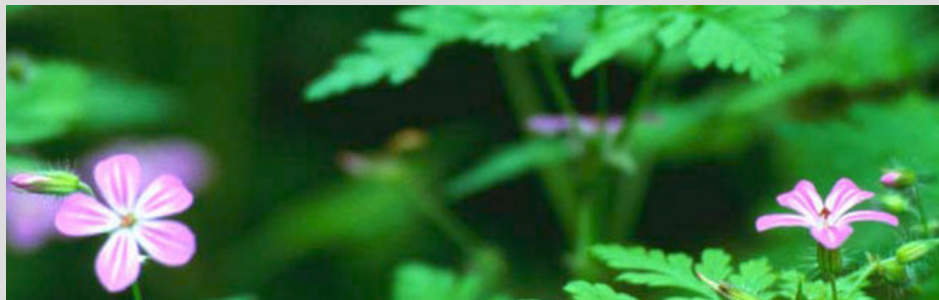


# V Curso Nacional de Genética

## “Genética de la Conservación”

Carmona, 7 - 11 de Junio de 2010





## Presentación

La inquietud por la conservación de la naturaleza no es cosa nueva, aunque actualmente tenga connotaciones de urgencia por la creciente degradación del hábitat natural debida a la incesante intervención humana. Esta ha supuesto un aumento de la tasa de desaparición de especies, hasta alcanzar valores comparables a los que caracterizaron en el pasado a los cinco grandes periodos de extinción identificados en el registro fósil. La continua amenaza a la diversidad de la vida, guiada por los principios económicos que rigen las operaciones a corto plazo, llevará, inevitablemente, a la supresión de la cuarta parte de las especies actuales durante los próximos veinticinco años y acarreará, con ella, la destrucción de unas reservas de genes potencialmente útiles para la agronomía y la medicina, y para paliar el progresivo desgaste del proceso global de reciclado biológico de aire, suelo y agua.

Como respuesta a esta comprometida situación, se ha desarrollado una nueva disciplina –la Biología de la Conservación– orientada hacia la protección de la biodiversidad correspondiente a los tres grandes niveles reconocidos por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN): genético, específico y ecológico. Esta postura responsable es un producto inmediato del pensamiento darwinista que, rompiendo con las concepciones tradicionales, puso por primera vez de manifiesto el principio de unidad de la vida. Los planteamientos de la Biología de la Conservación se refieren tanto al estudio como a la gestión, esto es, al diagnóstico de los problemas relacionados con la desaparición de la biodiversidad y a la propuesta de respuestas para solucionarlos.

La Genética de la Conservación es una rama de la Genética desarrollada a lo largo de los últimos treinta años que se basa en los conocimientos de la Genética de Poblaciones y la Genética Cuantitativa. Su objeto de aplicación son las poblaciones de organismos, el nivel de integración de la materia viva donde transcurren los procesos microevolutivos, en particular aquéllas cuyo censo ha disminuido notablemente como consecuencia de la reducción, fragmentación y deterioro de su hábitat y, por tanto, están amenazadas de extinción. Sus principales propósitos son: 1) la identificación de las poblaciones a conservar, evaluando su riesgo de extinción y sus posibilidades de recuperación, 2) la descripción de la variabilidad genética poblacional, tanto de la fracción neutra (mediante técnicas moleculares) como de la correspondiente a los caracteres

adaptativos (utilizando procedimientos estadísticos y técnicas de simulación en ordenador), 3) la determinación de la estructura demográfica de las unidades a conservar, en particular el grado de fragmentación de las poblaciones y la reducción del flujo genético entre ellas, 4) la predicción de las consecuencias del cambio genético aleatorio (deriva genética) en las poblaciones de censo reducido, con objeto de minimizar la pérdida de variabilidad genética y frenar el aumento de la depresión consanguínea, 5) la predicción de la acción de la selección natural en dichas poblaciones, en particular la conducente a la adaptación a las condiciones de cautividad que, generalmente, reduce la viabilidad de futuras repoblaciones, y 6) la definición de los programas de gestión de poblaciones, mediante el diseño de las estrategias óptimas de reproducción ex situ y de posibles operaciones de restauración.

El V Curso Nacional de Genética, dedicado a la Genética de la Conservación, constituye el primer intento español de este tipo y ha sido diseñado con la intención de proporcionar a doctorandos y postdoctorales una formación teórico-práctica en los temas mencionados.

El Curso Nacional de Genética tendrá como sede académica y administrativa el Centro Cultural de la Universidad Pablo de Olavide (UPO), situado en la Casa Palacio de los Briones (c/ Ramón y Cajal 15, Carmona, Sevilla).

## Patrocinadores



## Organizadores

**Carlos López-Fanjul**

**(Universidad Complutense de Madrid)**

**Armando Caballero**

**(Universidad de Vigo)**

**José Antonio Godoy**

**(Estación Biológica de Doñana, Universidad Pablo de Olavide)**

## Gestora

**Silvia T. Rodríguez-Ramilo**

**(Universidad de Vigo)**

## Profesores

<b>César Benito</b>	Universidad Complutense de Madrid
<b>Armando Caballero</b>	Universidad de Vigo
<b>Jesús Fernández</b>	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Madrid)
<b>Aurora García-Dorado</b>	Universidad Complutense de Madrid
<b>José Antonio Godoy</b>	Estación Biológica de Doñana, Universidad Pablo de Olavide (Sevilla)
<b>Santiago González</b>	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Madrid)
<b>Carlos López-Fanjul</b>	Universidad Complutense de Madrid
<b>Andrés Pérez-Figueroa</b>	Universidad de Vigo
<b>David Posada</b>	Universidad de Vigo
<b>María del Carmen Rodríguez</b>	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Madrid)
<b>Silvia T. Rodríguez-Ramilo</b>	Universidad de Vigo
<b>Luis Silió</b>	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Madrid)
<b>Miguel A. Toro</b>	Universidad Politécnica de Madrid
<b>Carles Vilá</b>	Estación Biológica de Doñana
<b>Beatriz Villanueva</b>	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Madrid)

# Programa

<b>Domingo 6 de junio:</b>	
21:00	Cena
<b>Lunes 7 de junio:</b>	
9:00-9:30	Bienvenida
9:30-11:00	<b>César Benito</b> (Técnicas de análisis molecular en genética de la conservación)
11:00-11:30	Café
11:30-13:00	<b>Miguel A. Toro</b> (Análisis del parentesco molecular. 1. Teoría)
13:00-15:30	Comida
15:30-17:00	<b>Jesús Fernández</b> (Análisis del parentesco molecular. 2. Presentación de programas informáticos)
17:00-17:30	Café
17:30-19:00	<b>David Posada</b> (Análisis filogenético. 1. Teoría)
19:00-20:30	<b>David Posada</b> (Análisis filogenético. 2. Presentación de programas informáticos)
21:30	Cena
<b>Martes 8 de junio:</b>	
9:30-11:00	<b>Beatriz Villanueva</b> (Estimación de parámetros genéticos en poblaciones naturales. 1. Teoría)
11:00-11:30	Café
11:30-13:00	<b>María del Carmen Rodríguez</b> (Estimación de parámetros genéticos en poblaciones naturales. 2. Presentación de programas informáticos)
13:00-15:30	Comida
15:30-17:00	<b>Carlos López-Fanjul</b> (Cambios de los parámetros genéticos en poblaciones de censo reducido)
17:00-17:30	Café
17:30-19:00	<b>Andrés Pérez-Figueroa</b> (Estimación del censo efectivo de población. 1. Teoría)
19:00-20:30	<b>Andrés Pérez-Figueroa</b> (Estimación del censo efectivo de población. 2. Presentación de programas informáticos)
21:30	Cena



<b>Miércoles 9 de junio:</b>	
9:00-10:30	<b>José Antonio Godoy</b> (Genética de la conservación del lince ibérico)
10:30-12:30	VIAJE AL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA
12:30-19:00	VISITA RESERVA BIOLÓGICA DOÑANA (incluye comida)
19:00-21:00	VIAJE A CARMONA
21:30	Cena
<b>Jueves 10 de junio:</b>	
9:30-11:00	<b>Aurora García-Dorado</b> (Deterioro de la eficacia biológica en poblaciones de censo reducido)
11:00-11:30	Café
11:30-13:00	<b>Santiago González</b> (Genética de la conservación de especies forestales)
13:00-15:30	Comida
15:30-17:00	<b>Armando Caballero</b> (Gestión de poblaciones en programas de conservación <i>ex-situ</i> . 1. Teoría)
17:00-17:30	Café
17:30-19:00	<b>Silvia T. Rodríguez-Ramilo</b> (Gestión de poblaciones en programas de conservación <i>ex-situ</i> . 2. Presentación de programas informáticos)
19:00-20:30	SESIÓN DE DISCUSIÓN
21:30	Cena
<b>Viernes 11 de junio:</b>	
9:30-11:00	<b>Luis Silió</b> (Genética de la conservación de razas de animales domésticos)
11:00-11:30	Café
11:30-13:00	<b>Carles Vilá</b> (Genética para la conservación de poblaciones de lobos)
13:00-15:30	Comida

# Resúmenes



# Técnicas de Análisis Molecular en Genética de la Conservación

César Benito

Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense.  
28040 Madrid. España.

