

Biología molecular en la conservación del lince ibérico

José A. Godoy, Elena Marmesat, María Lucena Pérez y Daniel Kleinman Ruiz

Departamento de Ecología Integrativa. Estación Biológica de Doñana, CSIC

La conservación de la biodiversidad en un escenario de cambio global acelerado constituye uno de los grandes retos de la humanidad para las próximas décadas. La genética ha pasado a ser un elemento fundamental del enfoque multidisciplinar que esta tarea requiere, dando origen al área de conocimiento de la genética de la conservación.

El papel de la genética en conservación tiene una doble dimensión. Por un lado, las especies amenazadas sufren cambios en su composición genética y estos cambios pueden afectar a la supervivencia y a la reproducción retroalimentando una espiral de declive que podría conducir a la extinción, incluso si las causas originales del declive desaparecen. Lo más preocupante a corto plazo son los efectos nocivos de la consanguinidad y, a más largo plazo, la pérdida de adaptabilidad asociada a una escasa diversidad genética. Conocer bien los procesos que llevan a este deterioro genético y aportar métodos eficaces para la evaluación y gestión de estos problemas son objetivos fundamentales de la genética de la conservación. Por otro lado, y en un aspecto mucho más pragmático, distintos tipos de marcadores moleculares han resultado muy eficaces para el seguimiento y la gestión de especies amenazadas.

El lince ibérico (*Lynx pardinus*) es un excelente ejemplo de una especie que ha llegado al borde de la extinción; fatal desenlace que se ha evitado *in extremis* gracias a intensos esfuerzos de conservación. Tras el intenso declive sufrido durante el s. XX, en 2002 apenas quedaban unos 100 individuos repartidos en dos poblaciones desconectadas entre sí (Doñana y Andújar-Cardena). Hoy día, se estiman más de 400 individuos de vida libre repartidos en las dos poblaciones remanentes y cinco sitios de reintroducción. El intenso declive y el seguimiento y la gestión activa a la que ha sido sometida la especie la han convertido en un excelente modelo de estudio para la genética de la conservación.

Aquí repasamos la contribución que ha realizado la genética molecular al conocimiento y la conservación >>>



Figura 1
Cachorro de lince ibérico de la población de la cohorte de 2017 en Doñana. Foto de Iñigo Sánchez.

>>> de esta especie emblemática, desde los primeros enfoques basados en unos pocos marcadores moleculares neutrales hasta la reciente incorporación de la genómica, siguiendo la tendencia histórica recogida en el capítulo introductorio de este dossier.

MARCADORES TRADICIONALES: ADN MITOCONDRIAL Y MICROSATÉLITES

Relaciones filogenéticas

La secuenciación de fragmentos del ADN mitocondrial ha iluminado en primer lugar las relaciones del lince ibérico con otros linceos y otros felinos. Distintos estudios han identificado alternativamente al lince boreal y al lince canadiense, al ibérico y el canadiense o al ibérico y boreal como especies hermanas. La incorporación de secuencias nucleares inclinó finalmente la balanza hacia el lince boreal como especie hermana del ibérico y permitió datar la divergencia entre ellos en unos 1.09 o 1.18 millones de años. Sin embargo, secuencias de genoma mitocondrial completo indican un antepasado común más reciente con lince canadiense, indicando un probable caso de clasificación incompleta de linajes para este genoma durante la divergencia de estas tres especies en un intervalo relativamente corto de tiempo (1.1-1.6 millones de años).

