



DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID



**MEMORIA DE LOS TRABAJOS CORRESPONDIENTES AL CONTRATO
MENOR**

Expediente nº 16MNSV002

**“CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE LINCE IBÉRICO (*Lynx
pardinus* Temminck, 1827) EN EL ENTORNO DE LA SIERRA DE
GUADARRAMA”**

Madrid, 2016



Equipo de Trabajo:

Germán Alonso Campos (*)

Pilar de Arana Montes (**)

Jorge González Casanovas (*)

Javier Lobón Rovira (*)

Pedro Alfaya Herbelo (*)

Beatriz Matallana Montes (**)

Alejandra Cruz Varona (**)

(*) Departamento de Ecología

(**) Departamento de Genética

“CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus* Temminck, 1827) EN EL ENTORNO DE LA SIERRA DE GUADARRAMA”

Germán Alonso Campos (*); Pilar de Arana Montes (**); Jorge González Casanovas (*); Javier Lobón Rovira (*); Pedro Alfaya Herbelo (*); Beatriz Matallana Montes (**)

Alejandra Cruz Varona (**)

(*) Departamento de Ecología, (**) Departamento de Genética.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Madrid, 2016

ÍNDICE DE TEXTOS

	<i>Pág.</i>
0. RESUMEN	1
1. OBJETO, FINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	4
1.1. Introducción	4
1.2. Breve Historia evolutiva del género <i>Lynx</i>	7
1.3. Distribución histórica de <i>Lynx pardinus</i> en la península ibérica	9
1.4. Antecedentes del lince ibérico en la CAM	11
1.5. Hábitat	14
2. METODOLOGÍA	16
2.1. Delimitación de las áreas de prospección en el entorno de la Sierra de Guadarrama	16
2.2. Desarrollo de trabajos de muestreo de campo para detección de presencia de lince ibérico y recogida de muestras biológicas	17
2.3. Análisis molecular de muestras biológicas obtenidas en campo para identificación específica y desarrollo de un método de identificación individual	18
2.4. Caracterización ecológica del área prospectada y evaluación de la adecuación de hábitat para el Lince ibérico	19
2.5. Búsqueda y Recogida de Heces	22
2.6. Caracterización del Microhábitat	23

2.7. Evaluación de Variables Ambientales	24
2.8. Mapa de Hábitat Potencial	26
2.9. Estimaciones de población	27
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1. Muestreo de campo	30
3.2. Análisis genético a partir de muestras de heces en lince ibérico	32
3.2.1. Identificación de especie	32
3.2.1.1. Diseño de un protocolo de extracción de DNA que minimice la probabilidad de contaminación	32
3.2.1.2. Desarrollo de un método de PCR anidada para amplificar la señal de la primera PCR, manteniendo la especificidad.	33
3.2.1.3. Desarrollo de un método de detección de SNPs específicos de lince a partir de los fragmentos de DNA mitocondrial amplificado mediante PCR	38
3.2.1.4. Resultados de la aplicación del método de PCR anidada desarrollado para la identificación de la especie, en otros laboratorios	42
3.2.2. Desarrollo de un método de identificación individual a partir de muestras de heces mediante amplificación de marcadores microsatélites	42
3.3. Caracterización del hábitat	48
3.4. Estimación de Poblaciones	48
3.5. Caracterización del Microhábitat	50
3.6. Evaluación de Variables Ambientales	51
3.7. Mapa de Hábitat Potencial	54
4. CONCLUSIONES	59
4.1. Presencia de lince ibérico en la CAM	59
4.2. Preferencias de hábitat y hábitat potencial	59
4.3. Estimación de abundancias	60
4.4. Individualización de muestras	60
5. BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE FIGURAS, MAPAS Y TABLAS

	Pág.
Figura 1. Representación de las dos posibles relaciones filogenéticas entre las cuatro especies del género <i>Lynx</i> consideradas en la actualidad.	8
Figura 2. Distribución de los fósiles de <i>Lynx pardinus</i> (Rodríguez-Varela et al., 2015) en la Península Ibérica.	9
Figura 3. Distribución de <i>L. pardinus</i> en la segunda mitad del s.XX en España	10
Figura 4. Distribución del <i>L. pardinus</i> estimada a) para la década de los 80 y b) para principios del siglo XXI.	11
Figura 5. Localización del área de estudio en la Península Ibérica y en la CAM.	20
Figura 6. Fotografías de paisaje dentro del área de estudio.	20
Figura 7. Fotografía de dos estructuras de paisaje recorrido durante el muestreo.	21
Figura 8. Fotografías de excrementos de felino recogidos en dos de los transectos recorridos.	23
Figura 9. Esquema del patrón de medición de las variables vegetales dentro de un kilómetro par del transecto.	24
Figura 10. Esquema de la amplificación por PCR anidada.	33
Figura 11. Fragmentos obtenidos en la reacción de PCR inicial con los cebadores de Palomares et al. (2002), de 130 pb (izda.) y PCR anidada de 63 pb (dcha.).	34
Figura 12. Fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR modificadas.	36
Figura 13. Alineamiento del fragmento mitocondrial que contiene las dos sondas utilizadas en el análisis de SNaPshot®.	39
Figura 14. Electroferogramas con los resultados de la aplicación de la técnica de SNaPshot® a diversas muestras utilizando la primera pareja de sondas.	40
Figura 15. Electroferogramas con los resultados de la aplicación de la técnica de SNaPshot® a diversas muestra utilizando la segunda pareja de sondas.	41
Figura 16. Fragmentos correspondientes a marcadores microsatélites amplificados por PCR multiplex.	43
Figura 17a. Perfiles de cinco individuos obtenidos por amplificación de los	44

marcadores microsatélites Fca090, Fca082 y Fca559.

Figura 17b. Perfiles de obtenidos por amplificación de los marcadores microsatélites. 45

Figura 17c. Perfiles de cinco individuos obtenidos por amplificación del marcador microsatélite Fca096, marcado con fluorescencia roja. 46

Figura 18. Recta de regresión propuesta por Garrote et al (2014) que correlaciona el número de muestras positivas con los Kilómetros recorridos. 49

Figura 19. Gráfica de sedimentación del ACP. 51

Figura 20. Representación de la correlación entre las variables originales y los dos primeros CPs. 52

Figura 21. Gráfica de dispersión en la que están representadas las celdas con presencia de lince ibérico en el espacio definido por los dos primeros CPs. 53

Figura 22. Mapa de hábitat potencial para el lince ibérico en la CAM con una resolución de 1x1 Km. 55

Mapa 1. Mapa llave de los transectos realizados. 17

Mapa 2. Localización de los excrementos de lince ibérico recogidos entre 2015 y 2016, que resultaron positivos al análisis. 48

Tabla 1. Citas históricas para *L. pardinus* en la CAM hasta 2015, colocadas por orden de antigüedad. 14

Tabla 2. Código, descripción y fuente de las variables ambientales consideradas en la elaboración del modelo de idoneidad de hábitat. 25

Tabla 3. Modelo Lineal Generalizado para el Microhábitat significativo. 31

Tabla 5. Muestras que han sido identificadas hasta el momento como positivas de lince mediante la aplicación de los métodos desarrollados. 37

Tabla 6. Genotipos para los seis marcadores microsatélites de cada uno de los cinco individuos en los que se obtuvo amplificación satisfactoria. 43

Tabla 7. Listado de los cebadores de PCR utilizados en este estudio. 47

Tabla 8. Coeficientes estimados y p-valores de las variables incluidas en el modelo final para IKA de *Felis sp.* 50

Tabla 9. Varianza, porcentaje de varianza absorbida, varianza acumulada y 51
autovalores de los 4 primeros componentes principales.

Tabla 10. Coeficientes y p-valores de las variables incluidas en el modelo de 54
idoneidad de hábitat ajustado.

“CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus* Temminck, 1827) EN EL ENTORNO DE LA SIERRA DE GUADARRAMA”

Germán Alonso Campos (*); Pilar de Arana Montes (**); Jorge González Casanovas (*); Javier Lobón Rovira (*); Pedro Alfaya Herbello (*); Beatriz Matallana Montes (**)
Alejandra Cruz Varona (**)

(*) Departamento de Ecología, (**) Departamento de Genética.
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Madrid, 2016

0. RESUMEN

El Lince ibérico (*Lynx pardinus*) es hoy una de las especies más amenazadas de la Península Ibérica, de la que es endémica y por tanto única en el planeta. Por este motivo, el seguimiento de sus poblaciones se hace de manera sistemática y precisa para a) conocer su tendencia poblacional y b) adoptar, en consecuencia, las medidas de gestión que garanticen que se alcanza un estado de conservación aceptable. Además es una especie considerada “*prioritaria*” por la Directiva 92/43/CEE, de Hábitat, e incluida en los anejos II y V de la Ley 42/2007 del Patrimonio Natural y la Biodiversidad, y en el Catálogo Español de Especies Amenazadas.

La Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) ha estado históricamente dentro del área de distribución natural de *Lynx pardinus*, aunque en el año 2006 se dio por extinguido en su territorio. No obstante, en el Catálogo Regional de Especies Amenazadas la incluye en un pequeño enclave en el Suroeste de la Comunidad. Sin embargo los avistamientos de ejemplares de esta especie han sido constantes en su territorio, y no sólo en el área incluida en este Catálogo Regional.

Durante 2015 y 2016 se ha realizado un muestreo sistemático del área en que se ha tenido constancia de los avistamientos en la última década, que comprende el territorio al Oeste de la N-I y la N-III, con un total de **21 transectos por terrenos de titularidad pública** de unos 5 Km, realizados (13 en 2015 y 21 en 2016) en dos estaciones anuales (primavera y otoño), cuyos resultados han sido la recogida de **84 muestras en 17 de esos transectos**, de las que **han resultado positivas al análisis de ADN un total de 44**. En 4 de los transectos repetidos hay muestras positivas ambos años, lo que podría ser indicio de permanencia en la zona.

Durante estos dos años hemos recogido algunos testimonios más de observaciones de lince, algunos en fincas privadas.

Trabajar con muestras de excrementos recolectados en el campo es un reto para la aplicación de técnicas genéticas, pues la fuente de ADN son las células epiteliales presentes en la fina película que los recubre. Después de ser depositadas los excrementos sufren un rápido deterioro por la exposición a las inclemencias del tiempo, razón por la cual no se han recogido otros excrementos que eran susceptibles de pertenecer a la especie, salvo en los 14 transectos que fueron usados para estimar la población.

Los análisis de ADN realizados han sido corroborados por dos laboratorios ajenos, el del **IREC-CSIC**, en Ciudad Real, y el de la empresa **Genyca Innova**, en Madrid.

La técnica de detección de ADN de lince ha sido mejorada mediante dos procedimientos: a) la técnica de **PCR anidada** que, manteniendo la especificidad, amplifica la respuesta, de modo que resulta más evidente el resultado, sea positivo o negativo; y b) **detección de SNPs específicos de lince** mediante la técnica de SNaPShot®, utilizando marcaje fluorescente. Esta última técnica es altamente específica, eficiente y repetible, y asiduamente usada en análisis forenses.

Se han iniciado estudios genéticos de **microsatélites para individualizar las muestras** de modo que se dispone de una técnica que permite distinguir un individuo de otro. En primer lugar se utilizaron 3 muestras frescas facilitadas por el Centro de Cría en Cautividad del Acebuche, de Doñana, y otras 2 recogidas en Andújar. **La técnica permitió identificar individualmente los cinco individuos.** Aplicada esta técnica a las muestras recogidas **en Madrid no se obtuvieron resultados** debido a la degradación de las muestras.

Por esta razón se ha ensayado una estrategia consistente en realizar una primera amplificación múltiple con los cebadores sin marcar, seguida de amplificaciones individuales de cada microsatélite con cebadores marcados. Los resultados tampoco fueron satisfactorios. **En sucesivas campañas modificaremos el método de muestreo para conseguir excrementos más frescos** que permitan aplicar esta técnica.

También se ha tratado de **caracterizar el hábitat** que usa el lince en el área de

estudio. Así se tomaron un conjunto de variables a lo largo de los transectos realizados, cruzando sus valores con la presencia de lince. La variable que mejor correlación muestra es la **‘cobertura de matorral menor de 50 cm de altura’**. Las otras variables que resultaron ser estadísticamente significativas muestran la preferencia de los felinos por **espacios heterogéneos**, sin predominancia de una formación vegetal concreta. Como resultado podemos resumir que **el lince selecciona el hábitat**, prefiriendo **zonas más cálidas**, con **contraste moderado entre mínimas y máximas**, y con **menor precipitación**. Asimismo prefiere **zonas del territorio poco elevadas**, ausentándose de montañas y riscos. En cuanto a la vegetación, prefiere zonas con baja cobertura de herbáceas y tienden a ocupar espacios con **coberturas relativamente altas de matorral bajo**, confirmando lo hasta ahora conocido.

La presencia de zorro no correlaciona con la de lince, resultando distribuciones independientes. Es posible que esta población de lince no sea tan reticente a compartir su espacio con otras especies predatoras, debido quizá a la abundancia de alimento. Al contrario de lo indicado por multitud de estudios previos, **la probabilidad de encontrar conejo no resultó significativa en el modelo de idoneidad de hábitat**.

En el mapa de hábitat potencial se observa la **importancia de los ríos permanentes**, ya que las zonas de “hábitat muy favorable” se encuentran alrededor de los ríos Guadarrama, Jarama, Alberche, Cofio, Tajo y Henares.

El resultado es un **mapa que muestra la idoneidad del hábitat o el hábitat potencial**, desde *poco* a *muy* favorable.

Se ha estimado, si bien de forma preliminar, la población de lince de la CAM, con un resultado de entre 28 y 38 ejemplares.

1. OBJETO, FINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

1.1. Introducción

El Lince ibérico (*Lynx pardinus*) es, a día de hoy, una de las especies más amenazadas de la Península Ibérica, de la que es endémica y por tanto única en el planeta. Probablemente es una de las preocupaciones más importantes para la sociedad. Asociaciones conservacionistas y ecologistas, científicos y, especialmente, administraciones públicas competentes asumen la responsabilidad de evitar este riesgo de extinción. Además, y consecuentemente, esta especie recibe una fuerte atención mediática, y la preocupación que suscita internacionalmente demanda grandes esfuerzos.

Por ello, el seguimiento de sus poblaciones, su monitorización, se hace de manera sistemática y precisa, para a) conocer su tendencia poblacional y b) adoptar, en consecuencia, las medidas de gestión que garanticen el alcance de un estado de conservación favorable. Este es el objetivo principal de la ‘estrategia de conservación del lince ibérico’ aprobada en 2007, que responde al compromiso internacional adquirido por nuestro país, especialmente en cuanto al Convenio de Diversidad Biológica (Río de Janeiro, 1992) y su derivada a nivel europeo Directiva de Hábitat (UE, 1992).

El Lince ibérico es una especie de interés comunitario, considerada “*prioritaria*”, incluida en los anejos II y IV de la Directiva 92/43/CEE, de Hábitat, y consecuentemente en los anejos II y V de la Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y la Biodiversidad. Por ello, existe la obligación de informar sexenalmente a la Comisión Europea en el marco del informe del art. 17 de la mencionada directiva, sobre aspectos como el tamaño de sus poblaciones, el área de distribución, las amenazas que la afectan y el estado de los hábitats que ocupa.

Por otra parte, el Lince ibérico está incluido en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, instrumento creado por la mencionada Ley 42/2007, y desarrollado mediante el Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero. Según este instrumento legal, las especies incluidas bajo esta categoría deben disponer de seguimientos actualizados cada tres años, y se deben adoptar medidas activas que permitan una recuperación de las

poblaciones por parte de las autoridades competentes. Por ello las Comunidades Autónomas que cuentan con este felino entre su fauna deben aprobar un Plan de Gestión, o en su caso de Conservación, para instrumentar medidas concretas.

La mayor alerta sobre su estado de conservación tuvo lugar en los inicios del siglo XXI, en el que el área de distribución de la especie parecía circunscribirse únicamente a Doñana y Sierra Morena, debido a que no se detectaba en sus tradicionales lugares de presencia en toda la región biogeográfica mediterránea. De este modo, los censos de la especie realizados a principios de la década de 2000 mostraban la existencia de unos 200 individuos. Los factores de amenaza identificados entonces incluían a) la persecución de la especie por parte del hombre (control de depredadores) y b) la disminución de las abundancias de su presa principal, el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*), en amplias áreas por efecto cambios en la funcionalidad de los ecosistemas debido, probablemente, a cambios en las prácticas agrarias y forestales que disminuyeron su hábitat y aumentaron su predisposición a sufrir enfermedades y ecopatologías derivadas de efectos dependientes de la densidad.

Ante la urgencia de esta situación, las distintas administraciones españolas pusieron en marcha distintas medidas de conservación. Entre ellas, se promovió un programa de cría en cautividad, destinado al reforzamiento de las poblaciones existentes y para la reintroducción en áreas de las que la especie desapareció durante el siglo XXI y XX. Así, se vienen realizando sueltas en zonas de Portugal, Extremadura y Castilla-La Mancha (Montes de Toledo y Sierra Morena), con indudable éxito, que ha permitido variar la calificación de amenaza de la especie desde ‘en peligro crítico’ a ‘en peligro’ a principios de 2015 (Rodríguez y Calzada, 2015), al constatar un aumento de la población de individuos reproductores desde el censo de 2002 al de 2010 (Garrote, 2015; Simón *et al.*, 2012).

Además, el programa de suelta ha puesto de manifiesto algunas características del lince respecto a su comportamiento dispersivo y alimentario. Concretamente se ha podido constatar la gran capacidad dispersiva de algunos ejemplares en su búsqueda de un lugar para asentarse y el aprovechamiento de otras presas distintas del conejo incluido la carroña o animales de granja. Todo ello en unas condiciones que podemos calificar de excepcionales al proceder de animales criados en cautividad, como son los que son objeto de suelta.

En 2015 un estudio de nuestro equipo de trabajo (Lobón-Rovira J., 2015) puso de manifiesto la presencia de individuos de esta especie en el entorno del Sistema Central, concretamente en la mitad occidental de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM), junto a testimonios fehacientes de avistamientos prácticamente ininterrumpidos, de los que no se tenía constancia. En consecuencia el, entonces, MAGRAMA se interesó en profundizar en el estudio de estas hipotéticas poblaciones mediante un proyecto del que ahora se presenta esta Memoria de los trabajos realizados.

Este trabajo presentaba algunas novedades respecto a lo conocido hasta ahora y puso de manifiesto la dificultad de detectar al lince en espacios con alta frecuentación, proximidad al ser humano y alta densidad de personas. Escenario ecológico que viene siendo distinto al habitual en espacios protegidos extensos, sierras con baja densidad humana y con una intensidad de uso reducida, caracterizados por presentar un hábitat propicio en cuanto a condiciones del medio. En consecuencia podría deducirse que, si existía una población de lince, aunque fuera más o menos escasa, podría presentar rasgos propios de adaptación a esas circunstancias.

La detección de su presencia por medio de heces, y su posterior determinación por métodos genéticos requería además mejorar el método conocido hasta ahora, con el fin de hacerlo más eficaz, en unas muestras ‘críticas’ que presentan una baja densidad de células del lince, como son las que se encuentran en la fina película que envuelve las deposiciones.

Otro reto de este proyecto consiste en individualizar las muestras, esto es, poder asignar las deposiciones a individuos diferentes. Esta técnica requiere un análisis del ADN siguiendo patrones de microsatélites. No se oculta la gran dificultad que tiene este tipo de análisis, y su viabilidad, cuando no se dispone de mucho material genético original, como ocurre en el caso de muestras denominadas ‘críticas’.

Por último, dados los últimos avances en el conocimiento de la especie, de su expansión geográfica y viabilidad poblacional, fruto de los esfuerzos en conservación realizados, resulta necesario continuar las actuaciones para garantizar un estado de conservación favorable. Para ello es necesario ampliar el conocimiento del estatus en el resto de su área de distribución conocida y potencial, como es el entorno de la Sierra de Guadarrama (Madrid y Castilla y León). El presente estudio contribuye a conocer tanto

las amenazas como el estatus poblacional con mayor precisión en el área de trabajo, permitiendo proponer las mejores soluciones de actuación. En particular, hemos obtenido información determinante acerca de la presencia de lince ibérico en el entorno del Sistema Central, así como información relevante acerca de la ecología de la especie en áreas distintas de las bien conocidas.

1.2. Breve Historia evolutiva del género *Lynx*

Conocer la historia evolutiva de la especie resulta clave a la hora de desarrollar planes de gestión adecuados (Johnson *et al.*, 2004), así como para definir el estatus de conservación de sus poblaciones (Gugolz *et al.*, 2008). Los estudios de esta índole también permiten discernir la diversidad genética, aspecto fundamental a la hora de elaborar programas de conservación (Johnson *et al.*, 2004). Además, el conocimiento de la historia evolutiva permite a) razonar cómo una especie concreta ha respondido a determinados eventos, ya sean estos climáticos, geológicos, etc. (Sommer & Benecke, 2005) y, por lo tanto, b) proporcionan información de crítica relevancia para comprender su distribución actual, y c) identificar sus potenciales amenazas futuras y/o presentes.

Actualmente el género *Lynx* comprende cuatro especies, de las cuales dos se encuentran en el continente americano (*Lynx rufus* y *Lynx canadiensis*) y dos en el continente Euroasiático (*Lynx lynx* y *Lynx pardinus*; San Miguel *et al.*, 2006). En África existe una especie de félido: el *Caracal caracal*, cuyo parecido con las especies del género *Lynx* es tal que, durante algún tiempo se pensó que podía pertenecer a este género (Wenderlin, 1981).

La primera especie de lince de la que se tienen evidencias inequívocas en el registro fósil es *Lynx issiodorensis*, cuyos primeros restos se considera que pertenecen al Plioceno temprano y fueron hallados en Francia en Mt. Perrier (Wenderlin, 1981). Se cree que esta especie es el ancestro común del cual divergieron, hace más de 6 millones de años, las cuatro especies del género *Lynx* que existen hoy día (Johnson *et al.*, 2004). Sin embargo, las relaciones evolutivas existentes entre las especies de lince y su reconocimiento como especies propias, nunca han estado libres de controversia (Johnson *et al.*, 2004).