La cuantificación de la variabilidad genética y el conocimiento de su distribución dentro y entre poblaciones requiere el uso de marcadores genéticos. Un marcador genético es un carácter indicador que puede ser morfológico, cromosómico, bioquímico (isoenzimas y proteínas de reserva) o molecular (genes y fragmentos de ADN). Los marcadores moleculares estiman de forma más precisa que el resto la variabilidad y, por ende, el estado de conservación de las poblaciones. Hay marcadores nucleares de herencia mendeliana dominante (no se distingue a los heterocigotos de uno de los dos tipos de homocigotos) y de herencia codominante (se distingue a los homocigotos de los heterocigotos). Los marcadores mitocondriales y cloroplásticos presentan herencia matrilineal y los situados en el segmento diferencial del cromosoma Y, patrilineal.

El ADN mitocondrial muestra una elevada tasa de mutación ( $10^{-4}$ ) y su estudio permite distinguir poblaciones que han divergido recientemente. Los marcadores nucleares codominantes son los que más información suministran, debiendo emplearse, siempre que sea posible, en los estudios de conservación genética. La precisión de las estimas de diversidad genética depende de que los marcadores moleculares analizados sean representativos de los diferentes tipos de secuencias (codificantes y no codificantes) que existen en los genomas.

Los marcadores moleculares que se desarrollaron primero fueron las isoenzimas, las proteínas de reserva de las semillas y los RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). En general, los tres tipos de marcadores tienen herencia codominante, suelen proceder de regiones

codificantes, muestran baja diversidad (pocos alelos por locus) y subestiman la variabilidad genética real. La degeneración del código genético y las limitaciones técnicas de la electroforesis permiten detectar alrededor de 1/3 de la variabilidad real en los genes que codifican isoenzimas y proteínas.

Posteriormente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha puesto a nuestro alcance una amplia gama de marcadores moleculares.

a) Productos de PCR con herencia codominante que contienen secuencias cortas (de menos de 6 ó más de 10 pb) repetidas en tándem: minisatélites y microsatélites o SSR (*Single Sequence Repeats*). Los SSR son los preferidos por su tipo de herencia, riqueza alélica (muchos alelos por locus), cantidad (unos 10.000 loci) y distribución uniforme en los genomas. Suelen proceder de regiones no codificantes y tienen una tasa de mutación alta ( $10^{-4}$ ), por lo que son más diversos y sobrestiman la variabilidad genética. Son recomendables cuando se estudian poblaciones que han divergido

recientemente. Los RBIP (*Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*) también son codominantes, pero son dialélicos.

b) Productos de PCR procedentes de regiones codificantes y no codificantes del genoma, con herencia dominante y baja riqueza alélica (dialélicos). Recomendables sólo en poblaciones de especies en las que hay muy poca información sobre las secuencias de sus genomas. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), RAMP (*Random Amplified Microsatellite Polymorphism*), IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*), REMAP (*REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) y SSAP (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism*). Además, están los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), basados en la PCR y en la utilización de endonucleasas de restricción y también con herencia dominante.

Los últimos marcadores empleados en genética de la conservación, debido al abaratamiento y auge de las técnicas de secuenciación, son los SNP (*Single*

*Nucleotide Polymorphisms*) e INDEL (INserciones y/o DELecciones). Las sustituciones de nucleótidos (SNP) son los polimorfismos más abundantes. Como promedio, se estima que existe un SNP por cada 1.000 nucleótidos, siendo mayor su frecuencia en las regiones no codificantes. Son codominantes y habitualmente dialélicos, pero debido a la gran cantidad de SNP variables se estudian haplotipos o combinaciones de SNP. Los INDEL también son abundantes, codominantes, dialélicos y se estudian en combinación con los SNP. Uno de los métodos para detectar variabilidad en poblaciones naturales debida a SNP e INDEL es el Eco-TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*).

Los marcadores preferidos en estudios de conservación y cuantificación de la variabilidad genética son los SSR y SNP. Para tener una estima precisa y real de la salud genética de las poblaciones, es conveniente utilizar marcadores codominantes procedentes de diferentes regiones del genoma (codificantes y no

codificantes) con distinto grado de variabilidad.

Nuez, F., Carrillo, J. M. **2000**. *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia.

Schulman, A. H. **2007**. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313-321.

## **Análisis de parentescos mediante el uso de marcadores moleculares**

Miguel Angel Toro<sup>†</sup>, Jesús Fernández\*

<sup>†</sup> Departamento de Producción Animal, ETS Ingenieros Agrónomos, Ciudad  
Universitaria, 28040 Madrid

\* Departamento de Mejora Genética Animal, Instituto Nacional de Investigación  
y Tecnología Agraria y Alimentaria, 28040 Madrid.

El estudio de las relaciones de parentesco mediante marcadores genéticos comienza muy tempranamente en humanos mediante el uso de información referente a grupos sanguíneos y más recientemente en los años 70 con la aplicación de polimorfismos enzimáticos. Con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, se desarrolla toda una gama de marcadores moleculares especialmente los marcadores microsatélite, que poseen las características idóneas para el análisis de parentesco. El desarrollo paralelo de métodos estadísticos específicos da lugar a una enorme profusión de trabajos

empíricos y teóricos en este campo, constituyendo un área muy activa de investigación en la actualidad

La inferencia de las relaciones de parentesco entre individuos a partir de su parecido molecular representa una metodología de gran utilidad para la mejora genética y la conservación. La idea es elegir a los reproductores más idóneos y aparearlos de forma óptima para que se minimice el parentesco evitando así las consecuencias nocivas de la consanguinidad y manteniendo la máxima diversidad genética a través de las generaciones. La elección del marcador y de la metodología estadística apropiados,

es fundamental para lograr la mejor solución a la problemática planteada. Dependiendo de si tenemos información previa de los grupos generacionales o no, respectivamente, aplicaremos el análisis de paternidad o de parentesco. La aproximación más sencilla para el análisis de paternidad, implica la identificación de los progenitores a partir de la exclusión del resto de candidatos. Sin embargo, esto puede conducir a más de una solución, resoluble probabilísticamente aplicando métodos de máxima verosimilitud. La capacidad para identificar los progenitores depende del escenario muestral (número de progenitores posible y proporción muestreada), de las características de los marcadores aplicados (polimorfismo, errores de genotipado), así como del grado de cumplimiento de las asunciones teóricas de los modelos implementados. Existen una gran variedad de programas disponibles relacionados con el análisis de paternidad, que suelen presentar prestaciones complementarias.

Cuando se tiene un grupo de individuos de una sola generación o de relación generacional incierta, el objetivo es

estimar las relaciones genéticas entre los individuos, habitualmente expresadas en función del coeficiente de parentesco. El problema general es determinar qué parte del parecido a nivel molecular (identidad en estado) se debe a identidad por descendencia (el parámetro de interés). Existen dos grandes grupos de estimadores a partir de la información molecular. En el primero se estiman las relaciones por separado para cada pareja de individuos (métodos *pairwise*), usualmente utilizando las frecuencias génicas de la población de referencia. Dentro de estos se pueden encontrar los denominados Métodos de Momentos (MME) y los basados en Máxima Verosimilitud (MLE). El otro grupo de estimadores utiliza la información de todos los individuos conjuntamente para determinar la estructura familiar más probable. Por su naturaleza estos métodos realizan una reconstrucción explícita de la genealogía (al menos en una generación), que ha dado lugar a la población actual. Dependiendo del tipo de estimador y de las asunciones que se hacen en su elaboración, cada uno de



ellos tiene ventajas y limitaciones que hay que tener en cuenta cuando se decide el estimador a usar. En el presente tema se analizan los estimadores más importantes y se ofrece una relación de herramientas informáticas de uso libre que los implementan.

Fernández, J. & Toro, M.A. **2006**. A new method to estimate relatedness from molecular markers. *Molecular Ecology* 15: 1657–1667.

Jamieson, A. & Taylor, C.S. **1997**. Comparison of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 28: 397-400.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. **2007**. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099–1106.

Martínez, P. & Fernández, J. **2008**. Estimating Parentage Relationships Using Molecular Markers in Aquaculture. In:

*Aquaculture Research Trends*. Ed.: S.H. Schwartz, pp. 59-112. Nova Science Publishers.

Oliehoek P.A., Windig, J. J., van Arendonk, J. A. M. & Bijma, P. **2006**. Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs. *Genetics* 173:483–496.

Toro, M.A., Barragán, C., Óvilo, C., Rodríguez, J., Rodríguez, C. & Silió, L. **2002**. Estimation of coancestry in Iberian pigs using molecular markers. *Conservation Genetics* 3: 309-320.

Weir, B. S., Anderson, A.D. & Heppler, G.M. **2006**. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics* 7: 771-780.

## Análisis Filogenético

David Posada

*Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. 36310 Vigo. España.*

Todos los seres vivos proceden de un ancestro común. Las relaciones de ancestralidad entre los distintos organismos conforman una filogenia que explica como diferentes linajes han ido apareciendo, divergiendo y desapareciendo hasta el presente. El análisis filogenético nos permite estimar en forma arborescente las relaciones evolutivas entre los organismos que conforman la diversidad que observamos hoy en día. Pero sobre todo, los árboles filogenéticos proporcionan el marco necesario para inferir diferentes parámetros evolutivos (p. ej., tasas de evolución, tiempos de divergencia, tamaños efectivos, etc.) o para contrastar distintas hipótesis sobre la historia de las poblaciones y especies (p. ej., aspectos filogeográficos, monofilia, etc.).

