

ESTUDIO DE LAS POBLACIONES DE CARNÍVOROS DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA USANDO MÉTODOS NO INVASIVOS

FRANCISCO PALOMARES¹, CAROLINA SOTO¹, JOSÉ VICENTE LÓPEZ-BAO¹,
ALEJANDRO RODRÍGUEZ¹, JOSÉ ANTONIO GODOY², EDUARDO ROLDÁN³,
MONSERRAT GOMENDIO³, FRANK GÖRITZ⁴, Y KATARINA JEWGENOW⁴

RESUMEN

Los objetivos principales del proyecto fueron 1) determinar si la alimentación suplementaria tenía efectos positivos sobre la reproducción del lince ibérico, 2) la puesta a punto de métodos no invasivos de seguimiento de las poblaciones de lince, 3) el estudio de la distribución y abundancia de carnívoros domésticos y generalistas en todo el Parque Nacional de Doñana (PND) usando principalmente censos de huellas, y 4) evaluar la efectividad de las campañas de control de la población de zorros tal y como se realizaban habitualmente dentro del PND también usando censos de huellas. El tamaño de camada en la población de lince de Doñana durante el periodo de estudio fue menor de lo observado años atrás a pesar del programa de alimentación suplementaria. El uso simultáneo de cámaras fotográficas y análisis genéticos de ADN en excrementos fue útil para hacer un seguimiento de la población de lince residentes. El zorro fue la especie de más amplia distribución en el PND, seguido de cerca por meloncillos y tejones. Las otras especies de carnívoros fueron siempre detectadas en menos del 50% de la superficie de matorral muestreada. Los gatos detectados en el PND fueron fundamentalmente monteses y en menor proporción domésticos. Finalmente, las poblaciones de zorros no parecieron responder a las campañas de extracción realizadas por personal del PND. Además, el seguimiento detallado de 2 zorros con collares GPS mostró que un único ejemplar puede cruzar en promedio hasta 10 veces 1 km de camino del PND.

Palabras clave: análisis genéticos en heces, censos de huellas, gato doméstico, gato montés, gineta, meloncillo, muestreo fotográfico, Parque Nacional de Doñana, perro, reproducción lince ibérico, seguimiento por satélite, técnicas no invasivas de muestreo, tejón, zorro.

SUMMARY

The main objectives of the project were 1) to determine whether supplementary feeding had a positive effect on reproduction of the Iberian lynx, 2) the development of non-invasive techniques for the monitoring of lynx populations, 3) the study of distribution and abundance of domestic and generalist car-

¹ Departamento de Biología de la Conservación, Estación Biológica de Doñana, CSIC, Avda. Américo Vespucio s/n, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla, ffpaloma@ebd.csic.es

² Departamento de Ecología Integrativa, Estación Biológica de Doñana, CSIC, Avda. Américo Vespucio s/n, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla, godoy@ebd.csic.es

³ Grupo de Ecología y Biología Reproductiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, 28006 Madrid, rol-dane@mmcn.csic.es

⁴ Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany, goeritz@izw-berlin.de

nivores of the Doñana National Park (PND) using primarily census tracksurveys, and 4) to evaluate the effectiveness of campaigns to control the red fox population as usually performed within PND, also using tracksurveys. Litter size in the Doñana lynx population during the study period was lower than that observed years ago despite the supplementary feeding program. The simultaneous use of cameras and genetic analysis of faecal DNA was useful to track the population of resident lynx. The red fox was the most widely distributed species, followed closely by Egyptian mongooses and European badgers. The other species of carnivores were always detected in less than 50% of the sampled shrubland area. Most cats detected in the PND were wild cats, and a lower domestic. Finally, the populations of foxes did not appear to respond to the control campaigns of the PND. In addition, detailed monitoring of 2 foxes tracked with GPS collars showed that a single individual can cross on average 10 times 1 km of road inside the PND.

Key words: camera-trapping, common genet, domestic cat, wild cat, domestic dog, Doñana National Park, Egyptian mongoose, European badger, faecal genetic sampling, GPS tracking, Iberian lynx reproduction, non-invasive techniques, red fox, track censuses.

INTRODUCCIÓN

El Parque Nacional de Doñana (PND) tiene una rica comunidad de carnívoros, de entre los que se destaca debido a su grado de amenaza el lince ibérico (*Lynx pardinus*), que es la especie de felino más amenazada en el mundo. Poblaciones naturales de la especie solo existen en 2 áreas, en Doñana y en Sierra Morena oriental, siendo la población de Doñana la única que en parte se encuentra dentro de un espacio protegido con la categoría de parque nacional. Aunque el tamaño de la población de linces en el área de Doñana se ha mantenido estable en las últimas dos décadas (entre 40 y 60 ejemplares), en los últimos años ha cambiado su distribución espacial, disminuyendo de forma preocupante dentro del Parque Nacional, lo que aumenta el riesgo de extinción de toda la metapoblación de linces del área de Doñana. Con esta situación, mientras se actuaba en el campo para recuperar las poblaciones naturales de conejo, *Oryctolagus cuniculus* (razón principal por la que ha disminuido la abundancia de linces dentro del Parque Nacional), se estaba llevando a cabo un plan de choque para facilitar el asentamiento de linces adultos dentro del parque e incrementar sus niveles reproductivos mediante un programa de alimentación suplementaria (LÓPEZ-BAO *et al.* 2008). En este contexto, los objetivos del presente proyecto fueron:

- 1) Determinar si la alimentación suplementaria favorecía el asentamiento y la reproducción (aumento de las tasas reproductivas y la productividad) de las hembras de lince ibérico en el PND.
- 2) La puesta a punto de métodos de seguimiento de la reproducción, composición y censo de la población de linces del PND usando métodos no invasivos como los censos de huellas, análisis genéticos de excrementos, y cámaras fotográficas.
- 3) Estudiar la distribución y abundancia de carnívoros domésticos y generalistas en todo el Parque Nacional, puesto que algunos de estos carnívoros podrían actuar como reservorio de las enfermedades que podían afectar mortalmente al lince ibérico.
- 4) Evaluar la efectividad de las campañas de control de la población de zorros (*Vulpes vulpes*) tal y como se realizan habitualmente dentro del PND. La eliminación de zorros es una práctica habitual dentro del Parque Nacional con el objetivo de disminuir el supuesto impacto que los zorros pueden tener sobre las poblaciones de conejos, la presa básica del lince ibérico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Captura, examen sanitario y radio-seguimiento de los lince del PND

En el inicio del proyecto (noviembre-diciembre de 2006) se procedió a la captura de todos los ejemplares de lince dentro del PND mediante el uso de jaulas trampa colocadas en las inmediaciones de los puntos de alimentación suplementaria. Las jaulas fueron cebadas con conejos domésticos y revisadas dos veces al día (amanecer/atardecer) para evitar que los animales pasaran un largo periodo dentro de ellas.