Kurten y Granqvist defendían, en 1987, que los fósiles encontrados en Puech-Margal (Francia) pertenecían al extinto lince de las cavernas [*Lynx pardina spelaea* (Boule, 1910)], una subespecie del lince ibérico. Sin embargo, su posición taxonómica continúa siendo un foco de debate (Ghezzeo *et al.*, 2015) al atribuir, algunos autores, la pertenencia de los fósiles a una especie completamente diferenciada (*Lynx spelaea*) del actual *L. pardinus* (Bonifay, 1971; Lorfèvre, 2009). Así mismo, numerosos autores habían considerado que el lince ibérico, conocido por aquel entonces como *Felis pardina*, era una subespecie del lince euroasiático (Rodríguez & Delibes, 1992). Posteriormente, los resultados obtenidos por Beltrán *et al.* (1996) certificaron la independencia del lince ibérico como especie diferenciada de sus homólogos euroasiático (*L. lynx*) y norte americanos (*L. canadiensis* y *L. rufus*).

Varios estudios moleculares (**Fig. 1**) demuestran que la primera de las cuatro especies que se diversificó fue *L. rufus*, mientras que no parece existir unanimidad en la historia evolutiva de las otras tres especies (Wenderlin, 1981; Beltrán *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2004). Por un lado, Johnson *et al.* (2004) definen al lince euroasiático y al ibérico como taxones hermanos, mientras que otros consideran que *L. pardinus* representa un linaje evolutivo que diverge del de *L. lynx* y *L. canadiensis* (Wenderlin, 1981; Beltrán *et al.*, 1996). Así, todavía no se ha conseguido resolver la politomía existente entre estas tres especies (Gugolz *et al.*, 2008).

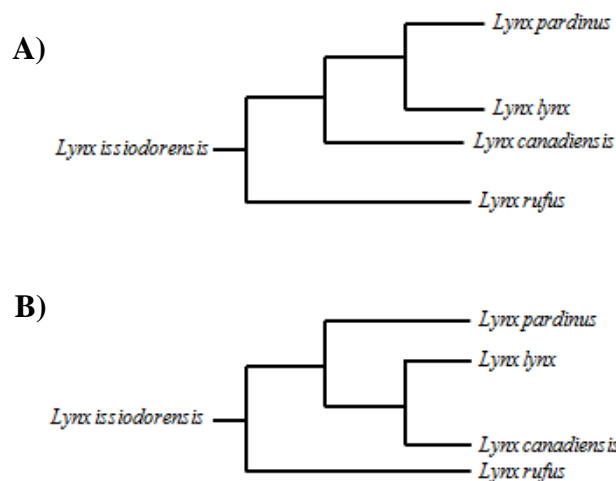


Figura 1- Representación de las dos posibles relaciones filogenéticas entre las cuatro especies del género Lynx consideradas en la actualidad. Elaboración propia, a partir de los resultados obtenidos por diferentes autores: A) representa la filogenia obtenida por Johnson *et al.* (2004); B) representa la filogenia defendida por Wenderlin (1981) y Beltrán *et al.* (1996).

1.3. Distribución histórica de *Lynx pardinus* en la península ibérica

Los últimos estudios genéticos sobre el origen *L. pardinus* parecen ubicar sus orígenes entre 2,2 m.a. (Bininda-Emonds *et al.*, 1999) y 1,6 m.a. (Johnson *et al.*, 2004), señalando como su antepasado directo al *Lynx issiodorensis* (Werdelin, 1981; Johnson *et al.*, 2004), un lince extinguido en el Plioceno tardío o a principios del Pleistoceno.

La primera evidencia paleontológica de *L. pardinus* fue encontrada en Francia y datada en el Pleistoceno medio (alrededor de los 2 m.a.) (Kurten y Granqvist, 1987), donde compartieron su rango de distribución con el Lince eurasiático (*Lynx lynx* Linnaeus, 1758).



Figura 2- Distribución de los fósiles de *Lynx pardinus* (Rodríguez-Varela *et al.*, 2015) en la Península Ibérica. Los triángulos hacen referencia a fósiles de *L. pardinus* datados en el Holoceno. Los círculos hacen referencia a fósiles de *L. pardinus* datados en el Pleistoceno.

Desde que comenzaron los estudios acerca de la distribución del *L. pardinus* en la Península Ibérica, a finales del siglo XIX (Graells, 1897), su área de distribución histórica ha sido siempre tema de controversia. Sin embargo, en los últimos años parece asentarse la idea de que el Lince Ibérico se encontraba distribuido por casi la totalidad de la Península (**Fig. 2**), al menos desde el Pleistoceno (≈ 2 m.a.) hasta principios del siglo XX (Cabrera, 1914; Rodríguez-Varela *et al.*, 2015), cuando parece que sus poblaciones empezaron a decaer, llegando a extinguirse en todo el Norte y Este peninsular (Cabrera, 1914).

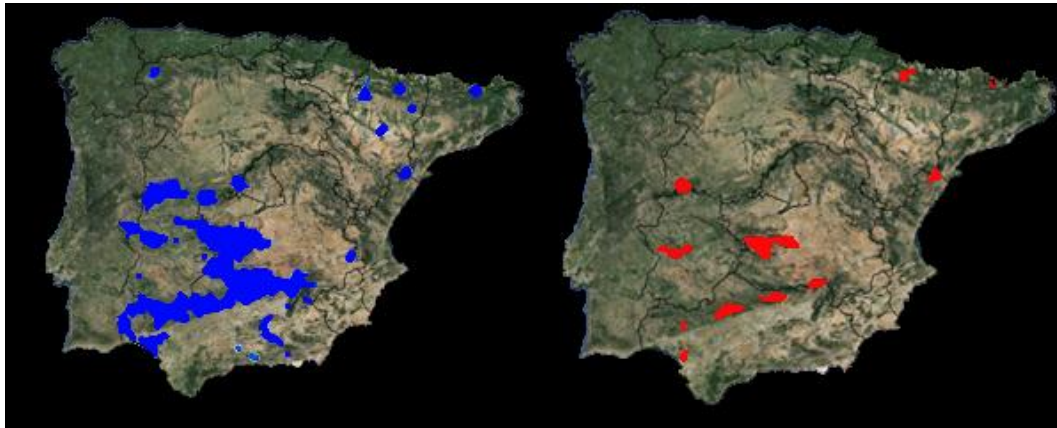


Figura 3- Distribución de *L. pardinus* en la segunda mitad del s.XX en España a) según Valverde (1963; izquierda), y b) Rodríguez y Delibes (1990; derecha).

A mediados del siglo pasado la población de Lince Ibérico se encontraba altamente fragmentada (**Fig. 3a**), reduciéndose su rango de distribución principal al Centro y Sur de la Península Ibérica, quedando algunos relictos al noreste de la península (Valverde, 1963; Delibes, 1979). Desde finales de los años 50 hasta finales de los 80 la población de *L. pardinus* sufrió una contracción vertiginosa, provocando que en la década de los 80, sus poblaciones se limitasen a pequeños grupos en el Sistema Central y Montes de Toledo, dejando el grueso de la población relegada al cuadrante suroccidental de la Península Ibérica (Rodríguez y Delibes, 1990, 2002, 2003) (**Fig. 3b**).

Por estas fechas, Rodríguez y Delibes (1990) estimaron, mediante encuestas, que la población de *Lynx pardinus* contaba con una abundancia de entre 880 y 1.150 individuos, repartidos en nueve poblaciones aisladas: Sierra Central occidental, Gredos, Alto Alberche, Sierra de San Pedro, Montes de Toledo-Villuercas-Monfragüe, Subbéticas, Sierra Morena oriental, Sierra Morena central, Sierra Morena occidental y Doñana (Rodríguez y Delibes, 1990, 1992).



Figura 4- Distribución del *L. pardinus* estimada a) para la década de los 80 en España y Portugal (Izquierda; Rodríguez y Delibes, 1990; Castro y Palma, 1996), y b) para principios del siglo XXI (derecha; Guzmán *et al.*, 2004; Sarmiento, 2009).

A comienzos del siglo XXI Guzmán *et al.* (2002, 2004) realizaron un diagnóstico de la situación de *L. pardinus* en la Península Ibérica, limitando su distribución a dos núcleos: Doñana y Sierra Morena (**Fig. 4**), dando por extinguidas el resto de poblaciones descritas con anterioridad.

En estos censos se localizaron, mediante la técnica de foto-trampeo, menos de 100 individuos (Garrote, 2015; Simón *et al.*, 2010) alertando de la crítica situación del *L. pardinus* en la Península Ibérica a principios de este siglo.

1.4. Antecedentes del lince ibérico en la Comunidad Autónoma de Madrid

La Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) ha estado históricamente dentro del área de distribución natural de *Lynx pardinus*, como queda recogido en numerosos archivos cinegéticos, animales naturalizados y fotografías antiguas, que prueban su presencia histórica en la región.

Ya en la distribución descrita por Rodríguez y Delibes (1990), se incluyó la ZEPA del Alto Alberche de la CAM como área de distribución de *L. pardinus*, lo cual continúa siendo tema de controversia.

A finales de los 90' el estudio realizado por Aldama (1996) señaló la existencia de una población en la zona del Suroeste de la Comunidad Autónoma de Madrid, describiendo tres sub-núcleos principales (Robledo de Chavela – Valdemaqueda;

Embalse de Picadas – finca “El Rincón de los Canchos”; Cenicientos – finca “El Hoyo”). Ambos autores, planteaban que quizás estas poblaciones pudiesen tener alguna conexión con las del Sistema Central Occidental a través del Valle del Tiétar. En cualquier caso, el pequeño tamaño de esta población hizo que fuese considerada como uno de los núcleos con mayor riesgo de desaparición a corto plazo (Guzmán *et al.*, 2002), aunque la CAM incluyó la especie en su Catálogo Regional de 1992 (Decreto 18/1992, de 26 de marzo por el que se aprueba el Catálogo Regional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres y se crea la categoría de árboles singulares) aunque nunca ha dispuesto de un Plan de Recuperación en la región, como es preceptivo.

A partir del informe de Guzmán citado, la empresa Boscaje S.L. realizó el seguimiento de la población de *L. pardinus* en la CAM desde 1997 hasta 2001 recopilando nuevas citas en la zona del Suroeste.

Además, en estos estudios se describieron nuevas áreas potenciales en la CAM que reunían *a priori* las condiciones mínimas necesarias para albergar a esta especie, las cuales incluían la Sierra de Hoyo de Manzanares, el Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares y el Monte del Pardo.

Sin embargo, en los censos realizados por Guzmán *et al.*, (2002, 2004) se asumió la extinción de todas las pequeñas poblaciones aisladas de la especie, incluyendo la población de la CAM. Esta conclusión fue corroborada posteriormente por dos estudios llevados a cabo en este área por encargo de la CAM, donde no se encontró ninguna evidencia de la presencia de la especie (Gir Consulting S.L, 2006, 2007).

Si bien la población de *L. pardinus* se considera extinguida desde principios del siglo XXI, las citas han continuado acumulándose, sobre todo en el área de la ZEPA del río Alberche y Cofio, y la Cuenca Alta del Manzanares (Virgós y Casanovas, 1993). Cabe citar como reseñable, el hallazgo de un excremento en este área durante el invierno de 2005 por investigadores de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC), aunque entonces se puso en duda su autenticidad. Más recientemente, un individuo marcado del proyecto *LIFE+* cruzó por el sur de la comunidad madrileña de Oeste a Este siguiendo el río Tajo, realizando movimientos dispersivos tras su suelta en los Montes de Toledo.

A continuación se recogen una serie de citas, basadas en testimonios fiables, localizadas en la zona de estudio que han servido como antecedentes para establecer el área de muestreo (**Tabla 1**). Se ofrece la información con la precisión que ha podido ser recogida de las fuentes. Conviene recordar aquí que los informantes, sobre todo de las citas recientes, se han mostrado reacios a proporcionarlas, toda vez que al darse oficialmente por extinto en esta área existe una tendencia a no comunicar el avistamiento por temor a la opinión pública y en general, solicitan el anonimato.

La utilidad de esta tabla ha sido poder dibujar el área en que hemos realizado el muestreo, conforme se muestra en el apartado Métodos.

Municipio	Localización	Fecha	Año	Cita
El Escorial	Escorial	s/f		NAT
Robledo de Chavela	Navalmuñoz (M.U.P. 45)	s/f		OB
Valdemaqueda	Finca el Endrinal	s/f		OB
Collado Mediano	El Montecillo		1950	LAZ
Navalagamella	Navalagamella		1960	OB
Valdemorillo	Rio Aulencia		1960	TIR
Hoyo de Manzanares	Pico Estepar	60'	1965	TIR
El Escorial	Valmayor		1977	TIR
Monte de Batres	Batres		(años. 80')	LAZ
Navas del Rey	Embalse de Picadas		1987	OB
Miraflores de la Sierra	Puerto de la Morcuera		1988	OB
Guadalix de la Sierra	Cerro de San Pedro		1989	OB
Valdemaqueda	Majada del cabrero (puente de la Mocha)	aprox.	1989	OB
Tres Cantos	Puente de la Marmota		(Inicios de los 90)1990	OB
Hoyo de Manzanares	El Palancar		1993	OB
Fresnedillas de la Oliva	Dehesa de Navalquejigo (MVP 36)		1994	SCA
Sevilla la Nueva	Villamantilla (Rio Perales)		1994	SCA
Colmenar del Arroyo	Finca Montesclaros		1995	OB
Robledo de Chavela	La Almenara	aprox.	1995	OB
San Martin de Valdeiglesias	M.U.P. 55		Años 90'	OB
Villa del Prado	Finca los Canchos		1995	OB
Navalagamella/Fresnedillas			1996	OB
Navas del Rey	M-855	may-	1996	OB
Sevilla la Nueva	Villamantilla (Rio Perales)	invierno de	1996	SPR
Navas de Rey / Pelayos de la Presa	Rio Alberche		1998	OB
Navas del Rey	El Guijo		1998	SCA
Robledo de Chavela	Cuatro Tablas		1998	SCA
Robledo de Chavela / Navas del Rey	Cuerda Verduguera / Fuente Aguila		1998	SPR
Robledo de Chavela	M-512		1999	ATR

Robledo de Chavela	Dehesa de Fuentelámparas (M.U.P. 44)		2003-2004	OB
Robledo de Chavela/Colmenar del Arrollo	Fuente Anguila	oct-	2005	SCA
San Martín de Valdeiglesias	Embalse de San Juan		2005	OB
Valdemorillo	Urbanización Cerro de Alarcón		2005	OB
Navalagamella	Arroyo de la dehesa		2007	OB
Navas del Rey	Embalse de Picadas		2007	OB
San Martín de Valdeiglesias	M.U.P. 55	dic-	2007	FOT
San Martín de Valdeiglesias	M.U.P. 55	dic-	2007	SPR
Sevilla la Nueva	Arroyo de la Retamosa	dic-	2007	OB
Valdemoro	Arroyo de la Covatilla	jul-	2007	OB
Navalagamella	El Horcajo	2-nov	2009	OB
Peralejo	Peralejo	17-nov-	2009	ATA
Navalagamella	Cantera del Horcajo		2011	OB
San Martín de Valdeiglesias	Urbanización San Ramón	25-dic-	2011	OB
Sevilla la Nueva	M-523		2012	OB
San Sebastián de los Reyes	Coto Pesadilla	dic-	2014	OB
Aranjuez	R-4	feb-	2015	MARC
Fuentidueña del Tajo	Rio Tajo	feb-	2015	MARC
Navalagamella/Quijorna	Finca la Cepilla	mar-	2015	OB
Navalcarnero	M-600	16-oct-	2015	OB
Quijorna	Caña Real Segoviana	6-oct-	2016	SCA
Valdemorillo	Camino del Canal	2-nov-	2016	OB

Tabla 1- Citas históricas para *L. pardinus* en la CAM hasta 2015, colocadas por orden de antigüedad. (ATA: Ataque; ATR: Atropello; FOT: Ejemplar fotografiado; LAZ: Ejemplar abatido con un lazo; MARC: Ejemplar marcado con el proyecto IberLince; NAT: Naturalizado; OB: Avistamiento; SCA: Heces; SPR: Huella; TIR: Ejemplar abatido con un disparo).

1.5. Hábitat

A la vista de lo precedente, una vez confirmada la posible presencia del lince en la CAM, y dado que las proximidades a la gran ciudad no parecen a priori el hábitat más propicio para la especie, diseñamos y realizamos una caracterización del hábitat, relacionando presencia detectada mediante el muestreo de campo con variables del medio que nos permitan definir sus preferencias actuales, en el área de estudio.

El territorio estudiado ha sufrido cambios importantes en los últimos cien años, y especialmente en los últimos cincuenta. Por un lado los cambios de usos del suelo, especialmente el abandono agrario y la consiguiente matorralización, y por otro la expansión de los núcleos poblados, tanto de los cascos urbanos como de urbanizaciones. Estos cambios también han dado lugar a la aparición o intensificación de otros usos,

como son los usos deportivos, especialmente la caza y golf. Las infraestructuras también se han incrementado notablemente, especialmente las de comunicación (carreteras y autopistas), así como los embalses y las depuradoras. Por último la presencia de personas en el medio es muy notable, si bien los usuarios actuales se mueven más por motivos deportivos o higiénicos, o simplemente de recreo, que por labores vinculadas a la ganadería o agricultura, como era tradicional.

Todos estos cambios deben haber influido en la distribución del felino, y si bien parecería que en primera instancia pueden hacer que el lince abandone el territorio, no es descartable que a medio plazo supongan una oportunidad, de modo que la especie haya podido acomodarse y obtener ventajas de la nueva situación. Estaríamos por tanto ante una población adaptada a las nuevas circunstancias.

En este estudio se describe, de manera analítica, la estructura vegetal más propicia o beneficiosa para el lince ibérico, a la vez que se presenta un mapa de hábitat potencial. Esto permitirá identificar nuevas zonas de estudio y/o zonas en las que, potencialmente, se podrían realizar alguno de los programas de reintroducción o de reforzamiento que están teniendo lugar por todo el territorio de la Península Ibérica.

2. METODOLOGÍA

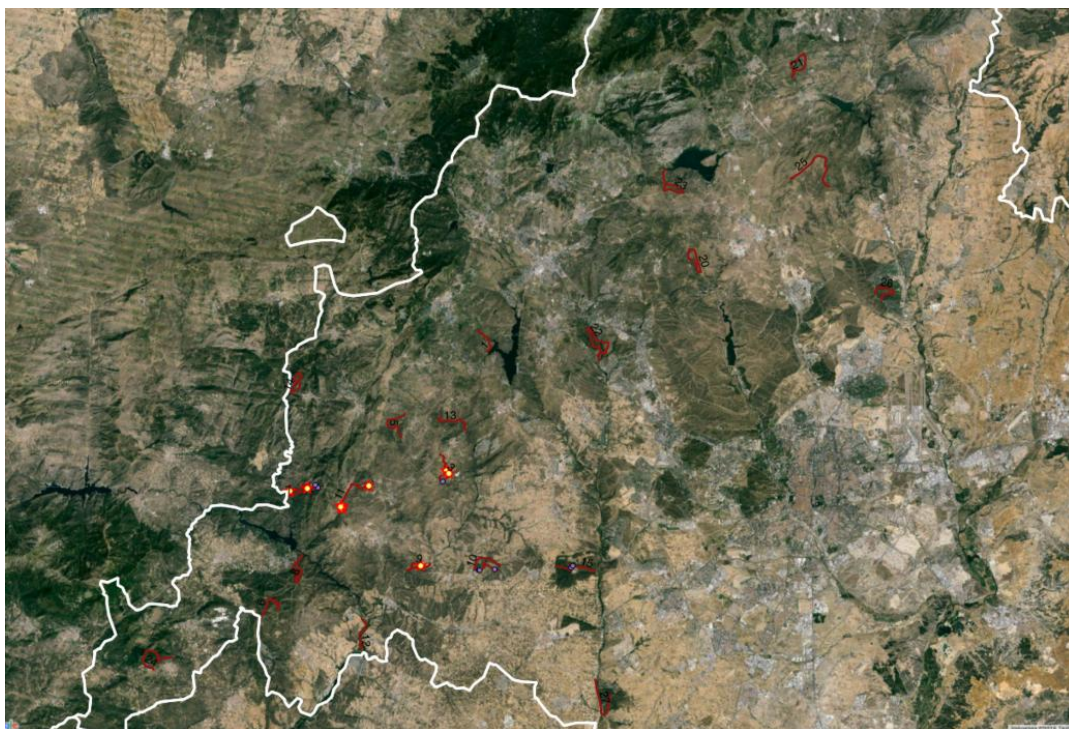
2.1. Delimitación de las áreas de prospección en el entorno de la Sierra de Guadarrama

Se han recopilado citas de presencia de la especie en el entorno de la Sierra de Guadarrama, de fuentes fidedignas y contrastadas, como son especialmente los análisis genéticos de excrementos, fotografías, observaciones de agentes y personal con suficiente capacitación o localizaciones de ejemplares marcados con emisores (telemetría VHF o GPS-Satélite), ejemplares naturalizados y avistamientos por personal de campo con conocimiento contrastado.

Se han representado gráficamente las localizaciones de presencia de lince ibérico en el entorno de la Sierra de Guadarrama en distintos períodos: 1950-1990, 1991-2000, 2001-2015.

Delimitación cartográfica de la zona (a escala 1:25.000) en la que se van a desarrollar los trabajos prácticos de campo, que engloben las áreas con mayor volumen de registros y donde se representen los puntos exactos de muestreos.

Así se han diseñado 21 transectos, por espacios de titularidad pública, conforme se indica en el **Mapa 1**.



Mapa 1- Mapa llave de los transectos realizados.