Genética poblacional: diversidad, consanguinidad y estructura

El análisis de 36 marcadores de tipo microsatélite a nivel poblacional permitió constatar un estado genético preocupante para la especie a principios del siglo XXI. Las dos únicas poblaciones remanentes estaban muy empobrecidas genéticamente y mostraban altos niveles de consanguinidad, en especial la población de Doñana, y contenían acervos genéticos altamente diferenciados. La sospecha inicial de que estos patrones eran consecuencia directa del declive sufrido durante el s. XX, y por tanto de la acción de la deriva genética, se vio en parte confirmada por los análisis de muestras históricas representadas en colecciones públicas y privadas. No obstante, estos análisis también revelaron que el deterioro y la estructuración genética estaban ya avanzados en las épocas cubiertas por estas muestras (1856-1990), apuntando a un declive temprano que diversos tipos de datos fechan en torno a hace tres o cuatro siglos. Al mismo tiempo, las secuencias de mitogenoma muestran una ausencia completa de diversidad a nivel de proteínas en el presente. Por el contrario, las secuencias obtenidas de muestras arqueológicas y paleontológicas (43.500-2070 años de antigüedad) muestran una mayor pero ya limitada diversidad genética y sugieren una ausencia de diferenciación a escala peninsular en un pasado más remoto. El estado genético actual del lince

ibérico parece pues ser la consecuencia de bajos tamaños poblacionales durante la mayor parte de la historia de la especie, declives sufridos hace varios siglos y un efecto dramático del declive del siglo XX.

Herramientas para el seguimiento y la gestión

Los marcadores tradicionales han aportado también herramientas eficaces para el seguimiento y la gestión de la especie, incluyendo la identificación de restos a nivel de especie e individuo.

Las secuencias de ADN mitocondrial obtenidas de restos biológicos muestreados en campo de manera no invasiva (excrementos, fundamentalmente) pueden identificar de manera no ambigua la especie de la que proceden y aportar así evidencias de su presencia en lugares concretos. Con el objetivo de aplicar este enfoque al análisis de la distribución global de la especie, pero eliminando los costes asociados a la secuenciación de ADN, desarrollamos un ensayo basado en una PCR diagnóstica de lince ibérico. La aplicación de este ensayo a un muestreo extensivo de las zonas de presencia histórica en Andalucía identificó a las poblaciones de Doñana y Andújar-Cardena como las únicas poblaciones de lince ibérico remanentes en el año 2000. A pesar de informes de presencia de lince en otros lugares, estas poblaciones se han mantenido como las únicas poblaciones reproductoras confirmadas a nivel global hasta el inicio de las actuaciones de reintroducción.

El genotipado de marcadores de tipo microsatélite, junto con marcadores moleculares de sexo, permite el seguimiento de la especie a nivel individual por métodos no invasivos. Aplicados de manera sistemática en un área determinada pueden generar un censo poblacional, proporcionar estimas de tamaño poblacional, delimitar territorios individuales, identificar inmigrantes y generar una genealogía de la población que puede utilizarse para la gestión genética. La asignación molecular de parentales ha permitido reconstruir una genealogía bastante completa y de varias generaciones de la población de Doñana y constatar el éxito de los machos territoriales en asegurar la reproducción con hembras con territorio solapante.

Por último, los marcadores microsatélites han resultado también críticos para la gestión genética de la población cautiva. Esta gestión está dirigida a preservar el máximo de la diversidad representada inicialmente en los fundadores y evitar la acumulación de consanguinidad, y se basa en minimizar el parentesco promedio de la población. Los genotipos moleculares han aportado estimas de parentesco entre los fundadores que, de otra forma, habrían sido ignoradas durante la gestión y habrían conducido a resultados subóptimos.

