

Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación Sierra de Guadarrama

INTROGRESIÓN GENÉTICA DE LIEBRE DE MONTAÑA EN LAS POBLACIONES DE LIEBRE IBÉRICA DE LA SIERRA DE GUADARRAMA



AÑO 2024

CONSEJERIA DE MEDIO AMBIENTE, AGRICULTURA E INTERIOR

DIRECCION GENERAL DE BIODIVERSIDAD Y GESTION FORESTAL

PARQUE NACIONAL DE LA SIERRA DE GUADARRAMA

CENTRO DE INVESTIGACION, SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN

INTROGRESIÓN GENÉTICA DE LIEBRE DE MONTAÑA EN LAS POBLACIONES DE LIEBRE IBÉRICA DE LA SIERRA DE GUADARRAMA

AÑO 2024

Dirección científica

José Antonio Dávila. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC). Universidad de Castilla la Mancha (UCLM).

Equipo de trabajo

Fernando Horcajada. Centro de Investigación del Parque Nacional (CISE)

Santiago Martín. Centro de Investigación del Parque Nacional (CISE)

Sergio Rubio. Centro de Investigación del Parque Nacional (CISE)

Coordinación

Juan A. Vielva. Responsable del Centro de Investigación del Parque Nacional (CISE)

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
PREÁMBULO	3
1. ANTECEDENTES	4
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	6
3. ÁREA DE ESTUDIO.....	7
3.1. Hábitats asociados a la distribución de la liebre ibérica en la Sierra de Guadarrama	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
4.1. Recolección de muestras	10
4.2. Extracción del ADN mitocondrial y análisis.....	11
5. RESULTADOS	12
6. DISCUSIÓN	15
7. REFERENCIAS.....	19

PREÁMBULO

Desde hace tiempo este Centro del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama tenía, entre sus objetivos, mejorar el conocimiento de varias especies emblemáticas de la Sierra de Guadarrama.

El documento que ahora presentamos se refiere a una especie, sin duda emblemática de la Sierra de Guadarrama y ha sido posible gracias a la colaboración con IREC-CSIC.

Se trata de una exploración en las complejas interacciones genéticas entre la liebre ibérica y otras especies de liebres de la península ibérica, relacionando los fenómenos de introgresión genética, que han tenido lugar a lo largo del tiempo, en relación con fenómenos de introgresión genética que han ocurrido a lo largo de su historia evolutiva.

El estudio, además de profundizar en la comprensión del grado de introgresión genética en el presente, evalúa cómo esta introgresión podría estar relacionada con factores ambientales y geográficos. Además, se destaca la importancia de este estudio en el marco de los esfuerzos de conservación dentro de los escenarios de cambio global, ya que proporciona información valiosa sobre la historia evolutiva de la especie y sus adaptaciones a condiciones cambiantes a lo largo del tiempo.

Es muestra, también, de la importancia de la colaboración entre instituciones, como en este caso el IREC-CSIC, lo que proporciona el enfoque multidisciplinario necesario para abordar los desafíos que enfrenta la biodiversidad en el contexto actual del cambio climático y la fuerte influencia de las actividades humanas.

JUAN VIELVA JUEZ
RESPONSABLE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN SEGUIMIENTO Y
EVALUACIÓN

INFORME

1. ANTECEDENTES

La liebre ibérica (*Lepus granatensis*) es una especie endémica de la península ibérica, con una amplia distribución, ocupando una amplia gama de hábitats a lo largo de toda España (Fig.1). Es una de las tres especies de liebre de la Península, siendo sustituida por la liebre europea (*Lepus europaeus*) en el noreste y la liebre de piornal (*Lepus castroviejoii*) en la cordillera Cantábrica.

Es una liebre de tamaño mediano, que suele pesar entre 2 y 2,5 kg, con un pelaje parduzco con las puntas de las orejas negras y la parte inferior blanca. La liebre ibérica parece ser bastante versátil en sus preferencias de hábitat, ocupando una amplia gama de entornos a lo largo de su área de distribución. En el uso y selección del hábitat, tiene preferencia por diferentes ambientes, incluidas tierras agrícolas, pastizales, matorrales y bordes de bosques, adaptándose a diferentes rangos altitudinales en su área de distribución. En la sierra de Guadarrama puede ocupar la mayoría de hábitats presentes, desde las zonas de cumbre, por encima de los 2000m de altitud, en el piso oromediterráneo, hasta las zonas más bajas de encinares, en el piso mesomediterráneo (Fig.2).

La liebre ibérica tiene una historia evolutiva interesante, en particular en lo que respecta a sus interacciones con otras especies de liebres. Las poblaciones de las tres especies presentes en la península ibérica, muestran introgresión de linajes de ADN mitocondrial (ADNmt) de la liebre de montaña o liebre variable (*Lepus timidus*), una especie boreal que estuvo presente en la península ibérica hasta el último máximo glacial (Melo-Ferreira et al., 2005). El área de distribución de *L. granatensis* se expandió tras la deglaciación, sustituyendo a *L. timidus*, hibridándose ambas especies durante el mencionado proceso y produciéndose un gradiente creciente de introgresión mitocondrial hacia el noreste por parte de *L. timidus* en *L. granatensis* (Melo-Ferreira et al., 2009; Marques et al., 2017).

Las consecuencias de la introgresión (transferencia del ADN mitocondrial entre especies) para la evolución de una especie determinada pueden variar ampliamente (Rotival y Quintana-Murci, 2020). Por un lado, los individuos introgresados podrían ser menos aptos, como ocurre por ejemplo con las introgresiones provocadas por las actividades humanas, como el caso de la introgresión genética en la perdiz roja (*Alectoris rufa*), como consecuencia de las repoblaciones cinegéticas (CISE, 2023). Por otro lado, pueden ser más aptos, estar mejor adaptados o tener mayor heterocigosidad, lo que lleva al mantenimiento y posiblemente a la expansión del patrón de introgresión (Schwenk et al., 2008). Se ha demostrado que el mantenimiento de porciones introgresadas del genoma a veces se ve favorecido por la selección natural, confiriendo adaptación en un entorno determinado. Estas ventajas adaptativas pueden incluir una mejor adaptabilidad a los cambios en las condiciones

ambientales como el clima (Hill, 2019) y/o la disponibilidad de alimentos (Selz y Seehausen, 2019), o una mayor resistencia/tolerancia a enfermedades o parásitos (Seixas et al., 2018).



Figura 1. Distribución de la liebre ibérica en España según el Atlas de mamíferos del MITECO (Carro, F y Sorriquer, R. 2007).

La persistencia de la introgresión en el caso de la liebre ibérica, podría deberse a factores demográficos y deriva genética (Seixas et al. (2018), aunque con frecuencia se ha invocado un posible papel de las mitocondrias de *L. timidus* en la adaptación a climas fríos y grandes altitudes para explicar su ubicuidad en varias especies de liebres. La introgresión del ADN mitocondrial (ADNmt) de *L. timidus* en *L. granatensis* ocurrió probablemente durante el Pleistoceno Superior, cuando *L. timidus* habitaba gran parte de la península ibérica. La introgresión parece ser en gran medida unidireccional, transfiriéndose el ADNmt de *L. timidus* a *L. granatensis*, pero no al revés (Cardoso et al., 2024).