Cada lince capturado fue anestesiado con una combinación de ketamina y medetomidina por vía intramuscular. Tras estimar el peso del animal se inyectó una dosis de 5 mg de ketamina y de 50 μ g de medetomidina. Durante la anestesia se monitorizó la frecuencia cardiaca, la frecuencia respiratoria, la temperatura corporal y la saturación de oxígeno periférico cada 5 minutos.

Para cada animal anestesiado se tomaron, entre otras, biopsias de piel para su almacenaje y muestras de sangre, orina y heces para estudios hematológicos, genéticos, parasitarios, fisiológicos y virológicos. Además, se procedió al control del estado fisiológico de machos y hembras adultas. Para el caso de los machos, el potencial reproductor (calidad espermática) se evaluó mediante el análisis de semen. La obtención del semen se llevo a cabo mediante electro-eyaculaciones de animales anestesiados siguiendo los protocolos descritos por HOWARD (1993). De las muestras de semen se evaluó la motilidad espermática (% mótil, progresivos, vigor de la motilidad), la concentración espermática, la proporción de espermatozoides normales y con anomalías en las distintas estructuras de los espermatozoides (cabeza y flagelo), y la proporción de acrosomas íntegros. El estado físico y reproductor de machos y hembras se evaluó mediante ecografías transrectales (GÖRITZ *et al.* 1997; HILDEBRANDT *et al.* 2000) con el objetivo de realizar una revisión anatómica de riñones, útero, testículos, cérvix, ovarios, glándulas adrenales y glándulas perianales.

En base a la información obtenida de las hembras adultas residentes dotadas de radio-emisor, se confirmaron los eventos de reproducción y se procedió a la búsqueda de camadas de lince recién nacidos durante las estaciones reproductoras de 2007 y 2008. Cada hembra que cumplía las características arriba señaladas fue seguida de manera intensiva entre los meses de marzo y mayo siguiendo los protocolos descritos por PALOMARES *et al.* (2005). Todas las camadas encontradas fueron visitadas tres semanas después, momento en el que se tomaron datos biométricos a todos los cachorros supervivientes, se determinó el sexo de cada uno y se tomaron además muestras de pelo para posteriores estudios de genética (véase PALOMARES *et al.* 2005 para más información).

Todos los lince radio-marcados fueron localizados aleatoriamente entre dos y cuatro veces a la semana, normalmente dos localizaciones en horas de luz y otras dos durante la noche, a una distancia menor de 1 km para reducir al máximo posibles errores de triangulación. Se siguieron los mismos procedimientos de radio-seguimiento utilizados con anterioridad en el estudio de la especie con el fin de obtener datos comparables y poder evaluar el efecto de la alimentación suplementaria sobre diferentes parámetros demográficos y de comportamiento del lince ibérico (FERRERAS *et al.* 1997, PALOMARES *et al.* 2001).

Efecto del atrayente sobre las capturas fotográficas en lince

Realizamos dos muestreos en julio de 2007 y octubre de 2007 para evaluar la capacidad de la orina de lince recogida en centros de cría en cautividad como atrayente en las estaciones de muestreo fotográfico. La orina de lince es comúnmente utilizada en muestreos fotográficos de la especie. Los muestreos, de 18 días de duración, se llevaron a cabo en dos áreas con presencia habitual de lince dentro del PND: Coto del Rey y la Reserva Biológica / Algaida. El muestreo de julio de 2007 se llevó a cabo sólo en Coto del Rey, y el de octubre en ambas áreas.

Una estación de muestreo consistió en una cámara fotográfica (*Cuddeback Digital Scouting Model Expert*[®]) provista de un sensor infrarrojo que toma automáticamente fotografías tras la detección de movimiento o de calor. Las cámaras se montaron sobre una estaca clavada en la arena en el borde de un camino o cortafuegos en áreas de matorral mediterráneo. Frente a la cámara, al otro lado del camino o del cortafuegos, se instaló una estaca idéntica provista de un trozo de alfombra de algodón donde se aplicaba el atrayente. Los lince fotografiados se distinguieron gracias al patrón de manchas del pelaje y en ocasiones al color del radio-collar que portaban.

La capacidad de atracción de la orina de lince se comparó con la de un atrayente alternativo y con la de un control (la estaca con el mismo trozo de alfombra sobre el que no se aplicó ninguna sustancia). El sexo y estado reproductor del lince que produce la orina pueden influir en la capacidad de atracción de otros lince, por lo que utilizamos orina de lince de cuatro orígenes diferentes: 1) de hembra adulta durante el periodo de celo (1 de diciembre de 2006 al 7 de febrero de 2007), 2) de hembra adulta fuera del periodo de celo, 3) de macho adulto fuera del periodo de celo, y 4) de individuo joven (< 2 años). La orina provino siempre de los mismos individuos seleccionados en el centro de cría en cautividad del lince ibérico de El Acebuche (Doñana), y se conservó a -20° C hasta 24 horas antes del comienzo de cada muestreo y refrigerada a 5° C durante la duración del mismo. El atrayente alternativo a la orina de lince fue el aceite esencial de la planta *Nepeta cataria*, que presenta un alto contenido (70%-99%) en nepetalactona. Se ha comprobado que esta esencia atrae a los gatos domésticos y otras especies de felinos, cuya respuesta en individuos sensibles no decrece en función del resultado de exposiciones previas. La nepetalactona se aplicó combinada en proporción 6:1:1 con propilenglicol y glicerina, que actúan como retardantes de la evaporación.