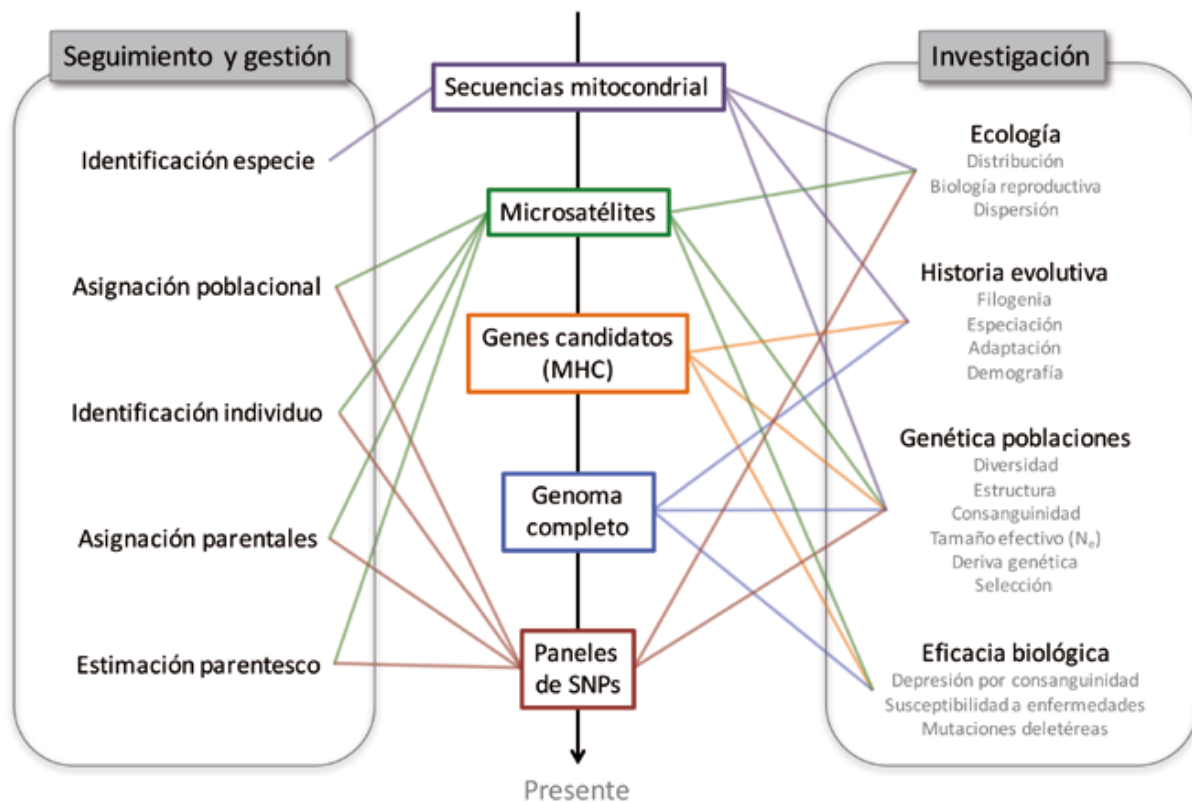


Figura 2

Usos de la información genética en la investigación y la conservación del lince ibérico. En el centro los distintos tipos de datos utilizados, en un orden cronológico aproximado de arriba (más antiguo) abajo (más reciente). A la izquierda se listan las aplicaciones útiles para el seguimiento y la gestión y a la derecha las áreas en las que esta información ha aportado nuevos conocimientos. Las aplicaciones en seguimiento y gestión se basan frecuentemente en el uso de muestras obtenidas de manera no invasiva como excrementos, mientras que las muestras de museo, arqueológicas y paleontológicas han contribuido al conocimiento de la historia demográfica y a evaluar el impacto de ésta sobre la genética actual.

GENES MHC: DIVERSIDAD FUNCIONAL Y RESPUESTA A ENFERMEDADES

Para trascender de la información demográfica que pueden darnos unos cuantos marcadores neutrales e investigar patrones adaptativos, las miradas se han vuelto hacia genes funcionales cuya diversidad es relevante para la supervivencia de los individuos. Estos genes están recibiendo atención también desde la genética de la conservación porque si pierden diversidad podría aumentar la susceptibilidad a enfermedades de las especies amenazadas y contribuir a su extinción. Pero también porque son claros candidatos a ser blanco de la selección balanceadora, fuerza evolutiva que podría contrarrestar la acción predominante de la deriva genética en especies en declive. Su análisis ha estado tradicionalmente limitado por las dificultades técnicas asociadas a la caracterización de una familia multigénica con un número variable de loci y múltiples alelos por locus. Las nuevas tecnologías de secuenciación han aliviado algunas de estas dificultades, aunque per-

sisten algunos problemas relacionados con sesgos de amplificación entre alelos.

