann. Zool. Fenn.* **18**, 37–71.
- Winge, H. (1900). Knoglerafdyr. In *Affaldsdynger fra Stenalderen I Danmark*: 81–89. Madsen, A.P., Müller, S., Neergaard, C., Steenstrup, K.J.V. & Winge, H. (Eds). Kjobenhavn: C.A. Reitzel.
- Yang, D., Eng, B., Wayne, J., Dudar, J. & Saunders, S. (1998). Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica based spin columns. *Am. J. Phys. Anthropol.* **105**, 539–554.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

- Figure S1. Extant geographic Eurasian lynx distribution. In blue and red are represented the areas with autochthonous and reintroduced populations, respectively (modified from <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=12519> and Arx *et al.*, 2009).
- Table S1. Sample information and GenBank accession numbers of Eurasian lynx individuals with successful ancient DNA sequencing and published samples used in Fig. 2. Ancient samples are indicated in bold letters.
- Table S2. Records of lynx (*Lynx* spp.) in the northern region of the Iberian Peninsula and the Pyrenees.

Table S1. Sample information and GenBank accession numbers of Eurasian lynx individuals with successful ancient DNA sequencing and published samples used in figure 2. Ancient samples are indicated in bold letters.

Networks and trees haplotype numbers.		Sample code	Reference	Site or geographic origin	Clade based on Rueness et al., 2014	Approx. geographic coordinates	Archaeological date/ Radiocarbon calibrated age 2s BP prob % BP/ Year specimen collection	GenBank accession numbers: control region/cytochrome <i>b</i>
Control region dataset Fig. 2A and 2C	Control region and cytochrome <i>b</i> dataset Fig. 2B and 2D							
1	1	CdR8501	Rodríguez-Varela et al., 2015	Coulet des Roches (Pyrenees, France)	West	44° 3' North 5° 23' East	8171-8000 95.4%	KJ210010/KJ210014
		CdR5548	Rodríguez-Varela et al., 2015	Coulet des Roches (Pyrenees, France)	West	44° 3' North 5° 23' East	7564-7431 95.4%	KJ210010/KJ210014
		LLAR1	This study	Sima Pagolusieta (Vizcaya, Spain)	West	43° 1' North -2° 45' East	3067-2878 95.4%	KP748522/KP748521
		SerpCoxal3p	This study	Serpenteko (Navarra, Spain)	West	42° 58' North -1° 22' East	3032-2855 95.4%	KP748522/KP748521
		LynxARA	This study	Serpenteko (Navarra, Spain)	West	42° 58' North -1° 22' East	NA	KP748522/KP748521
		111/1945-1	This study	Hjerk Nord (Denmark)	West	56° 41' North 8° 51' East	Late Atlanticum	KP748522/KP748521
		111/1945-2	This study	Hjerk Nord (Denmark)	West	56° 41' North 8° 51' East	Late Atlanticum	KP748522/KP748521
		111/1945-4	This study	Hjerk Nord (Denmark)	West	56° 41' North 8° 51' East	Late Atlanticum	KP748522/KP748521
		111/1945-5	This study	Hjerk Nord (Denmark)	West	56° 41' North 8° 51' East	Late Atlanticum	KP748522/KP748521
		111/1945-6	This study	Hjerk Nord (Denmark)	West	56° 41' North 8° 51' East	Late Atlanticum	KP748522/KP748521
		111/1945-7	This study	Hjerk Nord (Denmark)	West	56° 41' North 8° 51' East	Late Atlanticum	KP748522/KP748521
		5/1893B	This study	Ertebolle (Denmark)	West	56° 48' North 9° 10' East	Late Atlanticum	KP748522/KP748521
	R62	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818876/EU818890	
	NA	R88	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818876/NA
		R125	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	58° 48' North 33° 23' East	1977	EU818876/NA
		R135	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	59° 37' North 30° 32' East	1993	EU818876/NA
		R146	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	59° 37' North 30° 32' East	2001	EU818876/NA
		BM2	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	60° 0' North 28° 0' East	NA	EU818876/NA
	1	R72	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1948	EU818877/EU818890
	NA	R87	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1950	EU818877/NA
		R74	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818878/NA
	1	R63	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818880/EU818890
		R64	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1952	EU818880/EU818890
		R68	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818880/EU818890
		R69	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818880/EU818890
		R70	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818880/EU818890
	NA	R71	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1949	EU818880/NA
		R90	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818880/NA
		R91	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1952	EU818880/NA
		R92	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818880/NA
		R93	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818880/NA
		R148	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	59° 27' North 33° 52' East	1969	EU818880/NA
1	R128	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	44° 27' North 40° 10' East	1929	EU818883/EU818890	
2	2	Cueva de los Cinchos	This study	Cueva de los Cinchos (Asturias, Spain)	West	43° 2' North -5° 56' East	1864-1639 95.4%	KP748523/KP748521
3	3	Ra105	This study	Rascaño (Cantabria, Spain)	South	43° 17' North -3° 41' East	12082-11753 95.4%	KP748524/KP748521
		GMP7	Rodríguez-Varela et al., 2015	Grotta della Madonna (Italy)	South	39° 53' North 15° 47' East	12896-12697 95.4%	KJ210011/KJ210014
		111/1945-3	This study	Hjerk Nord (Denmark)	South	56° 41' North 8° 51' East	Late Atlanticum	KP748524/KP748521
		AC6	This study	Arene Candide (Italy)	South	44° 9' North 8° 19' East	18351-17986 95.4%	KJ210011/ KJ210014
	13	R17	Rueness et al., 2014	Eurasia	South	43° 35' North 40° 42' East	1936	EU818858/ EU818892
		R57	Rueness et al., 2014	Eurasia	South	43° 2' North 44° 35' East	1911	EU818858/ EU818892
	3	R112	Rueness et al., 2014	Eurasia	South	61° 7' North 96° 30' East	1929	EU818858/NA

Networks and trees haplotype numbers.		Sample code	Reference	Site or geographic origin	Clade based on Rueness et al., 2014	Approx. geographic coordinates	Archaeological date/ Radiocarbon calibrated age 2s BP prob % BP/ Year specimen collection	GenBank accession numbers: control region/cytochrome b
Control region dataset Fig. 2A and 2C	Control region and cytochrome b dataset Fig. 2B and 2D							
4	4	Sueve	This study	Pozu'l Lince in Sierra de Sueve (Asturias, Spain)	Northeast	43° 26' North -5° 14' East	4829-4581 95.4%	KP748525/KP748521
		R4	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	60° 33' North 42° 39' East	1975	EU818863/EU818890
		R6	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	60° 33' North 42° 39' East	1975	EU818863/ EU818890
	NA	R21	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	62° 26' North 117° 32' East	1968	EU818863/NA
	4	R41	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	51° 59' North 127° 40' East	1973	EU818863/ EU818890
		R47	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	50° 13' North 130° 14' East	NA	EU818863/ EU818890
		R54	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 56' North 64° 26' East	NA	EU818863/ EU818890
		R66	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	56° 55' North 32° 46' East	2002	EU818863/ EU818890
	NA	R76	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	64° 5' North 40° 38' East	1932	EU818863/ EU818890
		R78	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	64° 13' North 41° 39' East	1945	EU818863/NA
		R104	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	44° 27' North 40° 10' East	1929	EU818863/NA
		R105	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	44° 27' North 40° 10' East	1929	EU818863/NA
		R106	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	44° 27' North 40° 10' East	1929	EU818863/NA
	4	R107	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	44° 27' North 40° 10' East	1929	EU818863/NA
		R118	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	53° 22' North 49° 49' East	1985	EU818863/ EU818890
	NA	R127	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	44° 27' North 40° 10' East	1929	EU818863/NA
		R143	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	67° 16' North 86° 38' East	1932	EU818863/NA
	4	R147	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 10' North 92° 0' East	1930	EU818863/ EU818890
	NA	R162	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	50° 28' North 83° 9' East	1983	EU818863/NA
		R163	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	50° 28' North 83° 9' East	1983	EU818863/NA
		R179	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 11' North 83° 60' East	1978	EU818863/NA
		R184	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	54° 28' North 89° 58' East	1977	EU818863/NA
		R185	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 11' North 80° 19' East	1959	EU818863/NA
		R190	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	51° 47' North 87° 13' East	1952	EU818863/NA
		R191	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	51° 47' North 87° 13' East	1942	EU818863/NA
		R192	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 16' North 79° 42' East	1984	EU818863/NA
		R193	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 16' North 79° 42' East	1984	EU818863/NA
		R195	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	43° 20' North 132° 21' East	1959	EU818863/NA
		BM4	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	63° 0' North 10° 0' East	1924	EU818863/NA
		BM5	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	63° 0' North 10° 0' East	1919	EU818863/NA
		BM7	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	63° 0' North 10° 0' East	1919	EU818863/NA
		BM10	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	63° 0' North 10° 0' East	1922	EU818863/NA
		BM11	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	63° 0' North 10° 0' East	1912	EU818863/NA
		KZ3	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	48° 0' North 82° 0' East	2000	EU818863/NA
		R81	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	60° 15' North 69° 21' East	1941	EU818863/NA
	R96	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	59° 5' North 30° 9' East	1910	EU818863/NA	
	4	R178	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	51° 47' North 87° 13' East	1981	EU818868//EU818890
		R3	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	60° 24' North 44° 15' East	1974	EU818870//EU818890
	NA	R67	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 50' North 39° 28' East	1935	EU818870/NA
		R98	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 50' North 39° 28' East	1935	EU818870/NA
R129		Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	44° 27' North 40° 10' East	1929	EU818870/NA	
R65		Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 34' North 38° 55' East	1940	EU818871/NA	

Artículo III

Networks and trees haplotype numbers.		Sample code	Reference	Site or geographic origin	Clade based on Rueness et al., 2014	Approx. geographic coordinates	Archaeological date/ Radiocarbon calibrated age 2s BP prob % BP/ Year specimen collection	GenBank accession numbers: control region/cytochrome b	
Control region dataset Fig. 2A and 2C	Control region and cytochrome b dataset Fig. 2B and 2D								
	4	R103	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 24' North 55° 33' East	1929	EU818873/ EU818890	
	NA	R108	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	44° 27' North 40° 10' East	1929	EU818873/NA	
	4	R116	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	53° 26' North 107° 30' East	1916	EU818873/ EU818890	
	NA	R126	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 24' North 55° 33' East	1929	EU818873/NA	
		R124	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	59° 13' North 33° 34' East	1961	EU818874/NA	
		R84	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 59' North 92° 48' East	1977	EU818875/NA	
5	5	SerpCoxal2m	This study	Serpenteko (Navarra, Spain)	South	42° 58' North -1° 22' East	505-319 95.4%	KP748526/KP748521	
6	6	AC19	Rodríguez-Varela et al., 2015	Arene Candide (Italy)	South	44° 9' North 8° 19' East	27708-27298 95.4%	KJ210013/KJ210015	
		AC14	Rodríguez-Varela et al., 2015	Arene Candide (Italy)	South	44° 9' North 8° 19' East	27618-27165 95.4%	KJ210013/KJ210015	
		Arene 10484	Rodríguez-Varela et al., 2015	Arene Candide (Italy)	South	44° 9' North 8° 19' East	27556-27100 95.4%	KJ210013/KJ210015	
	NA	R174	Rueness et al., 2014	Eurasia	South	38° 30' North 72° 0' East	1913	EU818856/NA	
	12	R172	Rueness et al., 2014	Eurasia	South	38° 0' North 74° 0' East	1936	EU818857/ EU818891	
7	7	GMP6	Rodríguez-Varela et al., 2015	Grotta della Madonna (Italy)	South	39° 53' North 15° 47' East	Epigravettian	KJ210012/ KJ210014	
8	8	R23	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	62° 26' North 117° 32' East	1974	EU818842/ EU818890	
		R25	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	62° 26' North 117° 32' East	1974	EU818842/ EU818890	
		R26	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	62° 26' North 117° 32' East	1974	EU818842/ EU818890	
		R27	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	62° 26' North 117° 32' East	1973	EU818842/ EU818890	
	NA	R28	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	62° 26' North 117° 32' East	1971	EU818842/NA	
	8	R29	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	62° 26' North 117° 32' East	1974	EU818842/ EU818890	
		R40	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	45° 26' North 137° 6' East	1970	EU818842/ EU818890	
		R42	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	49° 31' North 139° 41' East	1932	EU818842/ EU818890	
		R44	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	43° 6' North 133° 60' East	1944	EU818842/ EU818890	
		R45	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	45° 26' North 137° 6' East	1970	EU818842/ EU818890	
		R49	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	45° 26' North 137° 6' East	1970	EU818842/ EU818890	
		R51	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	43° 0' North 76° 0' East	1965	EU818842/ EU818890	
		R60	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	64° 39' North 170° 24' East	1973	EU818842/ EU818890	
	R61	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	55° 15' North 104° 17' East	1934	EU818842/ EU818890		
	NA	R83	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	56° 21' North 160° 40' East	1971	EU818842/NA	
		R85	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	52° 13' North 107° 42' East	1972	EU818842/NA	
		R101	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	72° 30' North 104° 26' East	1930	EU818842/NA	
	8	R111	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	42° 33' North 43° 52' East	1844	EU818842/ EU818890	
	NA	R134	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	76° 10' North 105° 53' East	1948	EU818842/NA	
		R161	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	50° 0' North 83° 0' East	1981	EU818842/NA	
	8	R171	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	38° 0' North 72° 0' East	1913	EU818842/ EU818890	
	NA	R180	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	54° 28' North 89° 58' East	1976	EU818842/NA	
		KZ4	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	48° 0' North 82° 0' East	2000	EU818842/NA	
		KZ5	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	48° 0' North 82° 0' East	2000	EU818842/NA	
	8	R50	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	43° 6' North 133° 60' East	1949	EU818852/ EU818890	
	NA	R33	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	51° 59' North 127° 40' East	1973	EU818853/NA	
	8	R13	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	47° 0' North 120° 0' East	1934	EU818855/ EU818890	
	9	NA	R38	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	49° 31' North 139° 41' East	1932	EU818844/NA
	10	9	R59	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	52° 34' North 158° 23' East	1967	EU818845/ EU818890
	11	NA	R75	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	43° 1' North 44° 42' East	1934	EU818846/NA

Networks and trees haplotype numbers.		Sample code	Reference	Site or geographic origin	Clade based on Rueness et al., 2014	Approx. geographic coordinates	Archaeological date/ Radiocarbon calibrated age 2s BP prob % BP/ Year specimen collection	GenBank accession numbers: control region/cytochrome b	
Control region dataset Fig. 2A and 2C	Control region and cytochrome b dataset Fig. 2B and 2D								
12	10	R86	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	52° 13' North 107° 42' East	1971	EU818848/ EU818890	
	NA	R139	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	44° 35' North 134° 55' East	1929	EU818848/NA	
	10	R43	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	45° 55' North 133° 44' East	NA	EU818848/ EU818890	
		R37	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	53° 11' North 130° 3' East	1978	EU818849/ EU818890	
		R24	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	62° 26' North 117° 32' East	1968	EU818851/ EU818890	
13	11	R36	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	43° 3' North 136° 36' East	1936	EU818850/ EU818890	
14	NA	R30	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	62° 26' North 117° 32' East	1974	EU818854/NA	
15	13	R15	Rueness et al., 2014	Eurasia	South	43° 35' North 40° 42' East	1936	EU818859/ EU818890	
16	15	R32	Rueness et al., 2014	Eurasia	South	50° 13' North 130° 14' East	NA	EU818860/ EU818892	
17	16	R170	Rueness et al., 2014	Eurasia	South	37° 30' North 100° 0' East	1908	EU818861/ EU818893	
18	NA	R176	Rueness et al., 2014	Eurasia	South	38° 10' North 72° 0' East	1932	EU818862/NA	
19		R99	Rueness et al., 2014	Eurasia	Northeast	60° 9' North 32° 32' East	1910	EU818864/NA	
20		R73	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 0' North 23° 0' East	1951	EU818881/NA	
21		R80	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	55° 50' North 39° 28' East	1967	EU818882/NA	
22		R100	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	58° 23' North 56° 48' East	1977	EU818884/NA	
		CZ13	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	50° 0' North 15° 0' East	NA	EU818884/NA	
		17	CZ14	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	50° 0' North 15° 0' East	1994	EU818884/ EU818890
			CZ15	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	50° 0' North 15° 0' East	2001	EU818884/ EU818890
	CZ16		Rueness et al., 2014	Eurasia	West	50° 0' North 15° 0' East	2001	EU818884/ EU818890	
	R58		Rueness et al., 2014	Eurasia	West	55° 56' North 64° 26' East	NA	EU818885/ EU818890	
	NA	R82	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	55° 59' North 92° 48' East	1977	EU818885/NA	
17	R53	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	59° 9' North 61° 52' East	1940	EU818886/ EU818890		
23	NA	R187	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	53° 26' North 85° 26' East	1976	EU818887/NA	
24		R97	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	54° 33' North 33° 11' East	1993	EU818888/NA	
25		R95	Rueness et al., 2014	Eurasia	West	55° 9' North 36° 34' East	1976	EU818889/NA	
NA	NA	SerpCoxal1g	This study	Serpenteko (Navarra, Spain)	NA	42° 58' North -1° 22' East	10696-10443 95.4%	NA/KP748521	

Table S2. Records of lynx (*Lynx* spp.) in the northern region of the Iberian Peninsula and the Pyrenees.