Debido a estas singulares interacciones genéticas y a su historia evolutiva únicas, *L. granatensis* se ha convertido en una especie modelo importante para estudiar la hibridación, la introgresión y la adaptación evolutiva en mamíferos, proporcionando una información valiosa sobre los complejos procesos evolutivos que dan forma a la biodiversidad en mamíferos y sirviendo como un excelente indicador de las consecuencias a largo plazo del intercambio genético interespecífico.

El caso de *L. timidus* es otra evidencia más de la importancia que las penínsulas del sur de Europa tuvieron como refugios de diversidad genética durante el Pleistoceno (Randi et al., 2004). Taberlet et al. (1998) a partir de un estudio filogeográfico en el que incluyeron 10

taxones genéticamente muy diferentes (mamíferos, anfibios y artrópodos) concluyeron que la península ibérica, Italia y los Balcanes habrían actuado como un importante reservorio de biodiversidad durante la última glaciación.



Figura 2. Dos liebres localizadas en el estudio, una en zonas bajas del parque (izq.) en el piso mesomediterráneo y otra en las zonas de cumbre del piso oromediterráneo.

La presencia de la liebre en la sierra de Guadarrama en el Pleistoceno Superior fue bastante significativa, tal y como atestiguan los restos del yacimiento de Pinilla del Valle (Delgado, 1982; Buitrago, 1992). Estas sierras, además de funcionar como refugio en épocas pleistocénicas, han supuesto un nexo de unión entre las poblaciones de vertebrados del norte y sur de Europa, aportando diversidad y riqueza genética, como podría ser también en el caso de la liebre. Recientes avances en el campo de la genética de poblaciones y nuevos hallazgos paleontológicos, han impulsado el desarrollo de la filogeografía que ha dado lugar a una nueva visión de la distribución y filogenia para varias especies de mamíferos europeos, incluidas algunas especies considerablemente manipuladas por el hombre, como es el caso la liebre (Cardoso et al., 2024).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde el Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación del Parque Nacional (CISE), se ha establecido una colaboración con el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC-CSIC) para evaluar el nivel de introgresión genética presente en las poblaciones de liebre ibérica de la sierra de Guadarrama. Se sabe que los individuos de liebre ibérica que portan el tipo de ADNmt de liebre de montaña en la actualidad, están distribuidos en un área marginal del rango de distribución de *L. granatensis* y que la introgresión de ADNmt se correlaciona con gradientes ambientales que podrían asimilarse al área ocupada por la liebre de montaña a finales del pleistoceno superior (Acevedo et al., 2015), en la época del último máximo glacial (LGM) del que existen multitud de evidencias en el ámbito de estudio, especialmente en el macizo de Peñalara. Los cambios climáticos cuaternarios han regido la dinámica de distribución geográfica de las especies en todo el mundo, afectando su distribución espacial y diversidad genética (Hewitt, 2001), y son especialmente patentes en la Sierra de Guadarrama

en diversos grupos faunísticos estudiados por el CISE como el caso de los anfibios o de mamíferos como el corzo.

Los datos obtenidos hasta ahora en otras zonas de la península ibérica, sugieren que la introgresión de ADNmt puede haber tenido un efecto adaptativo, especialmente para las poblaciones de liebre ibérica presentes en alta montaña, como podría ocurrir con las poblaciones del parque nacional.

Desde su fundación en 1999, el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC-CSIC) ha dedicado sus investigaciones a especies de caza, con un interés destacado en la liebre. Una de las líneas de investigación se centra en aspectos genéticos de esta especie, sobre todo aquellos de aplicación en gestión cinegética. Las investigaciones sobre introgresión genética de la liebre ibérica han sido prolíficas y se han plasmado en publicaciones científicas, aunque hasta ahora no se han analizado datos relativos a las poblaciones de la Sierra de Guadarrama, por lo que este trabajo suple con un gran número de muestras esta carencia.

El desarrollo del muestreo en el parque nacional y su ZPP (Zona Periférica de Protección), se ha realizado a través del personal investigador del CISE y forma parte del seguimiento de la especie, en consonancia con el Subprograma de conservación de fauna del Programa de Conservación de los Recursos Naturales, Patrimonio Cultural y Paisaje del Plan Rector de Uso y Gestión del Parque. De forma complementaria el IREC ha aportado al estudio muestras de la zona de piedemonte, tanto en la vertiente madrileña como segoviana, de manera que se puedan comparar gradientes geográficos abarcando un ámbito mayor.

Por lo tanto, los objetivos principales del proyecto serían, por un lado, conocer el grado de introgresión genética de las poblaciones de la sierra de Guadarrama aumentando así también el conocimiento sobre la presencia de liebre de montaña en esta zona en la época de la última glaciación. Por otro lado, se pretende analizar si el porcentaje de introgresión está relacionado con gradientes geográficos, especialmente en lo referido a las poblaciones de liebre ibérica de alta montaña, lo que podría sugerir diferentes pautas de gestión y conservación de esta especie en la sierra de Guadarrama.

Parece importante, por lo tanto, estudiar la introgresión genética de la especie desde esta doble perspectiva conservacionista y evolutiva, proporcionando información importante sobre la historia de la liebre ibérica en última época glacial de la que la Sierra de Guadarrama fue destacado protagonista.

3. ÁREA DE ESTUDIO

El muestreo fue desarrollado en el ámbito del parque nacional y su ZPP (Fig. 3). La altitud media del territorio que compone el ámbito de muestreo es elevada, como corresponde a su situación en pleno Sistema Central. La diferencia de relieve entre las cumbres y el piedemonte también es muy grande, lo que condiciona diferencias en la distribución y densidad de muchas

especies, incluida la liebre. Esta diferencia de relieve es el principal factor de control de la distribución de precipitaciones y temperatura y, en definitiva, es la causa principal de la diversidad de vegetación. La mayoría de la superficie de censo estaba representada por zonas forestales, concretamente por pinares, bosques de pinos silvestres, bosques de robledales y prados de fondo de valle, como principal vegetación del piso oro y supramediterráneo Guadarrámico.

3.1. Hábitats asociados a la distribución de la liebre ibérica en la Sierra de Guadarrama

La Sierra de Guadarrama pertenece al Sistema Central y biogeográficamente se enmarca en el Sector Guadarrámico de la subprovincia Carpetana. El paisaje vegetal presente actualmente es fruto de una serie de acontecimientos que han sucedido a lo largo del tiempo y que han originado importantes cambios en la estructura y composición de los bosques, con manifestaciones de carácter geológico, climático y de origen humano que han conformado las principales unidades de vegetación en las que se ha desarrollado el muestreo (Fig. 3).