El análisis filogenético se basa en las similitudes y diferencias de estado para distintos caracteres entre los organismos en los que estamos interesados. A día de hoy, la reconstrucción filogenética se realiza sobre todo a partir de caracteres moleculares, fundamentalmente secuencias de ADN y proteínas. El primero paso del análisis filogenético consiste en el reconocimiento de caracteres homólogos, que en el caso de datos moleculares se corresponde con el proceso de *alineamiento de secuencias*. El siguiente paso será definir el modelo de evolución de los caracteres –todos los métodos de reconstrucción filogenética asumen algún modelo de evolución, sea implícita o explícitamente. Estos modelos de evolución de caracteres nos permiten calcular las probabilidades de cambio entre estados a lo largo de las ramas del árbol filogenético, y pueden ser

justificados dentro de un marco estadístico de *selección de modelos*, como el implementado en el programa *jModelTest* (Posada, 2008).

Existe una gran variedad de métodos de reconstrucción filogenética, que se pueden clasificar atendiendo a diversos criterios. Entre los métodos más precisos se encuentran los de *máxima verosimilitud* y la *inferencia bayesiana*, los cuales se desarrollan en el interior de un marco estadístico potente y robusto. El método de máxima verosimilitud elige el árbol más verosímil, donde la verosimilitud es la probabilidad de los datos dado un árbol y un modelo de evolución particular. La inferencia bayesiana, por otro lado, trata al árbol como una variable aleatoria. En este caso el mejor árbol es aquél con mayor probabilidad posterior —la probabilidad de un árbol dado un modelo de evolución determinado y los datos observados. De manera muy interesante, la estimación de la distribución de la probabilidad posterior mediante método de *Cadenas de Markov Monte Carlo* (MCMC) permitirá integrar la incertidumbre filogenética en muchos análisis

posteriores. Algunas de las herramientas más populares para llevar a cabo análisis de verosimilitud y bayesianos son *PhyML* (Guindon y Gascuel 2003) y *MrBayes* (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), respectivamente. En ambos casos se pueden obtener estimas de fiabilidad para cada nodo del árbol, mediante la técnica de *bootstrap* o mediante el propio cálculo de probabilidades posteriores.

Una vez que se ha obtenido un árbol robusto (o varios) se pueden realizar diferentes análisis o estimaciones de parámetros de interés, muchos de los cuales son claramente relevantes en el ámbito de la conservación (Purvis y col., 2005). En este contexto, una de las medidas más interesantes, aparte de las consideraciones demográficas, es la *diversidad filogenética* (Faith, 1992), que es en sí una medida de la biodiversidad. La diversidad filogenética de un grupo de especies (o secuencias) es la suma de las longitudes de rama del subárbol que incluye a ese grupo. La idea principal es que a la hora de conservar especies o áreas prioritarias deberíamos intentar maximizar la diversidad filogenética

protegida, teniendo siempre en cuenta que la conservación tiene unos costes y las especies diferentes probabilidades de supervivencia (el llamado “problema del arca de Noé”). Por otro lado, los árboles filogenéticos son esenciales para definir *unidades evolutivas significativas* ("evolutionarily significant units" o ESUs), las cuales pueden definirse de manera general como un conjunto de poblaciones con una historia evolutiva distintiva a largo plazo, (pero ver Crandall y col., 2000). Además de éstos, existen otros ejemplos que resaltan el importante papel del análisis filogenético en conservación.

Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R. P., Mace, G. M. & Wayne, R. K. **2000**. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 290-295.

Faith, D. P. **1992**. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61: 1-10.

Guindon, S. & Gascuel, O. **2003**. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.

Posada, D. **2008**. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

Purvis, A., Gittleman J. L. & Brooks, T. (eds.). **2005**. *Phylogeny and Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

Ronquist, F., & Huelsenbeck J. P. **2003**. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.

## Estimación de parámetros genéticos en poblaciones naturales

Beatriz Villanueva y M. Carmen Rodríguez

Departamento de Mejora Genética Animal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña km 7,5, 28040 Madrid. España.

Muchos de los caracteres de importancia en el estudio de poblaciones naturales son caracteres complejos, de naturaleza cuantitativa. En ellos, los fenotipos están determinados por la acción conjunta de muchos genes y por efectos ambientales. La estimación de parámetros genéticos (heredabilidades y correlaciones) para este tipo de caracteres, está basada en la partición de covarianzas fenotípicas entre parientes en componentes causales tales como varianzas debidas a efectos genéticos aditivos y a efectos ambientales (Falconer y Mackay, 1996). En el pasado, la estimación de covarianzas fenotípicas entre parientes se obtenía realizando análisis estadísticos de mínimos cuadrados (análisis de varianza y regresión) basados en grupos de individuos con el mismo grado de

relación genética; ej. grupos de medios hermanos paternos o grupos de padres e hijos.

Un problema con estos métodos es que requieren diseños equilibrados. Además, es necesario corregir los datos previamente para eliminar los efectos ambientales. Una solución al problema la proporcionan métodos de máxima verosimilitud y en particular el método de máxima verosimilitud restringida (REML, del inglés *restricted maximum-likelihood*) combinado con el “modelo animal”. El modelo animal es un modelo mixto que incluye tanto efectos fijos como aleatorios y en el los efectos aleatorios de interés son los valores genéticos aditivos de los individuos. En contraste con los métodos más sencillos utilizados en el pasado,

REML-modelo animal i) utiliza simultáneamente, mediante el uso de la matriz de relaciones genéticas, información de todas las clases de parientes pertenecientes a generaciones múltiples y permite, por tanto, tests estadísticos mucho más potentes (errores estándar menores); ii) no requiere que la estructura de los datos sea equilibrada; iii) permite estimar simultáneamente efectos fijos y aleatorios; iv) puede incorporar fácilmente efectos maternos y efectos ambientales comunes; y v) proporciona estimas insesgadas de los componentes de varianza.

El REML está reconocido como el método óptimo para estimar parámetros genéticos en diseños desequilibrados y ha sido utilizado rutinariamente en mejora genética animal desde hace ya muchas décadas. Sin embargo, su aplicación en poblaciones naturales sólo ha sido reciente (Kruuk, 2004).

Quizás una de las mayores dificultades para aplicar el modelo animal en poblaciones naturales sea la necesidad de conocer las relaciones de parentesco entre

individuos. En algunos casos la asignación de padres puede hacerse a través de observación en la naturaleza pero este procedimiento suele llevar a errores. Una solución al problema la proporcionan los marcadores moleculares. Existen diferentes métodos propuestos para estimar parentesco a partir de marcadores moleculares y su eficiencia relativa depende en gran parte de la estructura de la población (Oliehoek y col., 2006). Aunque la mayoría de los estudios han considerado marcadores microsatélite (ej., Saura y col., 2010), los grandes avances en las técnicas de secuenciación y genotipado, que han llevado al desarrollo de chips conteniendo miles de marcadores SNP (polimorfismos nucleotídicos sencillos) en la mayoría de las especies domésticas, abren nuevos horizontes en la estimación de relaciones genéticas.

Aunque muchos de los aspectos de la estimación de parámetros genéticos con REML son técnicamente complicados, la utilización del software disponible es relativamente sencilla. La cantidad de software disponible para obtener estimas

de parámetros genéticos con REML-modelo animal es grande debido en parte a hecho de que el método ha sido ampliamente utilizado en mejora genética animal. Algunos de los programas más utilizados por su versatilidad son ASReml, VCE y WOMBAT. Además la gran capacidad de los ordenadores de hoy en día hace posible que los mayores requerimientos de cálculo en REML no supongan una desventaja con respecto a métodos más sencillos de estimación. Por ejemplo en vacuno de leche estimas de parámetros genéticos y evaluaciones genéticas son llevadas a cabo rutinariamente utilizando millones de datos fenotípicos sin que esto suponga ningún problema. Sin embargo, también es cierto que la calidad de los datos fenotípicos y genealógicos obtenidos en poblaciones ganaderas es en general mejor que la de aquellos obtenidos en poblaciones naturales.

Falconer D.S. & Mackay T.F.C. **1996**. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4ª

edición. Addison Wesley Longman, Harlow, Reino Unido.

Kruuk L.E.B. **2004**. Estimating genetic parameters in natural populations using the ‘animal model’. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 359: 873-890.

Oliehoek P.A., Windig, J.J, van Arendonk, J.A.M & Bijma, P. **2006**. Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs. *Genetics* 173: 483–496.

Saura M., Morán P., Brotherstone S., Caballero A., Álvarez J. & Villanueva B. **2010**. Predictions of response to selection caused by angling in a wild population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Freshwater Biology* 55: 923–930.