Species morfometric classification*	Molecular identification	Site	Approx. geographic coordinates	Approx. age of the lynx remains	References
<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx lynx</i>	Sima Pagolusieta (Vizcaya, Spain)	43° 01' North -2° 45' East	Holocene	Altuna, 1980; This study
<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx lynx</i>	Cueva Rascaño (Cantabria, Spain)	43° 17' North -3° 41' East	Pleistocene	Altuna, 1981; This study
<i>Lynx lynx</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Urratxa III (Vizcaya, Spain)	43° 02' North -2° 47' East	NA	Castañón, 1993a; Rodríguez-Varela et al., 2015
NA	<i>Lynx lynx</i>	Serpenteko (Navarra, Spain)	42° 58' North -1° 22' East	Holocene	This study
NA	<i>Lynx lynx</i>	Cueva de los Cinchos (Asturias, Spain)	43° 02' North -5° 56' East	Holocene	This study
NA	<i>Lynx lynx</i>	Pozu'l Lince (Asturias, Spain)	43° 26' North -5° 14' East	Holocene	This study
<i>Lynx lynx</i>	NA	Santimamiñe (Vizcaya, Spain)	43° 20' North -2° 38' East	Holocene & Pleistocene	Castañón, 1984
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Morín (Cantabria, Spain)	43° 22' North -3° 51' East	Pleistocene	Altuna, 1972

Artículo III

Species morfometric classification*	Molecular identification	Site	Approx. geographic coordinates	Approx. age of the lynx remains	References
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Lezetxiki (Guipúzcoa, Spain)	43° 04' North -2° 31' East	Pleistocene	Altuna, 1972
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Ermittia (Guipúzcoa, Spain)	43° 16' North -2° 21' East	Pleistocene	Altuna, 1972
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Tito Bustillo (Asturias, Spain)	43° 27' North -5° 04' East	Pleistocene	Altuna, 1976
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Cueto de la Mina (Asturias, Spain)	43° 25' North -4° 51' East	Pleistocene	Castaños, 1982
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Bolinkoba (Vizcaya, Spain)	43° 07' North -2° 38' East	Pleistocene	Castaños, 1983; Castaños 1986
<i>Lynx</i> sp.	<i>Lynx pardinus</i>	Axlor (Vizcaya, Spain)	43° 07' North -2° 43' East	Pleistocene	Altuna, 1972; Rodríguez-Varela et al., 2015
<i>Felis lynx</i>	NA	Altamira (Cantabria, Spain)	43° 22' North -4° 07' East	Pleistocene	Breuil & Obermaier, 1935
<i>Felis lynx</i>	NA	Las Pajucas (Vizcaya, Spain)	43° 13' North -3° 26' East	Holocene	Altuna, 1967
<i>Lynx</i> sp.	NA	Urtiaga (Guipúzcoa, Spain)	43° 16' North -2° 19' East	Pleistocene	Altuna, 1972
<i>Lynx</i> sp.	NA	Lumentxa (Vizcaya, Spain)	43° 21' North -2° 31' East	Pleistocene	Altuna, 1972
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Erralla (Guipúzcoa, Spain)	43° 12' North -2° 10' East	Pleistocene	Altuna & Mariezkurrena, 1985
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Amalda (Guipúzcoa, Spain)	43° 14' North -2° 12' East	Pleistocene	Altuna, 1990
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Lezika (Vizcaya, Spain)	43° 20' North -2° 38' East	Pleistocene	Castaños et al., 2009
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Arrillor (Álava, Spain)	42° 58' North -2° 44' East	Pleistocene	Ruiz Selfa & Laurino, 1986
<i>Lynx pardinus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Chaves (Huesca, Spain)	42° 13' North -0° 08' East	Holocene & Pleistocene	Castaños, 2004; 1993b; Castaños, Rodríguez et al., 2011
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Cueva de Gabasa (Huesca, Spain)	42° 00' North 0° 25' East	Pleistocene	Blasco, 1997
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Valdegoba (Burgos, Spain)	42° 32' North -3° 46' East	Pleistocene	Rodríguez et al., 2011
<i>Lynx pardinus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Portalón (Burgos, Spain)	42° 21' North -3° 31' East	Holocene	Rodríguez et al., 2011
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Muricecs (Lérida, Spain)	42° 03' North 0° 53' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx pardinus</i> , <i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Cova L'Arbreda (Gerona, Spain)	42° 9' North 2° 44' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Cova dels Ermitons (Gerona, Spain)	42° 16' North 2° 35' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Cau del Duc de Torroella (Gerona, Spain)	43° 03' North 3° 07' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Castell Sa Sala (Gerona, Spain)	41° 57' North 2° 22' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx</i> sp.	NA	Bora Gran Carreres (Gerona, Spain)	42° 10' North 2° 44' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Cova del Coll Verdaguer (Barcelona, Spain)	41° 23' North 1° 54' East	Pleistocene	Daura et al., 2009
<i>Lynx pardinus</i> , <i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Cova del Gegant (Barcelona, Spain)	41° 13' North 1° 46' East	Pleistocene	Estévez, 1979; Daura et al., 2009
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Cova del Rinoceront (Barcelona, Spain)	41° 16' North 1° 56' East	Pleistocene	Daura et al., 2009
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Abric Romani (Barcelona, Spain)	41° 32' North 1° 41' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Muscle (Barcelona, Spain)	41° 13' North 1° 46' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx pardinus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Peña del Moro (Barcelona, Spain)	41° 23' North 2° 04' East	Holocene	Rodríguez et al., 2011
<i>Lynx pardinus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Marge del Moro (Barcelona, Spain)	41° 21' North 1° 56' East	Pleistocene	Rodríguez et al., 2011
<i>Lynx pardinus</i> , <i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	<i>Lynx pardinus</i>	Cova del Toll (Barcelona, Spain)	41° 48' North 2° 08' East	Pleistocene	Rodríguez et al., 2011
<i>Lynx pardinus</i> , <i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Mollet I, III (Gerona, Spain)	42° 09' North 2° 44' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx pardinus</i>	NA	Terrasses de la Riera dels Canyars (Barcelona, Spain)	41° 17' North 1° 58' East	Pleistocene	Daura et al., 2013
<i>Lynx</i> sp.	NA	Margueda (Andorra)	42° 28' North 1° 29' East	Holocene	Estévez, 1979
<i>Lynx pardinus</i> , <i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Cau del Duc d'Ullá (Gerona, Spain)	43° 03' North 3° 07' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>L. pardinus</i>	NA	Balma de l'Espuga (Gerona, Spain)	41° 43' North 2° 09' East	Holocene	Estévez, 1979
<i>L. pardinus</i>	NA	Can Sadurní (Barcelona, Spain)	41° 20' North 1° 54' East	Holocene	Nadal, 2000
<i>Lynx</i> sp.	NA	Cova de Bolet (Barcelona, Spain)	41° 27' North 1° 36' East	Holocene	Lorenzo & Estrada, 2007
<i>Lynx</i> cf. <i>spelaeus</i>	NA	Cova Verda (Barcelona, Spain)	41° 13' North 1° 46' East	Holocene	Nadal, 2000

Species morfometric classification*	Molecular identification	Site	Approx. geographic coordinates	Approx. age of the lynx remains	References
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Cau Goges (Gerona, Spain)	41° 55' North 3° 02' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Olopte VI (Gerona, Spain)	42° 23' North 5° 29' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Reclau Viver (Gerona, Spain)	42° 09' North 2° 44' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx sp.</i>	NA	Graiera (Tarragona, Spain)	41° 11' North 0° 34' East	Pleistocene	Diez & Escuer, 2008
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Toixoneres (Barcelona, Spain)	41° 48' North 2° 08' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx sp.</i>	NA	Parco (Lérida, Spain)	41° 54' North 0° 56' East	Holocene	Estévez, 1979
<i>Lynx sp.</i>	NA	Talud de Serinyà (Gerona, Spain)	42° 9' North 2° 44' East	Pleistocene	Galobart et al., 1996
<i>Lynx cf. spelaeus</i> , <i>Lynx pardinus</i>	NA	Roc Melca (Gerona, Spain)	42° 05' North 2° 35' East	Pleistocene	Estévez, 1979
<i>Lynx lynx</i>	NA	col d'Aran (Pyrenees, France)	43° 02' North -0° 30' East	Holocene	Beaufort, 1965; Clot & Besson, 1974
<i>Lynx lynx</i>	NA	Schatzi (Pyrenees, France)	43° 05' North 0° 10' East	Holocene	Clot & Besson, 1974
<i>Lynx lynx</i>	NA	Diable Rouge (Pyrenees, France)	43° 02' North 0° 13' East	Pleistocene	Clot & Evin, 1986
<i>Lynx lynx</i>	NA	Espèche (Pyrenees, France)	43° 03' North 0° 17' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx lynx</i>	NA	Labastide (Pyrenees, France)	43° 02' North 0° 21' East	Pleistocene	Clot, 1988
<i>Lynx lynx</i> , <i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Montoussé (Pyrenees, France)	43° 03' North 0° 24' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx lynx</i>	NA	Moustayous (Pyrenees, France)	43° 01' North 0° 11' East	Pleistocene	Clot, 1983; Clot & Evin, 1986
<i>Lynx lynx</i>	NA	Péne (Pyrenees, France)	43° 02' North 0° 30' East	Holocene	Clot, 1970; Clot & Besson, 1974
<i>Lynx lynx</i>	NA	Montfort (Pyrenees, France)	42° 59' North 1° 08' East	Holocene & Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx lynx</i>	NA	Riverenert (Pyrenees, France)	42° 57' North 1° 13' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx cf. spelaeus?</i>	NA	Montmaurin (Pyrenees, France)	43° 14' North 0° 37' East	Pleistocene & Holocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Lherm (Pyrenees, France)	42° 58' North 1° 39' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Lombrives (Pyrenees, France)	42° 49' North 1° 36' East	NA	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Massat (Pyrenees, France)	42° 53' North 1° 20' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Aragó (Pyrenees, France)	42° 50' North 2° 45' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx sp.</i>	NA	Attekondoua ko Karbia (Pyrenees, France)	43° 09' North -1° 02' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx sp.</i>	NA	Aurensan supérieur (Pyrenees, France)	43° 02' North 0° 09' East	Pleistocene	Clot & Evin, 1986
<i>Lynx sp.</i>	NA	Espéluques (Pyrenees, France)	43° 05' North -0° 03' East	Holocene & Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx sp.</i>	NA	Éléphant (Pyrenees, France)	43° 04' North 0° 34' East	Holocene & Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx sp.</i>	NA	Harpons (Pyrenees, France)	43° 14' North 0° 39' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx sp.</i>	NA	Bouichéta (Pyrenees, France)	42° 52' North 1° 34' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx sp.</i>	NA	Mas-d'Ázil (Pyrenees, France)	43° 04' North 1° 21' East	Holocene & Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx sp.</i>	NA	Trois-Frères (Pyrenees, France)	43° 01' North 1° 12' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx lynx</i>	NA	Isturitz (Pyrenees, France)	43° 21' North -1° 12' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx sp.</i>	NA	Embulla (Pyrenees, France)	42° 33' North 2° 22' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	La Tute de Carrelore (Pyrenees, France)	43° 06' North -0° 36' East	Holocene	Altuna, 1972
<i>Lynx cf. spelaeus</i>	NA	Crouzade (Pyrenees, France)	43° 07' North 3° 05' East	Pleistocene	Clot & Duranthon, 1990
<i>Lynx lynx</i>	NA	Gargas (Pyrenees, France)	43° 03' North 0° 32' East	Pleistocene	San Juan-Foucher et al., 2012

* Lynx remains classified as *Lynx pardinus spelaeus*, *Lynx spelaeus* = *Lynx spelaea* are named here as *Lynx cf. spelaeus*.



Figure S1. Extant geographic Eurasian lynx distribution. In blue and red are represented the areas with autochthonous and reintroduced populations respectively. Modify from <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=12519> and Arx et al., 2009.

Supporting information references

Altuna, J. & Mariezkurrena, K. (1985). Bases de subsistencia de los pobladores de Erralla: Macromamíferos. *Munibe* **37**, 87–117.

Altuna, J. (1967). Cuevas sepulcrales de Vizcaya. Estudio paleontológico de los mamíferos hallados en los estratos arqueológicos. *Munibe* **19**, 227–230.

Altuna, J. (1972). Fauna de Mamíferos de los yacimientos prehistóricos de Guipúzcoa. *Munibe* **24**, 1–464.

Altuna, J. (1976). Los Mamíferos del yacimiento prehistórico de Tito Bustillo (Asturias). In *Excavaciones en la cueva de Tito Bustillo (Asturias): Trabajos de 1975*: 149–194. Moure, J.A & Cano, M. (Eds). Instituto de Estudios Asturianos.

Altuna, J. (1980). Hallazgo de un lince nórdico (*Lynx lynx*. Mammalia) en la sima de Pagolusieta, Gorbea (Vizcaya). *Munibe* **32**, 317–322.

Altuna, J. (1981). Restos óseos del yacimiento prehistórico del Rascaño. *Centro de Investigación y Museo de Altamira monografías* **3**, 223–269.

Altuna, J. (1990). Caza y alimentación procedente de macromamíferos durante el Paleolítico de Amalda. In *La cueva de Amalda (P. Vasco) ocupaciones paleolíticas y postpaleolíticas*: 149–192. Altuna, J., Baleron, A & Meriezkurrena, K. (Eds). Sociedad de Estudios Vascos serie B, 4.

Arx, M., Breitenmoser-Würsten, C. & Breitenmoser, U. (2009). Lessons from the reintroduction of the Eurasian lynx in Central and West Europe. In *Iberian Lynx ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*: 402–410. Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds). Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.

Beaufort, F. de (1965). Lynx des Pyrénées, *Felis (L.) Lynx lynx (L.)*. *Mammalia* **29**, 598–601.

- Blasco, M-F. (1997). In the pursuit of game: the Mousterian cave site of Gabasa I in the Spanish Pyrenees. *J. Anthr. Res.* **53**, 177–217.
- Breuil, H. & Obermaier, H. (1935). *The Cave of Altamira at Santillana del Mar, Spain*. Madrid.
- Castaños, P. (1982). Estudio de los macromamíferos del yacimiento prehistórico de Cueto de la Mina Asturias. *Boletín del Instituto de Estudios Asturianos* **105-106**, 43–86.
- Castaños, P. (1983). Estudio de los Macromamíferos del yacimiento prehistórico de Bolinkoba (Abadiño-Vizcaya). *Kobie* **13**, 261–298.
- Castaños, P. (1984). Estudio de los Macromamíferos de la Cueva de Santimamiñe (Vizcaya). *Kobie* **14**, 235–318.
- Castaños, P. (1986). *Los macromamíferos del Pleistoceno y Holoceno de Vizcaya*. Tesis Doctoral. Bilbao.
- Castaños, P. (1993a). Estudio de los macromamíferos de la cueva de Urratxa III (Orozco, Bizkaia). *Kobie* **20**, 87–107.
- Castaños, P. (1993b). Estudio de los macromamíferos de los niveles paleolíticos de Chaves (Huesca). *Bolskan: Revista de Arqueología del Instituto de Estudios Altoaragoneses* **10**, 9-30.
- Castaños, P. (2004). Estudio arqueozoológico de los macromamíferos del Neolítico de la Cueva de Chaves (Huesca). *Saldvie: Estudios de prehistoria y arqueología* **4**, 125–172.
- Castaños, P., Murelaga, X., Bailon, S., Cataños, J., Saez de La fuente, X & Suarez, O. (2009). Estudio de los vertebrados del yacimiento de Lezikako Koba (Kortezubi, Bizkaia). *Kobie* **28**, 25–50.
- Clot, A & Duranthon, F. (1990). *Les mammifères fossiles du Quaternaire dans les Pyrénées*. Toulouse, Musèum d'Historie Naturelle de Toulouse.
- Clot, A. & Besson, J.P. (1974). Nouveaux restes osseux de Lynx dans les Pyrénées. *Bull. Soc. d'Hist. Naturelle de Toulouse* **110**, 157–169.
- Clot, A. & Evin, J. (1986). Gisements naturels pléistocènes et holocènes des cavités des Pyrénées Occidentales françaises: inventaire et datages ^{14}C . *Munibe* **38**, 185–194.
- Clot, A. (1970). Le gouffre de Pène, commune de Montégut (Hautes-Pyrénées), Description et Faune. *Bull. Soc. Ramond.* **105**, 35–42.
- Clot, A. (1983). Le Lynx des Moustayous (Saint-Pé-de-Bigorre, Hautes-Pyrénées). *Bull. Centre Aturien Rech. sous Terre* **4**, 88–94.
- Clot, A. (1988). Faune magdalénienne de la grande grotte de Labastide (Hautes-Pyrénées, France). *Munibe* **40**, 21–44.
- Daura, J., Sanz, M., García, N., Allué, E., Vaquero, M., Fierro, E., Carrión, J.S., López-García, J.M., Blain, H. A., Sánchez-Marco, A., Valls, C., Albert, R.M., Fornós, J. J., Julià, R., Fullola, J.M., & Zilhão, J. (2013). Terrasses de la Riera dels Canyars (Barcelona, Spain): the landscape of Heinrich Event 4 north of the “Ebro Frontier” and implications for modern human dispersal into Iberia. *Quat. Sci. Rev.* **60**, 26–48.

Daura, J., Sanz, M., Vaquero, M., Allué, E., Subirà, M.E., Fullola, J.M., Fornós, J.J., Torres, T., Ortiz, J.E. & Julià, R. (2009). Noves dades sobre el poblament paleolític al massís del Garraf-Ordal. *Tribuna d'Arqueologia* **2007-2008**, 127–146.

Diez, M.G., & Escuer, A.C.I. (2009). Evidencia gráfica mueble del Paleolítico superior antiguo: La Balma de la Griera (Calafell, Baix Penedés, Tarragona). *Zephyrus* **56**.

Estévez, J. (1979). *La fauna del Pleistoceno catalán*. Tesis doctoral.

Galobart, A., Maroto, J. & Ros, X., (1996). Las faunas cuaternarias de mamíferos de la cuenca de Banyoles-Besalú (Girona). *Revista Española de Paleontología*, N. Extraordinario, 248–255.

Lorenzo, J.N. & Estrada, A. (2007). Les estratègies de caça durant l'epipaleolític a l'Alt Penedès. *Del Penedès* **14**, 35.

Nadal, J. (2000). La fauna de mamífers al Garraf a través del registre arqueològic. *III Trobada d'estudiosos del Garraf*, 165–170.

Rodríguez, R., Ramírez, O., Valdiosera, C.E., García, N., Alda, F., Madurell-Malapeira, J., Marmi, J., Doadrio, I., Willerslev, E., Götherström, A., Arsuaga, J.L., Thomas, M.G., Lalueza-Fox, C. & Dalén, L. (2011). 50,000 years of genetic uniformity in the critically endangered Iberian lynx. *Mol. Ecol.* **20**, 3785–3795.

Rodríguez-Varela, R., Tagliacozzo, A., Ureña, I., García, N., Crégut-Bonnouere, E., Mannino, M-A., Arsuaga, J.L. & Valdiosera, C. (2015). Genetic evidence of Iberian lynx palaeoendemism. *Quat. Sci. Rev.* **112**, 172–180.

Rueness, E.K., Naidenko, S., Trosvik, P. & Stenseth, N.C. (2014). Large-Scale Genetic Structuring of a Widely Distributed Carnivore - The Eurasian Lynx (*Lynx lynx*). *PLoS ONE* **9**, e93675. doi:10.1371/journal.pone.0093675.

Ruíz Selfa, S. & Laurino, M. (1986). Estudio biométrico de la mandíbula del Lince de la cueva de Arrillor. *Felis (Lynx) spelaea...?* (Boule 1906). *Estudios del Instituto Alavés de la Naturaleza* **1**, 35–44.

San Juan-Foucher, C., Foucher, P., Cap, H., & Vercoutère, C. (2012). Découverte d'une dent perforée de Lynx boréal dans les niveaux gravettiens de la grotte de Gargas (Hautes-Pyrénées, France). *Bull. Soc. d'Hist. Naturelle de Toulouse* **148**, 83–92.