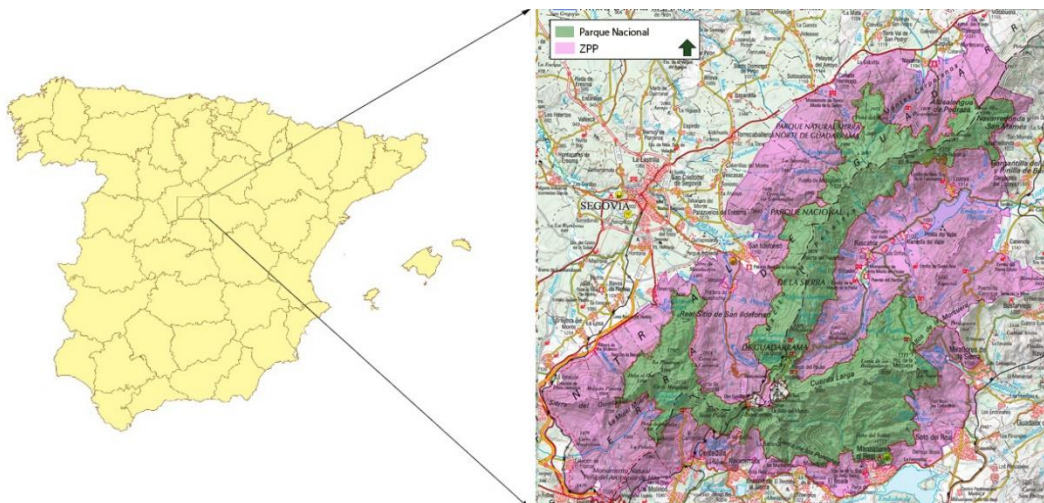


Figura 3. Localización del área de estudio en España y detalle de los límites del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama en verde y ZPP en rosa, coincidente con el ámbito de muestreo.

Los pinares de montaña son bosques compuestos mayoritariamente, en su estrato arbóreo, por el pino silvestre (*Pinus sylvestris*) (Fig. 4a). Estos bosques constituyen la vegetación potencial del piso oromediterráneo guadarrámico. Se trata de formaciones naturales y repobladas, situadas entre los 1.200 y 1.900 m sobre el nivel del mar. Estos ambientes, con diversidad de arbolado y matorral, cobijan ricas comunidades faunísticas, incluidos carnívoros como el lobo (*Canis lupus*), la garduña (*Martes foina*) o el tejón (*Meles meles*), detectados en este tipo de hábitat durante los muestreos.

Los bosques de roble rebollo o melojo ocupa el piso montano entre 1.700 y 1.400 m, extendiéndose por toda la sierra de Guadarrama (Fig. 4b). En la mayor parte de todo ese territorio, al robledal le corresponde el papel de bosque dominante en función de las condiciones mesoclimáticas.

En la actualidad, la mayor parte de las formaciones son de árboles jóvenes con gran cantidad de ejemplares procedentes de cepa. Fueron aprovechados antiguamente para leñas y carboneo mediante talas y entresacas, y con frecuencia aclaradas o adehesadas para pastos. Aun así, en muchos enclaves serranos se pueden encontrar individuos maduros que conservan en buenas condiciones la estructura de la comunidad, constituyendo ejemplos de los bosques originales. Además de la variedad de condiciones originadas por el hombre, los robledales presentan distintas formas, desde las formaciones más puras hasta los bosques mixtos con otras frondosas y con el pinar, pasando por zonas adehesadas con fresno en los fondos del valle.

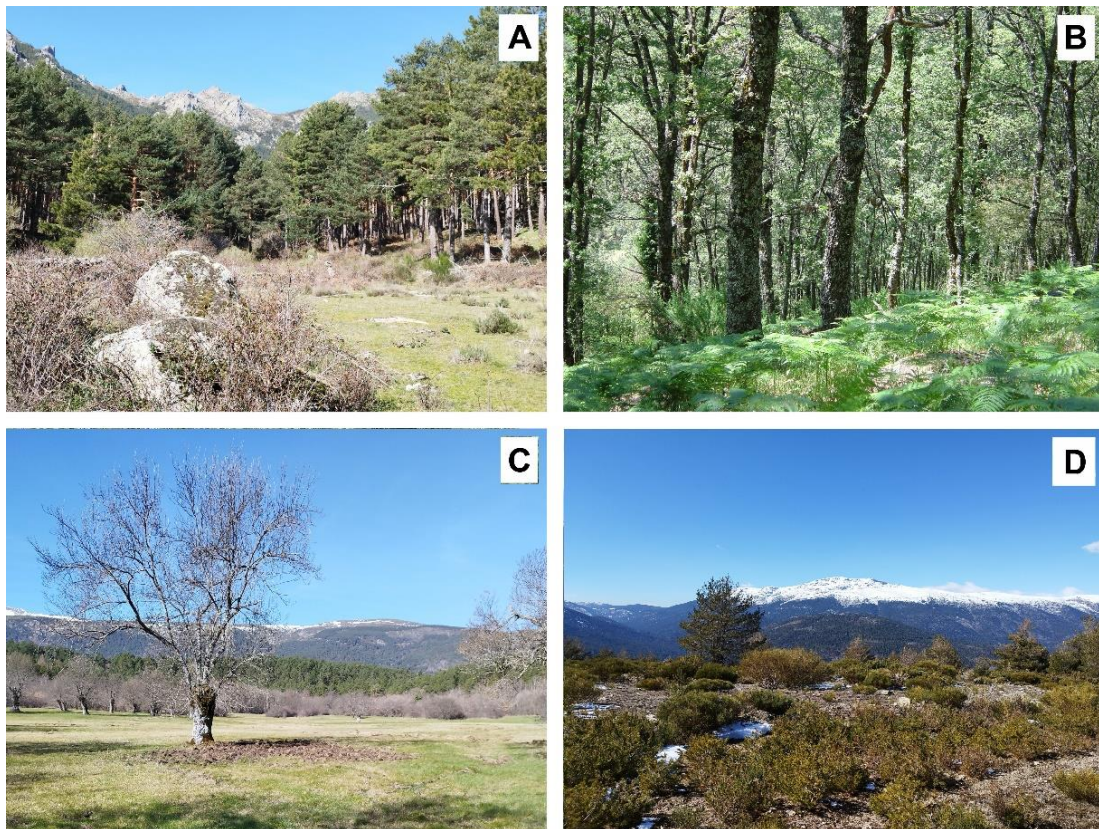


Figura 4. Principales unidades de vegetación ocupadas por la liebre ibérica en la Sierra de Guadarrama. (A) Pinares de montaña, (B) rebollares, (C) prados de fondo de valle y (D) matorrales de altura.

Los matorrales de altura son comunidades ampliamente extendidas por toda la sierra, en las zonas de cumbres y laderas altas, donde constituyen la vegetación principal entre los 1.800 y 2.200 m, inmediatamente por encima de los pinares (Fig. 4d). Constituye una

formación muy densa y de gran cobertura, aunque el matorral no alcanza mucha altura, alrededor de un metro, debido al peso de la nieve y a la fuerza de los vientos. Las especies de matorral dominantes en esta comunidad son el piorno serrano (*Cytisus oromediterraneus*) y el enebro rastrero (*Juniperus communis*). En la comunidad de mamíferos representativa de los hábitats del sector supraforestal destaca, la cabra montés (*Capra pyrenaica*), con poblaciones muy abundantes que provienen de las introducciones realizadas en los años 90 con ejemplares procedentes de la sierra de Gredos.