2.2. Desarrollo de trabajos de muestreo de campo para detección de presencia de lince ibérico y recogida de muestras biológicas

Se ha realizado un trabajo de muestreo de campo diseñado para la recolección de muestras biológicas de lince ibérico (excrementos), lo que es una técnica no invasiva. Para ello, se realizaron los transectos lineales definidos en el apartado anterior, poniendo especial atención en puntos potenciales de defecación, como son caminos y pistas forestales. En concreto, el trabajo han seguido las siguientes pautas:

- Se han realizado 21 transectos diferentes, con una distancia media de 5 km lineales, en el han participado 2 ó 3 muestreadores.
- Los transectos se repitieron en dos ocasiones, verano y otoño.
- Se anotó la localización geográfica UTM de todos los indicios susceptibles de ser de Lince ibérico, encontrados durante la realización de los transectos, especialmente de los excrementos atribuibles a la especie mediante una prospección minuciosa de los distintos puntos potenciales de depósito en cada recorrido.

- Al equipo de muestreo se sumaron dos técnicos de campo del Ministerio, Albert Roura y Francisco García Montoto, en las primeras jornadas.

Las muestras biológicas, atribuibles a lince ibérico, fueron georreferenciadas, colectadas, trasladadas al laboratorio y guardadas en condiciones adecuadas para su posterior análisis genético. A fecha de hoy las muestras permanecen depositadas en los congeladores de la Facultad de Biología de la UCM. Durante la realización de los transectos mencionados anteriormente, se recogieron indicios que pudieran ser atribuibles al felino, especialmente las heces, pelos o cualquier otra muestra biológica en los medios y características necesarias (temperatura, solución líquida, etc.) que permitieran realizar los análisis discriminatorios de especies, desechando aquellos cuyo estado de deterioro previsiblemente no lo permitiera.

2.3. Análisis molecular de muestras biológicas obtenidas en campo para identificación específica y desarrollo de un método de identificación individual

A) IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA

Las heces recogidas en el trabajo indicado en el punto anterior fueron trasladadas al laboratorio de Genética de la Facultad de Biología de la UCM para realizar una adecuada identificación molecular del Lince ibérico, en relación a otras especies de carnívoros.

B) INDIVIDUALIZACIÓN DE EJEMPLARES

Desarrollo y puesta a punto de un método de identificación del individuo al que pertenece la muestra analizada a partir de muestras de heces que correspondan a lince ibérico, y aplicación a las muestras obtenidas en los muestreos para contrastar, si es posible, su individualización.

C) CONTRASTE DE RESULTADOS

Se ha realizado un análisis de contraste en otros dos laboratorios con el objetivo de tener réplicas para incrementar la robustez de los resultados obtenidos. Para ello se ha realizado un acuerdo de colaboración entre el adjudicatario del servicio y un laboratorio

de referencia, en concreto el laboratorio del IREC (UC-LM y CSIC), en Ciudad Real, autorizado por el Director Técnico de este contrato menor de la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental, que cuenta con la tecnología y medios adecuados (materiales de laboratorio, técnicas PCR, disponibilidad de cebadores, etc.) para contrastar los resultados obtenidos.

Asimismo, y para garantizar aún más si cabe los resultados, se ha pedido un control de la fiabilidad de los análisis a un laboratorio privado, concretamente de la empresa Genyca Innova Análisis y Diagnóstico Genético S.L.

Mientras que el IREC es un centro de referencia, con gran experiencia en el análisis de muestras de animales, incluidos los lince; el laboratorio de la empresa GENYCA, fundamentalmente dedicada a análisis en humanos, nunca había tratado anteriormente con muestras de esta especie. De esta manera, se corrobora, de dos formas diferentes y complementarias, la asignación correcta de las muestras al lince.

Tras los análisis, los laboratorios han redactado una memoria técnica que incluye los resultados obtenidos, con especial indicación a la especie a la que pertenecen las muestras analizadas, que se acompañan en los anexos 1 y 2. Ambos han corroborado los resultados.

2.4. Caracterización ecológica del área prospectada y evaluación de la adecuación de hábitat para el Lince ibérico

El área de estudio abarca casi la totalidad de la mitad occidental de la CAM (**Fig. 5**), estando delimitada en el Oeste y en el Sur por los límites de la comunidad autónoma. La parte oriental del área de estudio queda acotada por el río Jarama, subiendo hacia el norte hasta el río Guadalix y su prolongación. Esta zona ha sido seleccionada basándose en la bibliografía ya que, la zona del suroeste de la CAM ha sido considerada como una zona potencial para el establecimiento de poblaciones de lince por diversos autores (Rodríguez & Delibes, 1992; Aldama, 1996; Boscaje, S.L.; 2000; Virgós & Traviani, 2005; Gil-Sánchez & McCain, 2011; Lobón-Rovira, 2015), si bien es cierto que se encuentra ampliada con respecto a los trabajos previos ya citados.

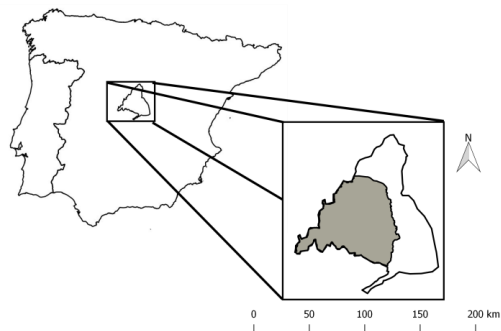


Figura 5- Localización del área de estudio (área gris) dentro de la Península Ibérica y de la CAM.

Esta zona se caracteriza por presentar unas variables ambientales relativamente homogéneas (Virgós & Traviani, 2005). Como la mayor parte de la Península, la CAM se encuentra en el dominio de los climas Mediterráneos siendo, la marcada estacionalidad de las temperaturas, la sequía estival y la irregularidad de las precipitaciones sus principales características climáticas según el Atlas Medio Ambiente de la CAM (Zabía & del Olmo, 2007). En cuanto a las masas forestales (**Fig. 6**), predominan las especies perennes (*Quercus ilex*, *Pinus* sp., entre otras) con matorral xerófilo (*Cistus ladanifer*, *Lavandula pedunculata*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, etc.; García & Pérez, 2016).



Figura 6- Fotografías de paisaje dentro del área de estudio. Se observa la típica formación de bosque mediterráneo con altas coberturas de matorral y arbolado disperso.

Por otra parte, la fauna de la CAM también destaca por su elevada diversidad de especies, muchas de las cuales requieren de medidas específicas de protección. Entre ellas destacan algunos carnívoros como el gato montés (*Felis sylvestris*), la nutria

(*Lutra lutra*) o el lince ibérico (*Lynx pardinus*; Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, y de Árboles Singulares).

Una vez escogida el área de estudio se elaboraron 21 transectos, de aproximadamente 5 Km cada uno, basándose en la metodología descrita por Lobón-Rovira (2015). El muestreo se realizó dos veces en cada transecto, en dos épocas distintas del año. La primera toma de datos tuvo lugar entre los meses de Junio-Julio del 2016, ya que este período coincide con el nacimiento de las crías del presente año y con el comienzo del período de dispersión de los individuos jóvenes nacidos en las mismas fechas del año anterior (los individuos comienzan a dispersarse entre los 13 y los 24 meses de edad; Ferreras *et al.*, 2004). El segundo período de muestreo se llevó a cabo entre los meses de Octubre-Noviembre de 2016, correspondiendo con la época en la que los cachorros dejan de depender de la lactancia y, en consecuencia, comienzan a realizar desplazamientos más largos en busca de alimento (Ferreras *et al.*, 2004).

La selección de los transectos se realizó en un mapa 1:25.000 a través de la herramienta IBERPIX, del Instituto Geográfico Nacional (IGN). Todos los transectos debían situarse en montes de uso público lo suficientemente extensos como para permitir un recorrido de 7 Km de longitud. Así, estos itinerarios transcurrieron por caminos, cortafuegos, fronteras entre pasto y matorral, campo a través o siguiendo estructuras del paisaje menos regulares que los caminos ya que, a menudo los lince las utilizan para depositar sus heces. Estas estructuras pueden ser: la base de grandes rocas, sobre vivares de conejo, antiguas carboneras, arroyos, etc. (**Fig. 7**; Martín *et al.*, 2007).



Figura 7- Fotografía de dos estructuras de paisaje recorrido durante el muestreo. A la izquierda un camino y, a la derecha, el cauce de un arroyo seco.

El trabajo realizado en cada uno de los transectos consistió tanto en la búsqueda y recogida de excrementos para su posterior análisis genético, así como en la toma de datos que permitiesen caracterizar la estructura vegetal de cada transecto (caracterización del microhábitat).

Durante la realización de los transectos de campo se han tomado medidas de variables para caracterizar el área de presencia potencial de lince ibérico. Este trabajo estará basado en una aproximación paisajística de micro y macrohábitat, fundamentado en las localizaciones georreferenciadas sobre presencia de indicios de Lince ibérico que se obtengan en campo. Las variables a considerar para realizar esta caracterización han sido las siguientes:

- Climatología
- Características del suelo
- Vegetación
- Abundancia de presas (conejo principalmente)
- Distancia a núcleos poblados

2.5. Búsqueda y Recogida de Heces

El estudio de carnívoros presenta unas importantes limitaciones que vienen impuestas por las características ecológicas y comportamentales de los organismos objeto de estudio (Boscaje S.L., 2000). En el caso que aquí nos ocupa, hay que resaltar la escasez de individuos existentes y que su comportamiento es sumamente discreto y esquivo respecto al ser humano (San Miguel *et al.*, 2006). Su organización social y espacial, siendo territoriales y solitarios, dificulta considerablemente su seguimiento y estudio (Boscaje S.L., 2000). Además, los individuos juveniles pasan por una etapa de dispersión en la que se desplazan de forma errática durante varios meses (Ferrerías *et al.*, 2004), haciéndolos extremadamente difíciles de localizar con los métodos de estudio convencionales. Por los motivos expuestos, se decidió emplear una metodología basada en indicios indirectos (excrementos recogidos). Para minimizar la subjetividad inherente a esta metodología, las muestras fueron analizadas por el Departamento de Genética de la Universidad Complutense de Madrid con una técnica basada en la descrita por

Palomares *et al.* (2002).

Los excrementos de lince ibérico (**Fig. 8**) se caracterizan por estar fragmentados, de tal forma que la parte cóncava de un fragmento encaja con la parte convexa del fragmento adyacente (Roldán, 2016). Su color puede variar entre el gris ceniza y pardo oscuro (Rodríguez, 1993), presentando una pátina mucosa uniforme que los recubre cuando están frescos (Iglesias & España, 2010). En cuanto a sus dimensiones, varían entre los 5 a 9 cm de largo y 1.5 a 2 cm de ancho (Rodríguez, 1993).



Figura 8- Fotografías de excrementos de felino recogidos en dos de los transectos recorridos. En las imágenes se aprecia la morfología típica de los excrementos de felinos: a la izquierda se observa bien cómo los fragmentos encajan unos con otros, mientras que a la derecha, se aprecia la coloración parduzca y la pátina mucosa.

Cada transecto fue recorrido por un mínimo de dos investigadores en busca de excrementos en el propio camino o en sus proximidades. Al detectar un posible excremento de lince, éste se georreferenció, fotografió e introdujo en un bote de plástico estéril, utilizando para ello la propia tapa del tubo para evitar el contacto con la muestra con el fin de minimizar el riesgo de contaminación genética. Cada bote fue debidamente identificado con la fecha, nombre del transecto y un código de identificación del mismo.

2.6. Caracterización del Microhábitat

La escala de microhábitat hace referencia a aquellas características estructurales seleccionadas por el organismo que afectan a su comportamiento individual y a su éxito reproductivo (Martin, 1998).

La toma de datos de vegetación se realizó según la metodología descrita por Fernández-Olalla (2011) y Barrull (2014). Según ésta, cada transecto se dividió en 7 tramos de 1 Km cada uno, añadiendo 1 al principio y otro al final. La toma de datos de

vegetación solo se realizó en los tramos pares (**Fig. 9**), ya que el primer tramo se vería afectado por la influencia de las carreteras u otras construcciones de origen antrópico. De esta forma, los tramos pares se dividieron en 5 sub-tramos de 200 m cada uno, al final de los cuales se estimaron las coberturas consideradas dentro de un área aproximada de 25 m de radio, partiendo del borde del camino (Roldán, 2016).



Figura 9- Esquema del patrón de medición de las variables vegetales dentro de un kilómetro par del transecto. Las secciones de color negro y blanco representan los tramos de 200 m al final de los cuales se tomaron medidas de vegetación. Los círculos en verde representan el área de 25 m de radio en la que se realizaron las estimaciones de las coberturas. Tomado de Roldán (2016).

Para caracterizar la estructura vegetal se estimaron, de forma visual, las coberturas de herbáceas, pasto, roca, suelo desnudo, cultivo, matorral menor de 50 cm de altura, matorral mayor de 50 cm de altura y arbolado. Esta metodología también nos permite contabilizar los excrementos de felino (*Felis sp.*) y zorro (*Vulpes vulpes*) encontradas en forma de IKAs (Índice Kilométrico de Abundancia), proporcionando un índice de abundancia comparable (Acevedo *et al.*, 2008).

Con los datos recogidos mediante la metodología que aquí se describe, se construyó un Modelo Lineal Generalizado (GLM) con función de enlace “gausiana” que permitirá conocer cuáles de las variables medidas presentan un efecto significativo sobre la variable respuesta (IKA de *Felis sp.*) y, por lo tanto, pueden afectar en la selección de hábitat por parte de los individuos. También se comprobó si existe algún tipo de correlación entre los felinos y el zorro. Para ello se llevó a cabo la prueba de rangos de Spearman, pues ninguna de las dos variables presentó una distribución normal.

2.7. Evaluación de Variables Ambientales

Las variables ambientales consideradas en este apartado se han tomado a una escala mayor, la del macrohábitat. Esta, ha de entenderse como una unidad cuyo área mínima se corresponde con aquella en la que, de media, los individuos de una especie determinada desarrollan sus funciones biológicas (Morris, 1987).

Para caracterizar el macrohábitat utilizado por el lince ibérico se escogieron una serie de variables ambientales consideradas, ‘a priori’, como relevantes (**Tabla 2**) y que pueden influir en la distribución de la especie. Dichas variables fueron escogidas basándose en la bibliografía (Valverde, 1963; Rodríguez & Delibes, 1992; Palomares *et al.*, 1991; Beltrán & Delibes, 1994; San Miguel *et al.*, 2006; Lobón-Rovira, 2015).

Código	Variable	Fuente
Bio1	Temperatura media anual	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Bio2	Rango de temperatura diurna (temperatura máxima – temperatura mínima)	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Bio3	Isothermality (Δ temperatura diurna/ Δ temperatura anual)	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Bio5	Temperatura máxima en el mes más cálido	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Bio6	Temperatura mínima en el mes más frío	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Bio7	Rango de temperatura anual (Bio5-Bio6)	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Bio12	Precipitación media anual	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Bio13	Precipitación en el mes más húmedo	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Bio14	Precipitación en el mes más seco	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Rad_Sol	Radiación solar incidente	Hijmans <i>et al.</i> (2006)
Cota	Altitud (m)	NEO (2016)
PPB	Productividad primaria ($\text{gC/m}^2/\text{día}$)	NEO (2016)
Población	Población (Personas/Km^2)	NEO (2016)
Oryctolagu	Probabilidad de encontrar conejo	Lobón-Rovira, J. (2015)
%Arbolado	Cobertura de arbolado (%)	Sexton <i>et al.</i> (2013)
%Suelo	Cobertura de suelo desnudo (%)	MDA Federal (2004)
%Herbáceas	Cobertura de herbáceas (%)	MDA Federal (2004)

Tabla 2- Código, descripción y fuente de las variables ambientales consideradas en la elaboración del modelo de idoneidad de hábitat.

Además, se calcularon las distancias al núcleo urbano (NucUrb), a la vía de comunicación (carretera, vías del tren, autopista, etc.; VC) y al río más cercano (Ríos).

De esta forma nos enfrentamos a un elevado número de variables que, además, presentan fuertes correlaciones entre sí. Con el objetivo de eliminar la correlación y de reducir su número, al mismo tiempo que se mantiene la mayor cantidad de información posible, se recurrió a un Análisis de Componentes Principales (ACP ó PCA). Para evitar la influencia excesiva de ciertas variables, debida a su escala o a la varianza de las variables originales, el ACP se realizó partiendo de la matriz de correlaciones.

Este análisis descriptivo inicial nos permitirá identificar las variables que más información aportan para, posteriormente, poder elaborar apropiadamente un modelo de

hábitat potencial de la especie dentro de los límites de la CAM.

2.8. Mapa de Hábitat Potencial

En primer lugar se recopilaron los datos conocidos sobre la distribución de la especie. Aquí se trataron dos tipos de datos: los datos recogidos en el campo, tanto en el presente trabajo como en el del año anterior, y las citas históricas recopiladas (Aldama, 1996; Boscaje S.L., 2000). En el caso de los datos de campo, únicamente se tuvieron en cuenta aquellos excrementos cuyo análisis genético resultase positivo. En segundo lugar se escogieron aquellas variables que habían demostrado aportar una mayor información en el análisis exploratorio realizado en el apartado anterior.

Una vez registrados los datos necesarios se procedió a la construcción de un modelo matemático, modelo de idoneidad de hábitat, que permitiese predecir qué zonas de la CAM presentan unas características más adecuadas para albergar una posible población de esta especie. Así, se elaboró un GLM, concretamente un modelo de Regresión Logística en el que las variables ambientales son las variables explicativas y la probabilidad de encontrar un ejemplar de lince ibérico es la variable respuesta. El modelo resultante fue el obtenido mediante la técnica conocida como Backward Stepwise Regression. Finalmente, se calcularon y representaron (en QGIS 2.14.3) los valores de la variable respuesta para cada una de las celdas (1x1 Km) en las que se dividió la CAM, dando lugar a un mapa de hábitat potencial.

Pero, este modelo, no permite afirmar si existe o no un proceso de selección de hábitat por parte de los individuos de la especie. Para poder comprobar esto, se construyó un segundo modelo, modelo control, similar al anterior, con la salvedad de que los valores de presencia o ausencia fueron asignados a celdas escogidas estocásticamente. Una vez construidos ambos modelos se compararon a través de la prueba de Kruskal-Wallis con el fin de saber si ambas distribuciones difieren significativamente entre ellas.

Todos los métodos de tratamiento de datos utilizados (GLMs, ACP, Kruskal-Wallis, etc.) en el apartado de “Material y Métodos”, fueron llevados a cabo en R 3.3.1.

2.9. Estimaciones de población

Medir en campo abundancias de carnívoros es muy complejo y sesgado, por los siguientes motivos:

- Diferentes **tasas de defecación** (dentro de la misma especie y entre diferentes especies) y descomposición en campo y dieta estacional.
- Parámetros **meteorológicos** de los días previos al muestreo, lo que puede lavar de restos fecales todo el terreno.
- Diferencias **comportamentales** de cara a la frecuencia y lugares de deposición, por factores dependientes de la densidad y de los recursos, como la competencia y territorialidad, etc.

Desde los comienzos del estudio científico de abundancias de carnívoros en campo, los problemas anteriores son recurrentes y muchas veces insoslayables. Por estos motivos la comunidad científica dedicada al estudio de Mamíferos en campo ha llegado a un cierto consenso o estandarización en protocolos de medida de abundancia, lo que implica un cierto grado de madurez dentro de la comunidad de investigadores. Esto no quiere decir que haya un aparato de medida estándar, y por tanto calibrado, y las comparaciones entre estudios -metaanálisis- sean siempre fiables.

Para evitar ese sesgo se procura entrenamiento previo en la búsqueda de indicios y en las estimaciones en campo de todas las variables por un mismo equipo de personas que no introduzcan sesgo en las mediciones (“*de visu*”).

Al menos en este estudio si podemos comparar resultados con los obtenidos para otros territorios, ya que la metodología se ha utilizado en al menos una Tesis Doctoral (Barrull, 2014) y numerosos informes técnicos cuyo acceso es siempre complicado y no es objeto aquí de recargar el texto.

El método que minimiza los errores o “fuentes de error” antes citadas (tasas de descomposición, meteorología y comportamiento) no es contar excrementos en campo sin más, asumiendo que cuantas más heces se encuentren habrá más individuos, lo que es completamente erróneo y sesgado.

El método estándar en Carnívoros, para estimar abundancias, como un estimador del censo, es la Frecuencia de Aparición (“*frequency of occurrence*” FO).

En Bioestadística una Frecuencia es un conteo no paramétrico, es decir, no es una variable medida con una escala continua, que sigue una distribución conocida, sino que es un número natural (0, 1, 2..., n). Si aparecen decimales es cuando se promedian las frecuencias entre distintas réplicas, lo que sí es lícito siempre que el dato de origen sea una frecuencia pura (n). Y es bueno tener varios IKA para cada transecto, y promediar si están distanciados para evitar tener un sesgo de pseudorreplicación (Hurlbert 1984).

Para evaluar cuantitativamente la frecuencia de cada especie de carnívoros de cada transecto, cada recorrido de 1 Km (IKA, o Índice Kilométrico de Abundancia) fue dividido en 5 tramos de 200 metros, obteniendo un rango de valores de abundancia entre (0-5). Que se interpreta como (0 en ninguno de los 5 tramos de 200 metros apareció la especie; 1 apareció en un tramo, y así hasta completar el Kilómetro con 5 tramos, por tanto tope de la variable de conteo “FO” = 5).

Para minimizar los problemas asociados con diferentes tasas de defecación, se registró un positivo, en cada tramo de 200 metros, cuando la presencia de al menos una muestra de cada especie estudiada especialmente Gato/Lince "félido" (ya que en campo, previamente al análisis de laboratorio, es muy difícil discriminar estos félidos).

También se cuantificó IKA de Zorro rojo (*Vulpes vulpes*), con el fin de contrastar la hipótesis de interferencia con félidos ya que marca también en caminos, sendas o cortafuegos.