6.3.3 Conclusiones artículo III

En este estudio se ha confirmado por primera vez, genéticamente, la presencia del lince boreal en la península ibérica desde finales del Pleistoceno hasta hace unos siglos. Gracias a los análisis de ADNmt y a las dataciones directas de radiocarbono se han identificado como lince boreal restos inéditos de Asturias y Navarra y se han podido confirmar o desmentir restos previamente atribuidos a una de las dos especies de lince con arreglo a caracteres morfométricos. Nuestros resultados sugieren una discontinuidad con respecto a la especie de lince que habitó en la cornisa cantábrica. Según ellos, habría sido el lince ibérico el principal habitante de esta región en la mayor parte del Pleistoceno para desaparecer en favor del lince boreal durante el Holoceno. Se puede comprobar que la distribución del lince boreal en la península ibérica se reduce exclusivamente a la cornisa cantábrica, siendo el ejemplar más antiguo encontrado en ella hasta la fecha el de Rascaño, en Cantabria, datado en el límite entre el Pleistoceno y el Holoceno. Durante el Holoceno la distribución de ambas especies de lince en la península ibérica coincide con las dos regiones biogeográficas o fitoclimáticas (Rivas-Martínez, 1987), de modo que el lince boreal habitará la región eurosiberiana y el lince ibérico la mediterránea.

El análisis del ADNmt de restos de lince boreales pertenecientes a poblaciones extintas del oeste de Europa ha permitido conocer su estructura filogeográfica. Estos análisis filogeográficos muestran que en el pasado había un mayor flujo genético entre los lince boreales y que la estructura genética (siguiendo un gradiente este-oeste) de las poblaciones actuales de lince boreales no estaba presentes en el pasado.

6.4. Artículo IV inédito

Variaciones genéticas temporales y espaciales en el topillo de Cabrera.

Autores: Ricardo Rodríguez-Varela., César Laplana., Pere M. Guillen Calatayud., Jean-Claude Marquet., Juan Manuel López García., Silvia Valenzuela Lamas., Juan Luis Arsuaga., Cristina Valdiosera.

Resumen

El topillo de Cabrera, *Microtus cabreræ*, es una especie endémica y amenazada de la península ibérica. En el pasado presentaba una mayor distribución, llegando a ocupar hasta el sur de Francia. Desde el Pleistoceno Superior esta especie ha sufrido importantes variaciones demográficas a consecuencia de factores ambientales y, más recientemente, también antrópicos. Para constatar si ha habido cuellos de botellas que hayan reducido la diversidad genética de las poblaciones actuales se ha analizado un fragmento del citocromo *b* en una serie cronológica de muestras de topillo de Cabrera ($n=38$), desde el Pleistoceno Superior a la actualidad. Los resultados obtenidos concuerdan con el registro fósil, mostrando un incremento de la diversidad genética durante el Neolítico con una ligera pérdida de variabilidad genética desde entonces hasta la Edad de los Metales que se ve acentuada cuando se compara con las poblaciones actuales. Los análisis realizados sugieren cierta continuidad poblacional desde finales del Pleistoceno hasta época romana, que se ve interrumpida en tiempos históricos.

Introducción

El topillo de Cabrera, *Microtus cabreræ*, es una especie endémica y amenazada de la península ibérica. Su área de distribución histórica se extendía por gran parte de la península ibérica y sur de Francia (López-Martínez, 2003; Laplana y Sevilla, 2013). En la actualidad esta especie, clasificada como casi amenazada por la lista roja de la IUCN, sobrevive en varias poblaciones aisladas de distintos puntos de la península ibérica, las cuales se encuentran en regresión (IUCN, 2015; Fernández-Salvador, 2007; Mira *et al.*, 2008; Garrido-García *et al.*, 2013).

El topillo de Cabrera es una especie muy dependiente de su hábitat (zonas húmedas dentro del ecosistema mediterráneo), lo que la hace muy vulnerable a los cambios climáticos y a las actividades humanas como la agricultura (Pita *et al.*, 2014).

Con arreglo a su presencia/ausencia en el registro paleontológico, Laplana y Sevilla, (2013) analizaron las variaciones en el área de distribución del topillo de Cabrera desde el Pleistoceno Superior a épocas históricas. En el MIS2 documentan la primera regresión en la distribución de *Microtus cabrerae*. La especie desaparece en el sureste de Francia y en el centro de España, donde había estado presente desde el principio del Pleistoceno Superior. Esta contracción de su rango se atribuye a la caída de las precipitaciones y de la temperatura durante este periodo. Durante el principio de Holoceno hay una rápida recolonización de las áreas previamente abandonadas y, durante el Neolítico, se da un incremento significativo de registros. A partir de ese punto se observa un gradual descenso de registros hasta el periodo romano, intensificado desde hace unos 2000 años en adelante, con la desaparición final de la especie en el suroeste de Francia y noroeste de Iberia. Esta segunda reducción en las poblaciones se relaciona con la aridificación de la región mediterránea, que empezó a mediados del Holoceno y ha sido incrementada por la modificación humana del terreno (Laplana y Sevilla, 2013).

Según el tiempo que hayan permanecido aisladas las diferentes poblaciones de topillo de Cabrera cabe o no esperar que se haya producido una diferenciación genética entre las distintas poblaciones. Este aislamiento, que pudo haberse iniciado en los últimos dos milenios y verse intensificado con el desarrollo de la agricultura en los últimos siglos, podría ser el causante de una restricción del flujo genético entre las distintas poblaciones (Blanco y González, 1992; Cabral *et al.*, 2005).

El análisis de la evolución del ADNmt del topillo de Cabrera es especialmente interesante, ya que el género *Microtus* presenta una de las mayores tasas evolutivas documentadas en mamíferos (Martin y Palumbi, 1993; Triant y De Woody, 2006). En este estudio se ha analizado la región más variable del citocromo *b* de restos de topillo de Cabrera en series cronológicas para relacionar sus cambios en la diversidad genética con sus extinciones locales en Francia y otras regiones, desde el Último Máximo Glaciar a la actualidad, con el objetivo de arrojar luz sobre la causa de dichas extinciones y contrastar las siguientes hipótesis: i) se produjo durante el Neolítico un aumento de la diversidad genética a consecuencia de la expansión poblacional que sugiere el registro fósil; ii) hubo una reducción paulatina de la diversidad genética desde el Neolítico a la actualidad; iii) se detecta algún cuello de botella a partir del análisis del citocromo *b* en muestras de *Microtus cabrerae* de distintas épocas; iiiii) sobreviven los haplotipos que estaban exclusivamente presentes en yacimientos franceses y los encontrados en otros yacimientos de regiones donde la especie ha desaparecido en las poblaciones actuales, o, por el contrario, dichos haplotipos se han extinguido junto con las poblaciones que los portaban. De validarse la última hipótesis podría ser un indicador de “*habitat tracking*”, es decir, que las

poblaciones han sido capaces de contraerse con su hábitat, a medida que las condiciones ambientales hacían que su área de distribución se redujera.

Material y Métodos

Muestreo y extracción de ADN

Se han analizado 70 muestras (dientes y huesos) de *Microtus cabreræ* con edades comprendidas entre el Pleistoceno Superior y la actualidad. En 38 de las muestras analizadas (Fig. 1a) se ha conseguido obtener un fragmento completo de 345 pb del citocromo *b*. Para ello se han usado 5 pares de oligonucleótidos (Tabla 1a). Las edades de las muestras de las que se ha podido secuenciar el fragmento completo objeto de estudio van desde el Epimagdalenense (~12 000 BP) hasta la actualidad (Tabla 2a). Para las muestras modernas se obtuvo el citocromo *b* (1196 pb) con 4 pares de oligonucleótidos (Tabla 1a). Las secuencias de las muestras actuales, obtenidas a partir de egagrópilas, fueron procesadas en el laboratorio de ADN moderno en el *Center de GeoGenetics* de la Universidad de Copenhague. Además se han usado todas las secuencias de topillo de Cabrera del citocromo *b* disponibles en el *GenBank*. Los restos antiguos provienen de la península ibérica y Francia (Fig. 1a). Únicamente se han elegido restos de topillo de Cabrera que hubieran sido datados por dataciones indirectas de material asociado o por estar en niveles dentro de un contexto cultural bien definido. Las muestras consistentes en dientes de *Microtus*, debido a su reducido tamaño, se digirieron directamente en el tampón de digestión, mientras que los huesos se redujeron a polvo de hueso mediante N₂ en un Spex 6700 Freezer Mill, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A partir del polvo de hueso o diente fue extraído el ADN siguiendo el protocolo modificado de Yang *et al.* (1998). Todos los restos antiguos fueron amplificados en el laboratorio de ADN antiguo del Centro Mixto UCM-ISCIH de Madrid.

Tabla 1a. Secuencias de los oligonucleótidos y tamaño de los amplicones del citocromo *b* obtenidos en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño producto (pb)	Muestras
MC1F/MC2R	CGGAGCTTCTATATTCTTC/GCAAATAGTAGAATAATCC	74 pb	antiguas
P3AF/P3AR	GCCGAGACGTAACATATGGG/GTTGTAGGAGCCGTAGTAGATC	74 pb	
P3BF/P3BR	CATCTGCCTCTTCTCCACG/CCCATAAATGCTGTTGCTATTACG	73 pb	
P4AF/P4AR	GAAACATGAAACATGGGATTATTC/GCTGATAGTAGGTTTGAATTACTG	75 pb	
P4BF/P4BR	GTCTACCATGAGGACAAATATCC/GCTTTATCTACTGAGAAGCCACC	78 pb	
MC3F/MC4R	GCTGACAAAATCCCCTTCC/GGTCTCCGAGTGCATCTG	79 pb	
P1FAP/3RA	CTATGACCAATGACCTGAAAAATC/ GTTGTAGGAGCCGTAGTAGATC	331 pb	modernas
P3BF/P5BR	CATCTGCCTCTTCTCCACG/ GATTTTGTACGCGTCTGAGTTTAGG	326 pb	
P6AF/P8AR	CCTTCACGAAACAGGATCTAAC/ CCAGGATTACGATAAATTGATTGCG	343 pb	
P7BF/P9BR	CCACACATTAAGCCAGAATGGTAC/CATTACTGGTTTACAAGACCAGCG	346 pb	

Amplificación por PCR

Se usaron 2 μ l de extracto de ADN en un total de 25 μ l de reacción consistente en 1X PCR buffer (Naxo), 1 mM MgCl₂ (Naxo), 0.8 μ g/ μ l de BSA (Sigma), 0.2 mM dNTPs (Sigma), 0.2 μ M, de cada oligonucleótido y 4 unidades de HotStar Taq DNA Polymerase (Naxo). Las condiciones del termociclador son las mismas a las utilizadas en el artículo I con la excepción de la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos, que en este estudio es de 60°C. Los amplicones han sido secuenciados y purificados como se refiere en el artículo III. Las secuencias obtenidas se han editado con el programa Sequencher v.4 y alineadas manualmente usando el software MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Autenticidad de los resultados

Se amplificó 1 blanco de extracción y 1 blanco de PCR por cada 4 muestras para detectar posibles fuentes de contaminación. Los oligonucleótidos fueron específicamente diseñados en este estudio para amplificar fragmentos del citocromo *b* de topillo de Cabrera. Los fragmentos amplificados se solapan entre sí, por lo que se obtiene parte de la misma secuencia con diferentes oligonucleótidos. Esto dificulta la posibilidad de amplificar NUMTs (Den Tex *et al.*, 2010) y proporciona una réplica independiente de la parte de cada secuencia más susceptible de sufrir daño y errores de secuenciación (los extremos 3' y 5').

Red de haplotipos

Con el objetivo de observar los cambios en la distribución de los haplotipos a lo largo del tiempo, se construyó una red de haplotipos realizada mediante análisis estadísticos de parsimonia para cuatro periodos de tiempo (Mesolítico, Neolítico, Edad de los Metales y actual) (Fig. 2a). Las secuencias utilizadas provienen de muestras antiguas y modernas obtenidas en este estudio junto con las secuencias modernas depositadas en el *GenBank*. Se usó la secuencia de comandos *TempNet* (Prost y Anderson, 2011) en R (R development Core Team, 2008) para construir una red estadísticamente parsimoniosa de haplotipos para 4 periodos temporales (Mesolítico, Neolítico, Edad de los Metales y actual).

Índices de diversidad

Se usó el programa Arlequin (ver 3.0) (Excoffier *et al.*, 2005) para comparar los índices estándar de diversidad genética (*H*, diversidad nucleotídica) y los test de neutralidad (Tajima's *D*, Fu y Li *F_s*) entre las muestras de topillo de Cabrera pertenecientes a los diferentes periodos considerados (Mesolítico, Neolítico, Edad de los Metales y modernas) (Tabla 3a).



Fig.1a. Localidades de las muestras analizadas en este trabajo. Todas las secuencias de las muestras modernas procedentes de Portugal han sido previamente publicadas y obtenidas del *GenBank*.

Resultados y discusión

Como se puede apreciar en la red de haplotipos (Fig. 2a), los resultados obtenidos son congruentes con lo observado por Laplana y Sevilla (2013) a partir del registro fósil. Se aprecia una mayor diversidad de haplotipos durante el Neolítico, que concuerda con la expansión de las poblaciones durante este periodo. Durante la edad de los metales disminuye ligeramente la diversidad genética, la cual sufrirá un acusado descenso en las poblaciones actuales. Es importante tener en cuenta que la falta de diversidad genética observada en las poblaciones actuales puede verse sesgada por el tipo de muestreo, ya que la mayoría de las muestras actuales analizadas son de Portugal.

La red de haplotipos indica una cierta continuidad poblacional desde el Mesolítico hasta la Edad de los Metales, que no tiene continuidad en la actualidad. Ninguno de los haplotipos observados en muestras antiguas sobrevive en las poblaciones actuales (Fig. 2a).

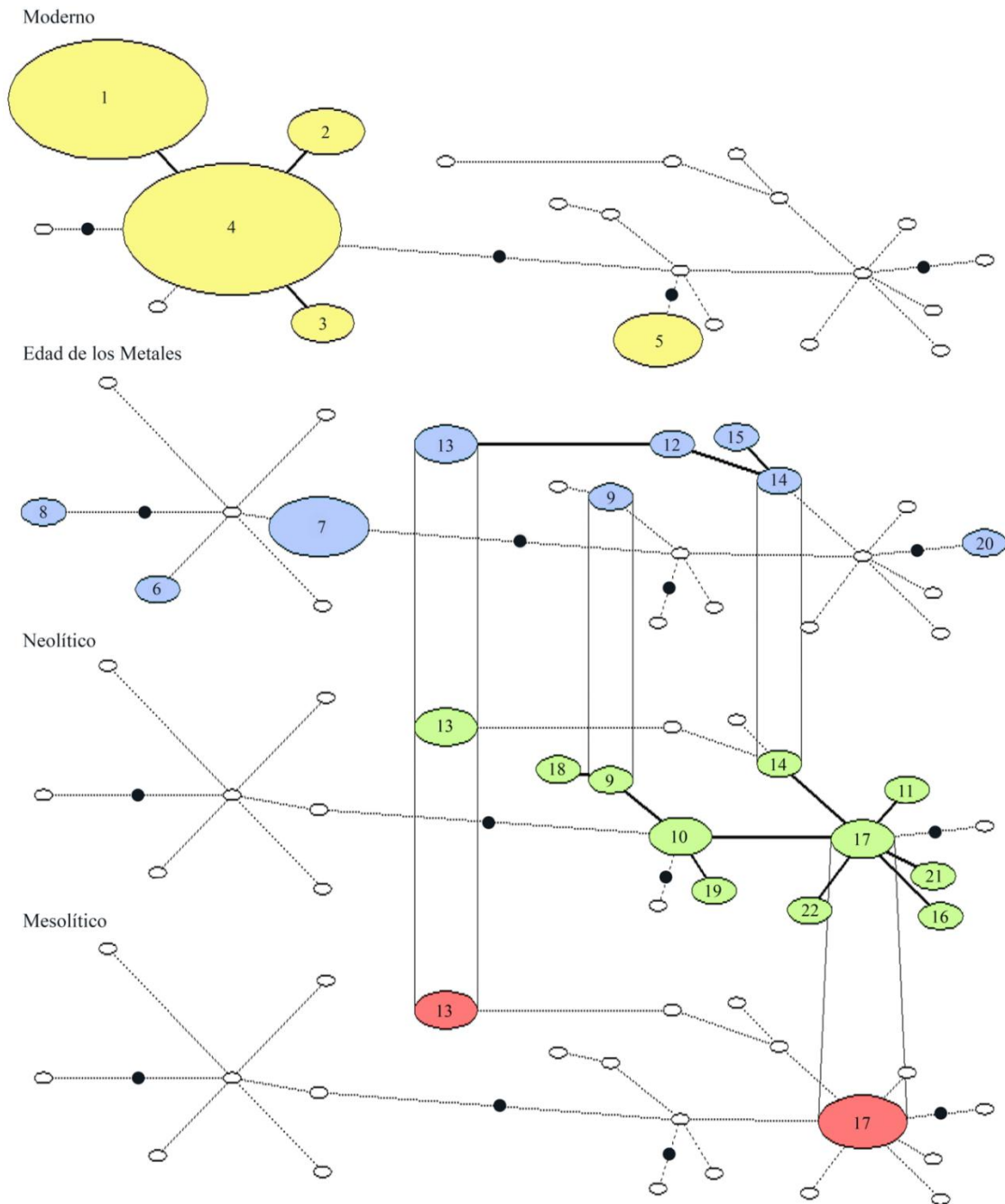


Fig. 2a. La distribución de los haplotipos de topillo de Cabrera se representa mediante una red de haplotipos realizada mediante análisis estadísticos de parsimonia para cuatro periodos (Mesolítico en rojo, Neolítico en verde, Edad de los Metales en azul y moderno o actual en amarillo). El número del interior de las elipses se corresponde con el número de haplotipo (ver Tabla 2a para saber qué muestras pertenecen a cada haplotipo). El tamaño de las elipses es proporcional al número de individuos por haplotipo. Las líneas entre cada haplotipo consecutivo representan una mutación. Cada bola negra representa la ausencia de un haplotipo. Las bolas blancas representan haplotipos que faltan solo en un determinado periodo.

Tabla 2a. Localidad, edad y el número de muestras correspondientes a cada haplotipo utilizado en la (Fig. 2a). Después del lugar de procedencia se indica entre paréntesis el número de muestras analizadas de esa localidad en aquellos casos en los que hay más de una muestra.