Dentro de cada área de muestreo se emplazaron 40 estaciones con una separación mínima de 400 m entre ellas. Cada estación se cebó, en tres bloques de 6 días consecutivos, con tres tipos de atrayente; por tanto, cada una de las seis presen-

taciones se ensayó en 20 estaciones por muestreo y un total de 18 días. La asignación de atrayentes a las estaciones y su secuencia fueron aleatorias. Los atrayentes se aplicaron cada dos días (primero, tercero y quinto), antes del atardecer para minimizar la evaporación. En cada aplicación se suministraron 2 ml de orina de lince, o, si se aplicaba esencia de nepeta, 10 ml el primer día y 5 ml los otros dos.

Seguimiento de la población de lince mediante análisis genético de excrementos

En marzo de 2007 realizamos un muestreo exhaustivo de búsqueda de excrementos sobre una superficie de 1000 ha en el área de Coto del Rey. La zona se peinó en líneas paralelas de dirección norte-sur separadas 100 m. La mayor parte de los excrementos se encontraron en caminos y rayas. Por tanto los siguientes muestreos, en junio y octubre de 2007 y en enero, febrero, marzo y octubre de 2008, se realizaron desde vehículo, recorriendo todos los carriles disponibles dentro del área de muestreo. En octubre de 2007 y en todo 2008 también se muestreó el área de la Reserva Biológica/La Algaída, y a partir de febrero de 2008 el área de Los Sotos. Tras localizar un excremento de lince se registró su posición con un GPS, se anotó si había más excrementos, la edad estimada de los mismos, y se colectó por separado. La colección en el campo se realizó sin tocar las muestras para evitar contaminaciones de ADN y desecando la muestra sumergiéndola inmediatamente en etanol.

La extracción de ADN se hizo siguiendo una adaptación del método de HÖSS & PÁÁBO (1993), tomando como material de partida las células colectadas tras el lavado de unos 500 mg de la parte superficial de los excrementos. El ADN se eluyó en un volumen final de 500 μ l y se conservó a -20°C hasta su utilización.

Los extractos se evaluaron inicialmente mediante una amplificación con el marcador microsatélite 82b (Tabla 1). Aquellos extractos que no amplificaron o lo hicieron de manera muy débil se limpiaron y concentraron mediante ultrafiltración en unidades Microcon-30 (Millipore) hasta un volu-

Locus	Marcador	Secuencia cebadores	Marcaje
8	PFca8a	F: ACTGTAATTTCTGAGCTGGCC	PET
		R: TGACAGACTGTTCTGGGTATGG	
82	N82b	F: TCACCGCTTAAGAAGAGGCTA	NED
		R: GTGAAGCTTCCGAAATGAGG	
115	FF115a	F: CTCACACAAGTAACTTTTG	FAM
		R: CCTCCAGATTAAGATGAGA	
424	P424b	F: CGGGGATCACAATGCTAAAG	PET
		R: TGACATCCCCTTTTCTATTCC	
453	V453b	F: GAGAACAAGCTGAGGGTTGG	VIC
		R: TCCTCTATGGCAGGACTTTGA	
519	V519b	F: CCCAAGGGGGTTCAATAAAT	VIC
		R: GCCAGGAAAGTTTCAGAGCA	
547	V547b	F: GGTGACAAAACAAAACAAAGCA	VIC
		R: GGAGCCTGCATAGGATTCAC	
559	NFca559b	F: TGCCAAAATGTCAAGAGTGG	NED
		R: ATCATGCCCTGAGCTGAGTC	
566	N566b	F: TGCTCAAACAGATAAGGCTGAA	NED
		R: CCCACTCATGCTGTCTCTCA	
571	N571a	F: TTTGTGGTGATAGCCCTTC	NED
		R: GCCCCCCCAAATAAATG	
Bcg8t	Fbcg8tb	F: CTGCGCCTGAAGTCATTCT	FAM
		R: CAATAGACAAGACACATTCAAGCA	

Tabla 1. Listado de marcadores de microsatélites utilizados.

Table 1. Microsatellite markers used in the study.

men de 100 μ l, repitiéndose el ensayo por PCR con idénticas condiciones. Las muestras que tras la ultrafiltración continuaron sin amplificar fueron descartadas para posteriores análisis. Algunas muestras que mostraron un producto de amplificación con el marcador 82b de tamaño menor al esperado, fueron analizadas con los marcadores específicos para lince DL7F/CR2bR (PALOMARES *et al.* 2002), y si no mostraron un producto del tamaño esperado fueron descartadas por no pertenecer a lince ibérico.

Para la identificación individual de excrementos se emplearon 11 marcadores microsatélites (Tabla 1) seleccionados entre un total de 36 que a su vez

fueron seleccionados entre los descritos para especies cercanas como el gato doméstico, *Felis catus* (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 1999), lince canadiense, *Lynx canadensis* (CARMICHAEL *et al.* 2000) y lince rojo, *Lynx rufus* (FAIRCLOTH *et al.* 2005). Este conjunto fue seleccionado por su alto poder discriminatorio entre individuos (PID = 7,89E-06 y PIDSib = 3,51E-03), alta eficiencia de amplificación (93%) y baja tasa de error (2,6%), estimados en estudios previos.