Cada 200 metros se registraron las variables de microhábitat, por tanto asociadas a escala “micro” con cada abundancia de carnívoro. Fueron estimadas visualmente por la misma persona entrenada previamente, en un círculo de 25 metros de radio. Siempre que fue posible se replicó el transecto de 1 Km dentro de cada cuadrícula estudiada, para obtener un IKA sin pseudorreplicación. Este protocolo de campo ha sido aplicado en trabajos estandarizados de carnívoros (Barrull *et al.* 2014).

Con los resultados obtenidos, se ha realizado una evaluación de la idoneidad de la zona de estudio como hábitat potencial de lince ibérico, basándose en el conocimiento previo existente al respecto de las variables más importantes.

También se ha realizado una estima de la población, siguiendo el método desarrollado por Garrote *et al.* (2014) con poblaciones de Andújar y Doñana, aunque consideramos que las condiciones del medio son distintas y, por tanto, habrá que tomar este resultado con las debidas precauciones.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Muestreo de campo

El modelo se ha calculado con el programa R de análisis estadístico, de uso estandarizado y repetible por la comunidad científica por ser “Software Libre” Team, R. C. (2013).

El modelo arroja los resultados de la **Tabla 3**, según el polinomio GLM (“*Generalized Linear Model*”) con función de enlace “*gausiana*” variable dependiente *Frecuencia de ocurrencia o frecuencia de aparición (FO)*.

Llamamos aquí, siguiendo a Barrull *et al.* (2014), FO a las siglas en inglés (“*frequency of occurrence*” FO), lo que traducido es frecuencia de aparición, que no es más que la variable de abundancia medida de la manera descrita (variando entre 0 y 5).

Se contabilizaron las FO de félidos, a menudo indistinguibles en campo entre gatos y Lince ibérico, de Zorro rojo y las variables independientes (coberturas de cabida cubierta) medidas en campo cada 200 metros en radios de 25 metros entorno al observador, lo que es un procedimiento estandarizado en estudios de carnívoros.

El modelo es el siguiente, donde no se implica causalidad ni igualdad sino correlación (~) estadística con las zonas de defecación y no de otros usos para la especie (áreas de alimentación y reproducción), estos resultados concuerdan con lo encontrado previamente para félidos (“*wild-living cats*”) en la CAM (Lozano *et al* 2003).

N=14	Coefficiente	Error estándar	Valor-t	P-Valor	Significación (ver pie)	Correlación
I: Punto de corte	3.491	0.965	3.616	0.008	**	
A: Cobertura arbórea	-0.038	0.014	-2.671	0.032	*	Negativo
B: Cobertura Cultivos	-1.369	0.529	-2.587	0.036	*	Negativo
H: Cobertura Herbáceas	-0.016	0.008	-2.040	0.081	No significativo	n.s.
M: Cobertura Matorral	0.053	0.020	2.648	0.033	*	Positivo
P: Cobertura Pasto	-0.046	0.013	-3.384	0.012	*	Negativo
S: Cobertura Suelo desnudo	-0.087	0.022	-3.945	0.005	**	Negativo

(*) P<0.05 (**) P<0.01 muy significativo

Tabla 3- Modelo Lineal Generalizado para el Microhábitat significativo. Se muestran los coeficientes de la Fórmula 1, polinomial, y los valores de significación de entrada al modelo. Destaca la variable ‘cobertura de matorral’ como muy significativa.

Fórmula 1

$$FO \text{ Félido \{rango 0-5\} } \sim \text{glm} (3.5*I - 0.04*A - 1.37*B + 0.05*M - 0.05*P - 0.09*S)$$

Las variables de coberturas en radios de 25 metros tomadas cada 200 metros en cada transecto (**Tabla 3**) muestran relaciones negativas con la *frecuencia de aparición u ocurrencia “frequency of occurrence” FO* de excrementos de “Félido” (*Felis* sp. o *Lynx pardinus*), para todas las coberturas menos para el matorral que es preferencial en la selección de hábitat en este modelo. Lo que coincide con estudios previos de félidos, realizados en la CAM (Lozano *et al.* 2003) con un protocolo y análisis muy similar.

En Lozano *et al.* (2003) se concluye la importancia del matorral para los félidos (“*wild-living cats*”). Que obviamente, en este estudio grueso de Lozano (2003) sin análisis genético, pueden ser muestras de gato doméstico, gato montés o lince ibérico, de ahí la denominación genérica de “gatos” o félidos silvestres “*wild-living cats*”.

Por alguna razón los félidos aparecen con mayores abundancias en zonas con abundante matorral, evitando otros puntos de marcaje, lo que requiere estudios más finos sobre las preferencias de alimentación, reproducción, etc., que no se miden contando heces por caminos, sino estimando ecosistémicamente el funcionamiento auto-ecológico, de una sola especie, o a nivel de comunidad, teniendo en cuenta a otras varias especies de carnívoros que pueden interferir.

3.2. Análisis genético a partir de muestras de heces en lince ibérico

3.2.1. Identificación de especie

Las muestras de excrementos recogidas en el campo son “muestras críticas”, es decir, contienen muy poco DNA molde de la especie que se quiere identificar, éste se encuentra muy degradado y, además, contaminado con DNA exógeno. Por ello, los protocolos de detección e identificación mediante PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa, siglas en inglés) deben ser altamente específicos y eficientes.

Partiendo del método descrito por Palomares *et al.* (2002), se ha realizado una modificación del protocolo para la identificación específica de heces de lince. El proceso, hasta el momento, ha contemplado los siguientes aspectos:

3.2.1.1. Diseño de un protocolo de extracción de DNA que minimice la probabilidad de contaminación.

Hemos diseñado un protocolo de extracción de DNA para evitar en lo posible cualquier contaminación que desvirtúe los resultados de los análisis:

- La extracción se realiza en un laboratorio reservado para ello, se utilizan pipetas específicas.
- La superficie de trabajo se limpia después y antes de cada tanda de extracción con una solución de lejía, para eliminar los posibles restos de DNA y los instrumentos de disección se lavan tras cada muestra secuencialmente en agua con detergente y lejía, agua y alcohol de 96° y posteriormente se flamean en un mechero de alcohol.
- La disección de las muestras se realiza sobre papel de filtro; tras la disección de cada muestra el papel utilizado se descarta y se sustituye por uno nuevo.

- Para el manejo del DNA se utilizan puntas de pipeta con filtro.
- Para la extracción del ADN se utilizó el kit EZNA® Stool DNA kit de OMEGA Bio-tek, específico para la extracción de ADN en excrementos, siguiendo las instrucciones del fabricante, con ligeras modificaciones.
- Como control positivo de estos análisis, se utilizaron tres excrementos de animales procedentes del Centro de Cría en Cautividad de El Acebuche en Doñana; dos excrementos recogidos en una finca privada en Jaén y una muestra de tejido obtenida de un cadáver; estas tres últimas proporcionadas por el Dr. José Antonio Dávila, del IREC. La extracción del ADN de estas muestras se hizo separadamente para evitar posibles contaminaciones.

3.2.1.2. Desarrollo de un método de PCR anidada para amplificar la señal de la primera PCR, manteniendo la especificidad.

El protocolo de amplificación de secuencias mitocondriales por PCR descrito por Palomares *et al.* (2002) es altamente específico para identificar muestras de lince, si bien el rendimiento de la reacción no es óptimo cuando aplica a muestras degradadas. Por ello, nos propusimos:

- Ajustar las condiciones de la reacción para hacerla más eficiente.
- Diseñar un protocolo de PCR anidada para amplificar la señal de la primera PCR. Una pequeña alícuota de esta primera PCR se utiliza como molde para la segunda amplificación, que produce un fragmento de menor tamaño con un elevado rendimiento (**Fig. 10**). La técnica de PCR anidada proporciona una mayor eficiencia y especificidad y se aplica a muestras con poca cantidad de DNA molde o que contienen DNA de diversas procedencias, como en la detección de parásitos en sangre y la identificación de la composición de microorganismos en muestras ambientales (Chapron *et al.*, 2000; Poirier *et al.*, 2016).

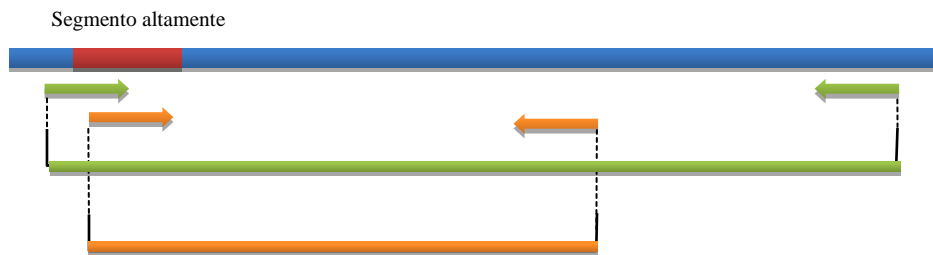


Figura 10- Esquema de la amplificación por PCR anidada.

Primeramente, se diseñó una pareja de cebadores internos – Lp7U y Lp76L (tabla 2) – contenidos en el fragmento amplificado por los cebadores DL7F y CR2bR, empleados con éxito por Palomares *et al.* (2002), que generan un fragmento de 130 pares de bases (pb). Al igual que ocurre en la primera reacción, uno de ellos es altamente específico de lince. La amplificación fue muy eficiente, pero el producto de la PCR anidada resultó ser demasiado pequeño, 63 pb y su tamaño se confundía fácilmente con los restos de cebadores de ambas reacciones y era muy difícil obtener secuencias de calidad; no obstante, se obtuvo un excelente rendimiento que proporcionó una banda claramente distinguible (**Fig. 11**).

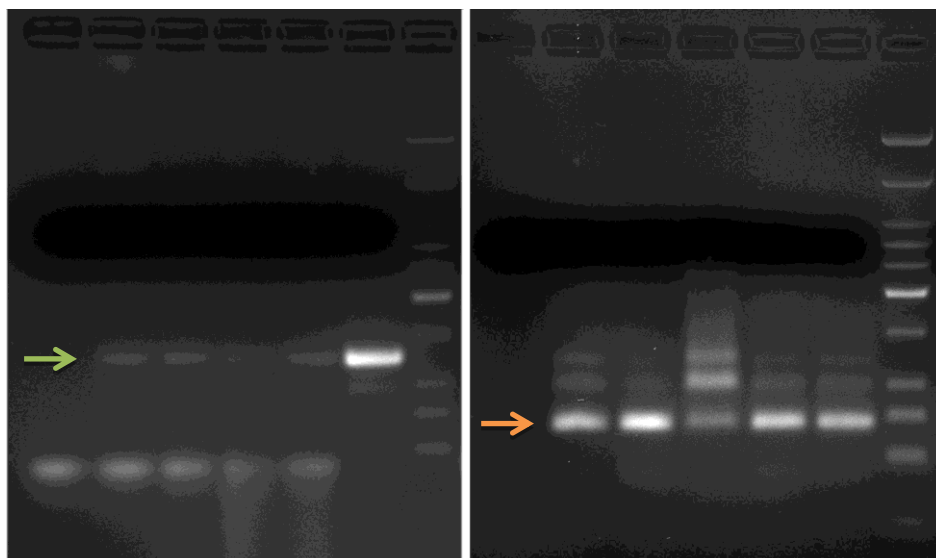


Figura 11- Fragmentos obtenidos en la reacción de PCR inicial con los cebadores de Palomares *et al.* (2002), de 130 pb (izda.) y PCR anidada de 63 pb (dcha.). En la PCR anidada, se observan también los fragmentos correspondientes a la primera amplificación, así como los correspondientes a combinaciones de cebadores de la primera y segunda reacciones.

Para tratar de mejorar el rendimiento de la primera PCR y, a la vez, disponer de un sistema de PCR anidada que permitiera comprobar la secuencia amplificada y contrastarla con las encontradas en las bases de datos, diseñamos una nueva reacción, manteniendo uno de los cebadores de Palomares *et al.* (2002), que es el que confiere especificidad y sustituyendo el cebador CR2bR, que es inespecífico, por otro – Pan16722L (**Tabla 7**) – que genera un fragmento ligeramente más largo, de 177pb (**Fig. 12, Tabla 5**), y aumenta el rendimiento de la amplificación requiriendo menor cantidad de DNA molde. El diseño de cebadores se ha realizado tras revisar en la base de datos molecular GenBank (NCBI), los alineamientos de las secuencias mitocondriales ortólogas de diversas especies que conviven con el lince y podrían confundirse con él. Asimismo, se diseñó una nueva pareja de cebadores para llevar a cabo la PCR anidada sobre este nuevo fragmento – Lnes16577U y Lnes16673L (**Tabla 7**). El primero de estos cebadores internos en la PCR anidada es altamente específico de lince y parcialmente solapante con el de la primera reacción (**Fig. 10**). Esta PCR anidada amplifica eficientemente un fragmento de 114 pb (**Fig. 12**), que puede secuenciarse para ser contrastado con las bases de datos moleculares. Como no se eliminan los restos de cebadores entre la primera y la segunda amplificación, en la PCR anidada se reamplifica el fragmento más grande, observándose dos bandas (**Fig. 12**). En todas las amplificaciones se utilizaron dos tipos de control negativo: un tubo con DNA genómico de gato doméstico, para comprobar la especificidad y un tubo sin DNA (NTC, ‘*non template control*’), para descartar cualquier tipo de contaminación. Ambos controles fueron negativos en todos los casos, aunque si se observaron las bandas correspondientes a la formación de dímeros de cebadores, siempre claramente por debajo de los 100pb.

Las PCR sencillas se realizaron con el siguiente programa: 95°C 5min; [94°C 30seg.; 60/61,5°C 45seg.; 72°C 30seg.] x 45; 72°C 5min, proporcionando bandas relativamente tenues; los programas utilizados en las PCR anidadas por nosotros, se ajustaron para evitar el exceso de ciclos y fueron los siguientes: para la primera PCR, 95°C 3min; [94°C 30seg.; 61°C 45seg.; 72°C 45seg.] x 35; 72°C 5min. y para la segunda: 95°C 2min; [92°C 30seg.; 60°C 45seg.; 72°C 45seg.] x 20; 72°C 5min.

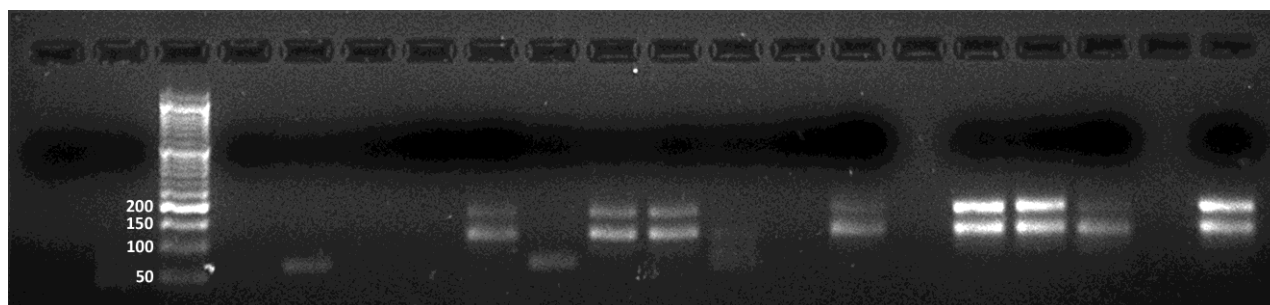
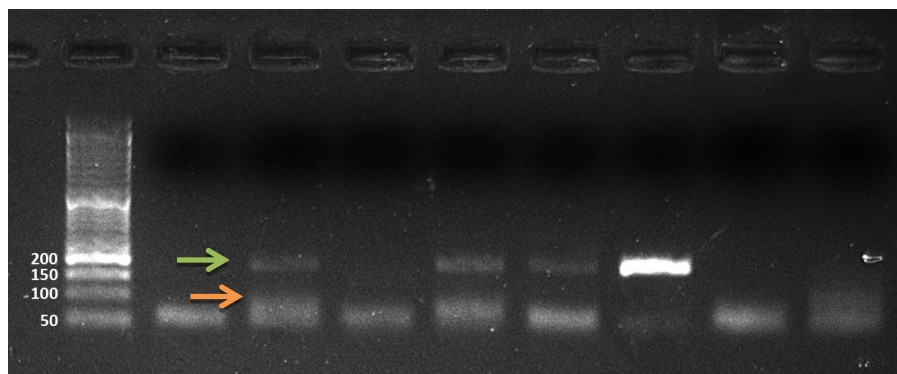


Figura 12- Fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR modificadas. La PCR inicial (superior) produce un fragmento de 177 pb (flecha verde), entre 50 y 100 pb se observa una banda formada por los dímeros de cebadores. La PCR anidada (inferior) produce un fragmento de 114 pb (flecha naranja); en el gel se observan ambos fragmentos y, entre 50 y 100pb, los dímeros de cebadores.

La **tabla 5** muestra los resultados de la identificación de las muestras analizadas hasta el momento. Un subconjunto de los fragmentos amplificados se ha secuenciado y contrastado con la base de datos molecular GenBank, resultando, en todos los casos coincidentes con las secuencias mitocondriales de lince ibérico, que no muestran variabilidad en este fragmento (**Tabla 5**).

Transecto	Localidad	Nº Muestras	Positivos
Villar del Gato	Navalagamella	2	1
Villamantilla	Colmenar del Arroyo	2	1
Valdetablas	Villanueva de Perales y Sevilla la Nueva	7	3
Navalquejigo	Fresnedilla de la Oliva	2	2
Monteagudillo	Robledo de Chavela y Navas del Rey	6	5
Monte Público 55	San Martín de Valdeiglesias	8	5
Monte de Batres	Batres	11	8
LIC Guadarrama	Villaviciosa de Odón	7	1
Hoyo de Manzanares	Colmenar Viejo	2	2
Horcajo	Navalagamella	13	7
Fuenteanguila	Colmenar del Arroyo Navas del Rey Robledo de Chavela	6	4
Embalse de Picadas	San Martín de Valdeiglesias	1	1
Coto Pesadilla	San Sebastián de los Reyes	4	2
Cerro de San Pedro	Colmenar Viejo	2	1
Cerceda (Santillana)	Manzanares el Real	2	0
Cenicientos	Cenicinetos	7	1

Tabla 5- Muestras que han sido identificadas hasta el momento como positivas de lince mediante la aplicación de los métodos desarrollados. Entre paréntesis, el primer número indica el número de muestras secuenciadas y el segundo, el de muestras diagnosticadas por SNaPshot®.

3.2.1.3 Desarrollo de un método de detección de SNPs específicos de lince a partir de los fragmentos de DNA mitocondrial amplificado mediante PCR.

Otro recurso útil para identificar las especies a partir de muestras críticas, es la detección de SNPs diagnóstico mediante reacciones de SNaPshot®. Esta técnica consiste en una reacción de adición de un didesoxirribonucleótido marcado con una fluorescencia diferente para cada uno de ellos, al extremo 3' de una sonda específica que se hibrida con fragmentos de DNA amplificados por PCR. Las sondas marcadas se separan por tamaños en electroforesis capilar en un analizador de fragmentos estándar (Jungerius, 2003) y, por tanto, presenta la ventaja de que no requiere secuenciación.

Esta técnica es altamente específica, eficiente y repetible y se utiliza asiduamente en análisis forenses, tanto en humanos (Sobrino *et al.*, 2005), como en animales (Lee *et al.*, 2009; Tobe y Linacre, 2010; Kitpipit *et al.*, 2012).

Para diseñar las sondas de SNaPshot®, se buscaron en la base de datos del NCBI, las secuencias homólogas del segmento amplificado del DNA de lince, de varias especies de mamíferos silvestres de la península Ibérica. Dichas secuencias se alinearon y se eligieron, dentro del fragmento amplificado por la PCR anidada, sondas de direcciones opuestas, cuyo extremo 3' coincidiera con SNPs diagnósticos de *L. pardinus*: variantes de la secuencia fijadas en esta especie y diferentes de las de otras especies que pudieran confundirse con ella. A este respecto, *L. canadensis* y *L. lynx* no se consideraron fuentes de confusión ya que no viven en la península Ibérica. Se diseñaron dos parejas de sondas de direcciones opuestas que, en total, detectan tres SNPs distintos (**Fig. 13**). La primera pareja de sondas, produce dos picos diagnóstico claros, sin embargo, se genera también un pico inespecífico atribuible a fenómenos de amplificación entre los cebadores ya que aparece también en los controles negativos (**Fig. 14**). Aunque no se confunde con los picos diagnóstico, sí puede disminuir su efectividad, por ello, se diseñó la segunda pareja de sondas, que no presenta amplificación inespecífica (**Fig. 15**).

La **figura 13** muestra el alineamiento de secuencias mitocondriales homólogas en *Lynx pardinus*, *L. canadensis*, *L. lynx*, *Felis silvestris* y *F. catus* en la región que contiene las sondas diseñadas para detectar los SNPs específicos de *L. pardinus*.

Partiendo de que tanto la primera PCR como la PCR anidada son específicas de *L. pardinus*, la aplicación del método de SNaPshot® supone la adquisición de un nivel extra de especificidad y sensibilidad. Tal como está diseñado este ensayo, se puede aplicar tanto tras realizar únicamente la primera PCR, como después de la PCR anidada, así como amplificando únicamente el fragmento menor (de 114pb) y aplicando después el SNaPshot®. Con lo cual, se dispone de tres sistemas específicos de detección de DNA de lince, que pueden combinarse entre sí de la forma en que proporcionen mejores resultados.