Los prados de fondo de valle y dehesas de fresno (*Fraxinus angustifolia*), es un hábitat que se extiende por las rampas y grandes valles internos de la sierra, como la cabecera del Valle del Lozoya. Los prados están salpicados por otros árboles caducifolios como el olmo común (*Ulmus minor*), el álamo temblón (*Populus tremula*), el sauce negro y el roble melojo, con estratos arbustivo y herbáceo. En las zonas bajas se desarrollan prados de siega (*Arrhenatherion*), en algunas zonas adehesados con fresno (*Fraxinus angustifolia*) y con facies húmedas (*Calthion palustris*, *Juncion acutiflori*), y algunos prados de diente (*Cynosurion sp.*). Estos prados presentan además orlas arbustivas con gran diversidad de especies (Fig. 4).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Recolección de muestras

Para la recolección de muestras genéticas de liebre ibérica en el ámbito de estudio se emplearon dos metodologías, muestras de tejido de ejemplares muertos y recopilación de pelos con metodologías no invasivas. Las muestras de ejemplares muertos consistieron en una porción de tejido del extremo de la oreja, o una pequeña muestra de músculo estriado. La mayoría de los ejemplares analizados procedían de la actividad cinegética, a través de colaboraciones con las sociedades de cazadores o de liebres atropelladas recogida directamente por el personal del CISE.



Figura 5. Detalle de una de las estaquillas para el muestreo no invasivo, ejemplar de liebre ibérica en zonas de cumbre e imagen de una muestra de oreja recogida de una liebre atropellada en la ZPP.

Las muestras no invasivas de liebre, consistieron en pelos obtenidos a través de un sistema de estaquillas con adhesivo distribuidas por las zonas de cumbre con abundancia de indicios (Fig. 5). Estas trampas de pelo a base de estaquillas de madera atraen de forma especial a la liebre que marca de manera abundante a su alrededor, identificándolas como zonas conspicuas para delimitar sus territorios. Las liebres presentan una compleja organización social, hoy todavía insuficientemente conocida, basada en una jerarquía entre individuos que se establece, entre otras, mediante el despliegue de una serie de comportamientos y actitudes entre las cuales se encontraría el marcaje del territorio (Holley 1986).

Para la recopilación de los datos muestras se utilizaron dispositivos móviles con el software libre Cybertracker 3.4. en el que se instaló la aplicación de muestreo con todos los formularios necesarios para la recopilación de los datos antes descritos.

4.2. Extracción del ADN mitocondrial y análisis

Las muestras de las que extraer ADN consistieron en pelos y músculo proveniente de trampas de pelo, ejemplares cazados o atropellados. Las muestras de tejidos fueron conservadas en etanol en el CISE hasta su envío al IREC. Tras la recepción de las muestras en el laboratorio, fueron congeladas a -82°C hasta el momento de extraer el ADN.

Se identificó el linaje de ADN mitocondrial mediante análisis PCR-RFLP en 92 muestras de *Lepus granatensis* de la sierra de Guadarrama y sus zonas de piedemonte, de las cuales 28 muestras pertenecían a la vertiente segoviana y 64 a la vertiente madrileña, con el fin de evaluar la distribución geográfica de los linajes de ADNmt y la frecuencia de introgresión.

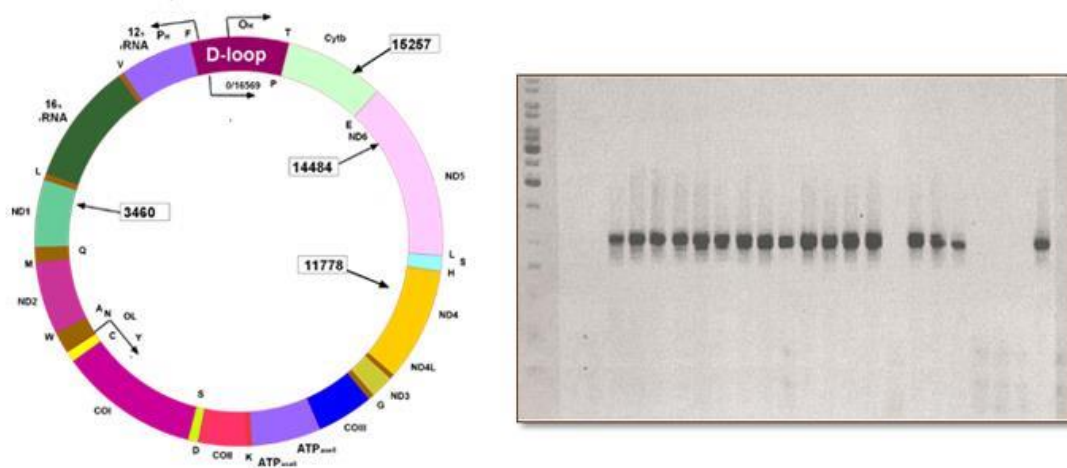


Figura 6. Detalle de la estructura del ADN mitocondrial donde se observa la región citocromo b utilizada también como marcador de hibridación (izq.). A la derecha imagen de los geles de agarosa de la PCR para la región control del citocromo b del ADN mitocondrial de las muestras analizadas de liebre ibérica.

El ADN se extrajo usando Animal Genomic DNA Mini-Preps Kit (Bio Basic) y ADN tisular E.Z.N.A. (Omega Bio-Tek) después de evaporar o lavar el etanol de las muestras, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. La concentración del ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se diluyó a una concentración de trabajo de 50 ng/μl cuando resultó superior.

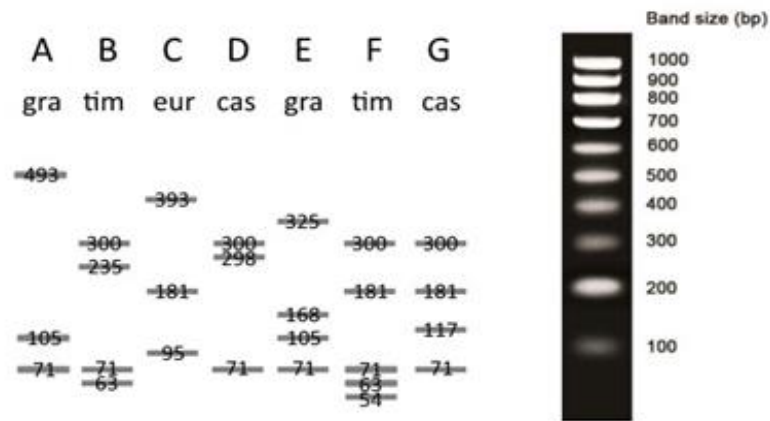


Figura 7. Representación esquemática de los patrones de restricción (A-G) para los linajes de ADNmt de *Lepus granatensis* (gra), *L. timidus* (tim), *L. europaeus* (eur) y *L. castroviejoii* (cas). Los números a lo largo de las bandas indican el tamaño (pb) de los fragmentos de ADN producidos después de la digestión de un fragmento de 669 pb del gen del citocromo b con AluI.