Haplotipo	Número de secuencias	Secuencias pertenecientes a cada haplotipo	Edad	Localidad	Referencia		
1	20	AY513789	Modernas	Grândola(18), Idanha-a-Velha(2) (Portugal)	Jaarola et al., 2004; Barbosa et al., 2013		
2	3	AY513788 GU954322 DQ663660		Alandrón (Portugal)	Jaarola et al., 2004		
				Cauda (Portugal)	Fink et al., 2008		
3	2	JX284284 JX457760		Portugal	Paupério et al., 2012		
				Vila Nova de Milfontes (Portugal)	Barbosa et al., 20013		
4	24	JX457756 JX457757 JX457759 JX457758		Sines(3), Castro Verde, Évora (Portugal)			
				Sines(7) (Portugal)			
				Tua river(7), Milhais, Mirandela, Brunheda, Murça (Portugal)			
			Vila Nova de Milfontes(2), Sines (Portugal)				
5	4	MCEUAFa MCEUAFc MCEUAFp MCEUAHu		La Unde, Aiora (Valencia)	Este estudio		
6	1	JAR1	Hierro	Valdetorres de Jarama (Madrid)			
7	5	JAR2 JAR3 JAR5 JAR6 JAR7					
		JAR4					
		8				1	JAR4
		9				2	1SP 28ALP
10	2	2CB 31CB	Hierro	Alorda Park (Tarragona)			
			Neolítico	Cova de Bolumini (Alicante)			
11	1	3CB					
12	1	5CAT 6CO 32CLAM 43CLAM 38ALP 58ALP 67CMC	Hierro	Alorda Park (Tarragona)			
			Neolítico	Cova Colomera (Lérida)			
			Mesolítico	Cingle de L'Aigua (Castellón)			
			Hierro	Alorda Park (Tarragona)			
			Neolítico	Cingle del Mas Cremat (Castellón)			
14	2	7FF 15FF	Neolítico	Abri de Font-Juvenal (Francia)			
			Bronce				
15	1	12FF	Calcolítico				
16	1	14FF	Neolítico				
17	6	37FA 57FA 17FA 54FA 66FF 35FF	Mesolítico	Grotte de l'Abeurador (Francia)			
			Neolítico	Abri de Font-Juvenal (Francia)			
				Cingle del Mas Cremat (Castellón)			
18	1	21CMC					
19	1	41CMC					
20	1	48FF	Calcolítico				
21	1	52FF	Neolítico	Abri de Font-Juvenal (Francia)			
22	1	65FA		Grotte de l'Abeurador (Francia)			

Los resultados preliminares de los análisis sugieren que esta especie presentaba una mayor diversidad en el pasado. La presencia de los mismos haplotipos en muestras de yacimientos franceses o ibéricos durante distintos periodos consecutivos indica una cierta continuidad poblacional desde el Mesolítico hasta el fin de la Edad de los Metales (Tabla 2a, Fig. 2a). Sin embargo, no se ha encontrado ningún haplotipo antiguo en las muestras modernas. Estos resultados sugieren que ha tenido lugar uno o varios cuellos de botella o que se ha producido un

reemplazamiento poblacional en algún momento desde la final de la Edad de los Metales a la actualidad

La comparación de los niveles de diversidad genética entre las poblaciones modernas y las que habitaron en el pasado debe tomarse con cautela, debido a que las muestras antiguas analizadas no son sincrónicas, ni siquiera aquellas que pertenecen a un mismo periodo arqueológico. Además hay que tener en cuenta que hay poblaciones modernas de topillo de Cabrera de muchas regiones de la península ibérica que no están representadas ya que todavía no se ha secuenciado el citocromo *b* de ningún individuo. Todo esto dificulta la comparación de los patrones filogeográficos y los índices de diversidad genética entre las muestras antiguas y las modernas.

Tabla 3a. L, longitud en número de nucleótidos; N, número de secuencias; *N* haplotipos, número de haplotipos; *N* poli, número de sitios polimórficos; H, diversidad génica (i.e., diversidad haplotídica); Diversidad nucleotídica; Pi (Theta); Tajima D; Fu's Fs test estadísticos.

L, nt	Periodo	N	<i>N</i> Haplotipos	<i>N</i> poli	H	Diversidad nucleotídica	Pi	Tajima D	D (p-value)	FS	FS (p-value)
345	Moderno	53	5	8	0.6546 ± 0.0399	0.004295 ± 0.002928	1.481858 ± 0.910370	-0.43024	0.11030	1.10457	0.44050
	Edad de los Metales	14	9	11	0.8791 ± 0.0788	0.010193 ± 0.006195	3.516484 ± 1.904090	0.06553	0.08130	-2.55911	0.00830
	Neolítico	14	11	10	0.9670 ± 0.0366	0.007135 ± 0.004604	2.461538 ± 1.414895	-0.84570	0.01450	-7.48264	0.00000
	Mesolítico	6	2	3	0.5333 ± 0.1721	0.004638 ± 0.003666	1.600000 ± 1.095445	1.12414	0.26280	2.50644	0.76550

Las diferencias geográficas en el número de muestras y en el intervalo de tiempo que abarca cada periodo dificultan la comparación de los índices de diversidad genética entre los distintos periodos analizados. A pesar de estas limitaciones, los datos obtenidos sugieren un claro incremento de la diversidad genética en el Neolítico. Del Neolítico a la edad de los Metales se mantienen similares valores de diversidad genética (se reduce el número de haplotipos pero aumenta la diversidad nucleotídica). Por el contrario, en las poblaciones actuales se observa una reducción en todos los índices de diversidad a pesar de ser mayor el tamaño de muestra (Tabla 3a).

El significativo valor negativo observado en los parámetros Tajima D y Fu's Fs test de las poblaciones Neolíticas ($P < 0.05$) (Tabla 3a) podría ser el resultado de una expansión poblacional, lo que encajaría con lo observado en el registro fósil (Laplana y Sevilla, 2013).

Trabajos en curso

Está previsto continuar y ampliar el muestreo, tanto de las poblaciones actuales de topillo de Cabrera, como de poblaciones extintas de edades que abarcan los últimos 25 000 años. Para poder conocer tanto la estructura filogeográfica de las poblaciones actuales del topillo de Cabrera como sus niveles de diversidad genética, es imprescindible muestrear individuos pertenecientes a poblaciones a lo largo de toda su distribución actual. Una vez esté bien definida la estructura genética de las poblaciones actuales de topillos se podrá reconstruir, con más precisión a medida que se vayan analizando más restos antiguos, la historia evolutiva y demográfica para el citocromo *b*. Esto permitirá inferir las causas y consecuencias de las fluctuaciones demográficas y extinciones locales de esta especie en el pasado. Lo cual, a su vez, podrá servir de modelo para predecir el comportamiento de esta especie amenazada ante la actual pérdida de hábitat provocada por los cambios ambientales y las perturbaciones antrópicas.

Referencias

- Barbosa, S., Pauperio, J., Searle, J.B., Alves, P.C. (2013). Genetic identification of Iberian rodent species using both mitochondrial and nuclear loci: application to non-invasive sampling. *Molecular Ecology Resources*, **13**(1), 43–56.
- Blanco, J.C., González, J.L. (1992). V. Fichas descriptivas de las especies y subespecies amenazadas: Mamíferos. In: *Libro Rojo de los Vertebrados de España*. (p. 515–681). Blanco, J.C., González, J.L. (Eds). Instituto para la Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Cabral, M.J., Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., *et al.* (2005). Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Lisboa, Instituto de Conservação da Natureza.
- Den Tex, R-J, Maldonado, J.E., Thorington, R., Leonard, J.A. (2010). Nuclear copies of mitochondrial genes: another problem for ancient DNA. *Genetica* **138**, 979–984.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software 463 package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online* **1**, 47–50.
- Fernández-Salvador, R. (2007). *Microtus cabreræ* Thomas, 1906. In: *Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España*. (p. 429–432). Palomo, L.J., Gisbert, J., Blanco, J.C. (Eds). Dirección General para la Biodiversidad–SECEM–SECEMU, Madrid.
- Fink, S., Fischer, M.C., Excoffier, L., Heckel, G. (2010). Genomic scans support repetitive continental colonization events during the rapid radiation of voles (Rodentia: Microtus): the utility of AFLPs versus mitochondrial and nuclear sequence markers. *Systematic biology*, **59**(5), 548–572.
- Garrido-García, J.A., Rosário, I.T., Gisbert, J., García-Perea, R., Cordero, A.I., *et al.* (2013). Revisión a nivel ibérico de la distribución del topillo de Cabrera o iberón, *Iberomys cabreræ* (Thomas, 1906). *Galemys* **25**, 35–49.
- IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 12 May 2015.
- Jaarola, M., Martínková, N., Gündüz, İ., Brunhoff, C., Zima, J., *et al.* (2004). Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**, 647–63.

- Laplana, C., Sevilla, P. (2013). Documenting the biogeographic history of *Microtus cabreræ* through its fossil record. *Mammal Review* **43**(4), 309–322.
- López-Martínez, N. (2003). La búsqueda del centro de origen en biogeografía histórica. *Graellsia* **59**, 503–522.
- Martin, A.P., Palumbi, S.R. (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**(9), 4087–4091.
- Mira, A., Marques, C.C., Santos, S.M., Rosário I.T., Mathias, M.L. (2008). Environmental determinants of the distribution of the Cabrera vole (*Microtus cabreræ*) in Portugal: Implications for conservation. *Mammalian Biology* **73**(2), 102–110.
- Paupério, J., Herman, J.S., Melo-Ferreira, J., Jaarola, M., Alves, P.C., Searle, J.B. (2012). Cryptic speciation in the field vole: a multilocus approach confirms three highly divergent lineages in Eurasia. *Molecular Ecology* **21**(24), 6015–6032.
- Pita, R., Mira, A., Beja, P. (2014). *Microtus cabreræ* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalian Species*, **46**(912), 48–70.
- Prost, S., Anderson, C.N.K. (2011). TempNet: a method to display statistical parsimony networks for heterochronous DNA sequence data. *Methods Ecology and Evolution* **2**, 663–667.
- R Development Core Team. (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Triant, D.A., DeWoody, J.A. (2006). Accelerated molecular evolution in *Microtus* (Rodentia) as assessed via complete mitochondrial genome sequences. *Genetica*, **128**(1–3), 95–108.
- Yang, D., Eng, B., Wayne, J., Dudar, J., Saunders, S. (1998). Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology* **105**, 539–54.

7. Discusión

La extracción y análisis del ADNmt de restos de lince de diferentes yacimientos de Europa ha permitido identificar a nivel específico restos erróneamente identificados o que no habían podido asignarse con seguridad a ninguna de las dos especies actuales (Fig. 12). Las muestras analizadas abarcan un intervalo de edad que engloba los últimos 50 000 años y pertenecen, tanto al lince ibérico, como al boreal, así como muestras morfométricamente clasificadas como *Lynx* sp. y *Lynx* cf. *spelaeus*.



Fig. 12. Mapa de los sitios muestreados en los que han sido obtenidos resultados positivos que permiten la asignación específica de cada resto con arreglo a su ADNmt. Ver detalles de las muestras de cada yacimiento en Tabla 2. Mapa físico modificado de www.primap.com.

Todas las muestras de lince ibérico de la península ibérica, analizadas en esta tesis, muestran un mismo y único haplotipo para la región control. Este haplotipo es el que está fijado en las poblaciones actuales que sobreviven en Doñana y Sierra Morena. Estos resultados son inusuales, ya que las muestras abarcan un amplio periodo de tiempo y están distribuidas a lo largo de toda la península ibérica. Solo al incluir muestras de fuera de la península ibérica se ha encontrado una mínima variación en la región control (Fig. 13). En contra de lo esperado, cuando se

amplificó parte del citocromo *b* de varias muestras de lince ibérico, de las que previamente se había amplificado la región control (artículo I), así como del resto de las muestras de los lince ibéricos italianos y franceses (artículo II), se encontró una mayor diversidad genética en este gen que en la región control (Fig. 13). Estos resultados apoyan la relativa diversidad de este gen, observada tras el análisis de heces de lince recogidas en los montes de Toledo (Alda *et al.*, 2008). Sin embargo, contrastan con la mayoría de los estudios, incluidos los realizados en las dos poblaciones actuales de lince ibérico (Casas-Marce *et al.*, 2013), ya que generalmente el citocromo *b* es una región más conservadora y mucho menos variable que la región control, considerada la región con una mayor tasa de mutación del ADNmt (Aquadro y Greenberg, 1983; Hoelzel y Dover, 1991; Brown *et al.*, 1993; López *et al.*, 1997). Para explicar estos resultados serán necesarios más estudios y amplificar el citocromo *b* de más restos de lince ibérico.

Varios restos de lince del norte de España, Francia e Italia, que morfométricamente se clasificaron como *Lynx lynx*, *Lynx* sp. o *Lynx* cf. *spelaeus* debido a su gran tamaño (fuera del rango de los actuales lince ibéricos) (ver Tabla 2), fueron genéticamente identificados en este trabajo como lince ibéricos (*L. pardinus pardinus*). Los resultados obtenidos corroboran la dificultad de una identificación a nivel específico, con base en criterios morfométricos, a partir de restos postcraneales fragmentados. Estos datos ponen de manifiesto que los lince, especialmente los de fuera de la península ibérica, tenían un mayor tamaño durante el Pleistoceno Superior. Diferentes estudios han demostrado que los lince pueden modificar su tamaño en base a factores bióticos y abióticos. Por ejemplo el lince rojo (*Lynx rufus*), que ocupa una amplia área de distribución, muestra variaciones geográficas significativas en su tamaño corporal, que tiende a aumentar en ambientes fríos, a latitudes y altitudes elevadas (Wigginton y Dobson, 1999). En los lince canadienses (*Lynx canadensis*) se ha puesto de manifiesto que su tamaño corporal está inversamente relacionado con su densidad de población (Yom-Tov *et al.*, 2007). Otros félidos, como los pumas americanos (*Puma concolor*), también muestran variaciones geográficas significativas en su tamaño, siendo este mayor en los pumas que viven más alejados del ecuador. Esta variación geográfica es atribuida a las diferencias latitudinales y dietéticas (Iriarte *et al.*, 1990; Gay *et al.*, 1996). El gran tamaño de los lince ibéricos de Arene Candide (Italia) se atribuye a la plasticidad intraespecífica de algunos félidos. No hay evidencias de que los lince ibéricos del Pleistoceno Superior tuvieran una dieta diferente de la de los lince actuales. Así pues, esta variación en el tamaño corporal puede ser debida a la adaptación a un ambiente diferente, en este caso a un ambiente ligeramente más frío, asociado al periodo LGM, según las dataciones obtenidas en este trabajo (Tabla 2). Sin embargo, para probar esta hipótesis se precisa un estudio detallado y un muestreo más extensivo en Francia y otras regiones.

Gracias a la identificación molecular de varios restos de lince se ha podido confirmar genéticamente la presencia, por un lado, del lince ibérico en el norte de Italia y sur de Francia durante el Pleistoceno Superior y el Holoceno, respectivamente; y, por el otro lado, la del lince boreal en el norte de España desde la transición del Pleistoceno al Holoceno hasta el siglo XVI. Estos resultados amplían el rango de distribución de ambas especies. Además se ha documentado la coexistencia de las dos especies de lince paleárticos actuales en el yacimiento de Arene Candide (norte de Italia) durante el Pleistoceno Superior.

Los restos analizados en esta tesis, morfométricamente clasificados como *Lynx cf. spelaeus*, presentan exactamente el mismo haplotipo mitocondrial o varían en solo una substitución nucleotídica (una transición) de los lince ibéricos actuales y extintos de la península ibérica (Fig. 13, Tabla 2). Estos resultados sugieren que no hay argumentos, desde el punto de vista del ADNmt, para clasificar al conjunto de restos asignados al *Lynx cf. spelaeus* del Pleistoceno Superior como una especie o incluso como una subespecie diferente al lince ibérico.

Las muestras AC17, AC18 y Arene 10485 (Arene Candide) (Tabla 2), identificadas en este trabajo como lince ibéricos (*Lynx pardinus pardinus*), fueron medida y estudiadas por Cassoli y Tagliacozzo (1994) y clasificadas con arreglo a su tamaño como lince boreales (*Lynx lynx*). Las muestras AC4 y AC12 (Arene Candide) (Tabla 2), que también han sido genéticamente clasificadas como lince ibéricos (*Lynx pardinus pardinus*) en este trabajo, presentan unas medidas que los sitúan dentro del rango de variabilidad de *Lynx pardinus spelaeus* = *Lynx spelaea*, por lo que fueron clasificadas como *Lynx cf. spelaea* (Cassoli y Tagliacozzo, 1994). Otras muestras como las de Axulna o Urratxa III (España) y Cabias (Francia), las cuales no pudieron ser identificadas a nivel específico o se han atribuido al lince boreal, han sido genéticamente identificadas en este trabajo como lince ibéricos (*Lynx pardinus pardinus*).

Los resultados obtenidos en el artículo II confirman la posible coexistencia de ambas especies de lince paleárticas en el yacimiento de Arene Candide durante el Pleistoceno Superior (Cardini, 1947; Cassoli y Tagliacozzo, 1994). Este escenario abre la posibilidad de que hubiese habido episodios esporádicos de hibridación entre ambas especies, como se ha documentado en América del Norte entre el lince rojo y el lince canadiense (Schwartz *et al.*, 2004). Este hipotético escenario de hibridación podría ser una explicación del gran tamaño de los lince ibéricos identificados en Arene Candide pudiendo ser el resultado de un cruce de una hembra *Lynx pardinus* y un macho *Lynx lynx*. Sin embargo, la presencia de numeros restos de lince clasificados como *Lynx cf. spelaeus* durante todo el Pleistoceno Superior a lo largo del suroeste europeo sugiere que la explicación más parsimoniosa es que todos ellos son lince ibéricos con una talla superior a la actual.