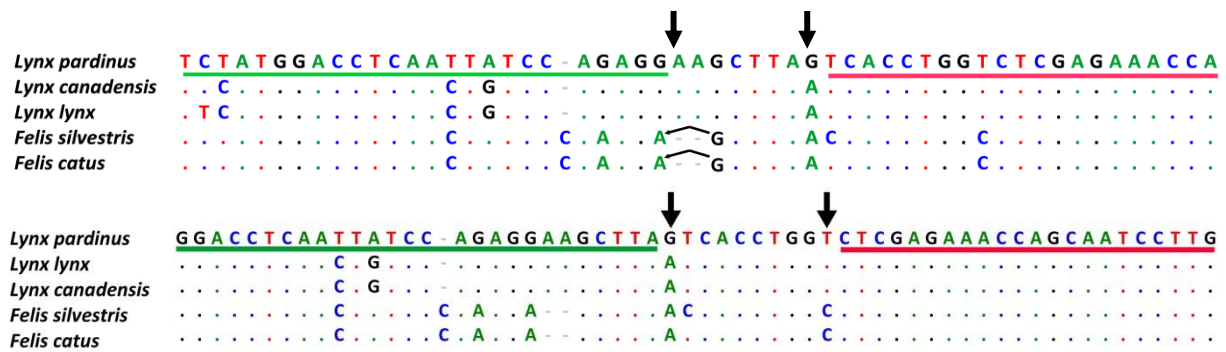


Figura 13 a-b.- Alineamiento del fragmento mitocondrial que contiene las dos parejas de sondas utilizadas en el análisis de SNaPshot®. La sonda marcada por el segmento verde, coincide con la secuencia mostrada; la sonda marcada en rojo, coincide con la secuencia complementaria de la mostrada. Las flechas indican la posición de los SNPs diagnóstico. Para el diseño de las sondas, las secuencias se alinearon con un mayor número de especies que las que se muestran en la figura. **13a)** La primera pareja de sondas detecta un SNP que en los lince incorpora una A (Adenina) mientras que en el resto de las especies incorpora una G (Guanina) ya que muestran una pequeña delección de dos nucleótidos y otro SNP que en *L. pardinus* incorpora una C (Citosina) y en el resto de especies, una T (timina); **13b)** En la segunda pareja de sondas, el primer SNP detectado coincide con el segundo de la anterior, pero en este caso, se incorpora G en *L. pardinus* y A en el resto de especies; la segunda sonda detecta un SNP nuevo incorporándose A en todos los lince y G en el resto de especies.

Las **figuras 14** y **15** muestran los resultados de la aplicación de la técnica de SNaPshot®, utilizando dos sondas de sentidos opuestos simultáneamente, a los productos de amplificación por PCR anidada de varias muestras de lince, gato y control negativo. Tanto los controles positivos, como las muestras positivas de la CAM, se corresponden con lo esperado en el caso de tratarse de muestras de lince ibérico, mostrando los picos correspondientes. En la **figura 14** se muestran los resultados obtenidos con la primera pareja de sondas y en la **figura 15**, con la segunda.

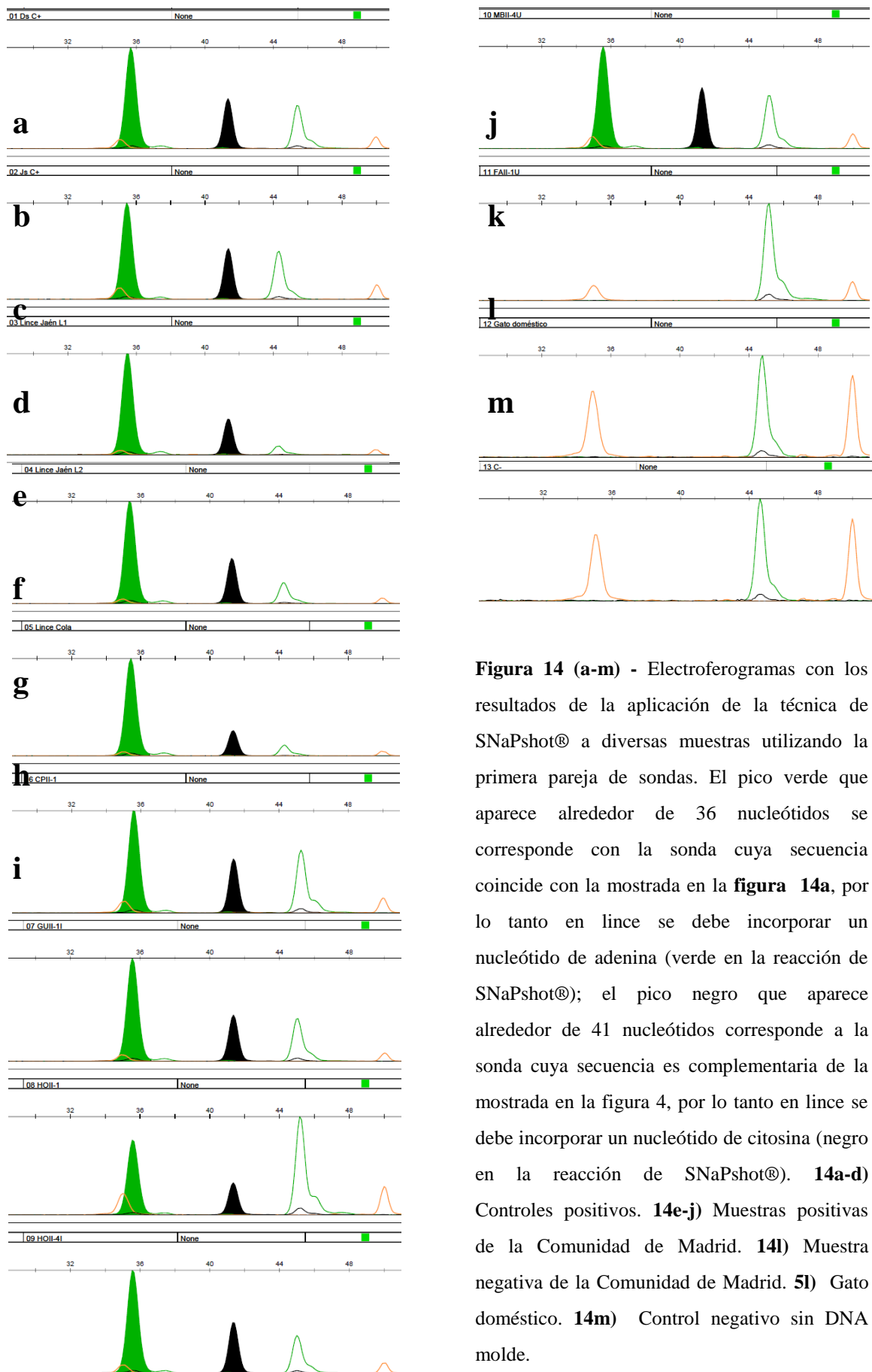


Figura 14 (a-m) - Electroferogramas con los resultados de la aplicación de la técnica de SNaPshot® a diversas muestras utilizando la primera pareja de sondas. El pico verde que aparece alrededor de 36 nucleótidos se corresponde con la sonda cuya secuencia coincide con la mostrada en la **figura 14a**, por lo tanto en lince se debe incorporar un nucleótido de adenina (verde en la reacción de SNaPshot®); el pico negro que aparece alrededor de 41 nucleótidos corresponde a la sonda cuya secuencia es complementaria de la mostrada en la figura 4, por lo tanto en lince se debe incorporar un nucleótido de citosina (negro en la reacción de SNaPshot®). **14a-d)** Controles positivos. **14e-j)** Muestras positivas de la Comunidad de Madrid. **14l)** Muestra negativa de la Comunidad de Madrid. **5l)** Gato doméstico. **14m)** Control negativo sin DNA molde.

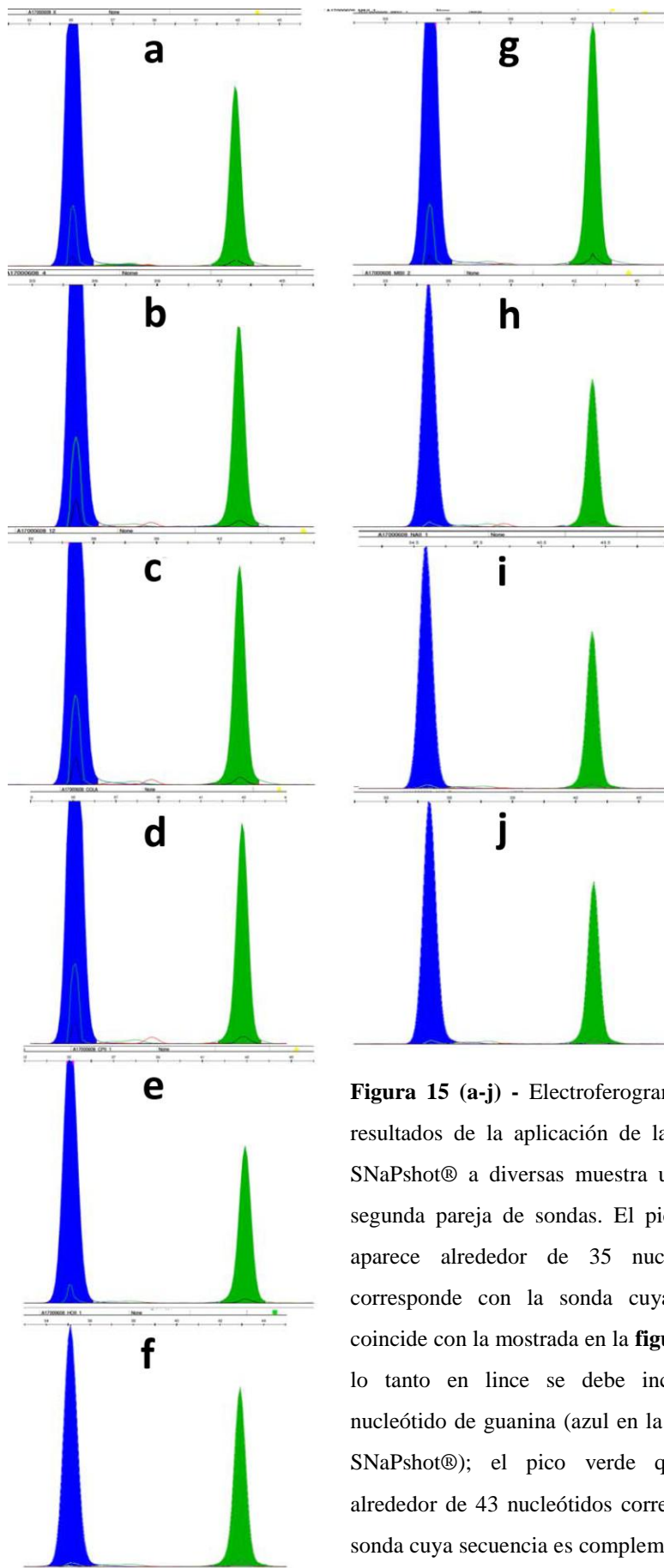


Figura 15 (a-j) - Electroferogramas con los resultados de la aplicación de la técnica de SNaPshot® a diversas muestra utilizando la segunda pareja de sondas. El pico azul que aparece alrededor de 35 nucleótidos se corresponde con la sonda cuya secuencia coincide con la mostrada en la **figura 13a**, por lo tanto en lince se debe incorporar un nucleótido de guanina (azul en la reacción de SNaPshot®); el pico verde que aparece alrededor de 43 nucleótidos corresponde a la sonda cuya secuencia es complementaria de la mostrada en la **figura 13a**, por lo tanto en lince se debe incorporar un nucleótido de adenina (verde en la reacción de SNaPshot®). **15a-d)** Controles positivos. **15e-j)** Muestras positivas de la CAM.

3.2.1.4. Resultados de la aplicación del método de PCR anidada desarrollado para la identificación de la especie, en otros laboratorios.

Con el fin de validar la aparición de resultados positivos de lince en la CAM, se solicitó el análisis de algunas de las muestras en dos laboratorios externos: la empresa especializada en análisis genéticos moleculares Genyca Innova (Majadahonda, Madrid) y el laboratorio de Genética del Instituto de Recursos Cinegéticos (IREC, CSIC, Ciudad Real). Se proporcionaron a ambos laboratorios, muestras de excrementos para la aplicación de la técnica de amplificación desarrollada por nuestro laboratorio. En cada caso, la técnica de extracción empleada fue diferente, siendo idéntico el resto del protocolo. Los resultados se reflejan en sendos informes adjuntos. En ambos casos se encontraron muestras positivas de lince pertenecientes a la CAM. Los controles positivos dieron los resultados esperados en todos los casos.

3.2.2. Desarrollo de un método identificación individual a partir de muestras de heces mediante amplificación de marcadores microsatélites.

Por otro lado, a partir de la consulta de las publicaciones previas sobre marcadores microsatélites aplicables al lince (Johnson *et al.*, 2004; Casas-Marce *et al.*, 2013); se eligieron varios marcadores que presentan elevada variabilidad y cuyas condiciones de amplificación son similares, para incluirlos en una reacción multiplex de PCR. Dichos marcadores son: BCG8Tb, Fca082b, Fca090, Fca559, Fca476 y Fca096 (**Tabla 7**). Se realizaron amplificaciones de cada marcador individualmente, para ajustar las condiciones de la reacción y comprobar la producción de un fragmento del tamaño esperado. Posteriormente, se utilizaron los seis marcadores elegidos en una PCR multiplex, demostrando que existe amplificación simultánea de todos los fragmentos (**Fig. 16**).

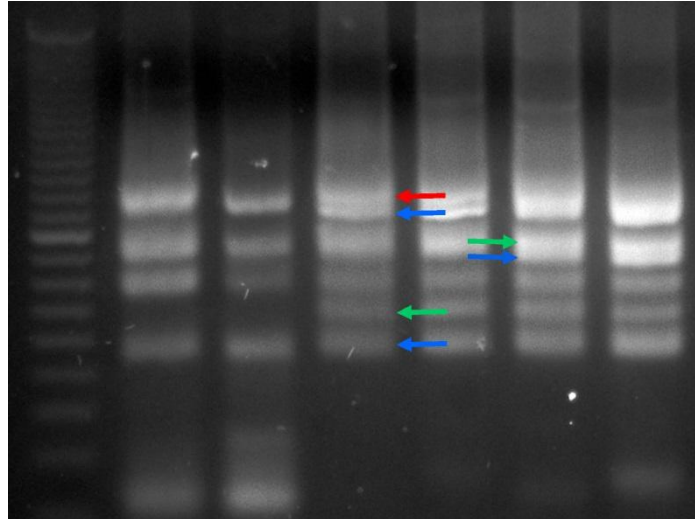


Figura 16- Fragmentos correspondientes a marcadores microsatélites amplificados por PCR multiplex. Los colores de las flechas que señalan cada fragmento se corresponden con los de los fluorocromos utilizados.

En una primera aproximación, las pruebas se llevaron a cabo con los cebadores sin marcar; según la intensidad de las bandas obtenidas se ajustaron las proporciones de cada cebador con el fin de conseguir un rendimiento similar para todos los marcadores.

Se consiguió una amplificación satisfactoria en las muestras bien conservadas: las muestras de excrementos frescos de tres individuos diferentes proporcionadas por el Centro de Cría en Cautividad del Acebuche de Doñana y dos muestras de excrementos frescos de animales silvestres, recogidas en el campo, procedentes de una finca localizada en Jaén y facilitadas por el propietario. Sin embargo, no se consiguió amplificación en las muestras procedentes en la CAM, debido a la considerable degradación de las mismas.

Cada muestra presentó una combinación única de alelos, lo que permitió la identificación de cada individuo (**Tabla 6**). En el total de las cinco muestras se encontraron tres alelos para cada uno de los microsatélites.

Muestra	Fca090		Fca082		Fca559		BCG8Tb		Fca476		Fca096	
Adelfa fresca (Af, Doñana)	110.55	110.55	186.65	186.65	231.6	235.74	158.19	158.19	193.39	197.17	238.5	238.5
Durillo fresca (Df, Doñana)	112.63	112.63	180.36	186.72	227.54	227.55	137.04	158.17	185.76	193.31	238.48	238.48
Jota fresca (Jf, Doñana)	112.66	114.83	180.47	184.72	227.51	231.63	137.17	158.2	193.55	193.55	238.51	244.72
L1 fresca (Jaén)	110.44	112.65	184.61	186.73	231.68	235.79	137.09	158.08	193.32	197.19	238.52	238.52
L2 fresca (Jaén)	110.51	110.51	180.36	180.36	231.76	231.77	156.0	158.18	197.16	197.16	238.49	242.39

Tabla 6- Genotipos para los seis marcadores microsatélites de cada uno de los cinco individuos en los que se obtuvo amplificación satisfactoria. Los colores indican el tipo de fluorescencia utilizada en cada marcador. Los números indican el tamaño del fragmento amplificado, es decir, los alelos para cada microsatélite. Los alelos coincidentes están sombreados del mismo modo.

La **figura 17 (a-c)**, muestra los perfiles obtenidos por amplificación de los marcadores microsatélites de los cinco individuos de los que disponíamos de material fresco. Los microsatélites BCG8 y Fca476, marcados con fluorescencia verde amplifican, en las condiciones ensayadas, con menos eficiencia que el resto, sin embargo, la información obtenida es suficiente para distinguir todos los individuos por su genotipo.

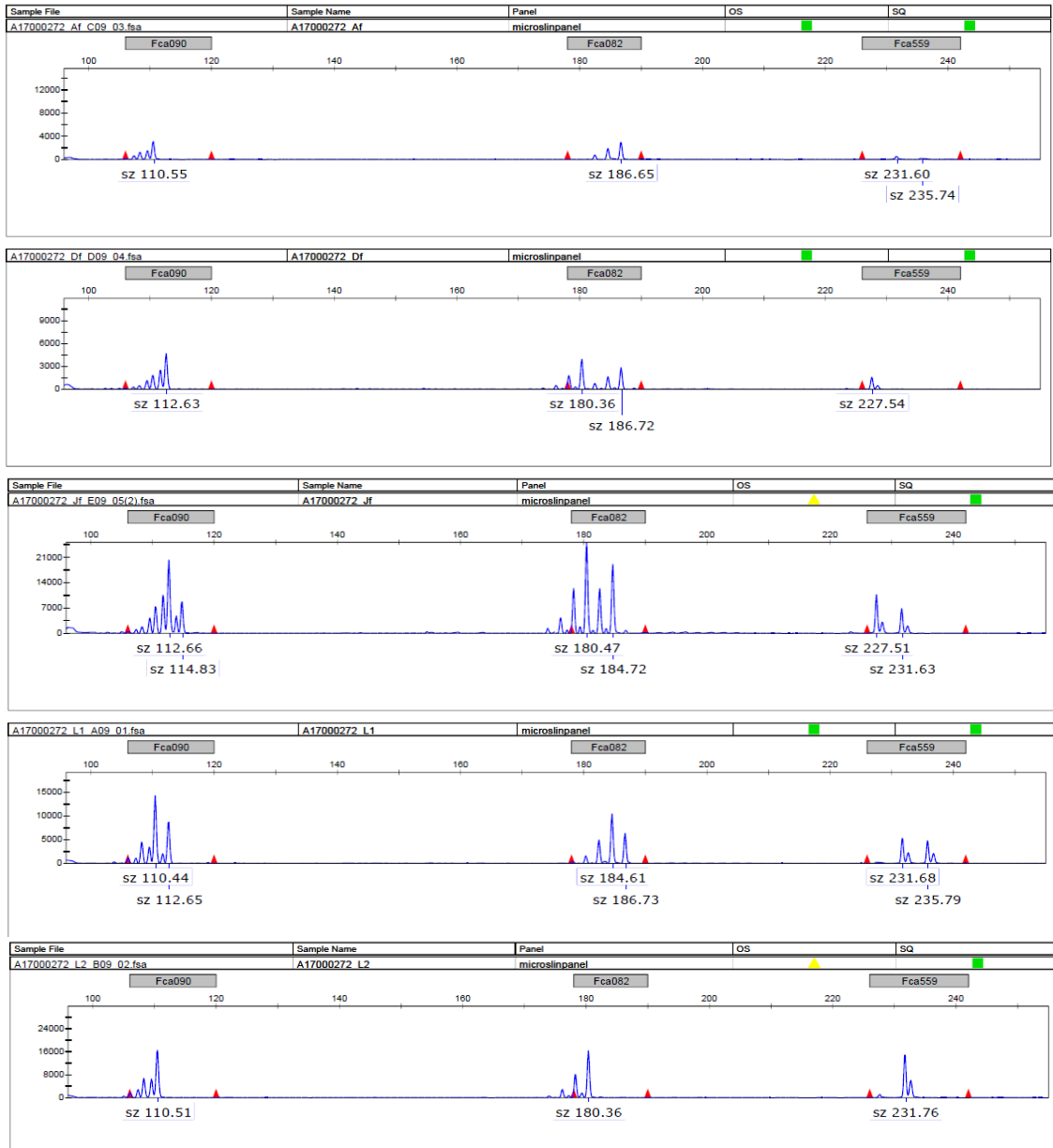


Figura 17a.- Perfiles de cinco individuos obtenidos por amplificación de los marcadores microsatélites Fca090, Fca082 y Fca559. Los números que identifican los picos corresponden al tamaño del fragmento amplificado y por tanto, al alelo de cada microsatélite. Todos los individuos muestran genotipos diferentes.