# Cambios de los parámetros genéticos en poblaciones de censo reducido

Carlos López-Fanjul

Departamento de Genética, Universidad Complutense de Madrid

Desde el punto de vista conservacionista, las amenazas más importantes a la supervivencia de las poblaciones son los deterioros de la media y la variación genética de su eficacia biológica y de los caracteres relacionados con ella, causados ambos por la disminución acelerada de su censo. Para analizar estos fenómenos consideraré, en primer lugar, la acción de la deriva genética sobre la contribución de uno o dos loci neutros e independientes al cambio de la media  $M$  y la varianza aditiva  $V_A$  de un carácter cuantitativo, en líneas totalmente endógamas derivadas de una misma población base y mantenidas a lo largo de las generaciones con un censo efectivo constante  $N_e$ . En la generación  $t$  (coeficiente de consanguinidad  $F_t$ ), los valores de dichos parámetros dependen del tipo de acción génica y se distribuyen con media  $E(M_t)$ ,  $E(V_{At})$  y varianza  $V(M_t)$ ,  $V(V_{At})$ .

## 1) $E(M_t)$ :

Sin epistasia, la media se mantiene temporalmente constante cuando la acción génica es predominantemente aditiva o disminuye linealmente en  $F_t$  cuando existe dominancia direccional (depresión consanguínea). Por otra parte, la media de cruzamientos entre parejas de líneas iguala al promedio parental si la acción es aditiva o lo supera con dominancia (vigor híbrido). De ahí la clásica consideración de la depresión y el vigor como la cara y la cruz de una misma moneda. Sin embargo, la epistasia aditiva x aditiva direccional puede producir depresión o vigor, invalidando la analogía cara-cruz. Es más, con epistasia dominante x dominante, la depresión deja de ser lineal en  $F_t$ .

## 2) $E(V_{At})$ :

La contribución de loci aditivos ( $A$ ) a  $E(V_{At})$  disminuye linealmente en  $F_t$  hasta



desaparecer por completo ( $F_t = 1$ ). Sin embargo, cualquier otro tipo de acción génica puede llevar consigo el que dicha contribución aumente inicialmente hasta que se alcanza un valor crítico de  $F_t$ , para disminuir a continuación hasta extinguirse. Este fenómeno corresponde a frecuencias alélicas iniciales intermedias (epistasia aditiva x aditiva,  $A \times A$ ) o extremas (dominancia  $D$  con o sin epistasia adicional  $E$ ). No obstante, la dominancia es la causa principal del incremento inicial de  $V_{At}$  y una epistasia adicional sólo modula la magnitud del cambio. Los cambios experimentados por  $E(V_{At})$  son función de la variación espacial [ $V(\alpha_{ii})$ ] y temporal [ $E(\alpha_{ii})$ ] del efecto marginal promedio de sustitución en el locus  $i$ -ésimo ( $\alpha_i$ ), así como de la covarianza  $cov(\alpha_i^2, H_i)$  entre el cuadrado de dicho efecto y la heterocigosis correspondiente ( $H_i$ ), de manera que  $E(V_{At}) = \sum Cov(\alpha_i^2, H_i) + (1 - F_t) \sum H_i [V(\alpha_{ii}) + E(\alpha_{ii})^2]$ . Esto implica:

Acción	$E(\alpha_{io} - \alpha_{ii})$	$V(\alpha_i)$	$Cov(\alpha_i^2, H_i)$
$A$	0	0	0
$A \times A$	0	$\neq 0$	0
$D$	0	$\neq 0$	$\neq 0$
$D + E$	$\neq 0$	$\neq 0$	$\neq 0$

La covarianza aditiva entre dos caracteres se comporta de la misma manera que la varianza aditiva. Por tanto, un cambio temporal de la matriz de varianzas-covarianzas aditivas que no sea proporcional a  $(1 - F_t)$  no debe interpretarse como producto de la selección natural, puesto que también puede atribuirse a la acción de la deriva sobre loci neutros que muestren cualquier tipo de acción génica no aditiva.

### 3) $V(M_t)$ y $V(V_{At})$ :

Con acción aditiva  $V(M_t)$  aumenta linealmente en  $F_t$ . Con cualquier otro tipo de acción génica  $V(M_t)$  experimenta un incremento similar ( $F_t \leq 1/4$ ) o mayor ( $F_t \geq 1/4$ ) que el anterior. La mayor parte de  $V(V_{At})$  se debe al desequilibrio gamético inducido por deriva y, para loci aditivos e independientes,  $CV(V_{At})$  tiende a  $\sqrt{2/3N_e}$ .

#### 4) $E(V_{Dt})$ y $E(V_{It})$ :

Los cambios temporales de la contribución de parejas de loci a la varianza dominante promedio vienen dados por  $E(V_{Dt}) = \Sigma [V(\delta_{it}) + E(\delta_{it})^2] [V(H_i) + E(H_i)^2]$ , es decir, son función de la variación espacial  $[V(\delta_{it})$  y  $V(H_i)]$  y temporal  $[E(\delta_{it})$  y  $E(H_i)]$  del valor genotípico marginal del heterocigoto ( $\delta_i$ ) y de su frecuencia ( $H_i$ ). Sin epistasia, el cambio de  $V_{Dt}$  es sólo función de los cambios espacio-temporales de  $H_i$  [ $V(\delta_{it}) = 0$ ,  $E(\delta_{it}) = \delta_{i0}$ ]. En cualquier caso, el aumento de la contribución de parejas de loci epistáticos al cambio temporal de las varianzas aditiva y no aditiva  $E(V_{Dt} + V_{It})$  tras sucesivos cuellos de botella suele darse para las mismas frecuencias alélicas iniciales.

#### 5) Múltiples loci:

Con epistasias aditiva x aditiva a  $n$  niveles, el componente epistático de la varianza de orden superior  $E(V_{AA(n)t})$ , disminuye continuamente a medida que  $F_t$  aumenta, pero los restantes componentes ( $E(V_{At})$  a  $E(V_{AA(n-1)t})$ ) aumentan inicialmente hasta que se alcanza un valor crítico de  $F_t$ , que está en relación inversa con el orden de la

interacción correspondiente, para disminuir a continuación hasta anularse.

#### 6) $F_{ST}$ y $Q_{ST}$ :

Con acción aditiva, los índices cualitativo ( $F_{ST} = F_t$ ) y cuantitativo  $\{Q_{ST} = V(M_t)/[V(M_t) + 2 E(V_{At})]\}$  de diferenciación genética poblacional son iguales, pero con cualquier otro tipo de acción génica puede ocurrir que  $Q_{ST} \neq F_{ST}$ . Esto cuestiona la interpretación de esa desigualdad como evidencia de una acción de la selección natural convergente ( $Q_{ST} \leq F_{ST}$ ) o divergente ( $Q_{ST} \geq F_{ST}$ ) sobre el carácter considerado.

#### 7) Efecto de la selección natural

Cuando mutación (M), selección (S) y deriva (D) actúan sobre parejas de loci epistáticos, todos los componentes de la varianza genética de la eficacia aumentan hasta que se alcanza un valor crítico de  $F_t$ , disminuyendo a continuación hasta su valor de equilibrio MSD. El aumento neto de  $V_{At}$  es relativamente pequeño, puesto que en su mayor parte es utilizado por la selección para purgar la depresión consanguínea. La selección purificadora impide la diferenciación en media y

varianza aditiva de las líneas. La epistasia sólo modifica ligeramente las magnitudes de la depresión, el cambio temporal de los componentes de la varianza genética, y la tasa evolutiva de la eficacia.

Barton, N. H. y Turelli, M. 2004. Effects of genetic drift on variance components under a general model of epistasis. *Evolution*, 58: 2111-2132.

Crow, J. F. y Kimura, M. 1970. *An introduction to population genetics theory*. Harper & Row (Nueva York), pp. 77-85, 99-100, y 331-345.

López-Fanjul, C., Fernández, A. y Toro, M. A. 2002. The effect of epistasis on the excess of the additive and nonadditive variances after population bottlenecks. *Evolution*, 56:865-876.

López-Fanjul, C., Fernández, A. y Toro, M. A. 2003. The effect of neutral nonadditive gene action on the quantitative index of population divergence. *Genetics*, 164: 1627-1633.

López-Fanjul, C., Fernández, A. y Toro, M. A. 2004. Epistasis and the temporal

change in the additive variance-covariance matrix induced by drift. *Evolution*, 58: 1655-1663.

Pérez-Figueroa, A., Caballero, A., García-Dorado, A. y López-Fanjul, C. 2009. The action of purifying selection, mutation and drift on fitness epistatic systems. *Genetics*, 183: 299-313.

## Estimación del censo efectivo de población

Andrés Pérez-Figueroa

Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Biología.  
Universidad de Vigo. 36310 Vigo. España.

En ausencia de fuerzas evolutivas sistemáticas como la mutación, la selección y la migración, las propiedades genéticas (tales como la heterocigosis, número de alelos o las frecuencias génicas y genotípicas en cada locus) de una población de tamaño infinito permanecen constantes con el tiempo. Sin embargo, en una población de tamaño finito esas propiedades cambian a lo largo de las generaciones debido a un proceso estocástico de muestreo de un número finito de gametos durante la reproducción. Estos cambios son más lentos en poblaciones con mayor censo efectivo. El censo efectivo de población ( $N_e$ ) se define como el tamaño de una población ideal de Wright-Fisher que tiene la misma tasa de cambio de las propiedades genéticas que la población en estudio (Luikart y col., 2010). Una población ideal es aquella en la que además de la ausencia de mutación, selección y migración, el tamaño es constante, el apareamiento es aleatorio con posibilidad de autofecundación y las generaciones son discretas. Dependiendo de la propiedad genética de interés, se han propuesto diferentes conceptos de censo efectivo entre los cuales los más utilizados son el de consanguinidad ( $N_{ei}$ ) y el de varianza de cambio de frecuencias ( $N_{eV}$ ), que son equivalentes en el caso de poblaciones aisladas de tamaño constante. También encontramos diferentes conceptos de  $N_e$  en función de la escala espacio-temporal considerada (Wang, 2005; Luikart y col., 2010).