En un primer análisis de la variación en genes MHC por secuenciación de productos de PCR clonados y análisis de conformación SSCP, identificamos una casi total ausencia de diversidad genética en Doñana para genes MHC de clase II (dos únicos alelos correspondientes a dos genes, ambos fijados). Recientemente, aplicando una estrategia de amplificación mejorada y secuenciación masiva pudimos detectar complementos alélicos a nivel de especie para genes clase II y clase I de tamaño parecido y muy solapantes a los observados en el lince boreal, además de otros ejemplos de compartición de alelos entre las cuatro especies del género y con otros felinos. Encontramos que el declive reciente ha supuesto una pérdida de alelos a nivel de especie en estos genes clave, pero se ha mantenido la diversidad funcional representada en los dominios de unión a antígeno. Esto puede ser el resultado de la selección balanceadora manteniendo linajes de alelos divergentes, pese a la >>>

»» acción de la deriva. En familias multigénicas como estas, esto puede ocurrir tanto porque se favorezcan los heterocigotos en cada locus, como porque se mantengan linajes divergentes en distintos genes, aunque cada uno de estos sea completamente monomórfico. Los estudios en curso pretenden caracterizar la diversidad MHC a nivel individual y poblacional para testar estas hipótesis y calibrar la posible contribución de estos genes a la aparentemente alta susceptibilidad a enfermedades observada en esta especie.

GENOMAS COMPLETOS

Historia evolutiva y demográfica, adaptación, y genómica poblacional

La genética de la conservación no ha quedado al margen de la reciente expansión de la genómica en múltiples áreas de conocimiento. Los enfoques genómicos en conservación están comenzando a revelar nuevos aspectos acerca de cómo los genomas son transformados por efecto de la deriva genética, y a sopesar la posible interacción de esta con otros procesos evolutivos como la mutación, la selección natural y la recombinación. Al mismo tiempo, prometen aportar herramientas aún más eficaces para el seguimiento y la gestión.

El lince ibérico ha sido una de las primeras especies amenazadas en incorporarse al selecto club de especies con genomas completos secuenciados. La secuenciación, ensamblaje y anotación de un primer borrador del genoma ha puesto el poder de los nuevos enfoques genómicos al alcance de la especie. Los primeros análisis genómicos han aportado conocimientos antes inaccesibles sobre el origen y la historia de la especie y han ayudado a caracterizar con un nivel de detalle antes impensable su estado genético.

La comparación del genoma del lince ibérico con el del boreal ha acercado la fecha de divergencia entre las dos especies a los 300.000 años, y ha revelado una larga historia de intercambio genético entre ambas, un proceso de hibridación e introgresión que parece ser común entre felinos. Además, ha revelado historias demográficas relativamente paralelas de las dos especies desde su divergencia, con fluctuaciones a través de los ciclos glaciares pero con tamaños po-

blacionales menores en el lince ibérico. En esta especie evidenció también un repentino declive al 10% del tamaño anterior hace unos cuatro siglos, confirmando las inferencias obtenidas de microsatélites y ADN mitocondrial. En lince ibérico encontramos señales de selección positiva en genes relacionados con la audición y la visión, entre otros, que podrían indicar adaptaciones propias de esta especie.

Los datos de re-secuenciación de genomas completos de 10 lince adicionales revelaron al lince ibérico como la especie con menor diversidad genética entre las secuenciadas hasta la fecha, por debajo de otras especies también amenazadas como el guepardo, el leopardo de las nieves, el gorila de montaña, por ejemplo. Un aspecto especialmente relevante es que la escasa diversidad existente en zonas codificantes es en muy alta proporción debida a variantes no sinónimas, algunas de las cuales han llegado a fijarse. Estas variantes, a menudo deletéreas, se mantienen a raya en especies demográficamente abundantes por la acción de la selección purificadora, un proceso que en poblaciones

pequeñas ve reducida su eficacia por el efecto predominante de la deriva genética. La expresión de estas variantes, en su mayoría recesivas, se vería incrementada por efecto de la consanguinidad, lo que podría estar generando depresión por consanguinidad, como la observada para calidad seminal.

La ocurrencia de consanguinidad reciente se visualiza en forma de largos bloques de genomas en homocigosis en muchos de los lince secuenciados, estimándose niveles de consanguinidad individual promedios de 0.32 en Doñana y 0.16 en Andújar.