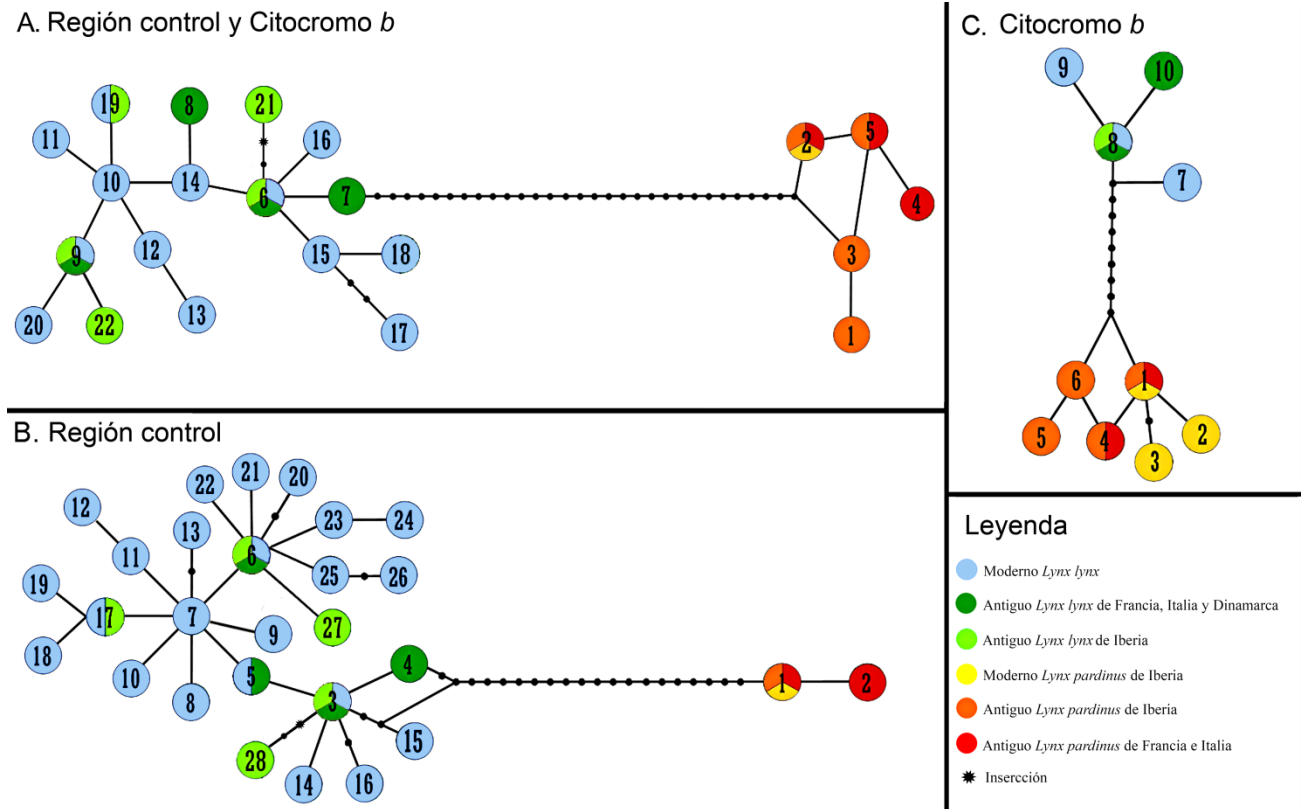


Fig. 13. Red de haplotipos en la que se muestra la distribución de los haplotipos de los linces europeos. Se usaron las secuencias obtenidas en este estudio de linces ibéricos (*L. pardinus pardinus*), boreales (*L. lynx*) y las secuencias homólogas, tanto de linces ibéricos, como boreales, depositadas en el *GenBank* (ver Tabla 2 para detalles de las muestras que pertenecen a cada haplotipo). A) Con las secuencias concatenadas de la región control y el citocromo *b*. B) Solo las secuencias de la región control. C) Solo las secuencias del citocromo *b*. Los linces ibéricos de Italia y Francia (en rojo) fueron previamente clasificados con arreglo a criterios morfométricos como *Lynx cf. spelaeus*, *Lynx sp.* o *L. lynx*.

Los datos obtenidos en esta tesis, junto con el registro fósil, sugieren que a finales del Pleistoceno hubo un reemplazo en la cornisa cantábrica del lince ibérico por el lince boreal, este último fue el habitante de esta región hasta hace unos siglos (Fig. 14). La exclusiva presencia de restos de linces ibéricos en el Pleistoceno Superior de la cornisa cantábrica (ej. Cueva de Morín, Cueva Ermitia, Lezetxiki, Tito Bustillo, Bolinkova, Polvorin, Cueto de la Mina, Axlor) (Altuna, 1972, 1976; Castaños, 1982, 1986) contrasta con la falta de restos de esta especie a partir del Holoceno. Por el contrario, no tenemos constancia de registros fiables de linces boreales al sur de los Pirineos durante el Pleistoceno mientras que su presencia (intermitente), desde hace aproximadamente 11 900 años cal BP hasta hace unos siglos, resulta acreditada por el presente estudio.

Tabla 2. Información de las muestras y número de acceso del *GenBank* de los individuos secuenciados en este trabajo y de los obtenidos de otros estudios que han sido usados en Fig. 13. Para el significado de los colores ver leyenda en Fig. 13.

Red de haplotipos			Muestra o referencia	Clasificación		Sitio	Edad arqueológica/ Edad calibrada por C14 2s BP prob % BP/ Año de recolección del individuo	Número del GenBank: región control /citocromo b
Fig. A	Fig. B	Fig. C		Morfo-métrica	Molecular			
22	27	8	Cueva de los Cinchos	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Cueva de los Cinchos (Asturias)	1864-1639 95.4%	KP748523/KP748521
19	17	8	Sueve	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Sierra de Sueve (Asturias)	4829-4581 95.4%	KP748525/KP748521
21	28	8	SerpCoxal2m	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Serpenteko (Navarra)	505-319 95.4%	KP748526/KP748521
9	6	8	CdR8501	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Coulet des Roches (Francia)	8171-8000 95.4%	KP748522/KP748521
			5/1893B	<i>L. Lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Ertebølle (Dinamarca)	Atlántico superior	
			SerpCoxal3p	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Serpenteko (Navarra)	3032-2855 95.4%	
			LynxARA	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Serpenteko (Navarra)	NA	
			111/1945-1	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Hjerk (Dinamarca)	Atlántico superior	
			111/1945-2	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Hjerk (Dinamarca)	Atlántico superior	
			111/1945-4	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Hjerk (Dinamarca)	Atlántico superior	
			111/1945-5	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Hjerk (Dinamarca)	Atlántico superior	
			111/1945-6	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Hjerk (Dinamarca)	Atlántico superior	
			111/1945-7	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Hjerk (Dinamarca)	Atlántico superior	
			LLAR1	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Sima Pagolusieta (Vizcaya)	3067-2878 95.4%	
			CdR5548	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Coulet des Roches (Francia)	7564-7431 95.4%	KJ210010/KJ210014
6	3	8	GMP7	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Grotta della Madonna (Italia)	12 896-12 697 95.4%	KP748524/KP748521
			Ra105	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Rascaño (Cantabria)	12 045 to 11 760 95.4%	
			111/1945-3	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Hjerk (Dinamarca)	Atlántico superior	
			AC6	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Arene Candide (Italia)	18 351-17 986 95.4%	
7	4	8	GMP6	<i>Lynx sp.</i>	<i>L. lynx</i>	Grotta della Madonna (Italia)	Epigravetiense	KJ210012/KJ210014
8	5	10	AC19	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Arene Candide (Italia)	27 708-27 298 95.4%	KJ210013/KJ210015
			AC14	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Arene Candide (Italia)	27 618-27 165 95.4%	
			Arene 10484	<i>L. lynx</i>	<i>L. lynx</i>	Arene Candide (Italia)	27 556-27 100 95.4%	
5	1	4	Arene10485	<i>L. lynx</i>	<i>L. pardinus</i>	Arene Candide (Italia)	25 170-24 480 95.4%	JN122007-8/KJ210016
			AC17	<i>L. lynx</i>	<i>L. pardinus</i>	Arene Candide (Italia)	24 958-24 305 95.4%	
			AC18	<i>L. lynx</i>	<i>L. pardinus</i>	Arene Candide (Italia)	25 192-24 499 95.4%	
			Axlulna	<i>Lynx sp.</i>	<i>L. pardinus</i>	Axlor (Vizcaya)	29 074-28 507 95.4%	
4	2	4	AC12	<i>L. cf. spelaea</i>	<i>L. pardinus</i>	Arene Candide (Italia)	Gravetiense	KJ210009/KJ210016
			AC4	<i>L. cf. spelaea</i>	<i>L. pardinus</i>	Arene Candide (Italia)	18 770-18 475 95.4%	
2	1	1	Cabias	<i>Lynx sp.</i>	<i>L. pardinus</i>	Grotte Cabias (Francia)	3867-3697 95.4%	JN122007-8/KJ210017
			Yebenes3AR	<i>L. pardinus</i>	<i>L. pardinus</i>	Los Yébenes (Toledo)	año de recolección 1860–2000	
			Doñana4AR	<i>L. pardinus</i>	<i>L. pardinus</i>	Doñana (Sevilla)	año de recolección 1860–2000	
			Chaves	<i>L. pardinus</i>	<i>L. pardinus</i>	Chaves (Huesca)	6960-6748 95.4%	
1	1	5	Valdegoba87	<i>L. pardinus</i>	<i>L. pardinus</i>	Valdegoba (Burgos)	(sin cal. BP) 48 400 ± 3300*	JN122007-8/KJ210019
3	1	6	Valdegoba89	<i>L. pardinus</i>	<i>L. pardinus</i>	Valdegoba (Burgos)	(sin cal. BP) 48 400 ± 3300*	JN122007-8/KJ210018
NA	1	NA	Casas-Marce et al., 2013	NA	<i>L. pardinus</i>	Doñana y Sierra Morena (España)	moderno	KF561247/NA
NA	1	NA	Rodríguez et al., 2011	NA	<i>L. pardinus</i>	península ibérica	antiguo	JN122007-8/NA
6, 9 - 20	3, 5 - 26	8, 9	Ruiness et al., 2014	NA	<i>L. lynx</i>	ver referencia	moderno	EU818842-89/EU818890-93
NA	NA	8, 7	Johnson et al., 2004	NA	<i>L. lynx</i>	ver referencia	moderno	NA/AY499324-27
		1		NA	<i>L. pardinus</i>	península ibérica	moderno	NA/AY499320-23
NA	NA	1 - 3	Alda et al., 2008	NA	<i>L. pardinus</i>	península ibérica	moderno	NA/EU588715-19
NA	NA	1	Fernandes et al., 2008	NA	<i>L. pardinus</i>	península ibérica	moderno	NA/EF689047-8
NA	NA	8	Masuda et al., 1994	NA	<i>L. lynx</i>	ver referencia	moderno	NA/D28902

Discusión

La presencia del lince ibérico en la cordillera cantábrica (Asturias, País Vasco, Cantabria) y el norte de Italia durante el Pleistoceno Superior contrasta con su comúnmente atribuido carácter mediterráneo. Las dataciones de lince ibéricos en el norte de España e Italia obtenidas en este trabajo (Tabla 2) nos muestran que esta especie vivió en momentos mucho más fríos que el actual en latitudes más septentrionales y, aunque las oscilaciones climáticas eran muy marcadas en esta época, no es esperable que hubiese un ambiente mediterráneo análogo al actual hábitat de la especie. Ello sugiere que la distribución del lince ibérico está determinada por la de su principal presa, el conejo, más que por factores climáticos.

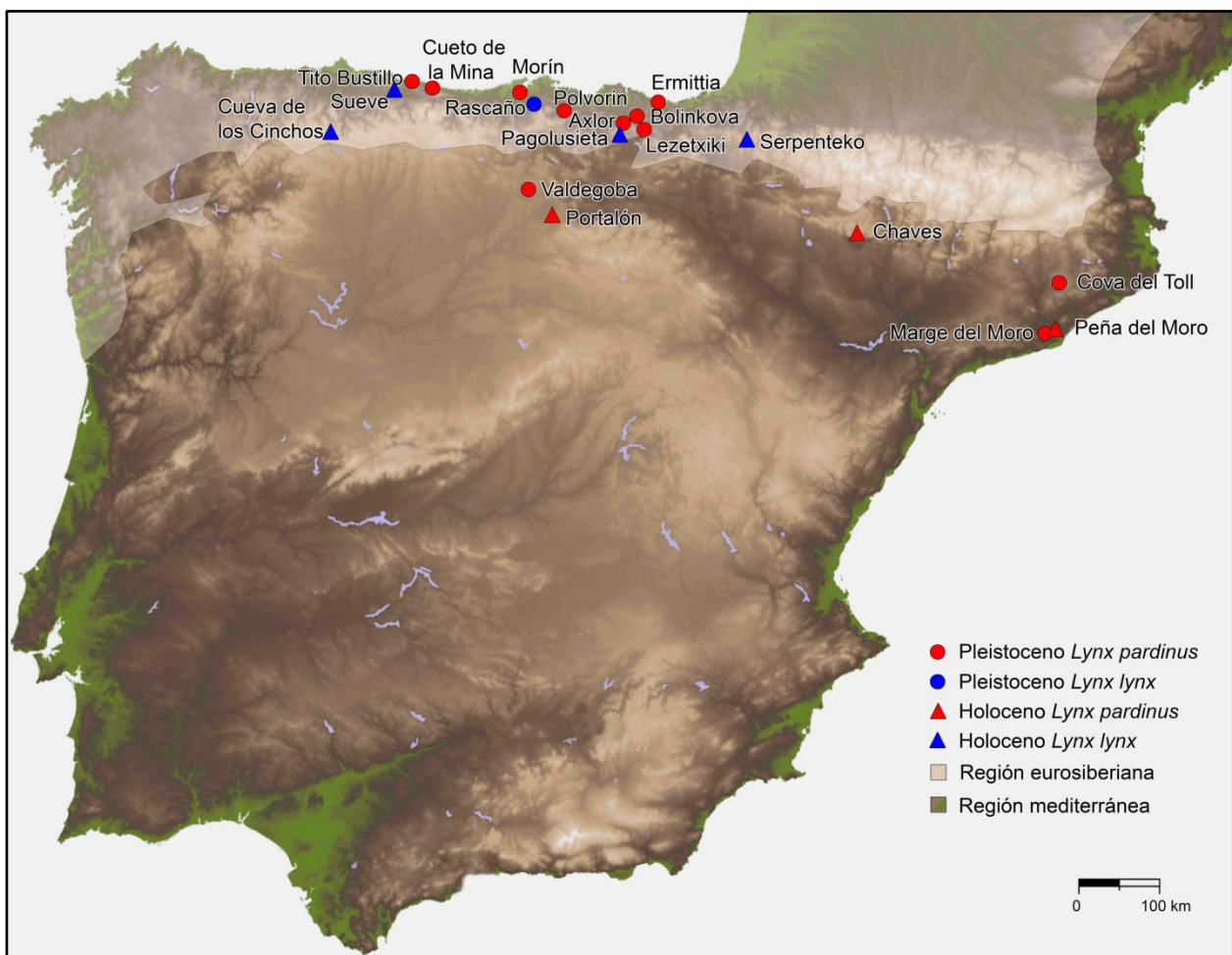


Fig. 14. Ubicación geográfica de las localidades en las que análisis genéticos (esta tesis) o morfométricos (Altuna, 1972, 1976; Castaños, 1982, 1986) han permitido la identificación a nivel específico de restos de lince. El mapa está dividido en las dos principales regiones biogeográficas: eurosiberiana en el norte de la península y mediterránea en el resto (Rivas-Martínez, 1987). Los triángulos rojos y azules representan sitios con restos de lince identificados como *Lynx pardinus* y *Lynx lynx*, respectivamente; y los círculos rojos y azules representan localidades en las que los restos de lince han sido identificados como *Lynx pardinus* y *Lynx lynx*, respectivamente.

El registro más antiguo de un lince boreal al sur de los Pirineos es, por el momento, el de Rascaño en Cantabria (datado en este trabajo por C^{14} en entre 11 760 y 12 045 cal años BP). Por ello, con los datos disponibles, la entrada del lince boreal en la península ibérica coincide y podría estar propiciada por la expansión de los bosques eurosiberianos (*Corylus*, *Alnus*,

Fraxinus, *Ulmus*, *Acer*, *Abies*, *Fagus*, y *Quercus*) a principios del Holoceno (Carrión *et al.*, 2010). Durante el Holoceno ambas especies de lince ocupan la península ibérica sin solaparse (Fig. 14). El registro fósil indica que, mientras que el lince boreal se distribuía exclusivamente por la región biogeográfica eurosiberiana, el lince ibérico lo hacía en la región mediterránea, al igual que su principal presa, el conejo europeo. No se conocen las razones por las cuales el lince boreal no se desplazó más a sur, como sí hizo por ejemplo en Italia, donde hay presencia de lince boreales en ecosistemas mediterráneos de las zonas más meridionales de Italia durante finales del Pleistoceno Superior (ej. Grotta della Madonna) y el Holoceno (ej. Trasacco o S. Maria d'Agnano) (Artículo II; Rustioni *et al.*, 1995). Quizás la presencia en el sur de la península ibérica del lince ibérico un depredador especializado en la principal presa de esta región impidió, al contrario que en Italia, su distribución a latitudes más meridionales.

8. Conclusiones/Conclusions

8.1 Conclusiones

1. La baja diversidad genética en la región control del ADNmt, constatada en el lince ibérico durante los últimos 50 000 años, es consecuencia de un tamaño poblacional pequeño y constante a lo largo del tiempo y/o de una inusualmente baja tasa de mutación para esa región del ADNmt. La actual ausencia de diversidad genética en la región control del ADNmt no es por sí misma una amenaza para la viabilidad del lince ibérico a largo plazo, ya que este félido ha sobrevivido al menos 50 000 años sin diversidad genética en esta parte del genoma. Ello no excluye que la pérdida de diversidad genética en otras regiones del genoma que afectan a su *fitness*, como consecuencia del drástico cuello de botella ocurrido en los últimos siglos, sí tenga repercusión en la viabilidad de esta especie.
2. El análisis del ADNmt de diferentes restos de lince revela, por vez primera desde una perspectiva molecular, que el lince ibérico habitó el norte de Italia y el sur de Francia durante el Pleistoceno Superior y el Holoceno. Estos resultados incrementan, por consiguiente, el área de distribución del lince ibérico durante el Pleistoceno Superior y muestran así mismo que el lince ibérico es un paleoendemismo de la península ibérica como consecuencia de la contracción de su rango de distribución desde el Pleistoceno Superior.
3. La identificación con base en el ADNmt de restos de lince morfométricamente clasificados como *Lynx* cf. *spelaeus*, *Lynx* sp. o *Lynx lynx* como *Lynx pardinus pardinus*, muestra la dificultad de una identificación específica segura a partir del tamaño de restos posteraneales del género *Lynx*.
4. Los resultados obtenidos no apoyan la clasificación de los lince italianos de Arene Candide, identificados a partir de criterios morfométricos como lince de las cavernas (*Lynx* cf. *spelaeus*), como una especie diferente de lince, ni siquiera como una subespecie del lince ibérico, ya que presentan el mismo haplotipo mitocondrial (o varían en una transición) que los actuales lince ibéricos (*Lynx pardinus pardinus*). La identificación de lince ibéricos mediante ADNmt muestra que además de tener una mayor distribución, tenían un mayor tamaño corporal durante el Pleistoceno Superior.