El  $N_e$  a corto plazo, de interés para la conservación de recursos genéticos, puede estimarse a partir de métodos demográficos o de métodos genéticos indirectos. Los métodos demográficos

(revisados en Caballero 1994) se basan en derivaciones teóricas resultantes de ir añadiendo violaciones a las asunciones de la población ideal. Estos métodos suelen sobrestimar el verdadero  $N_e$  dado que raramente se pueden incluir todos los factores, especialmente la varianza de éxito reproductivo, que pueden reducir  $N_e$  respecto al tamaño de población  $N$ . Los métodos genéticos se basan en la estimación del  $N_e$  a partir del cambio observado en algún parámetro genético. Podemos dividir estos métodos en los que utilizan una muestra o los que utilizan dos (o más) muestras.

Entre los métodos de una muestra encontramos el LDNe (implementado en el programa del mismo nombre, Waples y Do 2008) que se basa en que el desequilibrio gamético (también llamado de ligamiento, LD por sus siglas en inglés) entre dos loci no ligados se puede originar por deriva génica (en ausencia de selección y migración) y su magnitud dependerá del censo efectivo de la población considerada. Este método permite estimas precisas usando 10-20 loci microsatélites en muestras de 25-50

individuos (Luikart y col., 2010). Existen otros estimadores que utilizan diferentes estrategias, como el uso de computación bayesiana aproximada (ABC, implementado en el programa ONeSAMP, Tallmon y col., 2008).

Los estimadores más ampliamente utilizados y mejor evaluados son los que necesitan dos muestras, temporalmente separadas, de la población. El principio teórico que subyace en estos métodos temporales es que la magnitud del cambio de frecuencias alélicas es proporcional al  $N_e$ . Un factor clave en estos métodos es el estadístico  $F$  utilizado para cuantificar el cambio de frecuencias alélicas entre los eventos de muestreo. Los estadísticos utilizados clásicamente presentan importantes sesgos con tamaños de muestra pequeños. Recientemente se ha derivado un nuevo estadístico insesgado,  $F_s$  (implementado en el programa TempoFs, Jorde y Ryman 2007).

Conocer y comprender la diversidad de estimadores de  $N_e$  que hay en la literatura, sus asunciones, sus propiedades estadísticas y el efecto de utilizarlos en

situaciones no adecuadas, es fundamental para el estudio de las poblaciones tanto desde el punto de vista evolutivo como conservacionista. Durante la sesión práctica, aprenderemos a utilizar los programas informáticos citados y discutiremos en que condiciones y escenarios nos serán útiles y en cuales no.

Caballero, A. **1994**. Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* 73: 657-679.

Jorde, P. E. & Ryman, N. **2007**. Unbiased estimator for genetic drift and effective population size. *Genetics* 177: 927–935.

Luikart, G., Ryman, N., Tallmon, D. A., Schwartz, M. K. & Allendorf F. W. **2010**. Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conservation Genetics* 11: 355-373.

Tallmon, D. A., Koyuk, A., Luikart, G. & Beaumont, M. A. **2008**. ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian

computation. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 299–301

Wang, J. **2005**. Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 360: 1395-1409.

Waples, R. S. & Do, C. **2008**. LDNe: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 753–756.

## La genética de la conservación del lince ibérico

José A. Godoy

Estación Biológica Doñana, CSIC. C/ Américo Vespucio, s/n. 41092-Sevilla.

El lince ibérico (*Lynx pardinus*) es el felino más amenazado del mundo y está clasificado en peligro crítico de extinción por la IUCN. A esta situación se ha llegado después de que un espectacular declive sufrido en el último siglo haya relegado la especie a dos poblaciones remanentes, Doñana y Andujar, aisladas entre sí y con alrededor de 50 y 150 individuos, respectivamente. Las causas habitualmente señaladas para el declive de la especie han incluido la destrucción y fragmentación del hábitat, la persecución directa y, más recientemente, el declive del conejo, su principal presa. Su carácter de especie emblemática ha convertido al lince ibérico en un símbolo y en un gran reto para la conservación de la fauna amenazada en España.

Mediante la aplicación de marcadores moleculares hemos investigado los patrones genéticos en poblaciones tanto

contemporáneas como históricas de lince ibérico y evaluado las consecuencias que el declive poblacional y la fragmentación han tenido sobre la variación genética de la especie. La diversidad mitocondrial contemporánea es extremadamente baja, habiéndose detectado tan sólo dos haplotipos que se diferencian en una única base y que se encuentran alternativamente fijados en las dos poblaciones. La diversidad para microsatélites autosómicos es igualmente reducida respecto a la de otros felinos, y es significativamente menor en la población de Doñana que en la de Andújar. Los análisis preliminares de variación en genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II han revelado un número muy reducido de alelos. Además, las dos poblaciones remanentes presentan, una diferenciación genética acusada en términos de

frecuencias alélicas para marcadores microsátélites, aunque con distribuciones alélicas solapantes: los alelos encontrados en Doñana son mayoritariamente un subconjunto de los encontrados en Andújar. Por último, ambas poblaciones presentan señales débiles de cuellos de botella recientes y los tamaños poblacionales efectivos estimados son pequeños, lo que alerta sobre pérdidas acusadas de diversidad en el futuro de mantenerse la situación actual (Godoy *et al.*, en preparación; Godoy *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2004).

Los patrones contemporáneos descritos arriba contrastan con los revelados por el análisis de la variación histórica representada por un conjunto de ejemplares de museos que cubren el área de distribución histórica de la especie y de una antigüedad de hasta 160 años. Las poblaciones extintas de lince ibérico presentaban una diversidad significativamente más alta y un nivel de estructura menor que el observado en las poblaciones contemporáneas. No obstante, la población de Doñana, y en menor medida la de Sierra Morena

Oriental, presentaban ya una alta diferenciación y una menor diversidad genética respecto al resto de las poblaciones en el pasado reciente. Por último, ambas poblaciones remanentes han sufrido disminuciones significativas en la heterocigosidad individual a lo largo de tiempo (Casas-Marcé *et al.*, en preparación).

Los resultados obtenidos del análisis con marcadores moleculares muestran la acción predominante de la deriva genética en tiempos recientes, en relación al tamaño poblacional y el tiempo desde aislamiento de cada población. Esto puede haber resultado en pérdidas importantes de potencial adaptativo y en una reducción de la eficacia biológica relacionada con la acumulación de alelos deletéreos y el aumento de la homocigosidad (*depresión consanguínea*). Aunque no existen pruebas por ahora que lo relacionen de manera directa con factores genéticos, en los últimos años se ha constatado una reducción del tamaño medio de camada y un aumento de la mortalidad atribuible a enfermedades en Doñana (Palomares *et al.*, en revisión), y



se ha descrito una alta incidencia de glomerulonefritis y depleción linfocítica en la especie (Jiménez *et al.* 2008; Pena *et al.* 2006).

Las progresivas pérdidas de diversidad y los riesgos de depresión consanguínea, en conjunción con la probable conexión histórica entre poblaciones y la ausencia de evidencias de divergencias adaptativas, abogan por un manejo conjunto de éstas tanto *ex-situ* como *in-situ*. Entre las actuaciones de conservación emprendidas para la especie se incluyen un programa de conservación *ex-situ* (Vargas *et al.* 2008), actuaciones de translocación y un programa de reintroducción. La población cautiva se maneja como una única unidad permitiendo cruces interpoblacionales, lo que ha resultado en una diversidad genética cautiva superior a la de cualquiera de las dos poblaciones silvestres. El uso de marcadores moleculares está además ayudando a implementar una estrategia para maximizar las pérdidas de diversidad y minimizar la endogamia basada en la minimización del parentesco promedio, al aportar estimas del parentesco entre

fundadores (Godoy *et al.* 2009). Además, a finales de 2007 se translocó el primer individuo desde la población de Andujar a Doñana para intentar revertir las pérdidas de diversidad genética y prevenir las consecuencias negativas de la endogamia en esta población y en la primavera de 2008 nacieron los primeros cachorros de cruces interpoblacionales en libertad. Finalmente, en este año 2010 se han iniciado las primeras actuaciones encaminadas a la reintroducción del lince ibérico en localidades de su distribución histórica.

La gran cantidad de información que está generando el seguimiento y la conservación de la especie sobre aspectos demográficos, ecológicos, fisiológicos, reproductivos, sanitarios y comportamentales convierte al lince ibérico en un modelo empírico para el estudio de los cambios genéticos que ocurren en poblaciones en declive y para el estudio de sus consecuencias. Es de esperar que este conocimiento contribuirá de manera significativa a la preservación del mamífero más amenazado y emblemático de nuestra fauna.