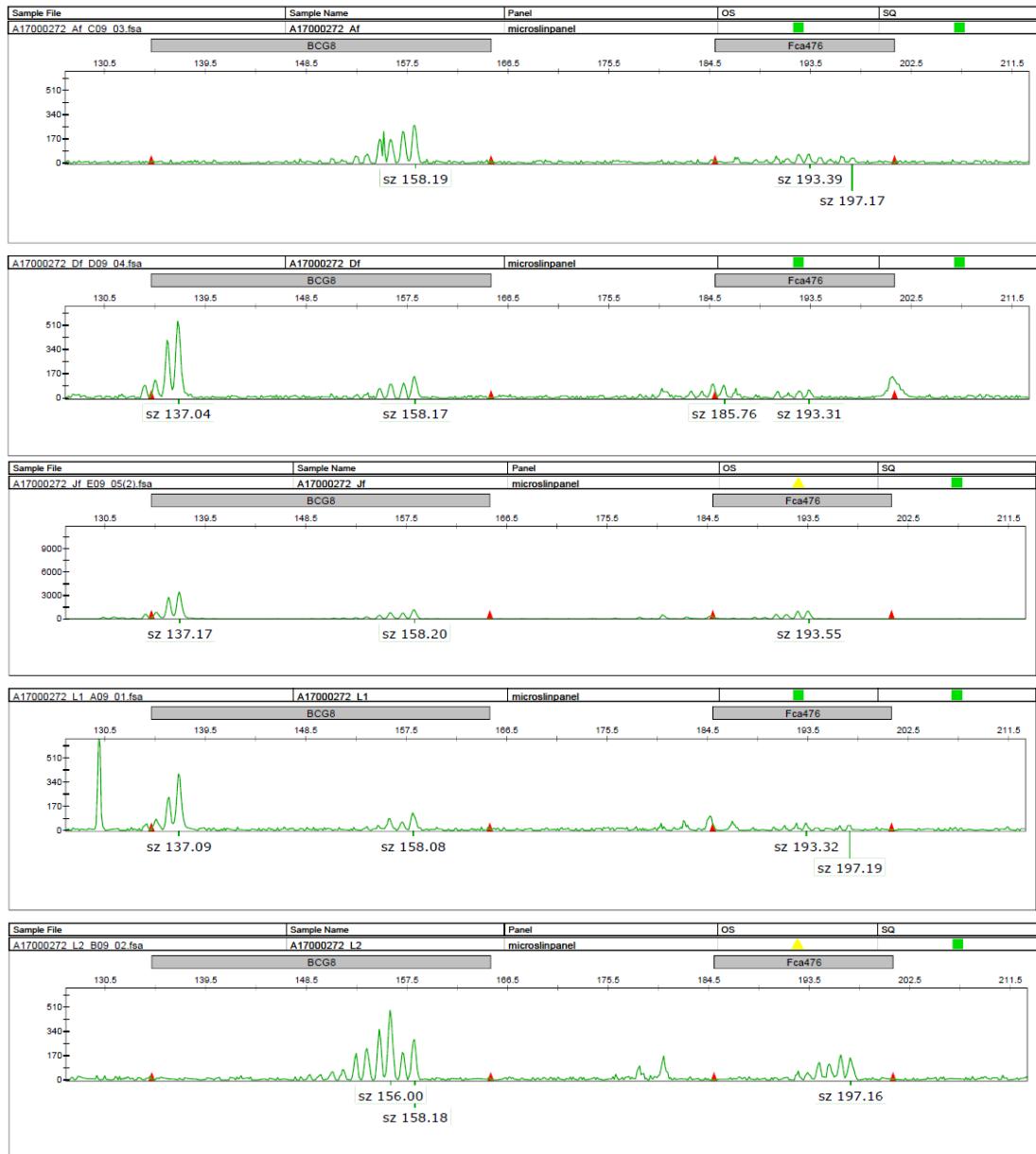


Figura 17b- Perfiles de cinco individuos obtenidos por amplificación de los marcadores microsatélites. Los marcadores BCG8Tb y Fca476, marcados con fluorescencia verde amplifican, en las condiciones ensayadas, con menos eficiencia que el resto.

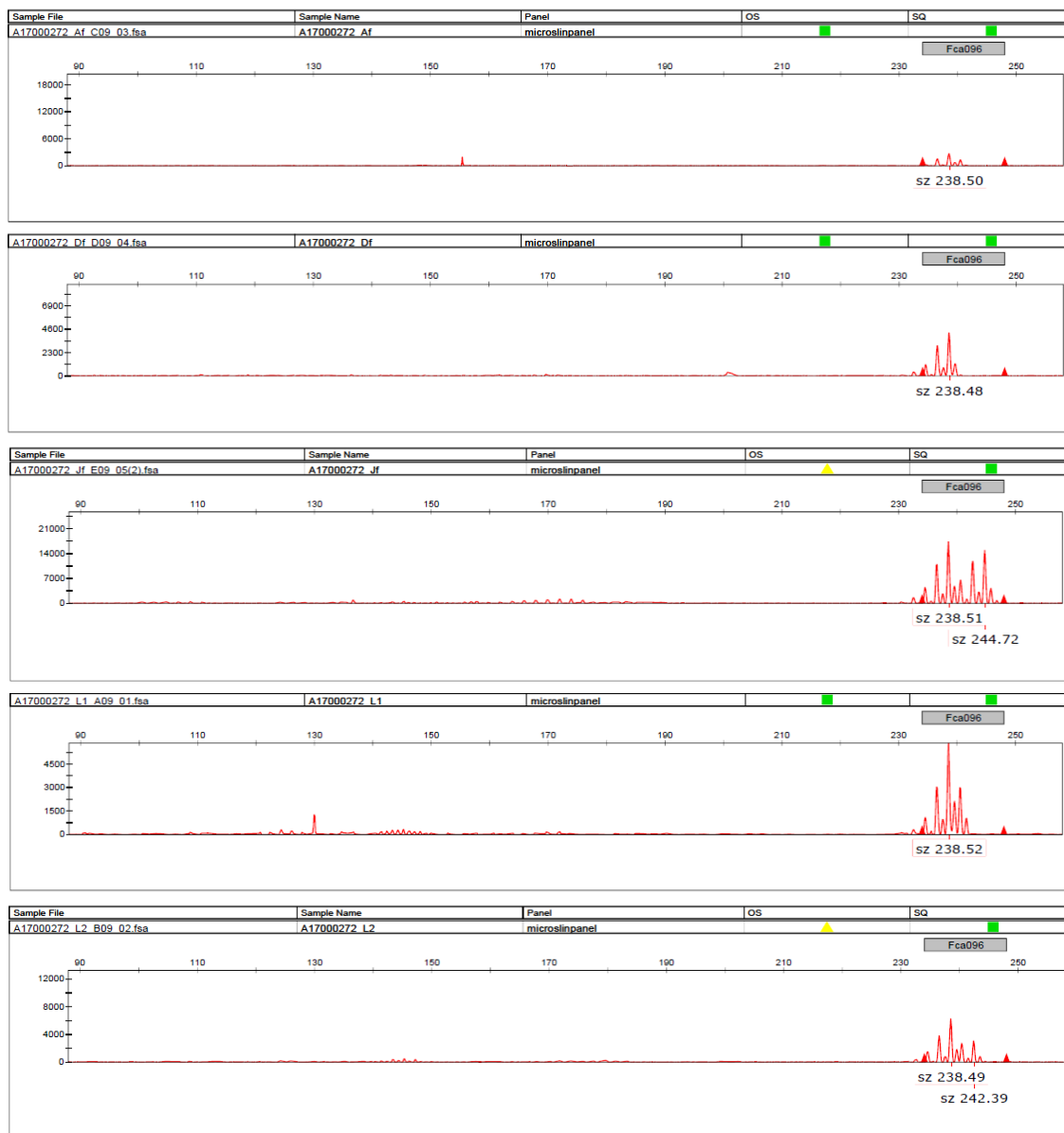


Figura 17c- Perfiles de cinco individuos obtenidos por amplificación del marcador microsatélite Fca096, marcado con fluorescencia roja.

Con el fin de conseguir amplificación de los microsatélites en muestras más degradadas se ensayó una estrategia (Piggot *et al.*, 2004; Bellemain *et al.*, 2005) consistente en realizar una primera amplificación múltiple con los cebadores sin marcar, seguida de amplificaciones individuales de cada microsatélite con cebadores marcados; sin embargo, no se han obtenido resultados satisfactorios, lo que indica que para la aplicación de este método de identificación individual, que requiere la amplificación de secuencias nucleares, es necesario disponer de excrementos relativamente menos deteriorados que los utilizados para la identificación específica con secuencias

mitocondriales, siempre más abundantes y mejor preservadas.

La **tabla 7** muestra los datos de todos los cebadores utilizados hasta el momento en este estudio.

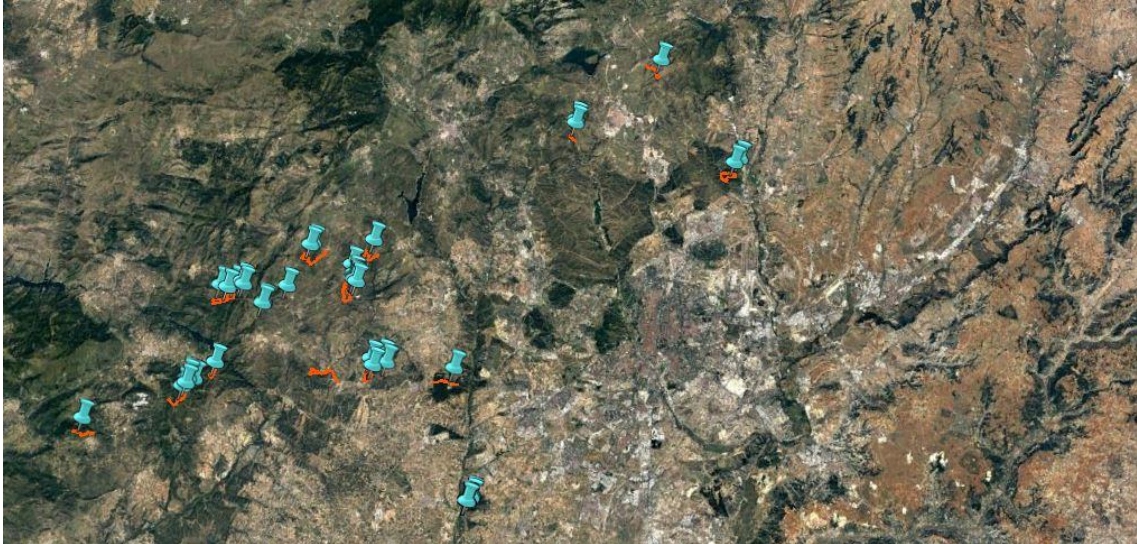
Nombre	Secuencia 5'-3'	Referencia
DL7F	CTTAATCGTGCATTATACCTTGT	Palomares et al. (2002)
CR2bR	CCGGAGCGAGAAGAGGTACA	Palomares et al. (2002)
Lp7UP	TATACCTTGTCTAGAGCAGTCT	Este trabajo
Lp76L	CAGGTGACTAAGCTTCTCT	Este trabajo
PanLO16722L	CAGATGCCAGGTATAGTTCC	Este trabajo
LNes16577U	TTATACCTTGTCTAGAGCAGTT	Este trabajo
Lnes16673L	GGAGCGAGAAGAGGTACA	Este trabajo
LinSNPaiz	AAATCTATGGACCTCAATTATCCAGAGG	Este trabajo
LinSNPadc	AAAAAAAAAAAAAAAAATGGTTTCTCGAGACCAGGTGA	Este trabajo
LinSNPaiz2	AGGACCTCAATTATCCAGAGGAAGCTTA	Este trabajo
LinSNPadc2	AAAAAAAAAAAAAAAAACAAGGATTGCTGGTTTCTCGAG	Este trabajo
BCG8TbUP	CTGCGCCTGAAGTCATTTCT	Casas-Marce et al. (2013)
BCG8TbLO	CAATAGACAAGACACATTCAAGCA	Casas-Marce et al. (2013)
Fca082bUP	TCACCGCTTAAGAAGAGGCTA	Casas-Marce et al. (2013)
Fca082bLO	GTGAAGCTTCCGAAATGAGG	Casas-Marce et al. (2013)
Fca090UP	ATCAAAAAGTCTTGAAGAGCATGG	Casas-Marce et al. (2013)
Fca090LO	TGTTAGCTCATGTTTATGTGTCC	Casas-Marce et al. (2013)
Fca559bUP	TGCCAAAATGTTCAAGAGTGG	Casas-Marce et al. (2013)
Fca559bLO	ATCATGCCCTGAGCTGAGTC	Casas-Marce et al. (2013)
Fca476UP	GACCTTGGAAGGAAAGGAGG	Menotti-Raymond et al. (1999)
Fca476LO	CCCTTTTCTCCATGTTGTTACT	Menotti-Raymond et al. (1999)
Fca096bUP	CACGCCAAACTCTATGCTGA	Casas-Marce et al. (2013)
Fca096bLO	CAACCAAGTTCCAAGTGGT	Casas-Marce et al. (2013)

Tabla 7- Listado de los cebadores de PCR utilizados en este estudio.

3.3. Caracterización del hábitat

Como se ha dicho anteriormente durante el muestreo se recogieron 84 excrementos de los cuales 44 resultaron ser positivos tras el análisis genético.

En el **Mapa 2** se muestran las localizaciones de las muestras que resultaron positivas.



Mapa 2- Localización de los excrementos de lince ibérico recogidos entre 2015 y 2016, que resultaron positivos al análisis.

3.4. Estima de Poblaciones

Para la estima de la población se han utilizado 14 IKAs en las que se recogieron todos los excrementos. En cada una se recorrieron 5 Km por zona asignada a esa IKA, por tanto habremos recorrido 70 Km en Madrid. Se han detectado 44 Excrementos positivos genéticamente en ellos, luego aplicando la correlación de la **Figura 18**, tendríamos:

$$X: \text{no.scats/km} = 44 / 70 = 0.63$$

$$Y: \text{n}^\circ \text{ individuos/100 Ha}$$

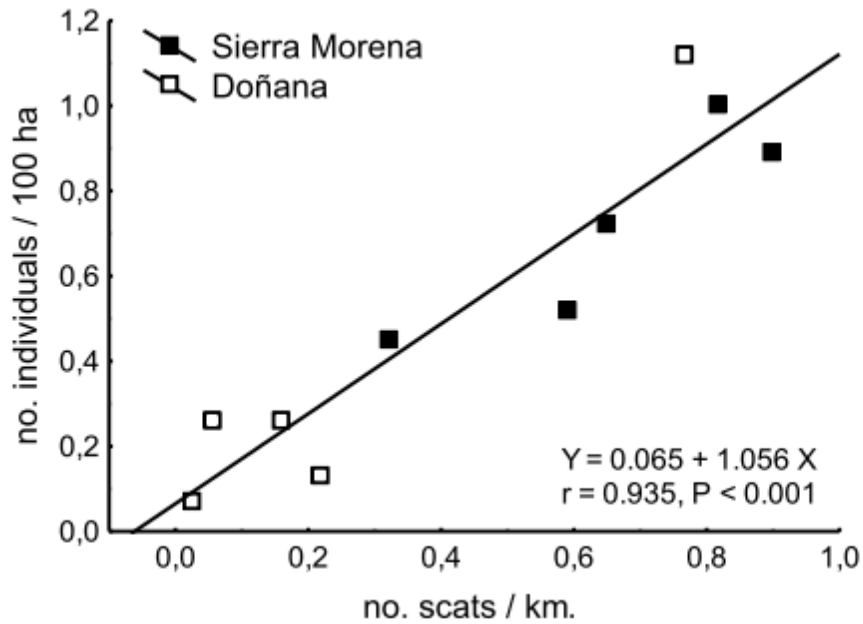


Figura 18- Recta de regresión propuesta por Garrote *et al.* (2014) que correlaciona el número de muestras positivas con los Kilómetros recorridos.

Según el modelo:

$$Y = 0,065 + 1,056 * 0.63 = 0.73 \text{ Linces/100 Ha}$$

Considerando la superficie del área potencial hallada en el mapa de hábitat potencial de aproximadamente 5.000 Ha, habría unos 33 lince en Madrid, con una horquilla de *más/menos* 5 lince, es decir, entre 28 y 38 lince.

Este resultado hay que tomarlo con precaución, dado que el hábitat potencial estimado y las particularidades de fragmentación del hábitat, así como la medida de la afectación que tienen las actividades humanas sobre el comportamiento del lince aún no ha sido evaluado, y el grado de acomodación a estas circunstancias no se conoce con precisión.

3.5. Caracterización del Microhábitat

El GLM construido con las variables recogidas en campo ($D^2 = 74.3 \%$; **Tabla 8**) muestra la importancia que tiene, para los felinos, la cobertura de matorral menor de 50 cm de altura. Esta variable resultó ser la única cuyo efecto es positivo sobre el IKA para felinos.

	Coefficiente	p-valor
Intercept	3.489	0.008
Arb	-0.038	0.032
Cul	-1.374	0.036
Her	-0.016	0.082
Mat	0.054	0.033
Pas	-0.047	0.012
Sue	-0.087	0.005

Tabla 8- Coeficientes estimados y p-valores de las variables incluidas en el modelo final para IKA de *Felis sp.* Se incluyeron las siguientes coberturas: arbórea (Arb), cultivo (Cul), herbáceas (Herb), matorral menor de 50 cm de altura (Mat), pasto (Pas) y suelo desnudo (Sue).

Las otras variables que resultaron ser estadísticamente significativas muestran la preferencia de los felinos por espacios heterogéneos, sin predominancia de una formación vegetal concreta. Además, se observa que la cobertura de sustrato agrario (Cul) presenta el efecto más negativo sobre la variable respuesta, mostrando la baja idoneidad que para los felinos tienen las zonas dominadas por este tipo de uso.

Por su parte, la abundancia de zorro no parece presentar ningún tipo de correlación con la de los felinos, al no ser el parámetro ρ significativamente distinto de 0 en la prueba de rangos de Spearman ($\rho = 0.067$ y p-valor = 0.819).

3.6. Evaluación de Variables Ambientales

Tras el ACP se decidió utilizar los 4 primeros componentes principales (CPs), ya que con ellos se absorbe el 83.476 % de la varianza total y, además, presentan un autovalor superior a 1. (**Fig. 19; Tabla 9**).

	CP1	CP2	CP3	CP4
Varianza	11.232	2.627	1.629	1.207
% de varianza	56.160	13.135	8.147	6.033
Varianza acumulada	56.160	69.295	77.442	83.476
Autovalor	11.232	2.627	1.629	1.207

Tabla 9- Varianza, porcentaje de varianza absorbida, varianza acumulada y autovalores de los 4 primeros componentes principales.

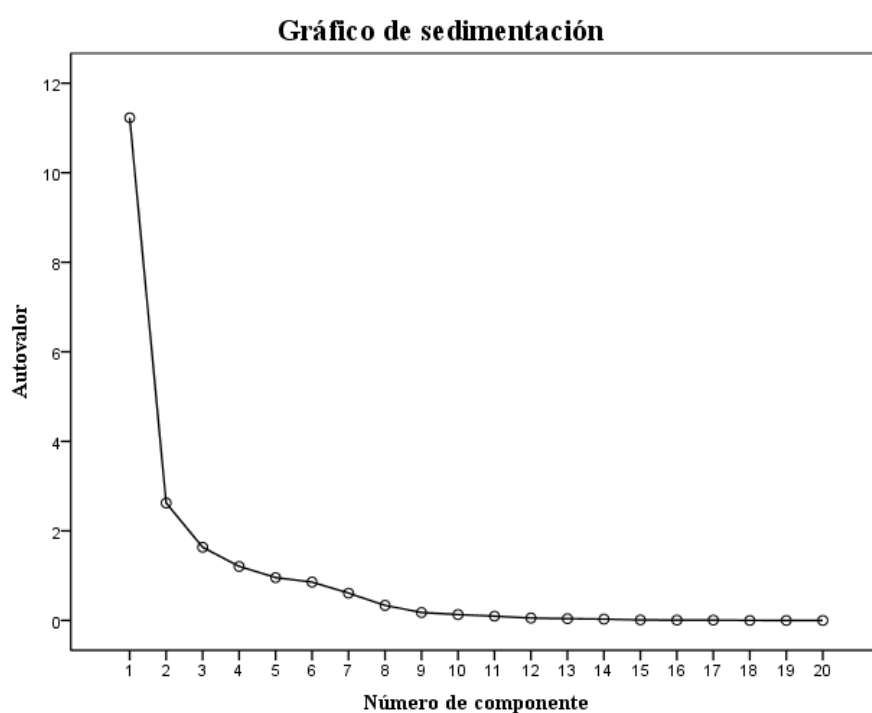


Figura 19- Gráfica de sedimentación del ACP. En ella se muestran los autovalores de cada CP generado.

En la **Figura 20** observamos que el CP1 recoge la información aportada por las variables climáticas. Así, se observa un gradiente definido por la altitud (Cota), precipitación en el mes más seco (Bio14) y precipitación media anual (Bio12) en el extremo negativo, y la temperatura en el mes más cálido (Bio5), temperatura media anual (Bio1) y temperatura en el mes más frío (Bio6) en la parte positiva. Por su parte,

el CP2 define un gradiente entre la cobertura de herbáceas (Herbáceas) en la fracción negativa y el rango de temperaturas diurno (Bio2) en la positiva. Estos resultados muestran la importancia que, a la escala definida, muestran las variables de tipo climático sobre la distribución del linco ibérico.