5. Se documenta por primera vez, con base en datos genéticos y dataciones radiométricas, la coexistencia de las dos especies de lince europeas en un mismo yacimiento en el Norte de Italia durante el Pleistoceno Superior.
6. Se confirma, genéticamente, la presencia del lince boreal en la península ibérica desde la transición del Pleistoceno al Holoceno hasta el siglo XVI.
7. El registro fósil y los resultados de esta tesis sugieren una discontinuidad en la especie de lince que habitó en la cornisa cantábrica. Así pues, habría sido el lince ibérico el principal habitante de esta región durante la mayor parte del Pleistoceno, para desaparecer en favor del lince boreal durante el Holoceno. Durante el Holoceno ambas especies de lince cohabitaron en la península ibérica sin solaparse: el lince boreal en la región biogeográfica eurosiberiana y el ibérico en la región mediterránea donde habita su principal presa en conejo europeo.
8. El análisis del ADNmt de restos de lince boreales pertenecientes a poblaciones extintas del oeste de Europa ha permitido conocer su estructura filogeografía. Estos análisis filogeográficos muestran que en el pasado había un mayor flujo genético entre los lince boreales y que la estructura genética (siguiendo un gradiente este-oeste y en menor medida norte-sur) de las poblaciones actuales de lince boreales no estaba presente en el pasado.
9. Los resultados preliminares sugieren que el topillo de Cabrera experimentó un incremento de la diversidad genética durante el Neolítico. Desde la Edad del Hierro hasta la actualidad se produce una pérdida de diversidad genética en esta especie. La presencia de los mismos haplotipos en yacimientos franceses e ibéricos desde el Mesolítico hasta la Edad del Hierro indica una cierta continuidad poblacional a lo largo del tiempo que se vio interrumpida en algún momento desde el final de la Edad de los Metales a la actualidad. Ninguno de los haplotipos analizados en muestras antiguas está presente en las poblaciones actuales analizadas hasta la fecha. Estos resultados sugieren que uno o varios cuellos de botella han tenido lugar en época reciente, o bien que se ha producido un reemplazamiento poblacional. Sin embargo, hay que tener en cuenta que todavía no hay datos disponibles de poblaciones modernas de topillo de Cabrera de varias regiones de la península ibérica, lo que dificulta la comparación de la diversidad genética y de los patrones filogeográficos entre las muestras antiguas y las modernas.

8.2 Conclusions

1. The Iberian lynx shows low levels of mtDNA variation in the last 50 000 years suggesting an unusually low mutation rate in the mtDNA control region and/or a continuously low population size over time. The survival of the Iberian lynx for this period of time under low levels of mtDNA genetic diversity indicates that this unusually low variability is intrinsic to the species, rather than the result of recent or historical bottlenecks. This implies that the current lack of mtDNA genetic diversity is not threatening the survival of this felid. However these results do not exclude that the loss of autosomal genetic variation during the last centuries can have a negative effect in the fitness of the species.
2. We genetically confirm, for the first time, the presence of the Iberian lynx in France and Italy during the Holocene and Late Pleistocene increasing the past range distribution of the Iberian lynx in southern-central Europe from Iberia to northern Italy. These results demonstrate that the Iberian lynx is a palaeoendemic species as a consequence of a range contraction from the Pleistocene to the Holocene.
3. The mtDNA identification of lynx remains morphometrically classified as *Lynx* cf. *spelaeus*, *Lynx* sp. and *Lynx lynx* as *Lynx pardinus pardinus*, shows the difficulty of a reliable species identification based solely on morphometrical parameters from postcranial lynx remains.
4. Mitochondrial DNA analysis does not support a different species or even subspecies classification of the Italian lynx remains from Arene Candide morphometrically classified as Cave lynx, *Lynx* cf. *spelaeus*. These remains have the same mitochondrial haplotype (or vary in only one transition) that modern and ancient Iberian lynx from the Iberian Peninsula. Therefore the Iberian lynx had larger body size during the Late Pleistocene when it also reached a wider distribution area.
5. Ancient DNA analysis in combination with direct radiocarbon dates show that both Palaeartic lynx species were present in Arene Candide (north Italy) during the Last Glacial Maximum.
6. Mitochondrial DNA analysis and the radiocarbon dates of lynx remains from the Cantabrian strip of Spain genetically confirm, for the first time, the Eurasian lynx presence in the Cantabrian strip of Spain since the Pleistocene-Holocene transition until the XVI century.

7. Our results and the paleontological record suggest a lynx species discontinuity between the Late Pleistocene and the Holocene in the Cantabrian strip of the Iberian Peninsula. During the Late Pleistocene the Iberian lynx was the main inhabitant of the north strip of Spain and was later replaced by the Eurasian lynx during the Pleistocene-Holocene transition. During the Holocene, the Eurasian lynx inhabit the Eurosiberian Atlantic zone of the Iberian Peninsula, while the Iberian lynx remained in the Mediterranean and sub-Mediterranean zones coinciding with the habitat of its main prey species, the European rabbit.
8. Our results indicate that the Eurasian lynx had a less clear phylogeographic structure with higher levels of gene flow between populations in the past.
9. Preliminary results on an ongoing study on Cabrera vole show that this endangered species had higher levels of genetic diversity in the Neolithic, with a posterior reduction since this period to the present. The presence of shared haplotypes from the Mesolithic all throughout Roman times, suggests population stability through consecutive periods of time. However, our data suggest a loss of haplotype diversity right after the Roman times as none of the earlier haplotypes are found in present day populations. These results suggest that one or more bottlenecks have taken place during historical times, or that there was a population replacement. However, there are no data from modern populations from some region of Iberia. Thus, a more extensive sampling would be needed to further confirm this hypothesis.

9. Referencias

- Alda, F., Inogés, J., Alcaraz, L., Oria, J., Aranda, A., Doadrio, I. (2008). Looking for the Iberian lynx in central Spain: a needle in a haystack? *Animal Conservation* **1**, 297–305.
- Allentoft, M.E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C.L., *et al.*, (2012). The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **279**(1748), 4724–4733.
- Altuna, J. (1972). Fauna de Mamíferos de los yacimientos prehistóricos de Guipúzcoa. *Munibe* **24**, 1–464.
- Altuna, J. (1976). Los Mamíferos del yacimiento prehistórico de Tito Bustillo (Asturias). In: *Excavaciones en la cueva de Tito Bustillo (Asturias): Trabajos de 1975*. (pp. 149–194). Moure, J.A., Cano, M. (Eds). Instituto de Estudios Asturianos.
- Altuna, J. (1980). Hallazgo de un lince nórdico (*Lynx lynx*. Mammalia) en la sima de Pagolusieta, Gorbea (Vizcaya). *Munibe* **32**, 317–322.
- Altuna, J. (1981). Restos óseos del yacimiento prehistórico del Rascaño. *Centro de Investigación y Museo de Altamira monografías* **3**, 223–269.
- Altuna, J. (1994). Los macromamíferos durante el Solutrense de la Península Ibérica. *Férvedes* **1**, 47–55.
- Álvarez, G.E.A., Sánchez, E.G., López, J.M.Q. (2007). Avance al estudio del Magdaleniense de Cueva Oscura de Ania (Las Regueras, Asturias, España). *Cæsaraugusta* **8**, 91–106.
- Álvarez-Lao, D.J., García, N. (2010). Chronological distribution of Pleistocene cold-adapted large mammal faunas in the Iberian Peninsula. *Quaternary International* **212**(2), 120–128.
- Anderson, C.N.K., Ramakrishnan, U., Chan, Y.L., Hadly, E.A. (2005). Serial SimCoal: A population genetic model for data from multiple populations and points in time. *Bioinformatics* **21**, 1733–1734.
- Aquadro, C.F., Greenberg, B.D. (1983). Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* **103**, 287–312.
- Arribas Herrera, A., Bernard García, J. (1994). Catálogo de mamíferos pliocenos del yacimiento de Villarroy (La Rioja), en la colección del Museo Geominero. *Boletín Geológico y Minero* **105**(3), 14–26.
- Arx, M., Breitenmoser-Würsten, C., Zimmermann, F., Breitenmoser, U. (2004). Status and Conservation of the Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Europe in 2001. Bern: KORA.
- Awise, J.C., Walker, D. (1999). Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**(3), 992–995.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology* **13**(4), 729–744.
- Barnett, R., Yamaguchi, N., Shapiro, B., Ho, S.Y., Barnes, I., *et al.* (2014). Revealing the maternal demographic history of *Panthera leo* using ancient DNA and a spatially explicit genealogical analysis. *BMC evolutionary biology* **14**(1), 70.

- Beltrán, J.F., Rice, J.E., Honeycutt, R.L. (1996). Taxonomy of the Iberian lynx. *Nature*, **379**(6564), 407–408.
- Benayas, R., José, M., Scheiner, S.M. (2002). Plant diversity, biogeography and environment in Iberia: patterns and possible causal factors. *Journal of Vegetation Science* **13**(2), 245–258.
- Blasco, M-F. (1997). In the pursuit of game: The Mousterian cave site of Gabasa I in the Spanish Pyrenees. *Journal of Anthropological Research* **53**, 177–217.
- Bonifay, M-F. (1971). Carnivores quaternaires du Sud-Est de la France. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Nouvelle Série. A. XXI*, fasc. 2.
- Bonifay, M-F. (1978). Le gisement de la Baume de Valorgues à Saint-Quentin-la-Poterie (Gard). (Paléolithique supérieur final et Epipaléolithique) II. La grande faune. *Gallia Préhistoire* **21**(1), 123–142.
- Boscaini, A., Madurell-Malapeira, J., Llenas, M., Martínez-Navarro, B. (2015). The origin of the critically endangered Iberian lynx: Speciation, diet and adaptive changes. *Quaternary Science Reviews*, **123**, 247–253.
- Boule, M. (1906). Les grottes de Grimaldi. *Imprimerie de Monaco* **1**(4), 237–362.
- Boule, M. (1910). Géologie et paléontologie (suite). In: *Les grottes de Grimaldi (Baoussé-Roussé)*. (pp. 157–236). Villeneuve, L.de., Boule, M., Verneau, R., Cartailhac, E. (Eds). Monaco. 1.
- Boule, M., Villeneuve, L.de. (1927). La Grotte de L'Observatoire à Monaco. *Archives de l'Institut de Paléontologie Humaine*. Paris. 1, pp 113.
- Branco, M., Monnerot, M., Ferrand, N., Templeton, A.R. (2002). Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian Peninsula reconstructed from the nested glade and mismatch analyses. *Evolution* **56**, 792–803.
- Breitenmoser, U. (1998). Large predators in the Alps: the fall and rise of Man's Competitors. *Biological Conservation* **83**, 279–289.
- Breitenmoser, U., Breitenmoser-Würsten, C., Carbyn, L., Funk, S. (2001). Assessment of carnivore reintroductions. In: *Carnivore conservation*. (pp. 241–281). Gittleman, J.L., Funk, S.M., McDonald, D., Wyne, R.K. (Eds). Cambridge: Cambridge University Press.
- Breitenmoser, U., Breitenmoser-Würsten, C., Lanz, T., von Arx, M., Antonevich, A., *et al.* (2015). *Lynx lynx*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 August 2015.
- Breitenmoser, U., Breitenmoser-Würsten, C., Okarma, H., Kaphegyi, T., Kaphegyi-Wallmann, U., Müller, U.M. (2000). The action plan for the conservation of the Eurasian Lynx (*Lynx lynx*) in Europe. Nature and Environmental Series No. 112. Council of Europe Publishing, Strasbourg.
- Briggs, A.W., Stenzel, U., Johnson, P.L., Green, R.E., Kelso, J., *et al.* (2007). Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **104**, 14616–14621.
- Bronk Ramsey, C. (2009). Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon* **51**, 337–360.
- Brown, J.R., Beckenbach, A.T., Smith, M.J. (1993). Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molecular Biology and Evolution* **10**, 326–341.
- Brown, W.M., George, M. Jr., Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **76**, 1967–1971

- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **18**(4), 225–239.
- Cabrera, A. (1914). *Lynx pardellus* en: *Fauna Ibérica. Mamíferos*. (pp. 207–210). Miller. (Ed). Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.
- Callou, C. (1995). Modification de l'aire de répartition du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) en France et en Espagne, du Pléistocène à l'époque actuelle: État de la question. *Anthropozoologica* **21**, 95–114.
- Callou, C. (2002). De la garenne au clapier: étude archéozoologique du Lapin en Europe occidentale. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. (France)*. **189**, 1–358.
- Cardini, L. (1947). Gli strati mesolitici e paleolitici della Caverna della Arene Candide, Riv. Studi. Liguri, anno XII, (1946). **1–3**, 3–11.
- Carrión, J.S., Fernández, S., González-Sampériz, P., Gil-Romera, G., Badal, E., *et al.* (2010). Expected trends and surprises in the Lateglacial and Holocene vegetation history of the Iberian Peninsula and Balearic Islands. *Review of Palaeobotany and Palynology* **162**, 458–476.
- Casas-Marce, M., Soriano, L., López-Bao, J.V., Godoy, J.A. (2013). Genetics at the verge of extinction: insights from the Iberian lynx. *Molecular Ecology* **22**, 5503–5515.
- Cassoli, P.F., Tagliacozzo, A. (1994). I macromammiferi dei livelli tardopleistoceni delle Arene Candide (Savona, Italia): considerazioni paleontologiche e archeologiche. *Quaternaria Nova* **4**, 101–262.
- Castaños, P. (1982). Estudio de los macromamíferos del yacimiento prehistórico de Cueto de la Mina Asturias. *Boletín del Instituto de Estudios Asturianos* **105–106**, 43–86.
- Castaños, P. (1983). Estudio de los Macromamíferos del yacimiento prehistórico de Bolinkoba (Abadiño-Vizcaya). *Kobie* **13**, 261–298.
- Castaños, P. (1984). Estudio de los Macromamíferos de la Cueva de Santimamiñe (Vizcaya). *Kobie* **14**, 235–318.
- Castaños, P. (1986). Los macromamíferos del Pleistoceno y Holoceno de Vizcaya. Tesis Doctoral. Bilbao.
- Castaños, P. (1993). Estudio de los macromamíferos de la cueva de Urratxa III (Orozco, Bizkaia). *Kobie* **20**, 87–107.
- Castro, E.B. (1997). Los bosques ibéricos: una interpretación geobotánica. GeoPlaneta, Editorial, SA.
- Chaline, J., Brunet-Lecomte, P., Montuire, S., Viriot, L., Courant, F. (1999). Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. In: *Annales Zoologici Fennici*. (pp. 239–267). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Chaline, J., Graf, J.-D. (1988). Phylogeny of the Arvicolidae (Rodentia): Biochemical and paleontological evidence. *Journal of Mammalogy* **69**, 22–33.
- Clavero, M., Delibes, M. (2013). Using historical accounts to set conservation baselines: the case of *Lynx* species in Spain. *Biodiversity and conservation* **22**, 1691–1702.
- Clot, A. (1970). Le gouffre de Pène, commune de Montégut (Hautes-Pyrénées), Description et Faune. *Bulletin de la Société Ramond* **105**, 35–42.

- Clot, A. (1983). Le Lynx des Moustayous (Saint-Pé-de-Bigorre, Hautes-Pyrénées). *Bulletin Centre Aturien de Recherches sous Terre* **4**, 88–94.
- Clot, A. (1988). Faune magdalénienne de la grande grotte de Labastide (Hautes-Pyrénées, France). *Munibe* **40**, 21–44.
- Clot, A., Besson, J.P. (1974). Nouveaux restes osseux de Lynx dans les Pyrénées. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* **110**, 157–169.
- Clot, A., Evin, J. (1986). Gisements naturels pléistocènes et holocènes des cavités des Pyrénées Occidentales françaises: inventaire et datages 14C. *Munibe* **38**, 185–194.
- Conroy, C.J., Cook, J.A. (1999). MtDNA evidence for repeated pulses of speciation within arvicoline and murid rodents. *Journal of Mammalian Evolution*, **6**(3), 221–245.
- Cooper, A. (1994). DNA from museum specimens. In: *Ancient DNA*. (pp. 149–165). Springer New York.
- Cooper, A., Lalueza-Fox, C., Anderson, S., Rambaut, A., Austin, J., Ward, R. (2001) Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* **409**, 704–707.
- Cooper, A., Poinar, H. (2000). Ancient DNA: do it right or not at all [letter; comment]. *Science* **289**, 1139–1139.
- Cooper, A., Rhymer, J.D., James, H.F., Olson, S.L., McIntosh, C.E., *et al.* (1996). Ancient DNA and island endemics. *Nature* **381**, 484–484.
- Crandall, K., Bininda-Emonds, O., Mace, G., Wayne, R. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* **15**, 290–295.
- Croizet, J.B., Jobert A .C.G. (1828) Recherches sur les ossements fossiles du département du Puy-de-Dome.- 224 pp. 57 pls. Paris
- Cuenca-Bescós, G., López-García, J. M., Galindo-Pellicena, M. A., García-Perea, R., Gisbert, J., *et al.* (2014). Pleistocene history of *Iberomys*, an endangered endemic rodent from southwestern Europe. *Integrative Zoology* **9**(4), 481–497.
- Culver, M., Johnson, W.E., Pecon-Slattery, J., O'brien, S.J. (2000). Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). *Journal of Heredity* **91**(3), 186–197.
- Dabey, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M.T., Weihmann, A., *et al.* (2013). A complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultra-short DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **110**(39), 15758–15763.
- Dalén, L., Nyström, V., Valdiosera, C., Germonpre, M., Sablin, M., *et al.* (2007). Ancient DNA reveals lack of postglacial habitat tracking in the arctic fox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **104**, 6726–6729.
- Dalén, L., Orlando, L., Shapiro, B., Brandström-Durling, M., Quam, R., *et al.* (2012). Partial genetic turnover in Neandertals: continuity in the east and population replacement in the west. *Molecular Biology and Evolution* **29**(8), 1893–1897.
- Delibes, M. (1980). Feeding ecology of the Spanish lynx in the Coto Doñana (Huelva, Spain). *Acta Theriologica* **25**, 309–324.