Para prevenir errores de genotipado, comunes en muestras no invasivas, se siguió una estrategia «multi-tubos» (TABERLET *et al.* 1996) por la que cada extracto se genotipó por cuadruplicado utili-

zando una preamplificación múltiple (PIGGOTT *et al.* 2004) seguida de una segunda post-amplificación para cada marcador. La preamplificación se realizó en una reacción multiplex a partir de 12 μ l de extracto en un volumen final de 50 μ l, con cebadores entre 0,02 y 0,04 μ M, BSA a 0,8 μ g/ μ l y 25 ciclos de PCR. Para la segunda amplificación, cuatro de los once marcadores (N82b, FF115a, N571a y Fbcg8tb) se amplificaron por separado, utilizando 6 μ l del producto de pre-amplificación en un volumen final de 20 μ l conteniendo 67 mM Tris-HCl pH 8, 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 0,25 mM dNTPs, 0,8 mg/ml BSA, 0,2 μ M de cada uno de los cebadores y 0,4 U de Taq polimerasa (Bioline). Las amplificaciones se realizaron en termocicladores MJ Research Modelo PTC-100 o Biometra T-Gradient, programados para realizar una primera desnaturalización a 94° C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 92° C, templado a 55° C y extensión a 72° C, cada uno de estos pasos con una duración de 30 segundos, terminando con una extensión final a 72° C durante 5 minutos. Los siete marcadores restantes se multiplexaron para la post-amplificación en un volumen final de 15 μ l, empleando 5,5 μ l de la reacción de preamplificación como molde, cebadores a 0,2 μ M, BSA a 0,08 μ g/ μ l y Type-it Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) a una concentración final 1x. El ciclado empleado en este caso fue un primer paso de activación a 95° C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 95° C, templado a 60° C durante 90 segundos y extensión a 72° C durante 30 segundos, terminando con una extensión final de 60° durante 30 minutos. El resultado de las amplificaciones se visualizó en geles de agarosa al 2%. Finalmente se mezclaron cantidades entre 2 y 10 μ l de los productos de las post-amplificaciones para su análisis de forma simultánea en un analizador automático ABI Prism-3100 (Applied Biosystems) basado en fluorescencia. La asignación de alelos se realizó con ayuda del programa GeneMapper v. 3.7 (Applied Biosystems).

Los cuatro genotipos obtenidos se agruparon en un único genotipo consenso para cada excremento. Los genotipos consenso se obtuvieron asignando homocigotos cuando se observaron al menos tres réplicas homocigoto iguales, sin de-

teectar otro alelo para ese locus, y asignando heterocigotos cuando se observaron al menos dos veces dos alelos distintos, sin la aparición de un tercer alelo. En aquellos casos en que se observó consistentemente un alelo pero no el otro, el consenso para dicho locus fue de hemicigoto.

Para la identificación del sexo se amplificó un fragmento del gen amelogenina cuyo tamaño difiere entre la copia del cromosoma X y la del Y, utilizando cebadores rediseñados a partir de los descritos para felinos (PILGRIM *et al.* 2005). Los machos se distinguen por la amplificación de dos fragmentos de diferente tamaño, frente a las hembras, que amplifican únicamente el mayor de estos fragmentos. Las PCR se realizaron con 4 μ l de extracto en un volumen final de 20 μ l conteniendo 67 mM Tris-HCl pH 8, 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 0,25 mM dNTPs, 0,8 mg/ml BSA, 1 μ M de cada uno de los cebadores y 0,4 U de Taq polimerasa (Bioline). El ciclado fue el mismo que el descrito anteriormente para la amplificación de microsatélites. La visualización de los productos de PCR se hizo en geles de agarosa al 2,5%. Para cada excremento se realizaron cuatro réplicas de PCR, dándose un diagnóstico de hembra cuando se visualizó al menos tres veces la banda de mayor tamaño sin que se detectara la banda menor. Para el diagnóstico de macho se requirió la aparición de la banda de macho en al menos dos de las réplicas.

Se evaluó la calidad de los genotipos obtenidos utilizando el índice QI propuesto por MIQUEL *et al.* (2006), modificado para calcular calidad por alelo y no por locus, y así tener en consideración los loci hemicigotos. Se obtuvieron valores de QI para cada genotipo multilocus consenso calculando la media de los QI obtenidos para cada locus. Además se analizó la fiabilidad de los genotipos consenso obtenidos utilizando el programa Reliotype (MILLER *et al.* 2002). Reliotype evalúa la fiabilidad de un genotipo multilocus usando una aproximación de máxima verosimilitud, asumiendo ausencia de alelos falsos y contaminaciones y que las tasas de error son constantes entre loci.

Los genotipos consenso obtenidos que incluyeron seis o más loci tipados y tuvieron índices

QI > 0,3 fueron comparados con otros genotipos fecales y con los genotipos ya disponibles para 54 individuos de lince ibérico cuya presencia era conocida en Doñana durante el periodo de recolección de las muestras. Además de esos 54 individuos, se conocía la presencia de al menos otros 12 individuos, pero no se disponía de su genotipo.

Los genotipos fueron comparados entre sí utilizando el programa GIMLET (VALIERE 2002). Los excrementos fueron asignados directamente a individuos de referencia cuando sus genotipos superaron el umbral de fiabilidad del 95% y mostraron una coincidencia total con uno y solo uno de los genotipos de referencia. Además, éstos fueron asignados cuando presentaban un único locus discrepante, siempre que ese genotipo no hubiera sido observado más de 3 veces, y siempre que la prueba de sexo diera resultados concordantes y la asignación fuera espacialmente coherente con la de otros excrementos del mismo individuo, interpretándose en estos casos que la discrepancia se debe a un error de genotipado. Para ello se tuvo en cuenta que el individuo tuviera presencia conocida en las zonas de muestreo o cercanas, concretamente Coto del Rey y la Vera. Los genotipos que no superaron el umbral de fiabilidad del 95% fueron también asignados si mostraban una coincidencia total con un único genotipo de referencia, y siempre que cumplieran las condiciones de concordancia mencionadas anteriormente.

Para la identificación de genotipos no incluidos entre los de referencia (nuevos genotipos) se exigió su observación en al menos tres excrementos con fiabilidades superiores al 95%. Los nuevos genotipos así definidos pasaron a formar parte del conjunto de referencia.