Godoy JA, Casas-Marcé M, Fernández J (2009) Genetic issues in the implementation of the Iberian Lynx Ex situ Conservation Programme. In: *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach* (eds. Vargas A, Breitenmoser C, Breitenmoser U), pp. 86-99. Fundación Biodiversidad in collaboration with: International Union for Conservation of Nature, Species Survival Commission (IUCN /SSC) Cat Specialist Group, Madrid.

Jiménez MA, Sánchez B, Alenza MDP, *et al.* (2008) Membranous glomerulonephritis in the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **121**, 34-43.

Johnson WE, Godoy JA, Palomares F, *et al.* (2004) Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *Journal of Heredity* **95**, 19-28.

Palomares F, Godoy JA, López-Bao JV, *et al.* Empirical evidence for an scenario of extinction vortex in the endangered Iberian lynx. *En revisión*

Peña L, García P, Jiménez MA, *et al.* (2006) Histopathological and immunohistochemical findings in lymphoid tissues of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **29**, 114-126.

Vargas A, Sánchez I, Martínez F, *et al.* (2008) The Iberian lynx *Lynx pardinus* Conservation Breeding Program. *International Zoo Yearbook* **42**, 190-198.

## Deterioro de la eficacia biológica en poblaciones de censo reducido

Aurora García Dorado

Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense.  
28040 Madrid. España.

Las consecuencias genéticas principales del pequeño censo de las poblaciones amenazadas son la reducción de la variabilidad genética y el deterioro de la eficacia biológica. Si bien la primera es indeseable porque representa una pérdida de biodiversidad y de potencial adaptativo, es la segunda la que puede implicar una amenaza más inmediata a la supervivencia de la población. Este deterioro de la eficacia se debe en primer lugar a la depresión consanguínea, atribuible a la variación genética que segregaba en la población original. A largo plazo, se espera un deterioro adicional debido a que la deriva limita la eficiencia de la selección natural en contra de las mutaciones deletéreas nuevas. Sin embargo, aquí nos referiremos especialmente a las consecuencias de la reducción del censo efectivo a un valor  $N$  en las primeras  $2N$  generaciones, durante

las cuales puede ignorarse el efecto de la nueva mutación.

La depresión consanguínea de la eficacia biológica se debe fundamentalmente a que, como la selección natural elimina los alelos deletéreos más ineficientemente cuanto más recesivos son, los deletéreos que segregan en las poblaciones tienen efecto predominantemente recesivo. Sin embargo, la eficacia media esperada tras  $t$  generaciones de reducción del censo se predice clásicamente en función del coeficiente de consanguinidad  $f_t$ , calculado de acuerdo con el modelo neutro, como

$$W_t = W_0 \exp[-\delta f_t],$$

donde  $\delta$  se puede interpretar como el % de reducción en eficacia media esperada por cada 1% de incremento en consanguinidad, si bien esta esperanza refiere a una situación hipotética en que

se relajase la selección natural. Esta depresión asociada al aumento de la homocigosis, se debe a que la desventaja de los deletéreos recesivos se incrementa en una cantidad  $d$  cuando éstos se presentan en homocigosis, pero este incremento también implica un aumento de la selección en contra de dichos deletéreos, conocida como purga. Este valor  $d$ , que coincide con la  $d$  de la escala de Falconer, será denominado coeficiente de purga, pues representa la parte del efecto deletéreo sobre la que la selección actúa más eficientemente en los individuos más consanguíneos. Como consecuencia, el coeficiente de consanguinidad respecto de los deletéreos parcialmente recesivos, o coeficiente de consanguinidad purgado  $g$ , puede calcularse en la generación  $t$  como

$$g_t = g \left\{ 1 - \left[ \left( 1 - \frac{1}{2N} \right) (1 - d) \right]^t \right\},$$

donde  $\hat{g} = \frac{1}{1 + d(2N - 1)}$  es el valor asintótico al que tiende  $g_t$ . Es decir, el coeficiente de consanguinidad purgado tiende a un valor asintótico que es menor

cuanto mayores son  $N$  y  $d$ , y que se alcanza más rápidamente cuanto menor es  $N$  y mayor es  $d$ . Por tanto, teniendo en cuenta la purga, la eficacia biológica media  $W_t$  en la generación  $t$  puede predecirse en función de la media inicial como

$$W_t = W_0 \exp[-\delta g_t].$$

Mostraremos resultados que indican que la purga limita el aumento de la depresión de forma muy eficiente, incluso en poblaciones bastante pequeñas, de modo que la predicción neutra resulta muy inadecuada.

La teoría anterior puede adaptarse para predecir la evolución de la eficacia en una población en que todas las familias contribuyen igual número de descendientes (CI) al grupo reproductor. Esta estrategia se recomienda con frecuencia en programas de conservación *ex situ*, pues se espera que proporcione un censo efectivo de alrededor del doble del censo real ( $2N$ ), ralentizando así las consecuencias de la consanguinidad y la deriva. Sin embargo, las contribuciones

familiares iguales (**CI**), ralentizan también las consecuencias de la selección sobre viabilidad, que pasa a ocurrir solo dentro de familias, purga incluida. Y, lo que es más dramático, relaja la selección sobre fertilidad, de modo que, no solo elimina la purga, sino que puede resultar arriesgado a medio plazo ignorar las consecuencias de la acumulación neutra de mutaciones deletéreas nuevas. Bajo **CI**, las medias de viabilidad  $V$  y fecundidad  $F$  en la generación  $t$  pueden aproximarse en función de sus respectivas  $\delta$ , como

$$V_t = V_0 \exp[-\delta g_{tE}]$$

$$F_t = F_0 \exp[-\delta f_{tE} - 4N\lambda s(1-2h) (t/4N - f_{tE}) - 2\lambda hst],$$

donde  $g_{tE}$  y  $f_{tE}$  se calculan con el censo efectivo correspondiente a **CI** ( $2N$ ), y, respecto de fecundidad,  $\lambda$  es la tasa de mutación deletérea,  $s$  es la desventaja del homocigoto, y  $h$  la proporción de esta desventaja que se expresa en el heterocigoto. Estas ecuaciones muestran que **CI** reduce el deterioro de la eficacia a corto y medio plazo en poblaciones

pequeñas, aunque termina por resultar desventajosa a largo plazo.

García-Dorado, A. 2008. A simple method to account for natural selection when predicting inbreeding depression. *Genetics* 180:1559-1566

García-Dorado, A. 2007. Shortcut predictions for fitness properties at the MSD balance and for its build-up after size reduction under different management strategies. *Genetics* 176: 983-997

## Genética de la conservación de especies forestales

Santiago C. González Martínez

Departamento de Ecología y Genética Forestal. Centro de Investigación Forestal, INIA. 28040 Madrid

La conservación de los bosques es de gran importancia, tanto por las especies vegetales y animales asociadas a estos sistemas como por los servicios ambientales y productos que proporcionan. Existen pocos casos de especies forestales catalogadas como en peligro de extinción en nuestro país. Sin embargo, muchas de las poblaciones marginales (tanto en sentido ecológico como geográfico) de estas especies se ven amenazadas por los cambios en el uso del suelo, la deforestación, los ataques de plagas y enfermedades, el cambio climático y la introgresión genética a partir de plantaciones.

Las poblaciones Ibéricas de especies forestales de amplia distribución en Europa podrían contener adaptaciones singulares y tener un valor ecológico (y productivo) muy elevado. Son las

llamadas poblaciones ‘rear edge’, que sobreviven cerca de los refugios glaciares de estas especies, en general con tamaños efectivos poblacionales pequeños y muy fragmentadas. Estas poblaciones tienen una importancia crítica como reserva genética a largo plazo (Hampe y Petit, 2005) y su conservación es muy importante para garantizar el potencial evolutivo de la especie en conjunto.

En esta ponencia, se presentan tres estudios de caso de relevancia para la conservación de recursos genéticos de especies forestales. En todos ellos, se utilizan marcadores moleculares neutrales (es decir, no afectados por la selección natural) para proporcionar información genética y demográfica de utilidad en la identificación de poblaciones de conservación, desarrollo de estrategias de

conservación y/o evaluación de riesgos potenciales.

El primero estudio de caso se centra en el análisis de la diversidad genética y singularidad de las poblaciones marginales de pino canario (*Pinus canariensis* C. Sm.), una especie endémica de las Islas Canarias y único pino nativo de las islas, mediante el uso de microsatélites del cloroplasto (Vaxevanidou y col, 2006). En este estudio, se encuentra que algunas de las poblaciones marginales tienen gran singularidad genética y, por tanto, notable valor potencial de conservación, mientras que otras están fijadas para alelos comunes y podrían ser el resultado de colonizaciones recientes a partir de poblaciones centrales cercanas.

El segundo estudio de caso utiliza microsatélites nucleares y herramientas de análisis Bayesianas (STRUCTURE y BAPS) para identificar acervos genéticos homogéneos y definir grandes regiones 'genéticas' de gestión y conservación. Este estudio de caso se desarrollará como una práctica en la que se compara una especie con estructura genética moderada (*Pinus*

*pinaster* Ait.; Bucci y col, 2007) y una especie que presenta estructura genética fuerte, como resultado de la fragmentación de sus poblaciones (*Taxus baccata* L.; González-Martínez y col, 2010). El nivel de estructura poblacional encontrado en estas dos especies apoya diferentes estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*.