Se amplificó un fragmento de 669 pb del gen del citocromo b mitocondrial (Fig. 6) según Melo-Ferreira et al. (2005). Los productos de la PCR se digirieron con la enzima de restricción AluI (Fermentas) y los perfiles de digestión se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y se compararon con patrones descritos previamente en especies de liebres de la península Ibérica por Melo-Ferreira et al. (2005) (Fig.7).

5. RESULTADOS

Se estudiaron por PCR-RFLP los genomas mitocondriales de 92 ejemplares de liebre ibérica muestreados a lo largo de la Sierra de Guadarrama y sus zonas de piedemonte (Tabla 1), tanto en la vertiente segoviana como en la madrileña. De los ejemplares secuenciados 33 pertenecían al ámbito de la sierra de Guadarrama (15 de los cuales se recopilaron en el parque nacional y su ZPP) y el resto (n=59) a las zonas de piedemonte y llanura tanto de la vertiente madrileña (n=45) como en la vertiente segoviana (n=13).

Tabla 1. Muestras de liebre ibérica recogidas evaluadas en durante estudio.

ID	Zona	X etrs89	Y etrs89	Altitud	PCR-RFLP p	MtDNA line
1	PN-ZPP	440244	4529560	1213	A	gra
2	PN-ZPP	429592	4520160	1771	A	gra
3	PN-ZPP	429621	4520873	1738	A	gra
4	PN-ZPP	425702	4525462	1176	B	tim

ID	Zona	X etrs89	Y etrs89	Altitud	PCR-RFLP p	MtDNA line
5	PN-ZPP	429659	4521314	1716	A	gra
6	PN-ZPP	429636	4521024	1727	A	gra
7	PN-ZPP	425270	4526329	1158	B	tim
8	PN-ZPP	425267	4526531	1154	B	tim
9	PN-ZPP	399813	4516517	1540	A	gra
10	PN-ZPP	404007	4517146	1310	A	gra
11	PN-ZPP	397783	4515768	1245	A	gra
12	PN-ZPP	424479	4540923	1480	A	gra
13	PN-ZPP	415959	4531195	1202	A	gra
14	PN-ZPP	426233	4543985	1150	B	tim
15	PN-ZPP	397783	4515768	930	B	tim
16	Sierra de Guadarrama	455563	4517817	697	B	tim
17	Sierra de Guadarrama	451897	4520177	796	F	tim
18	Sierra de Guadarrama	457839	4526488	1072	B	tim
19	Sierra de Guadarrama	459134	4526635	1084	B	tim
20	Sierra de Guadarrama	460047	4525762	951	B	tim
21	Sierra de Guadarrama	397980	4487548	1037	A	gra
22	Sierra de Guadarrama	373614	4456745	780	A	gra
23	Sierra de Guadarrama	444709	4533490	1102	A	gra
24	Sierra de Guadarrama	443133	4534765	1058	A	gra
25	Sierra de Guadarrama	449370	4509892	857	B	tim
26	Sierra de Guadarrama	443709	4534889	1073	A	gra
27	Sierra de Guadarrama	443591	4535318	1032	A	gra
28	Sierra de Guadarrama	420365	4503345	1035	B	tim
29	Sierra de Guadarrama	401701	4536856	965	B	tim
30	Sierra de Guadarrama	427247	4564817	950	X	error
31	Sierra de Guadarrama	414491	4547130	1080	B	tim
32	Sierra de Guadarrama	401701	4542727	940	B	tim
33	Sierra de Guadarrama	387442	4541888	900	B	tim
34	Sierra de Guadarrama	382410	4513162	1400	A	gra
35	Sierra de Guadarrama	402643	4535845	1050	B	tim
36	Sierra de Guadarrama	431056	4588857	1050	B	tim
37	Sierra de Guadarrama	428850	4582884	1080	B	tim
38	Sierra de Guadarrama	441749	4579840	1000	B	tim
39	Sierra de Guadarrama	448827	4576401	950	B	tim
40	Sierra de Guadarrama	450421	4568496	1020	B	tim
41	Piedemonte madrileño	429168	4418546	499	A	gra
42	Piedemonte madrileño	429596	4418019	524	A	gra
43	Piedemonte madrileño	435748	4496387	727	B	tim
44	Piedemonte madrileño	443463	4443434	626	A	gra
45	Piedemonte madrileño	443298	4443690	633	B	tim
46	Piedemonte madrileño	457089	4485276	695	A	gra
47	Piedemonte madrileño	461335	4486461	640	A	gra
48	Piedemonte madrileño	479759	4474895	837	B	tim
49	Piedemonte madrileño	440164	4452506	619	B	tim
50	Piedemonte madrileño	445641	4444472	604	B	tim
51	Piedemonte madrileño	457832	4485142	666	F	tim
52	Piedemonte madrileño	468295	4476680	663	B	tim
53	Piedemonte madrileño	457321	4485703	679	F	tim
54	Piedemonte madrileño	473182	4462399	776	A	gra
55	Piedemonte madrileño	470192	4465296	774	B	tim

ID	Zona	X etrs89	Y etrs89	Altitud	PCR-RFLP p	MtDNA line
56	Piedemonte madrileño	482341	4454126	669	A	gra
57	Piedemonte madrileño	474362	4445523	766	A	gra
58	Piedemonte madrileño	470522	4473518	648	A	gra
59	Piedemonte madrileño	436372	4494188	691	B	tim
60	Piedemonte madrileño	435431	4497632	750	B	tim
61	Piedemonte madrileño	434167	4446666	606	A	gra
62	Piedemonte madrileño	406626	4456193	623	A	gra
63	Piedemonte madrileño	405977	4455459	629	A	gra
64	Piedemonte madrileño	433312	4497366	775	B	tim
65	Piedemonte madrileño	435939	4498167	730	B	tim
66	Piedemonte madrileño	433368	4447757	613	B	tim
67	Piedemonte madrileño	407033	4456132	608	B	tim
68	Piedemonte madrileño	434706	4446259	601	A	gra
69	Piedemonte madrileño	435028	4447972	595	B	tim
70	Piedemonte madrileño	416441	4463203	623	A	gra
71	Piedemonte madrileño	391719	4458414	482	A	gra
72	Piedemonte madrileño	432231	4447686	621	A	gra
73	Piedemonte madrileño	424219	4465164	640	A	gra
74	Piedemonte madrileño	413480	4454069	620	B	tim
75	Piedemonte madrileño	413189	4454547	620	B	tim
76	Piedemonte madrileño	424021	4465051	642	A	gra
77	Piedemonte madrileño	424062	4465686	646	A	gra
78	Piedemonte madrileño	413441	4479329	641	B	tim
79	Piedemonte madrileño	410309	4469408	615	B	tim
80	Piedemonte madrileño	410455	4469697	621	A	gra
81	Piedemonte madrileño	410030	4468990	629	A	gra
82	Piedemonte madrileño	410680	4469022	636	B	tim
83	Piedemonte madrileño	393529	4460079	487	B	tim
84	Piedemonte segoviano	388491	4563276	830	B	tim
85	Piedemonte segoviano	407784	4566003	890	B	tim
86	Piedemonte segoviano	400652	4579211	830	A	gra
87	Piedemonte segoviano	387871	4554833	910	A	gra
88	Piedemonte segoviano	383459	4560340	835	A	gra
89	Piedemonte segoviano	393523	4571034	810	A	gra
90	Piedemonte segoviano	413233	4568098	900	A	gra
91	Piedemonte segoviano	411346	4585921	880	B	tim
92	Piedemonte segoviano	417217	4581308	830	B	tim

Las liebres presentaron un linaje nativo de ADNmt de *L. granatensis* en un 47% de las muestras y un linaje introgresado de origen ártico de *L. timidus* en un 53% (Tabla 1). La frecuencia de introgresión mitocondrial de *L. timidus* concuerda con estimaciones anteriores en la zona centro de España (Marques et al., 2017).