Distribución y abundancia de carnívoros silvestres y domésticos dentro del PND

Se llevaron a cabo dos muestreos de huellas entre noviembre de 2007 y junio de 2008, y entre octubre de 2008 y abril de 2009 para determinar la presencia y abundancia relativa de carnívoros silvestres y domésticos en todo el área de matorral

del PND. Para ello, se subdividió el área en 69 cuadrículas de 2x2 km, que se muestrearon andando por caminos y cortafuegos un mínimo de 3 km, registrando y georeferenciando todos los rastros de carnívoros encontrados. Los rastros que claramente pertenecían al mismo animal se contaron sólo una vez. Las especies de carnívoros presentes en el área de estudio son el zorro, el tejón (*Meles meles*), el meloncillo (*Herpestes ichneumon*), la gineta (*Genetta genetta*), el turón (*Mustela putorius*), el lince ibérico, la nutria (*Lutra lutra*), el gato montés (*Felis silvestris*), el gato doméstico y el perro (*Canis familiaris*). El turón y la nutria fueron excluidos del estudio debido a su escasa abundancia y/o dificultad para encontrar sus huellas en Doñana.

Para cada censo realizado se registró la siguiente información: el número de cuadrícula, la fecha, el observador, el período del día en el que el censo fue realizado (se establecieron tres bloques horarios; mañana (desde las 8:00 a las 12:00), mediodía (desde las 12:00 a las 15:00) y tarde (desde las 17:00 hasta una hora antes del anochecer), así como la hora a la que se comenzó y finalizó el censo.

Si en una cuadrícula no se disponía de suficientes caminos y cortafuegos para cubrir los 3 km mínimos de censo estipulados, se volvió a muestrear la misma tras un mínimo de 7 días para completar la distancia requerida. Los censos siempre se llevaron a cabo dejando al menos 3 días desde la última lluvia.

Los censos de huellas no nos permitieron determinar la especie de gato censada, por lo que usamos cámaras para intentar responder a esta cuestión. En junio de 2008 se inició la primera de las 13 campañas de muestreo fotográfico de aproximadamente un mes de duración en las cuadrículas donde habíamos encontrado rastros de gato o en cuadrículas próximas, durante los muestreos de huellas de los años 2007-2008 y 2008-2009. Por cada cuadrícula muestreada se instalaron aproximadamente 15 cámaras digitales (*Cuddeback Digital Scouting Model Expert*[®]) con flash automático y sensores infrarrojos pasivos separadas 200-400 m entre sí, y usualmente en los mismos caminos usados para los censos de huellas o entre el matorral

de sus bordes. Las cámaras estaban programadas para no hacer nuevas fotos antes de que hubiera pasado 1 minuto.

Entre junio de 2008 y febrero de 2009 las cámaras se instalaron de forma alterna con atrayente de «catnip» o valeriana, o al paso sin atrayente alguno en los caminos donde realizamos los censos de huellas. También durante ese periodo se seleccionaron zonas que creíamos potencialmente óptimas para los gatos, cerca de los caminos y cortafuegos, donde colocamos de forma alterna cámaras con atrayente de cebo vivo (palomas o conejos) o muerto (sardinas en lata), dentro de jaulas cerradas. A partir de marzo de 2009 las cámaras se colocaron cerca de caminos usando como atrayente palomas vivas o sardinas frescas en el interior de jaulas colocadas a unos 5 m de las cámaras. Los gatos fotografiados fueron identificados mediante el patrón de manchas de su pelaje.

Aunque no estaba previsto inicialmente en el proyecto, mientras trampeábamos para la captura y marcaje de zorros adultos (véase más adelante), capturamos en diciembre del 2008 un macho adulto de 4,7 kg que decidimos marcar con un radio-collar convencional (Wagener Telemetry®) para estudiar su uso del espacio. El gato fue inmovilizado para su manipulación con una inyección intramuscular de 0,75 ml Zoletil 50, y se le extrajeron 4 ml de sangre para determinar si genéticamente podía considerarse como montés. El estudio genético fue realizado en el CIBIO (Centro de Investigaçã em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Portugal) por el grupo del Dr. Paulo Celio Alves.

El gato fue radio-localizado con una antena receptora VHF Yagi entre diciembre y marzo del 2009. Se tomaron posiciones aisladas entre las 9:00 y las 14:00 horas por medio de aproximaciones andando al lugar donde se encontraba. El área de campeo fue estimada usando el método del mínimo polígono convexo con el 100% de las localizaciones (WHITE & GARROTT 1990) con la ayuda de la extensión Hawth's tools (BEYER 2004) del *software* ArcGis (ESRI, Redlands, CA).

Evolución de la población de zorros en relación con campañas de extracciones y detalle de los movimientos diarios

En primer lugar revisamos las bases de datos del PND para conocer la intensidad con la que se había realizado campañas de extracción de zorros en diferentes áreas. Las capturas fueron realizadas por personal de la guardería del PND usando métodos diversos. El análisis de estos datos nos permitió delimitar cuatro áreas (dos con extracciones de zorros y otras dos sin extracciones) donde estimamos la abundancia de zorros mediante censos de huellas. Para las áreas sin extracción, dejamos un área de amortiguación alrededor de los transectos para las huellas de al menos 2 km en la cual no se habían realizado extracciones en los dos años previos.

En cada una de las 4 áreas muestreadas establecimos 4 transectos de 1 km separados al menos 1 km entre si donde registramos los rastros de zorros y conejos. Los transectos se situaron en caminos o cortafuegos. Antes del censo, las huellas antiguas se limpiaron arrastrando una viga de hierro de 1,5 m de anchura y unos 30 kg sujeta a la parte posterior de un vehículo todoterreno. De esta forma el ancho del transecto muestreado fue igual a la distancia entre ambas ruedas laterales del vehículo. Al día siguiente, un observador sentado en la parte delantera del coche, que circulaba a unos 10 km/hora, contaba y georeferenciaba los rastros de zorro y conejo que cruzaban así como aquellos que, dentro del transecto, seguían la dirección del mismo. La viga de hierro sujeta en la parte posterior del coche borraba todas las huellas de ese día y preparaba el transecto para el día siguiente. El censo se repitió durante dos días consecutivos.

En total se censaron 16 transectos (4 por zona) localizados en las dos zonas de extracción de zorros (Los Sotos y El Puntal) y en las dos zonas control (La Reserva Biológica y El Acebuche).