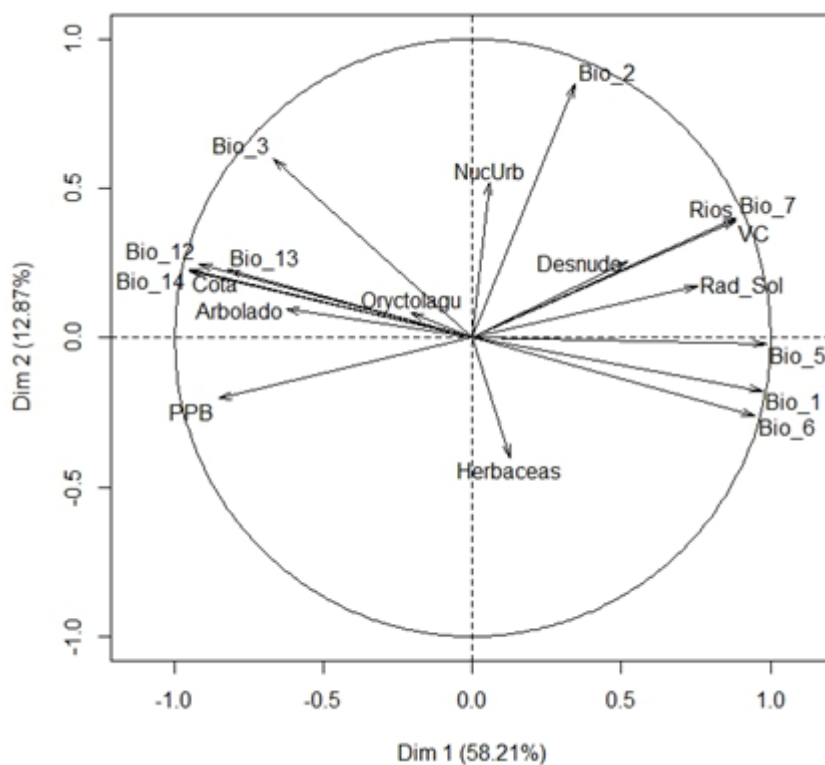


Figura 20- Representación de la correlación entre las variables originales y los dos primeros CPs. La longitud de los vectores representados indica el grado de correlación con cada eje. Las variables utilizadas en el ACP fueron las siguientes: temperatura media anual (Bio1), rango de temperaturas diurno (Bio2), isothermality (Bio3), temperatura máxima en el mes más cálido (Bio5), temperatura mínima en el mes más frío (Bio6), Rango de temperatura anual (Bio7), precipitación media anual (Bio12), precipitación en el mes más húmedo (Bio13), precipitación en el mes más seco (Bio14), radiación solar incidente (Rad_Sol), productividad primaria (PPB), personas/Km² (Población), altitud (Cota), probabilidad de encontrar conejo (Oryctolagu), distancia al núcleo urbano más cercano (NucUrb), distancia al río más cercano (Ríos), distancia a la vía de comunicación más cercana (VC), cobertura de herbáceas (Herbáceas), cobertura de arbolado (Arbolado) y cobertura de suelo desnudo (Desnudo) .

Si representamos el CP1 frente al CP2 en una gráfica de dispersión (**Fig. 21**), se observa una cierta, aunque siempre débil, relación lineal positiva entre ambos CPs.

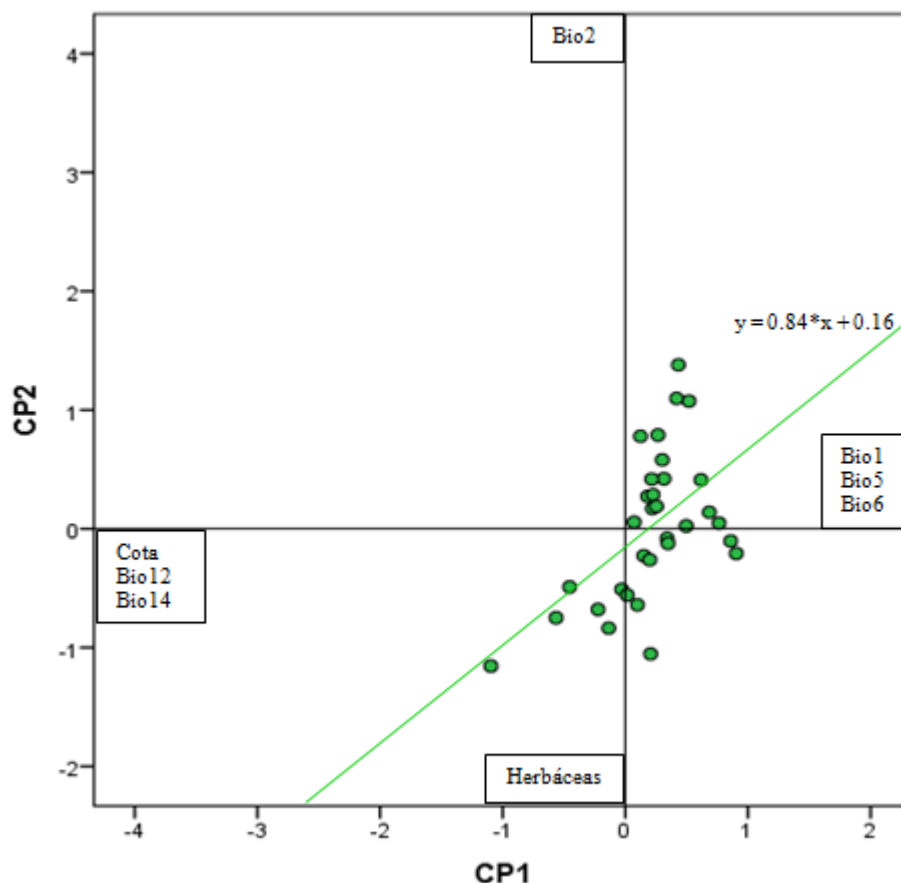


Figura 21- Gráfica de dispersión en la que están representadas las celdas con presencia de lince ibérico (puntos verdes) en el espacio definido por los dos primeros CPs. La línea verde es una recta de regresión lineal entre ambos CPs, en el extremo superior de la cual se muestra su ecuación. En los recuadros se indica qué variables resultaron más representativas para cada de los CP. Éstas son: temperatura media anual (Bio1), rango de temperaturas diurno (Bio2), temperatura máxima en el mes más cálido (Bio5), temperatura mínima en el mes más frío (Bio6), precipitación media anual (Bio12), precipitación en el mes más seco (Bio14), altitud (Cota) y cobertura de herbáceas (Herbáceas). Obtenida mediante IBM SPSS Statistics 22.

De esta forma, parece que las zonas en las que se ha detectado la presencia de ejemplares tienden a presentar valores ligeramente positivos en los CP1 y CP2, mostrando una cierta preferencia por zonas con temperaturas relativamente elevadas y con un contraste moderado entre la temperatura diurna y nocturna. También se aprecia un pequeño grupo de puntos en los que las herbáceas parecen jugar un papel importante. Concretamente, se observa una tendencia a ocupar zonas con baja cobertura de herbáceas. Asimismo, se observa claramente la ausencia de la especie en las zonas con elevados valores de precipitación, mostrando lo desfavorables que le resultan los lugares

con lluvias frecuentes, aunque este dato puede ser un “artefacto” del estudio dada la mayor velocidad de descomposición de los excrementos en zonas de alta pluviometría.

Los resultados sugieren que el lince ibérico selecciona áreas con unas características concretas, mostrando una tendencia a ocupar las zonas con el menor régimen de precipitaciones y temperaturas moderadas dentro de la CAM, alejándose de zonas montañosas y asentándose en terrenos de baja altitud, donde las temperaturas son más suaves y su contraste entre el día y la noche no es muy marcado.

3.7. Mapa de Hábitat Potencial

Para el modelo de idoneidad de hábitat (**Tabla 10**) solamente 4 de las 20 variables consideradas inicialmente presentaron un efecto significativo: precipitación media anual (Bio12; p-valor = 0.0005), distancia al río más cercano (Ríos; p-valor = 0.0016), distancia al núcleo urbano más cercano (NucUrb; p-valor = 0.0121) y cobertura de herbáceas (Herbáceas; p-valor = 0.1691).

	Coeficiente	p-valor
Intercept	7.97×10^7	0.0016
Bio12	-0.105	0.0005
Ríos	-17.97	0.0016
NucUrb	56.20	0.0121
Herbáceas	-4.8×10^{-2}	0.1691

Tabla 10- Coeficientes y p-valores de las variables incluidas en el modelo de idoneidad de hábitat ajustado. El modelo explica en torno al 42 % de la variabilidad total de los datos, siendo su varianza explicada (D^2) de 42.55. La variable respuesta es la probabilidad de encontrar un ejemplar de lince en cada una de las celdas de 1x1 Km. Las variables que resultaron estadísticamente significativas son: la precipitación media anual (Bio12), distancia al río más cercano (Ríos), distancia al núcleo urbano más cercano (NucUrb) y cobertura de herbáceas (Herbáceas).

Con este modelo se calculó la probabilidad de encontrar un ejemplar de lince ibérico en cada una de las celdas (1x1 Km) en las que se dividió el territorio y se representó en un mapa de hábitat potencial (**Fig. 22**).

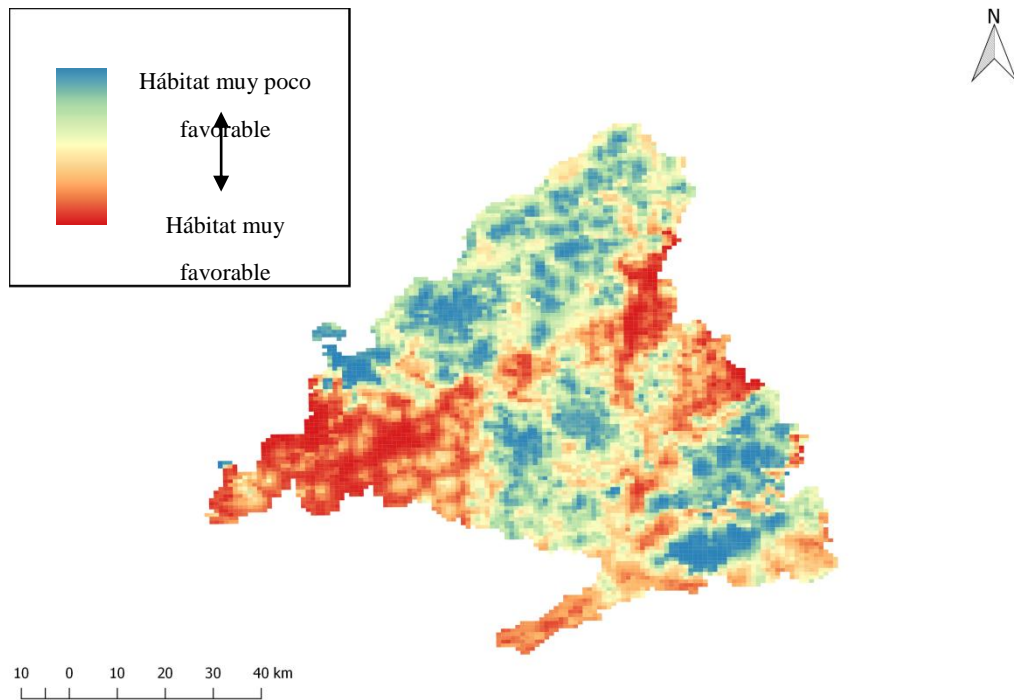


Figura 22- Mapa de hábitat potencial para el lince ibérico en la CAM con una resolución de 1x1 Km. La idoneidad del hábitat varía en un gradiente desde un hábitat muy poco favorable (azul) a uno muy favorable (rojo).

Este mapa nos muestra cuales son las zonas con un hábitat más idóneo en el que, potencialmente, podrían establecerse individuos de la especie. Se puede distinguir un área amplia en el suroeste de la comunidad cuyas condiciones ambientales resultan favorables para el lince. Esta zona coincide con el curso medio del río Guadarrama así como con la ZEPA de los ríos Alberche y Cofio, zona considerada históricamente como “lincera” (como ya se explicó en los apartados “Distribución y evolución de sus poblaciones en la Península Ibérica” y “El Lince Ibérico en la CAM”). Además, se aprecia una zona de hábitat favorable al noroeste de la ciudad de Madrid, coincidente con El Pardo-Viñuelas-Coto Pesadilla; otra situada al sur, en el curso bajo del río Jarama y el medio del río Tajo; y dos más en la zona oriental, una en el entorno del río Henares y otra en las cercanías del municipio de Valdetorres del Jarama.

La prueba de Kruskal-Wallis con la que se compararon el modelo arriba expuesto y el modelo control resultó ser estadísticamente significativa ($\chi^2 = 19.139$ y p-valor = 1.22×10^{-5}), por lo que se rechaza la hipótesis nula de homogeneidad de medias. Es decir, las distribuciones de probabilidad generadas con las presencias/ausencias observadas y las asignadas de forma aleatoria difieren significativamente entre ellas,

siendo más frecuentes las probabilidades altas en el modelo elaborado a partir de los datos recopilados en el campo y las citas históricas. En consecuencia, podemos afirmar que el lince ibérico realiza un proceso de selección de hábitat. En primer lugar ha de tenerse en cuenta que se han obtenido resultados para dos escalas diferentes: micro y macrohábitat. Dichos resultados han mostrado la relevancia de la escala en este tipo de estudios. De esta forma, diferentes variables han resultado significativas para la especie en función de la escala de estudio.

A nivel de microhábitat, los resultados coinciden con los obtenidos en estudios previos tanto para lince (Valverde, 1963; Rodríguez & Delibes, 1992; Palomares *et al.*, 1991; San Miguel *et al.*, 2006) como para gato montés (*Felis silvestris*; Lozano, 2010). Así, se refuerza la hipótesis de que los felinos tienden a ocupar, preferentemente, espacios con coberturas relativamente altas de matorral bajo. A pesar de que el modelo obtenido explica el 74.3 % de la varianza total de los datos, debe tomarse en consideración el bajo tamaño muestral disponible ($N = 14$), por lo que los resultados aquí expuestos han de servir únicamente de orientación para la realización de futuros estudios y/o programas de conservación. A pesar de esto, y como ya se ha dicho, los resultados son coherentes con los obtenidos en estudios previos. De este modo, se consolida la teoría de que los felinos tienden a ocupar paisajes formados por mosaicos en los que se alternan parches de matorral y arbolado disperso con zonas abiertas de pastos y herbáceas. Estos paisajes proporcionan simultáneamente refugio y alimento, permitiendo a los individuos ocultarse, criar y descansar entre los matorrales, a la vez que acechar a sus presas, que suelen pastar en áreas más abiertas (Rodríguez & Delibes, 1992).

El lince ibérico es considerado como un regulador de las poblaciones de otros depredadores (Cobo *et al.*, 2003). En Doñana, se ha demostrado que los niveles de zorros (*V. vulpes*), meloncillos (*Herpestes ichneumon*) o gineta (*Genetta genetta*) son mínimos en áreas habitadas por esta especie (Cobo *et al.*, 2003). Sin embargo, los resultados aquí expuestos muestran que no existe relación lineal entre las abundancias relativas (IKAs) de lince ibérico y zorro. Este hecho contradice una de las teorías más asentadas sobre el lince. Las causas de este comportamiento “novedoso” pueden ser varias. Podría ocurrir que la población de lince fuese tan reducida que no pudiese ejercer un “efecto regulador” apreciable. Otra posibilidad radica en una variación en el comportamiento conocido de la especie. Es posible que esta población no sea tan

reticente a compartir su espacio con otras especies debido, por ejemplo, a la abundancia de alimento. En este punto hay que resaltar el hecho de que la CAM es una de las comunidades autónomas con mayor densidad relativa de conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*) en España (Villafuerte, 2007). También hay que recordar que para estudiar la relación entre ambas especies se han utilizado todas las deposiciones encontradas, por lo tanto, es factible pensar que esto esté afectando a los resultados.

Al aumentar la escala de estudio a toda la CAM, observamos como las variables que resultan significativas para la especie cambian. Ahora la estructura vegetal no parece ser un factor tan determinante. En su lugar, las variables climáticas son las que limitarían el área de distribución de la especie. Así, se muestra la preferencia de los lince por las zonas con temperaturas relativamente altas y escasa precipitación. Esta tendencia puede venir marcada por la disponibilidad de presas. Como se explica en el trabajo de Beltrán & Delibes (1994), el lince sería capaz de tolerar un rango de variación ambiental más elevado, sin embargo, es posible que estos factores afecten de forma decisiva a sus potenciales presas. Por ejemplo, tanto en condiciones de temperaturas bajas y/o precipitación abundante la actividad de las presas potenciales se ve reducida, obligando al lince ibérico a gastar más energía en busca de alimento y, en consecuencia, dificultando su supervivencia.

También se aprecia la tendencia de la especie a ocupar áreas con baja cobertura de herbáceas, lo que coincide tanto con el conocimiento previo de la especie como con los datos obtenidos en el muestreo de campo. Dicha tendencia tiene su explicación en los ya comentados patrones de caza de la especie, cuya arma principal es el mimetismo (San Miguel *et al.*, 2006).

Al contrario de lo indicado por multitud de estudios previos, la probabilidad de encontrar conejo no resultó significativa en el modelo de idoneidad de hábitat. Es bien conocido que el lince ibérico es considerado como un especialista trófico, estrictamente dependiente del conejo de monte (Rodríguez & Delibes, 1992; Boscaje S.L., 2000; San Miguel *et al.*, 2006; Garrote, 2014), especie que constituye el 80 - 90% de su dieta (San Miguel *et al.*, 2006). Sin embargo algunos autores ya habían sugerido la independencia trófica del lince con respecto al conejo de monte (Real *et al.*, 2009; Lobón-Rovira, 2015). Podría ocurrir que la abundancia de conejo en la CAM fuese tan elevada que no llegase a representar un factor limitante para el lince ibérico, incluso en las zonas con

menores abundancias. Para contrastar la veracidad de estos resultados, es necesario profundizar en la cuestión y realizar nuevos estudios dirigidos a averiguar las causas de este posible “desacoplamiento” en la relación de dependencia trófica entre depredador y presa.

En el mapa de hábitat potencial se observa la importancia de los ríos permanentes, ya que las zonas de “hábitat muy favorable” se encuentran alrededor de los ríos Guadarrama, Jarama, Alberche, Cofio, Tajo y Henares. Así, se vislumbra la importancia que, éstos, tienen como potencial vía de dispersión y conectividad entre poblaciones de lince ibérico.

Existe cierto debate sobre la interpretación ecológica que se le ha de dar a los resultados obtenidos con esta metodología (Mateo *et al.*, 2011). Sin embargo, aquí se ha considerado que lo que realmente estima el modelo es el nicho fundamental o Grinelliano (James *et al.*, 1984) de la especie a estudiar, es decir, el “hipervolumen n-dimensional en el que cada punto del espacio está asociado a unas características ambientales que permitirían la existencia de la especie de forma indefinida” (Hutchinson, 1987). Por lo tanto, este modelo nos está proporcionando una sobreestimación del hábitat potencial, ya que no se han tenido en cuenta las relaciones inter-específicas con otros competidores, la capacidad de dispersión o la dinámica poblacional, lo que conformaría el “nicho realizado” (Guisan & Thuiller, 2005). A pesar de esto, el mapa construido proporciona información muy útil a la hora de focalizar los esfuerzos tanto de futuros estudios como de posibles reintroducciones.

Conocer el hábitat potencial de una especie nos ofrece la oportunidad de implementar el conocimiento de su distribución real. Ante la tesitura actual, en la que se están registrando nuevos avistamientos en zonas hasta ahora descartadas, es importante identificar nuevas zonas donde podría estar presente la especie con el fin de tener una percepción más precisa sobre la situación en la que se encuentran sus poblaciones, que muestran una correlación positiva para un tipo concreto de hábitat.

4. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se muestran a continuación corresponden a una investigación en una fase que podemos considerar preliminar, que comenzó en 2015, aunque contienen datos relevantes y, en cierta forma, sorprendentes. Son, por tanto, también preliminares, y correspondientes al estado de conocimiento que tenemos actualmente, aunque suscitan muchas preguntas de enorme interés a cerca de la conservación de la naturaleza tal y como hoy generalmente se concibe.

4.1. Presencia de lince ibérico en la CAM

1. Los resultados genéticos confirman la existencia de una población de lince ibérico, hasta ahora desconocida, que parece ser estable en el tiempo, al haberse encontrado excrementos positivos en dos años consecutivos en los mismos lugares. Además, ésta, podría suponer una fuente importante de material genético debido a la escasa variabilidad que presentan las poblaciones ya conocidas, altamente aisladas y es posible que sometidas a un deletéreo síndrome de “poblaciones pequeñas” con efecto Allee por ejemplo, lo que es crítico de cara a la viabilidad (Packer *et al.* 2009).

2. La CAM ha demostrado ser un territorio propicio para la especie, presentando grandes superficies con condiciones idóneas para su asentamiento.

4.2. Preferencias de hábitat y hábitat potencial

3. Con la metodología empleada se ha corroborado que el lince ibérico realiza una selección del hábitat en el que asentarse. Así, selecciona paisajes formados por teselas de bosque mediterráneo con arbolado disperso y matorral tupido que limitan con pastizales y/o herbazales.

4. En el territorio de la CAM el lince ibérico no parece verse tan influido por la disponibilidad del conejo de monte. Este resultado reclama la atención de futuras investigaciones sobre el contenido de los excrementos recogidos.

5. La identificación de dos zonas que, hasta la fecha no habían sido consideradas, abren las puertas a la realización de futuras prospecciones con el fin de descubrir nuevos individuos o poblaciones, así como de verificar la idoneidad de estas áreas.

6. Ha de considerarse, también, la importancia que han demostrado los ríos como potenciales vías de dispersión y conectividad entre poblaciones.

4.3. Estima de abundancias

7. Se ha aplicado el modelo propuesto por Garrote y Tellería, con un resultado de entre 28 y 38 lince en toda la CAM. Sin embargo no consideramos este modelo como definitivo, ya que fue desarrollado para otras áreas como Doñana y Andújar. Se propone desarrollar un modelo más ajustado a la realidad de Madrid.

4.4. Individualización de muestras

8. Se han iniciado estudios genéticos de **microsatélites para individualizar las muestras** de modo que se dispone de una técnica que permite distinguir un individuo de otro. En primer lugar se utilizaron 3 muestras frescas facilitadas por el Centro de Cría en Cautividad del Acebuche, de Doñana, y otras 2 recogidas en Andújar. **La técnica permitió identificar individualmente los cinco individuos.** Aplicada esta técnica a las muestras recogidas **en Madrid no se obtuvieron resultados** debido a la degradación de las muestras.

9. En sucesivos estudios se diseñará un sistema de muestreo que permita recoger muestras frescas, y colocar cámaras para poder identificar animales por el pelaje y determinar su sexo, de modo que puedan corroborarse los resultados de forma más fehaciente.