Ambos linajes estuvieron presentes en todo el ámbito de estudio (Fig.8). Sin embargo, no hubo evidencias de estructura genética a lo largo del rango altitudinal muestreado (de 482 a 1771 m) (Fig. 8 y 9) (Tabla 1), no habiendo una correlación entre la frecuencia de introgresión y la altitud ($p>0,05$).

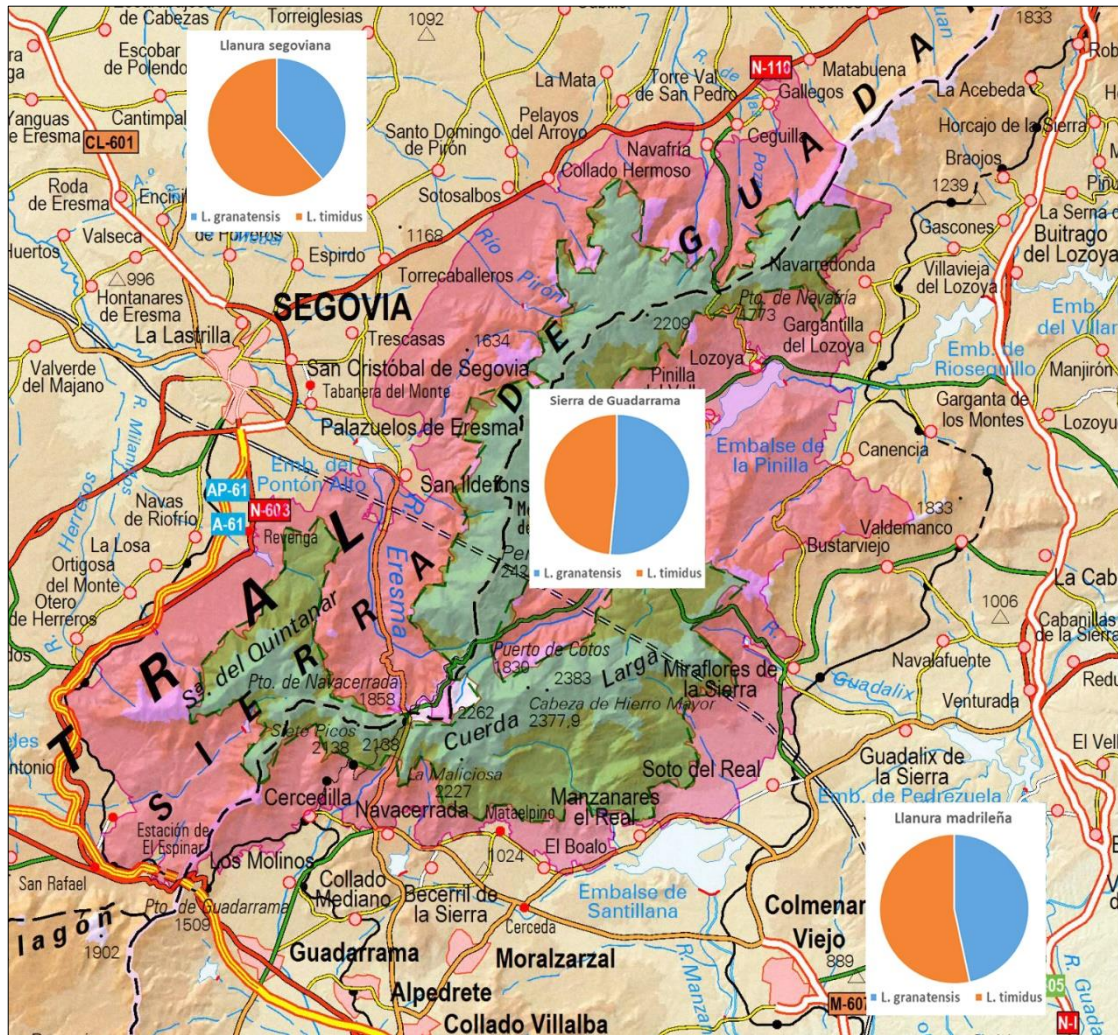


Figura 8. Gráfica de distribución de los linajes de ADN mitocondrial a lo largo del rango altitudinal del ámbito de estudio.

Las liebres analizadas presentaron una estructura filopátrida, heredada de las hembras que mantiene una variedad de haplotipos mitocondriales de diversos orígenes. De las 92 muestras analizadas, dos de los haplotipos procedían de *L. timidus* (B y F) y uno de *L. granatensis* (A). Además, con respecto a la distribución geográfica de los haplotipos, tampoco hubo segregación o estructuración con referencia ni a la altitud media en las que habitan los especímenes de cada uno, ni en relación con las diferentes zonas muestreadas ($p > 0,05$).

6. DISCUSIÓN

Se planteó el presente estudio con el objetivo, por un lado, de analizar la existencia de huellas de introgresión de alguna otra especie de liebre en las poblaciones de *L. granatensis* del ámbito de muestreo, y por otro, de evaluar si el gradiente altitudinal de la Sierra de

Guadarrama marcaba diferencias en el porcentaje de hibridación, teniendo siempre en mente al plantear esta hipótesis, las poblaciones de *L. timidus* presentes en Guadarrama en la época del pleistoceno superior (Cardoso et al., 2024). La liebre de montaña es una especie que está bien adaptada a vivir en regiones con bajas temperaturas y periodos prolongados de nieve en el norte de Europa. Durante las glaciaciones del Cuaternario, la Sierra de Guadarrama ofrecía esas condiciones. Hoy en día esta especie ya no se encuentra en la Península, pero sí sus vestigios (Campos et al., 2015), como ha quedado demostrado en este estudio.