En una de las dos áreas de no extracción de zorros (Reserva Biológica), entre los meses de noviembre y diciembre de 2008 se hizo una campaña de trapeo de zorros adultos usando jaulas-trampas cebadas con paloma o conejo. Los

zorros seleccionados para la colocación de los radio-collares con localizadores GPS (Tellus GPS-GSM (Televilt, Lindesberg, <http://wildlife.follo-wit.se/Wildlife/>), fueron dos machos adultos de 7,3 y 7,9 kg. Consideramos que el tamaño de estos zorros era adecuado para portar un collar GPS de 250 gr de peso, que era inferior al 5% recomendado de la masa corporal del animal (AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS 1998).

Los collares se programaron de manera que tomaran una posición cada 5 min durante un período de 24 horas (en total 288 posiciones por día). Transcurrido este período se programó para que cambiara automáticamente a otro programa que tomara una posición a intervalos de 6 h durante 72 h consecutivas, y así estos dos programas se iban alternando sucesivamente. Las posiciones se recibieron a través de la red GSM.

El área máxima por la que se movieron los zorros fue estimada a través del método del mínimo polígono convexo usando el 100% de las localizaciones disponibles (WHITE & GARROTT 1990) con la extensión Hawth's tools (BEYER 2004) del programa ArcGis (ESRI, Redlands, CA). Para calcular la tasa de cruce diaria sólo se emplearon los seguimientos de 24 h que tuvieran un número de posiciones superior a 200. Se excluyeron aquellos períodos que tuvieran un número de posiciones inferior para obtener una mayor precisión en el cálculo de las tasas. Para cada seguimiento continuo se calculó el número de cruces/m de camino o cortafuegos dentro del mínimo polígono convexo calculado con las localizaciones diarias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tamaño de camada y supervivencia de los cachorros

El tamaño medio de camada de lince durante los dos años de muestreo del proyecto fue de 2,5 oscilando entre 1 y 4 cachorros ($n = 7$ camadas), y el 61% de los cachorros nacidos ($n = 18$) sobrevivió a los 3 meses de edad. Esta cifra es inferior a la observada en un estudio previo

realizado entre 1993-2002 donde se encontró que el tamaño de camada medio fue de 3,11 y la supervivencia de los cachorros de 3 meses del 75% (PALOMARES *et al.* 2005). Estos resultados no están relacionados con la falta de alimento, ya que las hembras estudiadas durante este proyecto estuvieron sometidas a un programa de alimentación suplementaria (LÓPEZ-BAO *et al.* 2008, 2009, 2010). Otros factores, quizás relacionados con la pérdida de variabilidad genética de la especie en Doñana durante los últimos años, podrían contribuir a explicar estos resultados.

Estado sanitario y fisiológico de la población de lince del PND

Todos los lince capturados y examinados en diciembre de 2006 no mostraron ninguna anomalía física aparente con la excepción de un macho adulto al que le faltaba un riñón. En la misma fecha, otro macho adulto de Coto del Rey estaba infectado con el virus de la leucemia felina aunque no mostraba ningún síntoma externo de la enfermedad; entre marzo y mayo de 2007 se encontraron muertos los tres machos adultos de la población de Coto del Rey, estando los tres infectados con el virus de la leucemia felina (MELI *et al.* 2009; PALOMARES *et al.* 2011).

Los estudios sonográficos mostraron que las hembras adultas que se habían reproducido durante la estación anterior presentaban múltiples cuerpos lúteos justo antes de entrar en un nuevo celo (mes de noviembre), mientras que los ovarios de las hembras que no se reprodujeron estaban totalmente inactivos (GÖRITZ *et al.* 2009).

Se encontraron diferencias importantes en la calidad del semen entre lince de diferente edad, particularmente entre individuos de 2 años e individuos de más edad (GAÑÁN *et al.* 2010). Por ejemplo, el número total de espermatozoides o el porcentaje de anomalías era significativamente menor y mayor, respectivamente, en individuos de 2 años. Además, los machos con mayor volumen espermático y mayor motilidad espermática fueron padres de camadas con un mayor número de cachorros.

Efecto del atrayente sobre las capturas fotográficas

En conjunto las cámaras registraron 10.794 eventos de movimiento, de los cuáles el 1,3% correspondieron a fotos de 14 lincec distintos.

Aunque algunos individuos respondieron claramente al atrayente, más de dos tercios de los registros de lince fueron de individuos al paso, que aparentemente ignoraron la presencia de orina de lince o nepetalactona. Considerando los lincec que mostraron un interés claro por la estaca, tuviera o no atrayente, la frecuencias de visita no se apartaron significativamente de 0,17, el valor predicho por la hipótesis nula de no preferencia por ningún tipo de atrayente y de igualdad en la atracción entre estaciones con atrayente y estaciones control (primavera de 2007, $G = 2.973$, g.l.= 5, $p = 0.704$; otoño de 2007, $G = 5.018$, g.l.= 5, $p = 0.414$; Tabla 2). Aunque el número de registros independientes de lincec detectados no permitió un análisis formal, los resultados no indicaron que distintas clases de edad o sexo se desviaran de la tendencia general. Según estos resultados, no parece necesario usar atrayentes para conseguir buenas tasas de capturas fotográficas con los lincec de Doñana en condiciones similares a las estudiadas aquí.

Seguimiento de la población de lincec mediante análisis genético de excrementos

En conjunto se colectaron 1.008 excrementos de lince en 568 letrinas de tres áreas del Parque Nacional, ocupadas por cinco territorios de hembras reproductoras. De estos 1.008 excrementos, 689 amplificaron para el marcador microsatélite 82b, en los que el 69% de los genotipos mostraron un QI mayor o igual a 0,5, ascendiendo esta proporción al 84,8% con un umbral de corte de 0,3 de QI. Para un 30,5 % de las muestras genotipadas se obtuvo información sobre los 11 loci (Fig. 1).

Los 557 excrementos cuyos genotipos superaron los seis loci tipados y mostraron un QI > 0,3 fueron retenidos para posteriores análisis conducentes a la asignación de excrementos a individuos. De ellos, en el 97% de los casos se logró identificar el ejemplar de lince al que pertenecían, con un total de 18 individuos distintos con genotipos previamente conocidos, y otro individuo con genotipo previamente desconocido (Tabla 3).