5. BIBLIOGRAFÍA CITADA Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Reyes-García, A. R., Alzaga, V. & Gortázar, C. (2008). Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *Journal of Zoology*, 276: 37-47.
- Alda, F., Inoges, J., Alcaraz, L., Oria, J., Aranda, A., y Doadrio, I. (2008). Looking for the Iberian lynx in central Spain: a needle in a haystack?. *Animal conservation*, 11(4), 297-305.
- Aldama, J. J. (1996). Actuaciones para la conservación del lince ibérico en la C.A.M. Proyecto LIFE, informe técnico inédito.
- Barrull i Ventura, J. (2014). Factors estructuradors d'una comunitat de mesocamívors en un ambient agroforestal Mediterrani. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Barrull, J., Mate, I., Salicrú, M., Palet, J., Casanovas, J. G., Gosàlbez, J., & Ruiz-Olmo, J. (2014). Differential response of a carnivore community to predator control: a spatio-temporal observational study. *Italian Journal of Zoology*, 81(2), 271-279.
- Bellemain, E. V. A., Swenson, J. E., Tallmon, D., Brunberg, S., & Taberlet, P. (2005). Estimating Population Size of Elusive Animals with DNA from Hunter- Collected Feces: Four Methods for Brown Bears. *Conservation Biology*, 19(1), 150-161.
- Beltrán, J. F. & Delibes, M. (1994). Environmental determinants of circadian activity of free-ranging Iberian lynxes. *Journal of Mammalogy*, 75 (2): 382-393.
- Beltrán, J. F., Rice, J. & Honeycutt, R. (1996). Taxonomy of the Iberian lynx. *Nature*, 379.
- Bonifay, M. F. (1971) Carnivores quaternaires du Sud-Est de la France. *Mémoires Mus Nat Hist Nat Paris*, 21 (2): 43–377. En: Ghezzi, E., Boscaini, A., Madurell-Malapeira, J. & Rook, L. (2015). Lynx remains from the Pliocene of Valdemio cave (Savona, Northwestern Italy), and the oldest occurrence of *Lynx spelaeus* (Carnivora, Felidae). *Rend. Fis. Acc. Lincei*, 26: 87-95.
- Boscage, S.L. (1997-1998-1999-2000). Actuaciones para la conservación de las poblaciones de lince ibérico *Lynx pardina* en la C.A.M. Informe técnico inédito.
- Boscage, S.L (2001). Muestreo de indicios de presencia de Lince Ibérico en Madrid. Informe técnico inédito.
- Cabezas-Díaz, S., Lozano, J., y Virgos, E. (2009). The declines of the wild rabbit

(*Oryctolagus cuniculus*) and the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain: redirecting conservation efforts. Handbook of nature conservation: global, environmental and economic issues, 283-310.

Cabrera, A. (1914). Fauna Ibérica. Mamíferos. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.

Calzada, J., Muñoz, P., Sánchez, A., Palacios, M. J., Dávila, C., Simón, M. A., Cadenas, R., Jiménez, F., Leiva, A., Saldaña, S., Carbonell, R., Ignacio, J., Aranda, A., Mosqueda, I., Prada, L., Mariano, L., Heredia, B., Aymerich, M., Domínguez, F. G., Delibes, M., Palomares, F., Godoy, J. A., Píriz, A., Vargas, A., Martínez, F., Guzmán, J., Centenera, S., Grazón, P. & González, J. L. (2007). Estrategia para la Conservación del Lince Ibérico (*Lynx pardinus*). Comisión Nacional de Protección de la Naturaleza.

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(22), 5503-5515.

Castro, L. R., y Palma, L. (1996). The current status, distribution and conservation of Iberian lynx in Portugal. *Journal of Wildlife Research*, 2(1), 179-181.

Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, y de Árboles Singulares. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación de Territorio, Madrid. Disponible en: <http://www.madrid.org>. Acceso el 13/05/2016.

Chapron C.D., Ballester N.A., Fontaine J.H., Frades C.N., Margolin A.B. (2000). Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol.* 2000. 66(6), 2520-5.

Chefaoui, R. M., Hortal, J., y Lobo, J. M., 2005. Potential distribution modelling, niche characterization and conservation status assessment using GIS tools: a case study of Iberian Copris species. *Biological Conservation*, 122: 327–338.

Clavero, M., y Delibes, M. (2013). Using historical accounts to set conservation baselines: the case of Lynx species in Spain. *Biodiversity and conservation*, 22(8), 1691-1702.

Cobo, J., Barrios, F., Bartolomé, J., Maroto, A., Ojea, A. & Vega, I. (2003). El boletín de los que todavía conviven con lince. WWF/Adena, Lubicán, 15 pp.

Cohen, W. B., Maiersperger, T. K., Gower, S. T., y Turner, D. P. (2003). An improved strategy for regression of biophysical variables and Landsat ETM+ data. *Remote*

Sensing of Environment 84.4: 561-571.

Delibes, M. (1979). Le lynx dans la Péninsule Ibérique: répartition et régression. Bull. mens. Off. Nation. Chas. N° sp. Scie. Tech, 41 - 46.

Diario de Arousa. (2016). Vecinos de Lesón sospechan que la sorprendente presencia de un lince está detrás de la muerte de sus aves. Nota de prensa. Disponible en: <http://www.diariodearousa.com>. Acceso el 18/01/2017.

Fernández-Olalla, M. (2011). Seguimiento y gestión de sistemas depredadores-presa: aplicación a la conservación de fauna amenazada. Tesis Doctoral, E.T.S.I. Montes (UPM) [antigua denominación].

Ferrer, M., & Negro, J. J. (2004). The near extinction of two large European predators: super specialists pay a price. Conservation Biology, 18(2), 344-349.

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*. Behav. Ecol., 15: 31-40.

Footprint Dataset.(IGHP). NASA Socioeconomic Data and Applications Center (SEDAC). Disponible en: www.sedac.ciesin.columbia.edu

García, J., Cadenas, J. G., y Simón, M. A. (2004). Aplicación de un sistema de evaluación multicriterio a la conservación de fauna silvestre mediante un SIG. XI Congreso de Métodos Cuantitativos, SIG y Teledetección" celebrado en Murcia, 20-23 de septiembre, 2004 (pp. 289-302). Universidad de Murcia.

García, P. & Pérez, E. (2016). Mapping of soil sealing by vegetation indexes and built-up index: A case study in Madrid (Spain). Geoderma, 268: 100-107.

Garrote, G. (2015). Estudio y conservación del lince ibérico ("*Lynx pardinus*") en España. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Zoología.

Garrote, G., Pérez de Ayala, R., Tellería J. L. (2014) A comparison of scat counts and camera-trapping as means of assessing Iberian lynx abundance. Eur J Wildl Res (2014) 60:885–889. DOI 10.1007/s10344-014-0855-7

Ghezzi, E., Boscaini, A., Madurell-Malapeira, J. & Rook, L. (2015). Lynx remains from the Pliocene of Valdemio cave (Savona, Northwestern Italy), and the oldest occurrence of *Lynx spelaeus* (Carnivora, Felidae). Rnd. Fis. Acc. Lincei, 26: 87-95.

- Gil-Sánchez, J. M. & McCain, E. B. (2011). Former range and decline of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) reconstructed using verified records. *Journal of Mammalogy*, 92 (5): 1081-1090.
- GIR DIAGNOSTICS, S.L. (2006 – 2007). Muestreo de indicios de presencia de Lince Ibérico (*Lynx pardinus*) en el suroeste de la Comunidad Autónoma de Madrid. Informe técnico inédito.
- Graells, M. P. (1897). Fauna Mastodológica Ibérica. Real Academia de Ciencias. Madrid.
- Gugolz, D., Bernasconi, M. V., Breitenmoser-Würsten, C. & Wandeler, P. (2008). Historical DNA reveals the phylogenetic position of the extinct Alpine lynx. *Journal of zoology*, 275: 201-208.
- Guisan, A. & Thuiller, W. (2005). Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters*, 8: 993-1009.
- Guzmán, J. N., García, F. J., Garrote, G., Pérez de Ayala, R., & Iglesias, M. C. (2004). El lince ibérico (*Lynx pardinus*) en España y Portugal. Censo-diagnóstico de sus poblaciones. DGCN, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- Guzmán, J. N., Garrote, G., García, P., de Ayala, R. P., & Iglesias, M. C. (2002). Censo-diagnóstico de las poblaciones de lince Ibérico (*Lynx pardinus*) en España. 2000-2002. In Abstract International Seminar on the Iberian lynx.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
- Hernández, J. & Rodríguez, G. (1988). El Lince Ibérico (*Lynx pardina*) en la Sierra de Gredos. *Boletín Universitario*, 7: 115-117.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., & Parra, J. L. (2006). WorldClim Global Climate Layers Version 1.4. Disponible en: www.worldclim.org. Acceso el: 15/07/2016.
- Hurlbert, S. H. (1984). Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological monographs*, 54(2), 187-211.
- Hutchinson, G. E. (1957). Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symp Quantitative Biol.*, 22: 415-427.
- Iglesias, A. & España, A. J. (2010). Rastros y huellas de carnívoros ibéricos. Ediciones Jaguar. Madrid.

- Instituto Geográfico Nacional (IGN), 2015. Centro Nacional de Información Geográfica (CNIG). Ministerio de Fomento. Gobierno de España. (www.ign.es)
- James, F. C., Johnson, R. F., Wamer, N. O., Niemi, G. J. & Boecklen, W. J. (1984). The Grinnellian niche of the Wood Thrush. *Am. Naturalist*, 124: 17-47.
- Jean C. Roche, Boris Jollivet, Carlos de Hita y Eloisa Matheu (2012). Guía sonora de los mamíferos de España y Europa. CD1.
- 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. *Journal of Heredity*, 95(1), 19-28.
- Jungerius, B. J. (2003). Typing single-nucleotide polymorphisms using a gel-based sequencer. *Molecular biotechnology*, 25(3), 283-287.
- Kitpipit, T., Tobe, S. S., Kitchener, A. C., Gill, P., & Linacre, A. (2012). The development and validation of a single SNaPshot multiplex for tiger species and subspecies identification—Implications for forensic purposes. *Forensic Science International: Genetics*, 6(2), 250-257.
- Kurten, B. & Granqvist, E. (1987). Fossil pardel lynx (*Lynx pardina spelaea* Boule) from a cave in southern France. *Ann Zool Fennici*, 24: 39–43.
- Lee, J. C. I., Hsieh, H. M., Huang, L. H., Kuo, Y. C., Wu, J. H., Chin, S. C., ... & Tsai, L. C. (2009). Ivory identification by DNA profiling of cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*, 123(2), 117-121.
- Life+IBERLINCE. Recuperación de la distribución histórica del Lince ibérico (*Lynx pardinus*) en España y Portugal (LIFE10NAT/ES/570). Disponible en: <http://www.iberlince.eu>. Acceso el 9/11/2016.
- Lobón-Rovira, J. (2015). Lince ibérico (*Lynx pardinus*) en la Comunidad Autónoma de Madrid. Respuesta a una pregunta infinita. Tesis de Maestría, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Ecología.
- Lorfèvre, F. (2009) Les Lynx Plio-Pleistocènes: examen critique de leur phylogénie et intéret paléoenvironnemental. Dissertation, Université Bordeaux.
- Lozano, J. (2010). Habitat use by European wildcats (*Felis silvestris*) in central Spain: what is the relative importance of forest variables?. *Animal Biodiversity and Conservation*, 33 (2): 143–150.

- Lozano, J., Virgós, E., Malo, A. F., Huertas, D. L., & Casanovas, J. G. (2003). Importance of scrub–pastureland mosaics for wild-living cats occurrence in a Mediterranean area: implications for the conservation of the wildcat (*Felis silvestris*). *Biodiversity & Conservation*, 12(5), 921-935.
- Macdonald, D. W., Newman, C., Dean, J., Buesching, C. D., y Johnson, P. J. (2004). The distribution of Eurasian badger, *Meles meles*, setts in a high-density area: field observations contradict the sett dispersion hypothesis. *Oikos*, 106(2), 295-307.
- Mallinson, J. (1978). Lynxes. European lynx (*Lynx lynx*) and pardel lynx (*Lynx pardina*). En: *The shadow of extinction: Europe's Threatened Wild Mammals*. MacMillan. London, 141–148 pp.
- Martín, J., Grande, R., Hernando, A., Eliseo, J., Echegaray, J., García, P., González, J. G., Gutiérrez, A., Manzanedo, J. A., Martín, F., Moro, J., Porras, J., Sánchez, J. & Zamarreño, J. C. (2007). Prospección del Lince Ibérico en los montes del centro de España. Fundación Abertis, Cantabria.
- Martin, T. E. (1998). Are microhabitat preferences of coexisting species under selection and adaptive?. *Ecology*, 79 (2): 656-670.
- Mateo, R. G., Felicísimo, A. M. & Muñoz, J. (2011). Species distributions models: A synthetic revision. *Revista Chilena de Historia Natural*, 84: 217-240.
- MDA Federal. (2004). Landsat GeoCover ETM+ 2000 Edition Mosaics Tile N-03-05.ETM-EarthSat-MrSID, 1.0. USGS, Sioux Falls, South Dakota, 2000. Disponible en: www.landcover.org. Acceso el 13/07/2015.
- Menotti-Raymond M., David V.A., Lyons L.A., Schäffer A.A., Tomlin J.F., Hutton M.K., O'Brien S.J. (1999). A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics*.57(1), 9-23
- Morris, D. W. (1987). Ecological scale and habitat use. *Ecology*, 68 (2): 362-369.
- NASA Earth Observations (NEO). (2016). Disponible en: <http://neo.sci.gsfc.nasa.gov>. Acceso el: 16/07/2016.
- Nowell, K. & Jackson, P. (1996). *Wild cats: status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC Cat Specialist Group. Gland, Switzerland.
- Packer, C., Kosmala, M., Cooley, H.S., Brink, H., Pintea, L., Garshelis, D., Purchase, G., Strauss, M., Swanson, A., Balme, G. and Hunter, L., (2009). Sport hunting, predator

control and conservation of large carnivores. *Plos One*, 4(6), p.e5941.

Palomares, F., Godoy, J. A., Píriz, A., & O'Brien, S. J. (2002). Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular ecology*, 11(10), 2171-2182.

Palomares, F., Rodríguez, A., Laffitte, R. & Delibes, M. (1991). The status and distribution of the Iberian lynx *Felis pardina* (Temminck) in Coto Doñana Area, SW Spain. Estación Biológica de Doñana. CSIC.

Palomo, L. J., Gisbert, J. y Blanco, J.C. (2007). Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España. Madrid Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU.

Phillips, S. J. y Dudík, M. (2008). Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, 31:161–175.

Phillips, S. J., Anderson, R. P. y Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190: 231–259.

Piggott, M. P., E. Bellemain, P. Taberlet, and A. C. Taylor. (2004). A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. *Conservation Genetics* 5, 417–420.

Poirier P, Doderer-Lang C, Atchade PS, Lemoine JP, de l'Isle MC, Abou-Bacar A, Pfaff AW, Brunet J, Arnoux L, Haar E, Filisetti D, Perrotey S, Chabi NW, Akpovi CD, Anani L, Bigot A, Sanni A, Candolfi E. (2016). The hide and seek of *Plasmodium vivax* in West Africa: report from a large-scale study in Beninese asymptomatic subjects. *Malar J*. 2016 15(1), 570.

Real, R., Barbosa, A. M., Rodríguez, A., García, F. J., Vargas, J. M., Palomo, L. J., y Delibes, M. (2009). Conservation biogeography of ecologically interacting species: the case of the Iberian lynx and the European rabbit. *Diversity and Distributions*, 15(3), 390-400.

Rivas-Martínez S., Fernández-González F. y Sánchez-Mata D. (1987). El Sistema Central: de la Sierra de Ayllón a Serra da Estrela. In: Peinado M. and Rivas-Martínez S. (eds), *La vegetación de España*. Publicaciones Universidad de Alcalá, Madrid, pp. 419–451.

Rodríguez, A. & Delibes, M. (1988). El lince ibérico en España. Estación Biológica de Doñana. CSIC, 254 pp.

- Rodríguez, A. & Delibes, M. (1990). El lince ibérico (*Lynx pardina*) en España: distribución y problemas de conservación. ICONA (Former Spanish Institute for nature conservation), Madrid. En: Garrote, G. (2014). Estudio y Conservación del lince ibérico en España, Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Zoología.
- Rodríguez, A. & Delibes, M. (1992). Current range and status of the Iberian lynx *Felis pardina* Temminck, 1824 in Spain. *Biological conservation*, 61(3): 189-196.
- Rodríguez, A. (2004). Lince ibérico - *Lynx pardinus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L. M., Salvador, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Rodríguez, A. (2012). Lince ibérico – *Lynx pardinus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Cassinello, J. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Rodríguez, A., & Calzada, J. (2015). *Lynx pardinus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015, 2.
- Rodríguez, A., y Delibes, M. (2002). Internal structure and patterns of contraction in the geographic range of the Iberian lynx. *Ecography*, 25: 314-328.
- Rodríguez, A., y Delibes, M. (2003). Population fragmentation and extinction in the Iberian lynx. *Biol. Conserv.*, 109: 321-331.
- Rodríguez, J. L. (1993). Guía de Campo de los Mamíferos Terrestres de España. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.
- Rodríguez-Varela, R., Tagliacozzo, A., Ureña, I., García, N., Crégut-Bonnoure, E., Mannino, M. A., Arsuaga, J. L. & Valdiosera, C. (2015). Ancient DNA evidence of Iberian lynx palaeoendemism. *Quaternary Science Reviews*, 112: 172-180.
- Rogers, P. M., Arthur, C. P. y Soriguer, R. C. (1994). The rabbit in continental Europe. In H. V.
- Roldán, V. (2016). Análisis comparativo de los cambios en las poblaciones de mesocarnívoros detectados en caminos públicos del Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares (PRCAM) y de la influencia de las características de los caminos en la detección de mesocarnívoros. Tesis de Maestría, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Ecología.

- San Miguel, A., Agudín, S., Garzón, P., Guil, F., Inogés, J., Silvestre, F., González, L. M., García, F. M., Fernández, M., Martínez, M., Muñoz, J., Rodríguez, C., Alda, F., Doadrio, I. & Hernández, M.. (2006). 1ª reimp. Manual para la gestión del hábitat el lince ibérico (*Lynx pardinus* Temminck) y de su presa principal, el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus* L.). Fundación CBD-Habitat. Madrid.
- Sanz, L. A. (2006). En un informe encargado por la Consejería de Medio Ambiente Esperanza Aguirre da al lince por extinguido en la M-501. Nota de prensa. Disponible en: <http://www.elmundo.es>. Acceso el 30/09/2015.
- Sarmiento, P., Cruz, J., Monterroso, P., Tarroso, P., Ferreira, C., Negroes, N., y Eira, C. (2009). Status survey of the critically endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* in Portugal. *European Journal of Wildlife Research*, 55(3), 247-253.
- Sexton, J. O., Song, X. P., Feng, M., Noojipady, P., Anand, A., Huang, C., Kim, D. H., Collins, K. M., Channan, S., DiMiceli, C. & Townshend, J. R. G. (2013). Global, 30-m resolution continuous fields of tree cover: Landsat-based rescaling of MODIS Vegetation Continuous Fields with lidar-based estimates of error. Disponible en: www.landcover.org. Acceso el 15/07/2015.
- Simon, M. A., Gil-Sanchez, J. M., Ruiz, G., Garrote, G., McCain, E. B., Fernandez, L., Lopez-Parra, M., Rojas, E., Arenas-Rojas, R., Del Rey, T., Garcia-Tardío, M., y López, G. (2012). Reverse of the decline of the endangered Iberian lynx. *Conservation Biology*, 26(4), 731-736.
- Sobrino, B., Brión, M., & Carracedo, A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic science international*, 154(2), 181-194.
- Sommer, R. S. & Benecke, N. (2005). Late Pleistocene and Holocene development of the felid fauna (Felidae) of Europe: a review. *Journal of Zoology*, 269: 7-19.
- Team, R. C. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Free Document CC. Fiocruz, Br.
- Thompson, and C. M. King (Eds.), *The European rabbit. The history and biology of a successful coloniser* (pp. 22-63). Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Tobe, S. S., & Linacre, A. (2010). DNA typing in wildlife crime: recent developments in species identification. *Forensic science, medicine, and pathology*, 6(3), 195-206.
- U.S. Geological Survey. 1996. GTOPO30. In: Land Processes Distributed Archive Center. United States Geological Survey, Denver. Disponible en:

<http://www6.uniovi.es/~feli/Data/Datos.html>

- Valverde, J. A. (1963). Información sobre el lince ibérico en España. Boletín técnico, serie cinegética. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Montes, Caza y Pesca Fluvial. Servicio Nacional de Pesca Fluvial y Caza.
- Villafuerte, R. (2007). *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758). Ficha Libro Rojo. Pp: 487-491. En: L. J. Palomo, J. Gisbert & J. C. Blanco (eds). Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España. Dirección General para la Biodiversidad -SECEM-SECEMU, Madrid. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es>. Acceso el: 09/01/2017.
- Virgos, E., y Casanovas, J. G. (1993). Distribución, ecología y conservación de los carnívoros en el Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares. AEDENAT-CODA. Madrid.
- Virgos, E., y Gil-Sánchez, J.M. (2015) El lince sigue teniendo un riesgo de extinción crítico que no justifica su cambio de estatus. Nota de prensa. (www.eldiario.es)
- Virgos, E., y Travaini, A. (2005). Relationship between small-game hunting and carnivore diversity in central Spain. *Biodiversity & Conservation*, 14(14), 3475-3486.
- Werdelin, L. (1981). The evolution of lynxes. *Ann. Zool. Fenn.*, 18: 37-71. Wildlife Conservation Society, 2005. Last of the Wild Project, Version 2 (LWP-2): Global Human
- Williams, K., Parer, I., Coman, B., Burley, J., y Braysher, M. (1995). Managing vertebrate Pests: Rabbits. Canberra, Australia: Australian Government Publishing Service, Bureau of Resources Sciences/CSIRO Division of Wildlife and Ecology.
- Zabía, M. & del Olmo, L. (2007). Atlas Medio Ambiente de la CAM. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Disponible en: <http://www.madrid.org>. Acceso el 13/05/2016.

Anexo 1: Informes correspondientes de los Laboratorios de contraste.