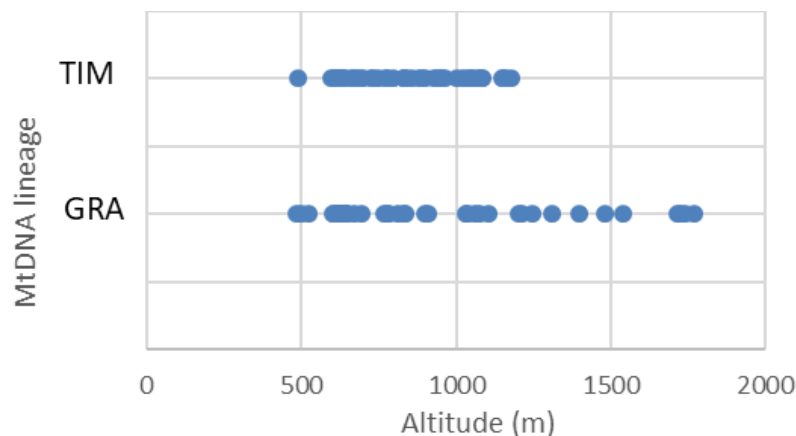


Figura 9. Gráfica de distribución de los linajes de ADN mitocondrial a lo largo del rango altitudinal del ámbito de estudio en la que no se aprecian evidencias de correlación entre los porcentajes de introgresión genética y altitud.

Los métodos destinados a detectar la ascendencia regional en poblaciones hibridadas generalmente se basan en la observación de poblaciones parentales presumiblemente puras (Price et al., 2009; Martin et al., 2014). Sin embargo, análisis previos de otros autores sobre el ADN de liebre ibérica sugieren que la introgresión nuclear de liebre de montaña está presente en todo el rango de liebre ibérica, por lo que ninguna de las muestras estudiadas aquí, podría considerarse una referencia pura de liebre ibérica.

La frecuencia de introgresión mitocondrial de *L. timidus* de este estudio (53%), es muy similar a estimaciones anteriores en la zona centro de España (Marques et al., 2017), aunque con un número menor de muestras. La introgresión entre las dos especies probablemente ocurrió entre el último máximo glacial y el Holoceno temprano. Algunos autores sugieren que la introgresión masiva entre liebre ibérica y liebre de montaña, aunque geográficamente restringida en un gradiente de norte a sur, puede haber sido una circunstancia de la dinámica demográfica histórica, en la que una especie se estaba retirando de la península ibérica y otra se estaba expandiendo, beneficiada por las condiciones climáticas de aumento de las temperaturas.

Esta introgresión mtADN podría haber conducido a incompatibilidades en las combinaciones de genes nucleares y mitocondriales de ambas especies que podrían estar perjudicando a los individuos introgresados. Por ejemplo, algunos genes analizados por otros

autores estarían involucrados en el correcto funcionamiento de la mitocondria, como la biosíntesis de carnitina, un antioxidante y transportador de grasas que podría proteger a las mitocondrias del estrés oxidativo (Savitha et al., 2005). El control del estrés oxidativo es un componente importante de muchos aspectos de la fisiología y la reproducción, y se ha informado que su alteración ocurre en situaciones de hibridación (Du et al., 2017). Por lo tanto, en este tipo de situaciones la introgresión estaría penalizando a los individuos con mayor grado de introgresión.

Sin embargo, otros genes introgresados podrían estar beneficiando a las poblaciones con este linaje ártico, especialmente con un posible impacto en la fertilidad de los machos. Se ha demostrado que la alteración de las combinaciones coevolucionadas con ADNmt y ADN nuclear afectan la fertilidad en machos en liebres (Smith et al., 2010). En este caso, los estudios que evalúan la fertilidad de los machos de liebre ibérica y liebre de montaña podrían aclarar el grado de beneficio aportado por estos nuevos genes.

Con respecto a la distribución geográfica del porcentaje de introgresión y de los haplotipos hallados en el estudio, no se encontró segregación o estructuración significativa con referencia a la altitud media en las que habitan los 92 ejemplares analizados. Sin embargo si analizamos la proporción de los linajes de ADN mitocondrial introgresado desde liebre de montaña en todo el ámbito de distribución de liebre ibérica en la península ibérica (Marques et al., 2017) (Fig.10), los porcentajes encontrados en este estudio son más elevados de lo esperado, según el gradiente latitudinal, en el que las poblaciones más al norte tendrían mayor porcentaje de introgresión, por lo que parece que a una escala geográfica mayor, la Sierra de Guadarrama y el Sistema Central en general si albergarían individuos mejor adaptados a condiciones de climas más fríos.

Por lo tanto, parece probable pensar que los individuos de liebre ibérica con ADN mitocondrial ártico están en ambientes claramente diferentes de los ocupados por individuos sin este ADN. Es decir, existe concordancia entre la distribución del ADN mitocondrial ártico y alguno de los principales gradientes ambientales presentes en la Península, lo que es un resultado más a favor de la posible ventaja adaptativa del ADN mitocondrial ártico (Campos et al., 2015).

En referencia a los haplotipos encontrados, la existencia de diferentes tipos de ADN mitocondrial de tipo ártico en las liebres ibéricas, en este caso haplotipos B y F, sugiere que hubo contacto entre la liebre variable y las especies ibéricas en diferentes periodos. La hipótesis más parsimoniosa dice que cuanto más parecido con el ADN mitocondrial de individuos de liebre variable es un ADN mitocondrial de tipo ártico encontrado en las especies ibéricas, más reciente habrá sido el contacto y la introgresión (Campos et al., 2015).

Además, ninguna de las muestras analizadas muestra vestigios de liebre europea, como podía esperarse por la cercanía de esta especie en la península ibérica. La llegada más tardía

de esta especie a la Península después del Último Máximo Glacial parece que le impidió ocupar un área más extensa debido a la presencia de liebre ibérica, cuyas condiciones climáticas le eran beneficiosas, por lo que por competencia directa restringió el territorio de la liebre europea al norte peninsular, que es el área que ocupa en la actualidad.

La sierra de Guadarrama reúne las condiciones ideales para el estudio de este tipo de procesos, ya que supone prácticamente el límite meridional de influencia de introgresión de liebre de montaña, mostrando unos niveles altos de hibridación propios de latitudes más norteñas, lo que parece indicar que las poblaciones estudiadas albergarían individuos mejor adaptados a condiciones de climas más fríos. No es posible aún explicar los efectos que estos niveles de introgresión puedan provocar en la biología de la liebre ibérica ya que probablemente sean el resultado de interacciones evolutivas entre la fisiología, el medio ambiente y la genética.