- Delibes-Mateos, M., Delibes, M., Ferreras, P., Villafuerte, R. (2008). Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. *Conservation Biology*, **22**(5) 1106–1117.
- Den Tex, R-J, Maldonado, J.E., Thorington, R., Leonard, J.A. (2010). Nuclear copies of mitochondrial genes: another problem for ancient DNA. *Genetica* **138**, 979–984.
- Díaz de la Guardia, R., Pascual, L., Orozco, J.C. (1979). The karyotype of *Microtus cabreræ* Thomas, another species with giant chromosomes. *Experientia* **35**, 741.
- Driscoll, C.A., Menotti-Raymond, M., Nelson, G., Goldstein, D., O'Brien, S.J. (2002). Genomic Microsatellites as evolutionary chronometers: A test in wild cats. *Genome Research* **12**, 414–423.
- Edmands, S. (2007). Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* **16**, 463–475.
- Fernandes, C., Ginja, C., Pereira, I., Tenreiro, R., Bruford, M., Santos-Reis, M. (2008). Species-specific mitochondrial DNA markers for identification of non-invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. *Conservation Genetics* **9**, 681–690.
- Fernández, R., Barragán, M.J.L., Bullejos, M., Marchal, J.A., Martínez, S., *et al.* (2001). Molecular and cytogenetic characterization of highly repeated DNA sequences in the vole *Microtus cabreræ*. *Heredity* **87**, 637–46.
- Fernández, R., Barragán, M.J.L., Bullejos, M., Marchal, J.A., Martínez, S., *et al.* (2002). Mapping the SRY gene in *Microtus cabreræ*: a vole species with multiple SRY copies in males and females. *Genome* **45**, 600–603.
- Fernández-Salvador, R. (1998). Mamíferos de España. Topillo de Cabrera, *Microtus cabreræ* Thomas 1906. *Galemys* **10** (2), 5–18.
- Fernández-Salvador, R. (2007). *Microtus cabreræ* Thomas, 1906. In: *Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España*. (pp. 429–432). Palomo, L.J., Gisbert, J., Blanco, J.C. (Eds). Dirección General para la Biodiversidad–SECEM–SECEMU, Madrid.
- Fernández-Salvador, R., García-Perea, R., Ventura, J. (2001). Reproduction and postnatal growth of the Cabrera vole, *Microtus cabreræ*, in captivity. *Canadian Journal of Zoology* **79**, 2080–2085.
- Ferrer, M., Negro, J.J. (2004). The near extinction of two large European predators: super specialists pay a price. *Conservation Biology* **18**, 344–349.
- Ferreras, P. (2001). Landscape structure and asymmetrical inter-patch connectivity in a metapopulation of the endangered Iberian lynx. *Biological Conservation* **100**(1), 125–136.
- Ferreras, P., Delibes, M., Palomares, F., Fedriani, J. M., Calzada, J., Revilla, E. (2004). Proximate and ultimate causes of dispersal in the Iberian lynx *Lynx pardinus*. *Behavioral Ecology* **15**(1), 31–40.
- Ferreras, P., Rodríguez, A., Palomares, F., Delibes, M. (2010). Iberian lynx: the uncertain future of a critically endangered cat. In: *Biology and conservation of wild felids*. (pp. 507–520). Macdonald, D.W., Loveridge, J.A. (Eds). Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Ficcarelli, G., Torre, D. (1977). Phyletic relationships between *Lynx* group *issiodorensis* and *Lynx pardina*. *Bolletino della Società Paleontologica Italiana* **16**(2), 197–202.

- Fink, S., Fischer, M.C., Excoffier, L., Heckel, G. (2010). Genomic scans support repetitive continental colonization events during the rapid radiation of voles (Rodentia: *Microtus*): the utility of AFLPs versus mitochondrial and nuclear sequence markers. *Systematic biology*, **59**(5), 548–572.
- Finlayson, C., Carrion, J.S. (2007). Rapid ecological turnover and its impact on Neanderthal and other human populations. *Trends in Ecology & Evolution* **22**(4), 213–222.
- Fordham, D.A., Akçakaya, H.R., Brook, B.W., Rodríguez, A., Alves, P.C., *et al.* (2013). Adapted conservation measures are required to save the Iberian lynx in a changing climate. *Nature Climate Change* **3**, 899–903.
- Frankham, R. (1995). Conservation genetics. *Annual review of genetics* **29**(1), 305–327.
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction (Review). *Biological Conservation* **126**, 131–140.
- Frankham, R. (2012). How closely does genetic diversity in finite populations conform to predictions of neutral theory; Large deficits in regions of low recombination. *Heredity* **108**(3), 167–178.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2002). Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham, R., Kingslover, J.G. (2004). Response to environmental change: Adaptation or extinction. In: *Evolutionary Conservation Biology*. (pp. 85–100). Ferrier, R., Dieckman, U., Couvet, D. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge.
- Franklin, I.R., Frankham, R. (1998). How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation* **1**(01), 69–70
- Fuentes, D., Virgós, E., García-Perea, R., Garrido-García, J.A., Gisbert, J. (2013). Comparativa de métodos para estimas de regresión en el iberón (*Iberomys cabreræ*): implicaciones para su conservación. *XI Congreso SECEM*, Aviles. Poster inédito.
- García, N. (2003). *Osos y otros carnívoros de la Sierra de Atapuerca*. Fundación Oso de Asturias.
- García, N., Arsuaga, J.L. (1998). The carnivore remains from the hominid-bearing Trincheras-Galería, Sierra de Atapuerca, Middle Pleistocene site (Spain). *Géobios* **31**, 659–674.
- García, N., Arsuaga, J.L., Torres, T. (1997). The carnivore remains from the Sima de los Huesos Middle Pleistocene site (Sierra de Atapuerca, Spain). *Journal Of Human Evolution* **33**, 155–174.
- Garrido-García, J.A., Rosário, I.T., Gisbert, J., García-Perea, R., Cordero, A.I., *et al.* (2013). Revisión a nivel ibérico de la distribución del topillo de Cabrera o iberón, *Iberomys cabreræ* (Thomas, 1906). *Galemys* **25**, 35–49.
- Garrido-García, J.A., Soriguer R.C. (2014). Mapa de distribución de *Iberomys cabreræ* en la península ibérica: actualización a 30/9/2014 y base de datos. Documento Inédito. Estación Biológica de Doñana, Sevilla
- Gay, S.W., Best, T.L. (1996). Relationships between abiotic variables and geographic variation in skulls of pumas (*Puma concolor*: Mammalia, Felidae) in North and South America. *Zoological Journal of the Linnean Society* **117**(3), 259–282.
- Ghezzi, E., Boscaini, A., Madurell-Malapeira, J., Rook, L. (2014). Lynx remains from the Pleistocene of Valdemino cave (Savona, Northwestern Italy), and the oldest occurrence of *Lynx spelæus* (Carnivora, Felidae). *Rendiconti Lincei* 1–9.

- Gilbert, M. T. P., Bandelt, H. J., Hofreiter, M., Barnes, I. (2005). Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology & Evolution* **20**(10), 541–544.
- Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Willerslev, E., Rudbeck, L., Barnes, I., *et al.* (2003a) Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *The American Journal of Human Genetics* **72**, 48–61.
- Gilbert, M.T.P., Willerslev, E., Hansen, A.J., Barnes, I., Rudbeck, L., *et al.* (2003b) Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *The American Journal of Human Genetics* **72**, 32–47.
- Gil-Sánchez, J.M., Ballesteros-Duperon, E., Bueno-Segura, J.F. (2006). Feeding ecology of the Iberian lynx *Lynx pardinus* in eastern Sierra Morena (Southern Spain). *Acta Theriologica* **51**, 85–90.
- Gil-Sanchez, J.M., McCain, E.B. (2011). Former range and decline of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) reconstructed using verified records. *Journal of Mammalogy* **92**, 1081–1090.
- Gisbert, J., García-Perea, R. (2013). Bases para la conservación del Topillo de Cabrera, o Iberón (*Iberomys cabreræ*), en España. Actividades 2012-13. Informe Inédito. Galemia/Fundación Biodiversidad.
- Godoy, J.A., Casas-Marcé, M., Fernández, J. (2009). Genetic issues in the implementation of the Iberian Lynx ex situ conservation programme. (pp. 42–55). In: *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. Vargas, A., Breitenmoser, C.H., Breitenmoser, U. (Eds). Fundación Biodiversidad, Madrid.
- Goldstein, P.Z., DeSalle, R. (2003). Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. *Molecular Ecology* **12**, 1993–1995.
- Graells, M.P. (1897) *Felis pardina* (Temminck). Fauna mastodológica ibérica. Memorias Real Academia Ciencias, XVII, 224–229.
- Grayson, D.K., Delpech, F. (1994). The evidence for Middle Palaeolithic scavenging from Couche VIII, Grotte Vaufray (Dordogne, France). *Journal of Archaeological Science* **21**, 359–375.
- Grayson, D.K., Delpech, F. (1998). Changing diet breadth in the early Upper Paleolithic of southwestern France. *Journal of Archaeological Science* **25**, 1119–1129.
- Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic, T., Stenzel, U., *et al.* (2010). A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* **328**(5979), 710–722.
- Green, R.E., Krause, J., Ptak, S.E., Briggs, A.W., Ronan, M.T., *et al.* (2006) Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* **444**, 330–336.
- Griffith, B., Scott, J.M., Carpenter, J.W., Reed, C. (1989). Translocation as a species conservation tool: Status and strategy. *Science* **245**, 477–480.
- Gugolz, D., Bernasconi, M.V., Breitenmoser-Wursten, C., Wandeler, P. (2008). Historical DNA reveals the phylogenetic position of the extinct Alpine lynx. *Journal of Zoology (London)* **275**, 201–208.
- Guilaine, J., Rencoule, G., Vaquer, J., Passelac, M., Vigne, J.D. (1986). Carsac une agglomération protohistorique en Languedoc. Centre d'Anthropologie des Sociétés Rurales, Toulouse.
- Guzmán, J.N., García, F., Garrote, G., Ayala, R., Iglesias, C. (2004) El lince ibérico (*Lynx pardinus*) en España y Portugal. Censo-diagnóstico de sus poblaciones. Dirección General para la Biodiversidad. Madrid.
- Hagelberg, E., Sykes, B., Hedges, R. (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature* **342**, 485–485.

- Hansen, A., Willerslev, E., Wiuf, C., Mourier, T., Arctander, P. (2001). Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 262–265.
- Hellborg, L., Walker, C.W., Rueness, E.K., Stacy, J.E., Kojola, I., *et al.* (2002). Differentiation and levels of genetic variation in northern European lynx (*Lynx lynx*) populations revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. *Conservation Genetics* **3**, 97–111.
- Hemmer, H. (1993a). *Felis (Lynx) lynx* (Linnaeus, 1758) – Nordluchs. In *Handbuch der Säugetiere Europas*. (pp. 1119–1167). Niethammer, J., Krapp, F. (Eds). Wiesbaden: Aula-Verlag.
- Hemmer, H. (1993b). *Felis pardina* (Temminck, 1827) – Pardelluchs. In *Handbuch der Säugetiere Europas*. (pp. 1168–1187). Niethammer, J., Krapp, F. (Eds). Wiesbaden: Aula-Verlag.
- Hemmer, H. (2001). Die Feliden aus dem Epivillafranchium von Untermassenfeld. In: *Das Pleistozön von Untermassenfeld bei Meiningen (Thüringer)*. (pp. 699–782). Kahlke, R.-D. (Ed). Bonn: R. Habelt.
- Hendey, Q.B. (1974). The late Cenozoic Carnivora of the south-western Cape Province (Vol. 63). South African Museum.
- Hetherington, D.A., Lord, T.C., Jacobi, R.M. (2006). New evidence for the occurrence of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in medieval Britain. *Journal of Quaternary Science* **21**, 3–8.
- Hewitt, G.M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society* **58**, 247–276.
- Hewitt, G.M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **359**, 183–195.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O.A., Wilson, A.C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* **312**, 282–284.
- Hoelzel, A.R., Dover, G.A. (1991). Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology and Evolution* **8**, 475–493.
- Hofreiter, M. (2008). Long DNA sequences and large data sets: investigating the Quaternary via ancient DNA. *Quaternary Science Reviews* **27**, 2586–2592.
- Hofreiter, M., Barnes, I. (2010). Diversity lost: are all Holarctic large mammal species just relict populations? *BMC biology* **8**(1), 46.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M., Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics* **2**, 353–359.
- Hofreiter, M., Serre, D., Rohland, N., Rabeder, G., Nagel, D., *et al.* (2004). Lack of phylogeography in European mammals before the last glaciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**, 12963–12968.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T.H., Dizdaroglu, M., Pääbo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic acids research* **24**, 1304–1307.
- Iriarte, J.A., Redford, K.H., Franklin, W.L., Johnson, W.E., 1990. Biogeographic variation of food habits and body size of the American puma (*Felis concolor*). *Oecologia* **82**, 185–190.

IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 12 May 2015.

Jaarola, M., Martínková, N., Gündüz, İ., Brunhoff, C., Zima, J., *et al.* (2004). Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**, 647–663.

Jae-Heup, K., Eizirik, E., O'Brien, S.J., Johnson, W.E. (2001). Structure and patterns of sequence variation in the mitochondrial DNA control region of the great cats. *Mitochondrion* **1**(3), 279–292.

Johns, G.C., Avise, J.C. (1998). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 1481–1490.

Johnson, W.E., Godoy, J.A., Palomares, F., Delibes, M., Fernandes, M., *et al.* (2004). Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *Journal of Heredity* **95**, 19–28.

Johnson, W.E., Eizirik, E., Pecon-Slattery, J., Murphy, W.J., Antunes, A., *et al.* (2006). The Late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science* **311**, 73–77.

Kahlke, R.-D. (1999). The History of the Origin, Evolution and Dispersal of the Late Pleistocene Mammuthus-Coelodonta Faunal Complex in Eurasia (Large Mammals). Fenske Companies, Rapid City.

Keller, L.F., Arcese, P., Smith, J.N.M., Hochachka, W.M., Stearns, S.C. (1994). Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature* **372**, 356–357.

Kratochvil, J. (1968). History of the distribution of the lynx in Europe. *Acta Science of Nature Brno* **2**, 1–50.

Krause, J., Dear, P.H., Pollack, J.L., Slatkin, M., Spriggs, H., *et al.* (2006). Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* **439**, 724–727.

Kurten, B. (1968). Pleistocene mammals of Europe Weidenfeld and Nicholson, London.

Kurtén, B. (1978). The lynx from Etouaires, *Lynx issiodorensis* (Croizet & Jobert), late Pliocene. In: *Annales Zoologici Fennici* (pp. 314–322). Finnish Academy of Sciences, Societas Scientiarum Fennica, Societas pro Fauna et Flora Fennica and Societas Biologica Fennica Vanamo.

Kurtén, B., Granqvist, E. (1987). Fossil pardel lynx (*Lynx pardina spelaea* Boule) from a cave in southern France. *Annales Zoologici Fennici* **24**, 39–43.

Kurtén, B., Crusafont, M.P. (1977). *Villafranchian Carnivores (mammalia) from la puebla de Valverde (Teruel, Spain)*.

Laplana, C., Sevilla, P. (2013). Documenting the biogeographic history of *Microtus cabreræ* through its fossil record. *Mammal Review* **43**(4), 309–322.

Lareu, M.V., Salas, A. (2000). Mitochondrial DNA analysis in forensic genetics. In: *Handbook of Analytical Separation*. Vol 2. (pp. 707–720). Bogusz, M.J. (Ed). Elsevier Science Amsterdam

Leonard, J.A. (2008). Ancient DNA applications for wildlife conservation. *Molecular Ecology* **17**, 4186–4196.

Leroy, S.A., Arpe, K. (2007). Glacial refugia for summer-green trees in Europe and south-west Asia as proposed by ECHAM3 time-slice atmospheric model simulations. *Journal of Biogeography* **34**(12), 2115–2128.

Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709–715.

- Lopez, J.V., Cevario, S., O'Brien, S.J. (1996). Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (Numt) in the nuclear genome. *Genomics* **33**, 229–246.
- Lopez, J.V., Culver, M., Stephens, J.C., Johnson, W.E., O'Brien, S.J. (1997). Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 277–286.
- López-Martínez, N. (2003). La búsqueda del centro de origen en biogeografía histórica. *Graellsia* **59**, 503–522.
- López-Martínez, N. (2008). The lagomorph fossil record and the origin of the European rabbit. In: *Lagomorph biology Evolution, ecology and conservation*. (pp. 27–46). Alves, P.C., Ferrand, N., Hackländer, K. (Eds). Springer Berlin Heidelberg, Berlin.
- Lorenzen, E.D., Nogués-Bravo, D., Orlando, L., Weinstock, J., Binladen, J., *et al.* (2011). Species-specific responses of Late Quaternary megafauna to climate and humans. *Nature*, **479**(7373), 359–364.
- Lorfèvre, F. (2009). Les Lynx Plio-Pléistocènes: examen critique de leur phylogénie et intérêt paléoenvironnemental. Dissertation, Université Bordeaux I
- MacFadden, B.J., Galiano, H. (1981). Late Hemphillian cat (Mammalia, Felidae) from the Bone Valley Formation of central Florida. *Journal of Paleontology* **55**, 218–226.
- Mallinson, J. (1978). Lynxes. European lynx (*Lynx lynx*) and pardel lynx (*Lynx pardina*). In: *The shadow of extinction*. (pp. 141–148). MacMillan, London.
- Mardis, E.R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **9**, 387–402.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., *et al.* (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376–380.
- Marker, L.L., Wilkerson, A.J.P., Sarno, R.J., Martenson, J., Breitenmoser-Wuersten, C., *et al.* (2008). Molecular genetic insights on cheetah (*Acinonyx jubatus*) ecology and conservation in Namibia. *Journal of Heredity* **99**, 2–13.
- Martin, A.P., Palumbi, S.R. (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**(9), 4087–4091.
- Martin, L.D. (1989). Fossil history of the terrestrial Carnivora. In: *Carnivore Behaviour, Ecology, and Evolution*. (pp. 536–568). Gittleman, J.L. (Ed). Cornell University Press Ithaca, NY.
- Maruyama, T., Imai, H.T. (1981). Evolutionary rate of the mammalian karyotype. *Journal of theoretical biology* **90** (1), 111–121.
- Masuda, R., Yoshida, M.C., Shinyashiki, F., Bando, G. (1994). Molecular phylogenetic status of the iriomote cat *Felis iriomotensis*, inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. *Zoological Science* **11**, 597–604.
- Mathias, M.L., Klunder, M., Santos, S.M. (2003). Metabolism and thermoregulation in the Cabrera vole (Rodentia: *Microtus cabreræ*). *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* **136**, 441–6.
- Médail, F., Diadema, K. (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography* **36**(7), 1333–1345.