El tercer estudio de caso, evalúa el potencial de introgresión por polen a partir de plantaciones de origen desconocido en la variedad endémica de pino silvestre de Sierra Nevada (*Pinus sylvestris* var. *nevadensis* D. H. Christ; Robledo-Arnuncio y col, 2009). Esta variedad es de gran interés ya que supone el límite meridional de la especie y hay evidencia de adaptación a condiciones locales de sequía, lo que resulta atractivo para plantaciones protectoras en zonas donde se prevea un impacto fuerte del cambio climático. Usando haplotipos exclusivos de las plantaciones y métodos de máxima verosimilitud se determinan las zonas del Parque Nacional de S. Nevada con menores niveles de introgresión genética y que se podrían

utilizar para recoger semilla no introgresada para el refuerzo de la población autóctona.

En conclusión, estos ejemplos muestran como el uso de marcadores moleculares neutrales puede proporcionar información valiosa de utilidad para la conservación genética de especies forestales. En el futuro, se prevé que el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación y genotipado permita aumentar la precisión de las estimaciones (al incluir miles de marcadores) y, también, identificar polimorfismos en genes candidatos para diferentes caracteres adaptativos. En cualquier caso, la información obtenida a partir de marcadores moleculares necesita completarse con información ecológica y procedente de ensayos de genética cuantitativa para su aplicación operativa en conservación.

Bucci, G., González-Martínez, S.C., Le-Provost, G., Plomion, C., Ribeiro, M.M., Sebastiani, F., Alía, R. & Vendramin, G.G. **2007**. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait.

revealed by chloroplast microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 16: 2137-2153.

González-Martínez, S.C., Dubreuil, M., Riba, M., Vendramin, G.G., Sebastiani F. & Mayol, M. **2010**. Spatial genetic structure of *Taxus baccata* L. in the western Mediterranean Basin: past and present limits to gene movement over a broad geographic scale. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (en prensa).

Hampe, A. & Petit, R.J. **2005**. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters* 8: 461-467.

Robledo-Arnuncio, J.J., Navascués, M., González-Martínez, S.C. & Gil, L. **2009**. Estimating gametic introgression rates in a risk assessment context: a case study with Scots pine relicts. *Heredity* 103: 385-393.

Vaxevanidou, Z., González-Martínez, S.C., Climent, J. & Gil, L. **2006**. Tree populations bordering on extinction: a case study in the endemic Canary Island pine. *Biol. Conser.* 129: 451-460.



## Gestión de poblaciones en programas de conservación *ex-situ*

Armando Caballero y Silvia T. Rodríguez-Ramilo

Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Biología.  
Universidad de Vigo. 36310 Vigo. España.

En muchas ocasiones, debido al elevado riesgo para la supervivencia de las poblaciones, ya sea por su reducido censo o por el deterioro de su hábitat natural, es necesario el mantenimiento de las mismas en condiciones de cautividad, constituyendo los denominados programas de conservación *ex-situ* (Allendorf y Luikart, 2007). La cautividad se lleva a cabo en zoológicos, parques naturales, acuarios, jardines botánicos y arboretos, pero también en bancos de germo-plasma vegetal y criopreservación de plantas y animales, cultivos celulares y gametos. Comúnmente se ha aceptado como objetivos principales en los programas de conservación: (1) evitar la consanguinidad, ya que afecta a la eficacia biológica de la especie; (2) mantener la mayor variación genética posible, para garantizar la capacidad futura de la población ante los nuevos retos

ambientales; y, en el caso de programas *ex-situ*, (3) preservar a la población de la adaptación a la cautividad para una posible reintroducción futura en su medio natural.

En la mayoría de los programas de conservación *ex-situ* los individuos no se mantienen en un solo núcleo sino que se crean diferentes poblaciones por problemas logísticos (imposibilidad de encontrar recintos lo suficientemente grandes, escasez de recursos por parte de una sola institución, etc.) La estructuración de las poblaciones de censo reducido tiene la consecuencia de que erosiona la variación genética y se incrementa la consanguinidad, factores de gran importancia en los programas de conservación (Allendorf y Luikart, 2007). Es, por tanto, de interés general, desarrollar métodos para el manejo de la

variación genética en poblaciones subdivididas y establecer criterios objetivos para cuantificar la importancia de la variación intra e interpoblacional.

El análisis de la diversidad genética en poblaciones subdivididas se realiza generalmente en términos de diversidad génica o heterocigosis esperada (Nei, 1973). Sin embargo, la riqueza alélica (el número de alelos distintos que están segregando en una población) es un criterio alternativo y complementario para evaluar la diversidad genética (Foulley y Ollivier, 2006). Mientras que la diversidad génica es responsable directa de la depresión consanguínea y la respuesta a la selección a corto plazo, la diversidad alélica lo es de la respuesta a la selección a largo plazo. Resulta posible realizar una partición de la diversidad alélica de una forma análoga a la que se realiza para la diversidad génica (Caballero y col., 2010), y esta partición tiene aplicaciones en la priorización de subpoblaciones para su conservación. Como consecuencia de la partición también es posible definir un coeficiente de diferenciación alélica

interpoblacional,  $A_{ST}$ , análogo al clásico coeficiente de diferenciación génica,  $F_{ST}$ .

Recientemente se han empezado a desarrollar protocolos de manejo de la diversidad genética en poblaciones subdivididas en programas de conservación. Fernández y col. (2008) han propuesto un método dinámico de optimización de la diversidad genética global controlando la tasa de consanguinidad a partir de la información genealógica disponible. Esta metodología se implementa en el programa METAPOPOP (Pérez-Figueroa y col., 2009), que también incorpora análisis básicos de la variación genética.

En el curso resumiremos los aspectos básicos del análisis y manejo de la diversidad genética en poblaciones subdivididas. En primer lugar, describiremos la partición de la diversidad génica y alélica en componentes intra- e inter-poblacionales. En segundo, ilustraremos las aplicaciones de esta partición en el contexto de la priorización de subpoblaciones con objetivos de conservación y la obtención de

poblaciones sintéticas. En tercero, describiremos el protocolo de conservación basado en el método dinámico propuesto por Fernández y col. (2008) para el mantenimiento de la diversidad en poblaciones subdivididas cuando se dispone de información genealógica y hay posibilidades de manipulación de los apareamientos. Finalmente, ilustraremos las anteriores metodologías mediante la aplicación del programa METAPOPOP a datos empíricos.

Allendorf, F. W. & Luikart, G. **2007** *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, Malden, MA, USA.

Caballero, A., Rodríguez-Ramilo, S. T., Ávila, V. & Fernández, J. **2010**. Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. *Conservation Genetics* 11: 409-419.

Fernández, J., Toro, M. A. & Caballero, A. **2008**. Management of subdivided populations in conservation programs:

development of a novel dynamic system. *Genetics* 179: 683-692.

Foulley, J. L. & Ollivier, L. **2006**. Estimating allelic richness and its diversity. *Livestock Science* 101: 150-158.

Nei, M. **1973**. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 70: 3321-3323.

Pérez-Figueroa, A., Saura, M., Fernández, J., Toro, M. A. & Caballero, A. **2009**. METAPOPOP—a software for the management and analysis of subdivided populations in conservation programs. *Conservation Genetics* 10: 1097-1099.

## Genética de la conservación de razas de animales domésticos

Luis Silió

Departamento de Mejora Genética Animal. INIA. 28040 Madrid. España.

A la domesticación de algunas especies siguió una larga historia de migraciones, adaptación y selección que ha originado una enorme variedad de razas de animales domésticos. La base de datos de FAO registra actualmente un total de 7.616 razas, 6.536 catalogadas como locales y el resto transfronterizas: 523 de ámbito regional y 557 internacional. Diversos factores han contribuido a la pérdida, sustitución o erosión genética de numerosas razas locales. Está documentada la extinción de 62 de ellas en los primeros seis años de este siglo, y otras 1.491 razas se encuentran clasificadas como en riesgo de extinción (<http://www.fao.org/dad-is>). Por otra parte, la diversidad genética de las razas más difundidas se ha reducido notablemente por la intensa selección realizada sobre un reducido número de unidades de selección combinado con el

uso creciente de técnicas de reproducción artificial.

Hay un creciente consenso sobre la necesidad de detener esta erosión genética. La conservación de los recursos genéticos de animales domésticos se justifica por a) la necesidad de disponer de genotipos mejor adaptados a posibles nuevos sistemas productivos, a cambios climáticos y ambientales o a nuevas enfermedades, b) la singularidad fisiogenética de algunas poblaciones o c) el valor paisajístico o histórico de otras. Sin embargo, es obvio que no es posible conservar los miles de razas todavía existentes aunque afortunadamente tampoco es necesario, ya que muchas de ellas son reiterativas, carecen de singularidad notoria o disponen de un nicho de mercado para sus productos que les da la oportunidad de ser económicamente viables. Se requiere una

priorización de los recursos genéticos a conservar, que usualmente se establece a partir de evaluaciones del riesgo de extinción y del interés atribuido a cada población.