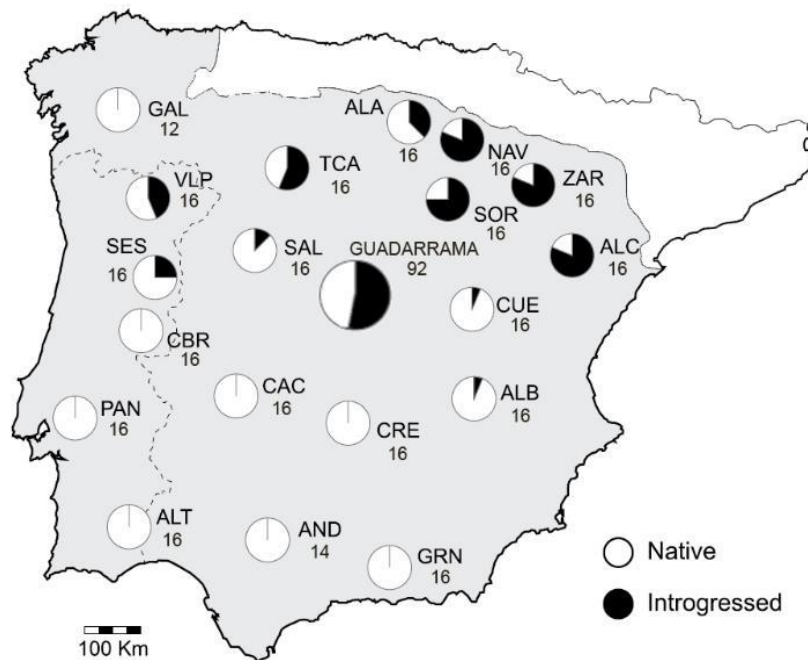


Figura 10. Proporción de los linajes de ADN mitocondrial introgresado de liebre de montaña en poblaciones de liebre ibérica en la Península. Las poblaciones de la sierra de Guadarrama supondrían la frontera meridional de introgresión. Los datos de Guadarrama son los de este estudio y el resto de poblaciones están descritas en Marques et al., 2017, en donde se identifican los códigos de cada población (Modificado de Marques et al., 2017). El fondo gris es el ámbito de distribución de la liebre ibérica.

No parece que haya necesidad de aplicar diferentes medidas de gestión en las poblaciones de las zonas de sierra y de piedemonte, al menos con los datos mitocondriales obtenidos hasta el momento, aunque sí es del todo relevante, según estos resultados, no alterar este acervo genético de climas fríos, evitando cualquier tipo de manejo o repoblaciones con liebres de otras zonas.

Por último, parece evidente que llegar a comprender si los patrones de introgresión de ADNmt detectados en el estudio podrían suponer que el ADN nuclear también se hubiera visto afectado por introgresiones de liebre de montaña, como resultado de la misma dinámica demográfica, depende de una inspección exhaustiva del genoma nuclear. Además, las historias evolutivas son complejas y no podemos descartar la posibilidad de que la introgresión masiva tuviera consecuencias selectivas en el genoma nuclear y se pudiera plantear la posibilidad de diferenciar subespecies de liebre ibérica. Una vez más, solo los estudios de todo el genoma permitirán abordar esta cuestión de manera apropiada.

7. REFERENCIAS

- Acevedo, P., Melo-Ferreira, J., Farelo, L., Beltran-Beck, B., Real, R., Campos, R., & Alves, P. C. (2015). Range dynamics driven by Quaternary climate oscillations explain the distribution of introgressed mt DNA of *Lepus timidus* origin in hares from the Iberian Peninsula. *Journal of Biogeography*, 42(9), 1727-1735.
- Buitrago, A.M. (1992). Estudio de los Artiodáctilos del yacimiento del Pleistoceno medio de Pinilla del Valle (Madrid). Ph.D. thesis, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Campos R; Melo-Ferreira J, Acevedo P. (2015). Liebres fantasmas: la evolución de las liebres en la Península Ibérica. CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos. Porto, Portugal.
- Cardoso, B., Carpio, A. J., Martínez-Haro, M., Beltrán-Beck, B., Alzaga, V., Farelo, L., ... & Acevedo, P. (2024). Eco-physiological arguments on the functional impact of *Lepus timidus* mitochondrial DNA introgression in Iberian hares (*Lepus granatensis*). *Journal of Zoology*, 322(3), 281-289.
- Carro, F y Soriguer, R. (2007). *Lepus granatensis* Rosenhauer, 1856. Pp: 476-478. En: L. J. Palomo, J. Gisbert y J. C. Blanco (eds). Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España. Dirección
- CISE (2023). El riesgo de introgresión genética en las poblaciones de perdiz roja del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación. Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. Comunidad de Madrid.
- Delgado, F.A.; Brea, P.; Buitrago, A. M.; Maldonado, E.; y Molero, G. (1982). Descubrimiento del primer yacimiento cuaternario (Riss-Würm) de vertebrados con restos humanos en la provincia de Madrid (Pinilla del Valle). *Coloquios de Paleontología*, 37, 15.
- Du S.N.N., Khajali F., Dawson N.J., Scott G.R. (2017) Hybridization increases mitochondrial production of reactive oxygen species in sunfish. *Evolution*. 71:1643–52.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time.

Molecular Ecology, 10, 537-549.

- Hill, G. E. (2019). Reconciling the mitonuclear compatibility species concept with rampant mitochondrial introgression. *Integrative and Comparative Biology*, 59(4), 912-924.
- Holley, A. J. F. (1986). A hierarchy of hares: dominance status and access to oestrous does. *Mammal Review*, 16(3-4), 181-186.
- Marques, J. P., Farello, L., Vilela, J., Vanderpool, D., Alves, P. C., Good, J. M., ... & Melo-Ferreira, J. (2017). Range expansion underlies historical introgressive hybridization in the Iberian hare. *Scientific Reports*, 7(1), 40788.
- Martin S.H., Davey J.W., Jiggins C.D. (2014). Evaluating the use of ABBA-BABA statistics to locate Introgressed loci. *Mol Biol Evol.* 2014;32:244–57.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC (2005) Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology*, 14, 2459–2464.
- Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Randi, E., Kryukov, A., Suchentrunk, F., Ferrand, N., & Alves, P. C. (2007). The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene glaciations: expansion and retreat with hybridization in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 16(3), 605-618.Madrid.
- Melo-Ferreira, J., Alves, P. C., Freitas, H., Ferrand, N., & Boursot, P. (2009). The genomic legacy from the extinct *Lepus timidus* to the three hare species of Iberia: contrast between mtDNA, sex chromosomes and autosomes. *Molecular ecology*, 18(12), 2643-2658.
- Price A.L., Tandon A., Patterson N., Barnes K.C., Rafaels N., Ruczinski I., et al. (2009). Sensitive detection of chromosomal segments of distinct ancestry in admixed populations. *PLoS Genet.* ;5:e1000519.
- Randi, E.; Alves, P.; Carranza, J.; Milosevi-Zlatanovi, S. & Sfougaris, A. (2004). Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology*, 13: 3071–3083.
- Rotival, M., & Quintana-Murci, L. (2020). Functional consequences of archaic introgression and their impact on fitness. *Genome Biology*, 21, 1-4.
- Savitha S., Tamilselvan J., Anusuyadevi M., Panneerselvam C. (2005). Oxidative stress on mitochondrial antioxidant defense system in the aging process: role of DL- α -lipoic acid and L-carnitine. *Clin Chim Acta.*;355:173–80.
- Schwenk, K., Brede, N., & Streit, B. (2008). Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of

interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1505), 2805-2811.

Seixas, F. A., Boursot, P., & Melo-Ferreira, J. (2018). The genomic impact of historical hybridization with massive mitochondrial DNA introgression. *Genome Biology*, 19, 1-20.

Selz, O. M., & Seehausen, O. (2019). Interspecific hybridization can generate functional novelty in cichlid fish. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1913), 20191621.

Smith S., Turbill C., Suchentrunk F. (2010). Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Mol Ecol*. 19:36–43.

Taberlet, P.; Fumagalli, L, Wust-Saucy, A.G. & Cosson, J.F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453-464.