En general los genotipos fueron consistentes con la posición espacial de los individuos determinada mediante radio-rastreo. La práctica totalidad de los excrementos producidos por adultos

	HC	H	M	J	C	N	Total
Primavera							
Observadas	3	2	2	4	8	5	24
Esperadas	4	4	4	4	4	4	24
Otoño 2007							
Observadas	10	8	3	8	2	4	35
Esperadas	5,3	5,83	5,83	5,83	5,83	5,83	35

Tabla 2. Comparación entre las visitas de lince observadas y las predichas bajo la hipótesis de igualdad en la capacidad atractiva de distintas sustancias entre sí y con el control (ausencia de atrayente). Atrayentes: HC: orina de hembra adulta en celo; H: orina de hembra adulta fuera del periodo de celo; M: orina de macho adulto fuera del periodo de celo; J: orina de lince juvenil (< 2 años); C: aceite esencial de *Nepeta cataria*; N: control.

Table 2. Comparison between the lynx visits observed and predicted under the null hypothesis of equality between the different attractants used in the study. HC: female urine during the mating season; H: female urine out of the mating season; M: male urine out of the mating season; J: juvenile urine (< 2 years); C: oil essence of *Nepeta cataria*; N: control.

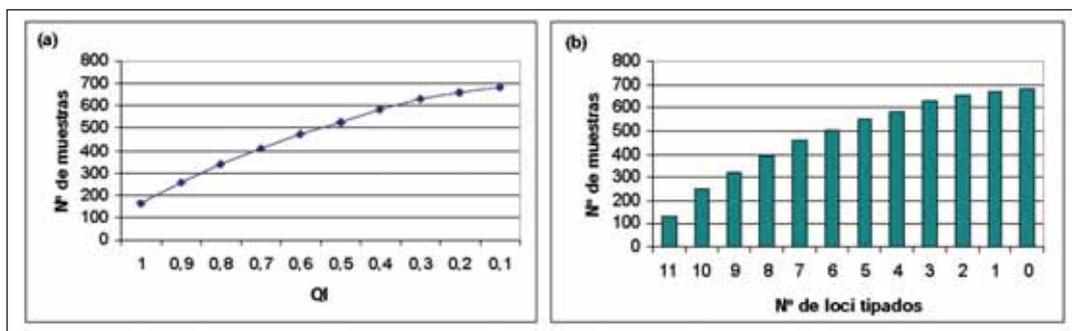


Figura 1. Distribución acumulada del número de genotipos que obtuvieron como mínimo un valor determinado de QI (a) y distribución acumulada del número de muestras con un número mínimo de loci tipados, sin incluir los loci hemicigotos (b).

Figure 1. Cumulative frequency of the number of genotypes with a minimum given QI value (a) and of the number of samples with a minimum number of typed loci, excluding hemicigote loci (b).

Individuo	Número de excrementos
Aliso (LAH155)	9
Arrayan (LAM139)	12
Baya (LAM187)	11
Boliche (LSM154)	6
Bonares (LSH168)	6
Calendula (LJH145)	33
Centaurea (LJH146)	113
Cicuta (LJM143)	13
Clavo (LJM160)	10
Coca (LJM144)	25
Daroeira (LJH184)	16
Durillo (LJM173)	17
Jabatall (LAH137)	16
Nati II (LAM136)	12
Rayuela (LAH140)	27
Roman (LAM141)	20
Viciosa (LAH120)	83
Wari (LAH127)	65
Total individuos conocidos	494
«Genotipo nuevo», ¿Dulcamara (LJH185)?	42
Total identificadas	536

Tabla 3. Individuos detectados gracias al genotipado de excrementos recogidos en campo, y número de excrementos asignados a cada uno de ellos.

Table 3. Individuals detected by genotyping of faeces collected in the wild, and the number of faeces assigned to each individual.

residentes se encontraron dentro de los límites de su área de campeo estimada por el kernel del 90%, y la mayor parte dentro del área utilizada con mayor intensidad estimada por el kernel del 70% (Fig. 2). Prácticamente todos los excrementos producidos por los individuos juveniles de un año tendieron a encontrarse dentro del área más utilizada por sus madres (Fig. 2).

Distribución y abundancia de carnívoros silvestres y domésticos dentro del PND

Distribución y abundancia

En el primer año de muestreo, 3 observadores emplearon 60 días en muestrear un total de 252,4 km con una media de 3,5 km por cuadrícula, localizando un total de 6.639 rastros de carnívoros (Tabla 4) en 98 censos y 69 cuadrículas muestreadas. Se encontraron $3,23 \pm 5,83$ rastros de carnívoros/km, siendo el zorro y el meloncillo las especies más frecuentes (Tabla 4). En el segundo año de muestreo, se emplearon 62 días y se recorrieron por dos observadores 219,2 km (media de 3,3 km por cuadrícula). Se encontraron 4.312 rastros de carnívoros en 77 censos y 65 cuadrículas muestreadas, con un promedio de $2,59 \pm 4,45$ carnívoros/km, siendo el zorro y el tejón las especies más frecuentes (Tabla 4).

A partir de los resultados de los censos de rastros en cuadrículas se obtuvieron los mapas de abun-