Durante las dos últimas décadas se han realizado múltiples trabajos de caracterización de diferentes razas, análisis de la variación genética inter e intraracial y reconstrucción de su prehistoria y de su relación con las poblaciones ancestrales (Groeneveld *et al.*, 2010). Asimismo el problema de la priorización en la conservación se ha abordado con diferentes enfoques basados en el análisis de diversidad genética neutra estimada a partir de marcadores genéticos (Boettcher *et al.*, 2010). El elemento diferencial de estos métodos es la ponderación relativa ( $\lambda$ ) asignada a la diversidad genética intra ( $GD_W$ ) e interpoblacional ( $GD_B$ ) en la partición de la diversidad genética total  $GD = \lambda GD_W + GD_B$ . Ponderaciones extremas ( $\lambda = 0, 1$ ) dan lugar a decisiones conservacionistas de signo opuesto, a favor respectivamente de pequeñas líneas o de grandes poblaciones no amenazadas.

Parcialmente estas decisiones se corresponden a planteamientos centrados en las razas o en el conjunto de la especie, aunque la metodología es también aplicable a la priorización entre variedades de una raza (Fabuel *et al.*, 2004).

La gestión de programas de conservación se basa principalmente en poblaciones de animales vivos, que en ocasiones puede combinarse con la crioconservación en bancos de gametos. Es este un campo en el que se ha registrado un considerable desarrollo teórico ya reflejado en este curso. Las dos decisiones cruciales -qué animales se eligen como reproductores y como se aparean- deben orientarse a la minimización de  $\Delta F$  por generación, y deben basarse en la maximización del número de reproductores del sexo limitante (generalmente machos), el equilibrio de las contribuciones genéticas y el diseño de planes de apareamientos de mínimo parentesco. Para ello, en un programa de conservación viable es imprescindible un riguroso control genealógico, que facilita además el

chequeo de lo realizado mediante técnicas de análisis genealógico (Toro et al., 2000).

La información genealógica puede ser inexistente al inicio de un programa de conservación o al incorporar nuevos animales al mismo. En esos casos puede recurrirse al empleo de marcadores genéticos, bien para reconstruir las posibles relaciones de parentesco o para cuantificar el mismo (Toro et al., 2002). Hasta ahora los microsatélites han sido los marcadores de referencia, aunque el genotipado automatizado de SNP ofrece claras ventajas para que el recurso práctico a la información molecular sea asequible (Silió et al., 2010).

Boettcher, P.J., Tixier-Boichard, M., Toro, M.A. et al. **2010**. Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources *Animal Genetics* 41 (Suppl. 1): 64-77.

Groeneveld, L.F., Lenstra, J.A., Eding, H. et al. **2010**. Genetic diversity in farm

animals – a review. *Animal Genetics* 41 (Suppl. 1): 6-31.

Fabuel, E., Barragán, C., Silió, L. et al. **2004**. Analysis of genetic diversity and conservation priorities in Iberian pigs based on microsatellite markers. *Heredity* 93: 104-113.

Toro, M.A., Rodrigáñez, J., Silió, L. et al. **2000**. Genealogical analysis of a closed herd of Black Hairless Iberian pigs. *Conservation Biology*. 14: 1843-1851.

Toro, M.A., Barragán, C., Ovilo, C. et al. **2002**. Estimation of coancestry in Iberian pigs using molecular markers. *Conservation Genetics*. 3: 309-320.

Silió, L., Fernández, A.I., Mercadé, A. et al. **2010**. Measuring inbreeding in a closed pig strain from high density SNP genotypes. *WCGALP*, 2 a 6 de Agosto, Leipzig, Alemania.

# Genética para la conservación de poblaciones de lobos

Carles Vilà

Estación Biológica de Doñana-CSIC, Avd. Américo Vespucio s/n, 41013 Sevilla.  
España.

Tradicionalmente, la aplicación de herramientas genéticas a la gestión y conservación de poblaciones naturales se ha visto limitada por la dificultad que entraña el desarrollo de marcadores genéticos específicos. Sin embargo, estos problemas han sido menores en el caso del lobo (*Canis lupus*). Esto se debe a la importancia del perro en investigación biomédica, lo que ha hecho que miles de marcadores genéticos estén disponibles. Como perros y lobos son casi idénticos desde el punto de vista genético (los perros derivan de la domesticación de lobos), marcadores desarrollados para perros se pueden aplicar a lobos. Esto ha permitido una gran cantidad de estudios, permitiendo que el lobo se convierta en un modelo de las posibilidades ofrecidas por la genética para la conservación.

Una población de lobos que ha sido estudiada con especial intensidad es la de

la Península Escandinava. Allí el lobo era muy escaso a mediados del siglo XX. Un estudio genético utilizando técnicas de ADN antiguo (Flagstad y col. 2003) mostró que el pequeño y decreciente tamaño poblacional durante los últimos 200 años llevó a una progresiva pérdida de diversidad genética hasta su extinción alrededor de 1970.

Sin embargo, un grupo de lobos apareció en 1984 en el sur de Suecia, a más de 1000 km de su borde de distribución más cercano. El origen de esta población fue muy controvertido y se caracterizaba por una composición genética muy diferente de la de poblaciones cercanas. Un análisis integrando marcadores genéticos autosómicos, en cromosomas sexuales y ADN mitocondrial junto con datos de campo mostró que esto podía explicarse como consecuencia de un efecto fundador y deriva genética ya que la

población derivaba de sólo tres individuos que habían llegado desde las poblaciones de Finlandia y Rusia (Vilà y cols. 2003a).

A partir de ese momento la población creció en tamaño de forma rápida hasta llegar a los más de 200 individuos en la actualidad. Sin embargo, y a pesar de que esta se trata de una población aparentemente sana, un análisis detallado muestra que es así. La población seguía aislada, llevando al aumento progresivo de la endogamia. Un seguimiento de la población desde su fundación mediante técnicas de campo y muestreo genético no invasivo (analizando excrementos) mostró una depresión por endogamia muy clara con el descenso progresivo de la supervivencia de los cachorros al aumentar su tasa de endogamia (Liberg y cols. 2005). Otro estudio morfológico confirmó esta depresión al mostrar una elevada frecuencia de malformaciones en la columna vertebral de estos lobos (Räikkönen y cols. 2006). Esto demostraba que la depresión por endogamia era posible incluso en

poblaciones en crecimiento y aparentemente sanas.

Por otro lado, una preocupación permanente en la gestión y conservación de poblaciones de lobos es la hibridación con perros y la consiguiente posible pérdida de adaptaciones locales o alelos coadaptados (o la pérdida de “pureza”). Cuando un lobo con aspecto extraño apareció cerca de Oslo (Noruega) y se sugirió que podía ser un híbrido, se produjo una gran alarma pública. Tras analizar una muestra de este animal utilizando un diverso panel de marcadores genéticos pudimos confirmar que se trataba de un híbrido, hijo de una loba y un perro (Vilà et al. 2003b). Tras conocer los resultados, el gobierno noruego autorizó la caza en periodo de veda de cualquier animal de “aspecto lobuno” en una amplia zona del sur del país (la población de lobos en Noruega se calculaba que era de unos 12-20 individuos) para así prevenir la llegada de alelos de perros a la población de lobos.

Está claro que perros y lobos se pueden cruzar y pueden producir descendencia



fértil, pero ¿hasta que punto es peligrosa la hibridación para la población de lobos? Como lobos y perros coexisten en todo el noroeste de España, hemos intentado cuantificar el grado de introgresión de genes de perros en la población ibérica de lobos. Aunque hemos encontrado un 3% de individuos híbridos de primera generación, apenas hemos visto híbridos de segunda generación o retrocruces. Esto sugiere que los híbridos pueden estar poco capacitados para sobrevivir en condiciones naturales y, por tanto, la hibridación puede ser sólo una preocupación menor.

Flagstad, Ø., Walker, C.W., Vilà, C., Sundqvist, A.-K., Fernholm, B., Hufthammer, A.K., Wiig, Ø., Koyola, I. & Ellegren H. **2003**. Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular Ecology* 12: 869-880.

Liberg, O., Andrén, H., Pedersen, H.-C., Sand, H., Sejberg, D., Wabakken, P.,

Åkesson, M. & Bensch, S. **2005**. Severe inbreeding depression in a wild wolf *Canis lupus* population. *Biology letters* 1:17-20.

Räikkönen, J., Bignert, A., Mortensen, P. & Fernholm, B. 2006. Congenital defects in a highly inbred wild wolf population (*Canis lupus*). *Mammalian Biology* 71: 65-73.

Vilà, C., Sundqvist, A.-K., Flagstad, Ø., Seddon, J., Björnerfeldt, S., Kojola, I., Casulli, A., Sand, H., Wabakken, P. & Ellegren, H. **2003a**. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 91-97.

Vilà, C., Walker, C., Sundqvist, A.-K., Flagstad, Ø., Andersone, Z., Casulli, A., Kojola, I., Valdmann, H., Halverson, J. & Ellegren, H. **2003b**. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* 90: 17-24.



**E-mail:** [cng2010@uvigo.es](mailto:cng2010@uvigo.es)

**Web:** <http://webs.uvigo.es/cng2010/>

---