NUEVAS HERRAMIENTAS GENÓMICAS

La secuenciación del genoma del lince ibérico ha aportado importantes recursos para el seguimiento y la gestión. Quizás el de aplicación más directa ha sido un catálogo de 1,6 millones de variantes genómicas de nucleótido sencillo (SNP) en la especie. De entre estos, seleccionamos alrededor de 1.500 distantes entre sí y con alta diversidad y los genotipamos en más de 300 muestras de lince contemporáneos. Los datos permitieron seleccionar un conjunto de ca. 300 marcadores máximamente informativos y mínimamente ligados y paneles reducidos de SNPs para las distintas aplicaciones en seguimiento y gestión. Estos paneles superan



en poder, eficiencia y bajo coste a los 36 microsatélites utilizados hasta la fecha y su implementación en un seguimiento genético de poblaciones silvestres y reintroducidas puede ayudar a prevenir futuras pérdidas de diversidad y a disminuir los altos niveles de endogamia acumulados durante décadas, maximizando así las probabilidades de persistencia de la especie.

Un reto importante para el futuro será la identificación de variantes asociadas a caracteres fenotípicos importantes para la supervivencia y reproducción, incluidas aquellas asociadas a caracteres deletéreos y enfermedades genéticas que pueden estar lastrando la recuperación, como la epilepsia juvenil en el lince ibérico o la condrodistrofia en los cóndores de California. Con ello se haría posible la incorporación de una “selección purificadora asistida” a la gestión genética integral, al menos para unos pocos caracteres de gran efecto.

PERSPECTIVAS

La aplicación de la genética en la conservación de especies es ya una realidad en casos paradigmáticos como el del lince ibérico, aunque todavía tiene que ser incorporada a otros muchos organismos. Las tecnologías genómicas, en particular la secuenciación de genomas completos, siguen estando fuera del alcance de la mayoría de especies amenazadas, pero las nuevas técnicas de secuenciación de fracciones del genoma (e.g. RAD-Seq o *Genotyping-By-Sequencing*) están ya sustituyendo a los marcadores genéticos tradicionales.

Más allá de las variaciones en la secuencia de nucleótidos, las aproximaciones futuras podrían incorporar otros aspectos hasta hora poco explorados del geno-

ma, como la variación en número de copias, la expresión génica y su regulación, y los cambios epigenéticos, todos ellos con muy probables implicaciones para la viabilidad de especies amenazadas

Detener el ritmo creciente de pérdida de biodiversidad exige cambios drásticos en nuestra forma de relacionarnos con el planeta. Mientras esto ocurre, los esfuerzos por evitar la extinción de especies como el lince ibérico y por asegurar su viabilidad a largo plazo van a beneficiarse de nuevos enfoques, en los que la biología molecular jugará sin duda un papel importante. ■

PARA LEER MÁS

- Abascal F, Corvelo A, Cruz F, *et al.* (2016) Extreme genomic erosion after recurrent demographic bottlenecks in the highly endangered Iberian lynx. *Genome Biology* 17, 251.
- Casas-Marcé M, Marmesat E, Soriano L, *et al.* (2017) Spatio-temporal dynamics of genetic variation in the Iberian lynx along its path to extinction reconstructed with ancient DNA. *Molecular Biology and Evolution* en prensa.
- Casas-Marcé M, Soriano L, López-Bao JV, Godoy JA (2013) Genetics at the verge of extinction: insights from the Iberian lynx. *Molecular Ecology* 22, 5503-5515.
- Kleinman-Ruiz D, Martínez-Cruz B, Soriano L, *et al.* (2017) Novel efficient genome-wide SNP panels for the conservation of the highly endangered Iberian lynx. *BMC Genomics* 18, 556.
- Marmesat E, Schmidt K, Saveljev AP, Seryodkin IV, Godoy JA (2017) Retention of functional variation despite extreme genomic erosion: MHC allelic repertoires in the Lynx genus. *BMC Evolutionary Biology* 17, 158.
- Palomares F, Lucena-Pérez M, López-Bao JV, Godoy JA (2017) Territoriality ensures paternity in a solitary carnivore mammal. *Scientific Reports* 7, 4494.