- Mestre, F., Pita, R., Paupério, J., Martins, F.M.S., Alves, P.C., *et al.* (2015). Combining distribution modelling and non-invasive genetics to improve range shift forecasting. *Ecological Modelling* **207**, 171–179.
- Meyer, M., Fu, Q., Aximu-Petri, A., Glocke, I., Nickel, B., *et al.* (2014). A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. *Nature* **505**(7483), 403–406.
- Meyer, M., Kircher, M., Gansauge, M.T., Li, H., *et al.*, (2012). A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science* **338**(6104), 222–226.
- Mira, A., Marques, C.C., Santos, S.M., Rosário I.T., Mathias, M.L. (2008). Environmental determinants of the distribution of the Cabrera vole (*Microtus cabrerae*) in Portugal: Implications for conservation. *Mammalian Biology* **73**(2), 102–110.
- Mitchell, D., Willerslev, E., Hansen, A. (2005). Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **571**, 265–276.
- Modi, William S. (1987). Phylogenetic analyses of chromosomal banding patterns among the Nearctic Arvicolidae (Mammalia: Rodentia). *Systematic Biology* **36**(2), 109–136.
- Morales, J., Soria, D., Montoya, P., Pérez, B., Salesa, M.J. (2003). *Caracal depereti* nov. sp. y *Felis* aff. *silvestris* (Felidae, Mammalia) del Plioceno inferior de Layna (Soria, España). *Estudios geológicos* **59**(1–4), 229–247.
- Moritz, C. (1994). Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **9**, 373–375.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335–350.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T., Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series* 17–17.
- Musser, G.G., Carleton, M.D. (2005). Superfamily Muroidea. In: *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. (pp. 894–1531). Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds). 3th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Neff, N. (1983). *The big cats: the paintings of Guy Coheleach*. New York: Harry N. Abrams.
- Noonan, J.P., Coop, G., Kudaravalli, S., Smith, D., Krause, J., *et al.* (2006). Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science* **314**, 1113–1118.
- Noonan, J.P., Hofreiter, M., Smith, D., Priest, J.R., Rohland, N., *et al.* (2005). Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* **309**, 597–599.
- Nores, C. (1999). ¿Es el Lobo Cerval un lince Boreal (*Lynx lynx*)? Actas de las IV Jornadas Españolas de Conservación y Estudio de Mamíferos SECEM, Segovia: 87.
- Nores, C., Vázquez, V.M. (1984). Datos sobre la presencia del lince en Asturias desde el siglo XVIII. *Acta Biologica Montana* **4**, 361–370.
- Nowak, R.M. (1991). Walker's mammals of the world. 5th ed. Baltimore (MD): Johns Hopkins University Press.
- Nowell, K., Jackson, P. (1996). Wild cats: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN publications. Cambridge: Burlington Press.

- O'Brien, S.J., Wildt, D.E., Goldman, D., Merrill, C.R., Bush, M. (1983). The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science* **221**, 459–462.
- Orlando, L., Ginolhac, A., Zhang, G., Froese, D., Albrechtsen, A., *et al.* (2013). Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* **499** (7456), 74–78.
- Orlando, L., Leonard, J.A., Thenot, A., Laudet, V., Guerin, C., Hänni, C. (2003). Ancient DNA analysis reveals woolly rhino evolutionary relationships. *Molecular phylogenetics and evolution* **3**, 485–499.
- Pääbo, S. (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**, 1939–1943.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J. *et al.* (2004). Genetic Analyses from Ancient DNA. *Annual Review of Genetics* **38**, 645–679.
- Packer, C., Pusey, A.E., Rowley, H., Gilbert, D.A., Martenson, J., O'Brien, S.J. (1991). Case study of a population bottleneck - lions of the Ngorongoro Crater. *Conservation Biology* **5**, 219–230.
- Palomares, F. (2001). Vegetation structure and prey abundance requirements of the Iberian lynx: implications for the design of reserves and corridors. *Journal of Applied Ecology* **38**, 9–18.
- Palomares, F., Caro, T.M. (1999). Interspecific killing among mammalian carnivores. *The American Naturalist* **153**(5), 492–508.
- Palomares, F., Delibes, M., Ferreras, P., Fedriani, J.M., Calzada, J., Revilla, E. (2000). Iberian lynx in a fragmented landscape: pre-dispersal, dispersal and post-dispersal habitats. *Conservation Biology* **14**, 809–818.
- Palomares, F., Delibes, M., Revilla, E., Calzada, J., Fedriani, J.M. (2001). Spatial ecology of Iberian lynx and abundance of European rabbits in southwestern Spain. *Wildlife Monographs* **148**, 1–36.
- Palomares, F., Ferreras, P., Fedriani, J.M., Delibes, M. (1996). Spatial relationships between Iberian lynx and other carnivores in an area of south-western Spain. *Journal of Applied Ecology* **33**, 5–13.
- Palomares, F., Gaona, P., Ferreras, P., Delibes, M. (1995). Positive effects on game species of top predators by controlling smaller predator populations: an example with lynx, mongooses, and rabbits. *Conservation Biology* **9**, 295–305.
- Palomares, F., Godoy, J.A., López-Bao, J.V., Rodríguez, A., Roques, S., *et al.* (2012). Possible extinction vortex for a population of Iberian lynx on the verge of extirpation. *Conservation Biology* **26**(4), 689–697.
- Palomares, F., Godoy, J.A., Piriz, A., O'Brien, S.J., Johnson, W.E. (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., Revilla, E., Calzada, J., Fernández, N., Delibes, M. (2005). Reproduction and pre-dispersal survival of Iberian lynx in a sub-population of the Doñana National Park. *Biological Conservation* **122**, 53–59.
- Palomares, F., Rodríguez, A., Revilla, E., López-Bao, J.V., Calzada, J. (2011). Assessment of the conservation efforts to prevent extinction of the Iberian lynx. *Conservation Biology* **25**, 4–8.
- Pita, R., Mira, A., Beja, P. (2014). *Microtus cabreræ* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalian Species*, **46**(912), 48–70.

- Poinar, H.N., Schwarz, C., Qi, J., Shapiro, B., MacPhee, R.D., *et al.* (2006). Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* **311**(5759), 392–394.
- Ramakrishnan, U.M.A., Hadly, E. A. (2009). Using phylochronology to reveal cryptic population histories: review and synthesis of 29 ancient DNA studies. *Molecular Ecology* **18**(7), 1310–1330.
- Ratkiewicz, M., Matosiuk, M., Kowalczyk, R., Konopinski, M.K., Okarma, H., *et al.* (2012). High level of population differentiation in Eurasian lynx at the edge of the species western range in Europe revealed by mitochondrial DNA analysis. *Animal Conservation* **15**, 603–612.
- Ratkiewicz, M., Matosiuk, M., Saveljev, A. P., Sidorovich, V., Ozolins, J., *et al.*, (2014). Long-Range Gene Flow and the Effects of Climatic and Ecological Factors on Genetic Structuring in a Large, Solitary Carnivore: The Eurasian Lynx. *PLoS one* **9**(12), e115160.
- Reimer, P.J., Bard, E., Bayliss, A., Beck, J.W., Blackwell, P.G., *et al.* (2013). IntCal13 and Marine13 Radiocarbon Age Calibration Curves 0-50,000 Years cal BP. *Radiocarbon* **55**, 1869–1887.
- Rivas-Martínez, S. (1987). Memoria del mapa de series de vegetación de España. ICONA, Serie Técnica. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- Rodríguez, A., Delibes, M. (1992). Current range and status of the Iberian lynx *Felis pardina* Temminck, 1824 in Spain. *Biological Conservation* **61**, 89–196.
- Rodríguez, A., Delibes, M. (2002). Internal structure and patterns of contraction in the geographic range of the Iberian lynx. *Ecography* **25**, 314–328.
- Rodríguez, R., Ramírez, O., Valdiosera, C.E., García, N., Alda, F., *et al.* (2011). 50,000 years of genetic uniformity in the critically endangered Iberian lynx. *Molecular Ecology* **20**, 3785–3795.
- Rodríguez-Varela, R., García, N., Nores, C., Álvarez-Lao, D., Barnett, R., *et al.*, (2015b). Ancient DNA reveals past existence of Eurasian lynx in Spain. *Journal of Zoology (London)* (DOI: 10.1111/jzo.12289).
- Rodríguez-Varela, R., Tagliacozzo, A., Ureña, I., García, N., Crégut-Bonnoure, E., *et al.* (2015a). Genetic evidence of Iberian lynx palaeoendemism. *Quaternary Science Reviews* **112**, 172–180.
- Roelke, M.E., Martenson, J.S., O'Brien, S.J. (1993). The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida Panther. *Current Biology* **3**, 340–350.
- Rogaev, E.I., Moliaka, Y.K., Malyarchuk, B.A., Kondrashov, F.A., Derenko, M.V., *et al.* (2006). Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene Mammoth *Mammuthus primigenius*. *PLoS Biol* **4**, e73.
- Rohland, N., Malaspinas, A. S., Pollack, J. L., Slatkin, M., Matheus, P., Hofreiter, M. (2007). Proboscidean mitogenomics: chronology and mode of elephant evolution using mastodon as outgroup. *PLoS Biol* **5**, 1663–1671.
- Rueness, E.K., Naidenko, S., Trosvik, P., Stenseth, N.C. (2014). Large-Scale Genetic Structuring of a Widely Distributed Carnivore - The Eurasian Lynx (*Lynx lynx*). *PLoS ONE* **9**, e93675. doi:10.1371/journal.pone.0093675.
- Ruiz, G., López, M., Fernández, L., Franco, J.A., López, G., Simón, M.A. (2009). Short communication on the first Iberian lynx translocation from Sierra Morena to the Doñana population. In: *Iberian Lynx ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. (pp. 445–447). Vargas, A., Breitenmoser, C.H., Breitenmoser, U. (Eds). Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.

- Ruiz-López, M.J., Ganan, N., Godoy, J.A., Del Olmo, A., Garde, J., *et al.* (2012). Heterozygosity-Fitness Correlations and Inbreeding Depression in Two Critically Endangered Mammals. *Conservation Biology* **26**(6), 1121–1129.
- Rustioni, M., Sardella, R., Rook, L. (1995). Note sulla distribuzione e sulla tassonomia del genere *Lynx* in Italia. *Padusa* **1**, 359–364.
- Ryder, O.A. (1986). Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution* **1**, 9–10.
- Sánchez Gonñi, M.F., d'Errico, F. (2005). La historia de la vegetación y el clima del último ciclo climático (OIS 5–OIS 1, 140,000–10,000 años BP) en la Península Ibérica y su posible impacto para los grupos paleolíticos. Museo de Altamira, Santander. *Monografías* **20**, 115–129.
- Sawyer, S., Krause, J., Guschanski, K., Savolainen, V., Pääbo, S. (2012). Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA. *PloS one*, **7**(3), e34131-e34131.
- Schmidt, K. (1998). Maternal behaviour and juvenile dispersal in the Eurasian lynx. *Acta Theriologica* **43**, 391–408.
- Schmidt, K., Ratkiewicz, M., Konopinski, M.K. (2011). The importance of genetic variability and population differentiation in the Eurasian lynx *Lynx lynx* for conservation, in the context of habitat and climate change. *Mammal Review* **41**, 112–124.
- Schwartz, M.K., Pilgrim, K.L., McKelvey, K.S., Lindquist, E.L., Claar J.J., *et al.* (2004). Hybridization between Canada lynx and bobcats: Genetic results and management implications Canada lynx. *Conservation Genetics* **6**, 349–355.
- Shapiro, B., Drummond, A.J., Rambaut, A., Wilson, M.C., Matheus, P.E., *et al.* (2004). Rise and fall of the Beringian steppe bison. *Science* **306**, 1561–1565.
- Shepherd, L.D., Lambert, D.M. (2008). Ancient DNA and conservation: lessons from the endangered kiwi of New Zealand. *Molecular Ecology* **17**, 2174–2184.
- Simón, M.A., Cadenas, R., Gil-Sánchez, J.M., López-Parra, M., García, J., *et al.* (2009). Conservation of free-ranging Iberian lynx (*Lynx pardinus*) populations in Andalusia. In: *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp. 43–55). Vargas, A., *et al.* (Eds). Fundación Biodiversidad, Madrid.
- Simón, M.A., Gil-Sánchez, J.M., Ruiz, G., Garrote, G., McCain, E.B., *et al.* (2012). Reverse of the decline of the endangered Iberian lynx. *Conservation Biology* **26**(4), 731–736.
- Smith, C.I., Chamberlain, A.T., Riley, M.S., Cooper, A., Stringer, C.B., Collins, M.J. (2001). Neanderthal DNA. Not just old but old and cold? *Nature* **410**, 771–772.
- Smith, C.I., Chamberlain, A.T., Riley, M.S., Stringer, C., Collins, M.J. (2003). The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *Journal of Human Evolution* **45**, 203–217.
- Smulders, M., Snoek, L., Booy, G., Vosman, B. (2003). Complete loss of MHC genetic diversity in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) population in The Netherlands. Consequences for conservation strategies. *Conservation Genetics* **4**, 441–451.
- Sommer, R.S., Benecke, N. (2006). Late Pleistocene and Holocene development of the felid fauna (Felidae) of Europe: a review. *Journal of Zoology (London.)* **269**, 7–19.

- Sommer, R.S., Nadachowski, A. (2006). Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review* **36**, 251–265.
- Stiller, M., Green, R.E., Ronan, M., Simons, J.F., Du, L., *et al.* (2006). Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**, 13578–13584.
- Taberlet, P., Bouvet, J. (1994). Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **255**, 195–200.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G., Cosson, J.F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453–464.
- Tagliacozzo, A., Cassoli, P.F. (1993). La macrofaune del l'Abri Soman (Val d'Adige - Italie). *Prehistoria Alpina* **28**, 181–192.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Testu, A. (2006). Etude paléontologique et biostratigraphique des Felidae et Hyaenidae pléistocènes de l'Europe méditerranéenne. Ph.D. dissertation, Université de Perpignan.
- Thomas, C.D. (2011). Translocation of species, climate change, and the end of trying to recreate past ecological communities. *Trends in Ecology & Evolution* **26**, 216–221.
- Triant, D.A. DeWoody, J.A. (2006). Accelerated molecular evolution in *Microtus* (Rodentia) as assessed via complete mitochondrial genome sequences. *Genetica*, **128**(1–3), 95–108.
- Valdiosera, C., García, N., Dalén, L., Smith, C., Kahlke, R. D., *et al.* (2006). Typing single polymorphic nucleotides in mitochondrial DNA as a way to access Middle Pleistocene DNA. *Biology letters* **2**(4), 601–603.
- Valdiosera, C.E., García, N., Anderung, C., Dalén, L., Crégut-Bonnoure, E., *et al.* (2007). Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Molecular Ecology* **16**, 5140–5148.
- Valdiosera, C.E., García-Garitaigotia, J.L., García, N., Doadrio, I., Thomas, M.G., *et al.* (2008). Surprising migration and population size dynamics in ancient Iberian brown bears (*Ursus arctos*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **105**, 5123–5128.
- Vale-Gonçalves, H.M., Cabral, J.A. (2014). New records on the distribution of three rodent species in NE Portugal from barn owl (*Tyto alba*) diet analysis. *Galemys* **26**, 100–104.
- Valensi, P. (1994). Les grands mammifères de la grotte du Lazaret, Nice. Etude paléontologique et biostratigraphique des Carnivores. Archéozoologie des grandes faunes. PhD thesis, National Museum of Natural History, Paris.

- Valensi, P., Psathi, E. (2004). Faunal exploitation during the Middle Palaeolithic in South-eastern France and North-western Italy. *International Journal of Osteoarchaeology* **14**, 256–272.
- Vargas, A., Sanchez, I., Martinez, F., Rivas, A., Godoy, J.A., *et al.* (2008). The Iberian lynx *Lynx pardinus* Conservation Breeding Program. *International Zoo Yearbook* **42**, 190–198.
- Ventura, J., López-Fuster, M.J., Cabrera-Millet, M. (1998). The Cabrera vole, *Microtus cabrerae*, in Spain: a biological and morphometrical approach. *Netherland Journal of Zoology* **47**, 1–18.
- Vigne, J.D. (1996). La faune des vertébrés. In: *Le Laouret et la Montagne d'Alaric à la fin de l'âge du Bronze. Un hameau abandonné entre Floure et Monze (Aude)* (pp. 197–239) Gasco, J. (Ed). Centre d' Anthropologie, Toulouse.
- Vigne, J.D., Pascal, M. (2003). Le Lynx pardelle *Lynx pardinus* (Temnick, 1827). In: *Evolution de la Faune de Vertebres en France Metropolitaine depuis le debut de Holocene. Invasions et Extinctions*. (pp. 87–89). Pascal, M., Lorvelec, O., Vigne, J.D., Keith, P., Clergeau, P. (Eds). Institut National de la Recherche Agronomique, Museum National d'Histoire Naturelle de Paris.
- Viret, J. (1954). Le loess a bancs durcis de Saint-Vallier (Drome) et sa faune de mammifères villafranchiens. *Nouvelles Archives du Museum D'Histoire Naturelle De Lyon* **4**, 1–200
- Vuletic, A. (1953). Brèche diluviale osseuse à Marjan. *Biljeske* **7**, 1–3.
- Wandeler, P., Hoeck, P.E., Keller, L.F. (2007). Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **22**(12), 634–642.
- Waples, R. (1991) Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of species under the endangered species act. *Marine Fisheries Review* **53**, 11–22.
- Werdelin, L. (1981). The evolution of lynxes. *Finnish Academy of Sciences, Societas Scientiarum Fennica, Societas pro Fauna et Flora Fennica and Societas Biologica Fennica Vanamo* **18**, 37–71.
- Wiggington, J.D., Dobson, F.S. (1999). Environmental influences on geographic variation in body size of western bobcats. *Canadian Journal of Zoology* **77**, 802–813.
- Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M.B. *et al.*, (2007). Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *Science* **317**, 111–114.
- Yang, D., Eng, B., Wayne, J., Dudar, J. & Saunders, S. (1998). Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology* **105**, 539–54.
- Yom-Tov, Y., Yom-Tov, S., MacDonald, D., Yom-Tov, E. (2007). Population cycles and changes in body size of the lynx in Alaska. *Oecologia* **152**, 239–244.
- Young, S.P., Goldman, E.A. (1946). The puma, mysterious American cat. Washington, DC: American Wildlife Institute.
- Zheng, S.-H., Zhang, Z.-Q. (2000). Late Miocene–Early Pleistocene micromammals from Wenwanggou of Lingtai, Gansu, China. *Vertebrata Palasiatica* **38**, 58–71.
- Zima, J., Král, B. (1984). Karyotypes of European mammals II. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae Brno* **18**, 1–62

10. Participación en otros artículos publicados durante el desarrollo de la tesis

Valdiosera, C.V., *et al.* (2011). El ADN antiguo aplicado a contextos arqueopaleontológicos: el caso de la cueva de Arlanpe (Lemoa, Bizkaia). *Munibe Antropologia-Arkeologia* **62**, 49-63.

Raghavan, M., *et al.* (2015). Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. *Science* **349**(6250), aab3884.

Günther, T., *et al.* (2015). Ancient Genomes link early farmers from Atapuerca in Spain to modern-day Basques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (doi:10.1073/pnas.1509851112).