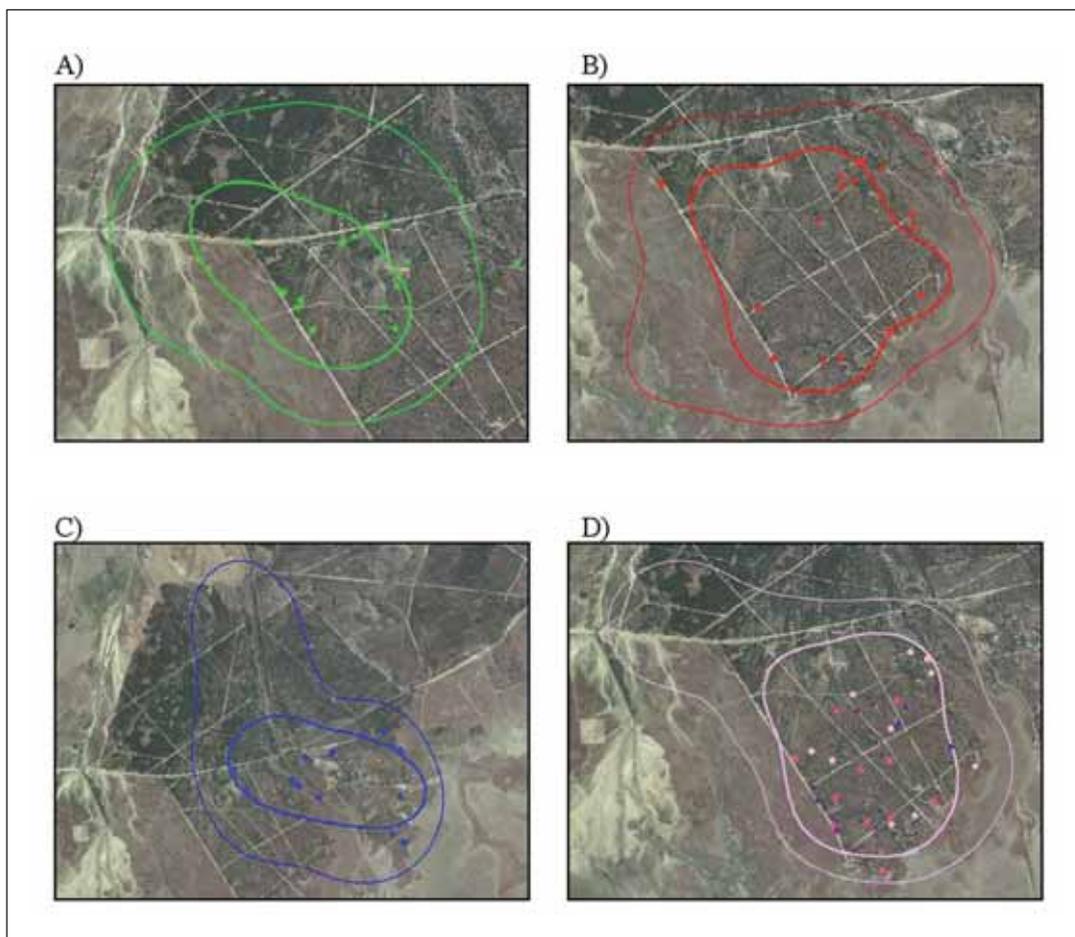


Figura 2. Posición de los excrementos (puntos) en relación con la situación de las áreas de campeo de los linces que los han producido. Los límites de las áreas de campeo se estiman mediante kernels del 90% (líneas finas) y, dentro de éstas, los kernels del 70% (líneas gruesas) delimitan áreas utilizadas con una intensidad mayor. Ejemplos del muestreo de Coto del Rey en la primavera de 2007. A) Macho adulto LAM139; B) Macho adulto LAM136; C) Macho adulto LAM141; D) Hembra adulta LAH140 (puntos claros). En el mapa D) se muestra la disposición de los excrementos de la descendencia de esta hembra, dos cachorros de un año de edad: LJM143 (cuadrados) y LJM144 (puntos oscuros).

Figure 2. Location of faeces assigned to different lynx in relation to their home ranges. Home ranges were estimated using 90% and 70% kernels (thin and thick lines, respectively). Examples are from the Coto del Rey sampling in spring 2007. A) Adult male LAM139; B) Adult male LAM136; C) Adult male LAM141; D) Adult female LAH140 (light points) and their two young, LJM143 (squares) and LJM144 (dark points).

dancia relativa y distribución para cada especie basados en los índices de abundancia kilométrica (Fig. 3). El zorro y el meloncillo estuvieron ampliamente distribuidos por todo el PND y el tejón se detectó en el 83% de las cuadrículas. Ginetas y linces tuvieron una distribución más limitada; en

ningún año encontramos rastros de su presencia en más del 42% y el 26%, respectivamente, de las cuadrículas muestreadas. Los perros fueron detectados en el 22% de las cuadrículas, mientras que los gatos fueron detectados en el 32% de las cuadrículas.

Especie	Cuadrículas positivas	Rastros totales	% rastros	IKA/cuadrícula	
				Media ± DE	Rango
Censo 2007-2008					
Lince ibérico	17	74	1,1	0,3±0,9	0,0-5,4
Zorro	69	4.368	65,9	17,2±9,1	2,4-42,1
Meloncillo	61	996	15	3,9±4,6	0,0-21,2
Tejón	55	786	11,8	2,6±3,7	0,0-19,5
Gineta	29	280	4,2	1,2±2,5	0,0-15,9
Gato*	12	48	0,7	0,1±0,5	0,0-3,9
Perro	15	38	0,6	0,2±0,8	0,0-5,9
Nutria	14	49	0,7	0,2±0,7	0,0-3,8
TOTAL	69	6.639	100	3,2±5,8	0,0-42,1
Censo 2008-2009					
Lince ibérico	17	73	1,7	0,3±0,9	0,0-5,0
Zorro	61	2.773	64,3	13,1±10,2	1,6-77,4
Meloncillo	50	617	14,3	3,1±3,7	0,0-17,2
Tejón	53	665	15,4	3,3±3,4	0,0-17,3
Gineta	22	83	1,9	0,4±0,8	0,0-3,1
Gato	21	35	0,8	0,2±0,3	0,0-1,4
Perro	12	29	0,7	0,2±0,5	0,0-3,4
Nutria	14	37	0,9	0,2±0,4	0,0-2,2
TOTAL	65	4.312	100	2,6±4,45	0,0-77,4

Tabla 4. Número de cuadrículas positivas (sobre un total de 69 y 65 muestreadas respectivamente en cada año), rastros totales encontrados, porcentaje respecto al total de rastros y número de rastros por km recorrido (IKA) para cada especie de carnívoro en el PND durante la estación húmeda. No se distingue entre gatos monteses y domésticos.

Table 4. Number of positive squares (for 69 and 65 squares sampled in each year), total tracks found, percentage of total tracks and number of tracks per km (IKA) for each carnivore species of the Doñana National Park during the wet season. There is no distinction between wild and domestic cats.

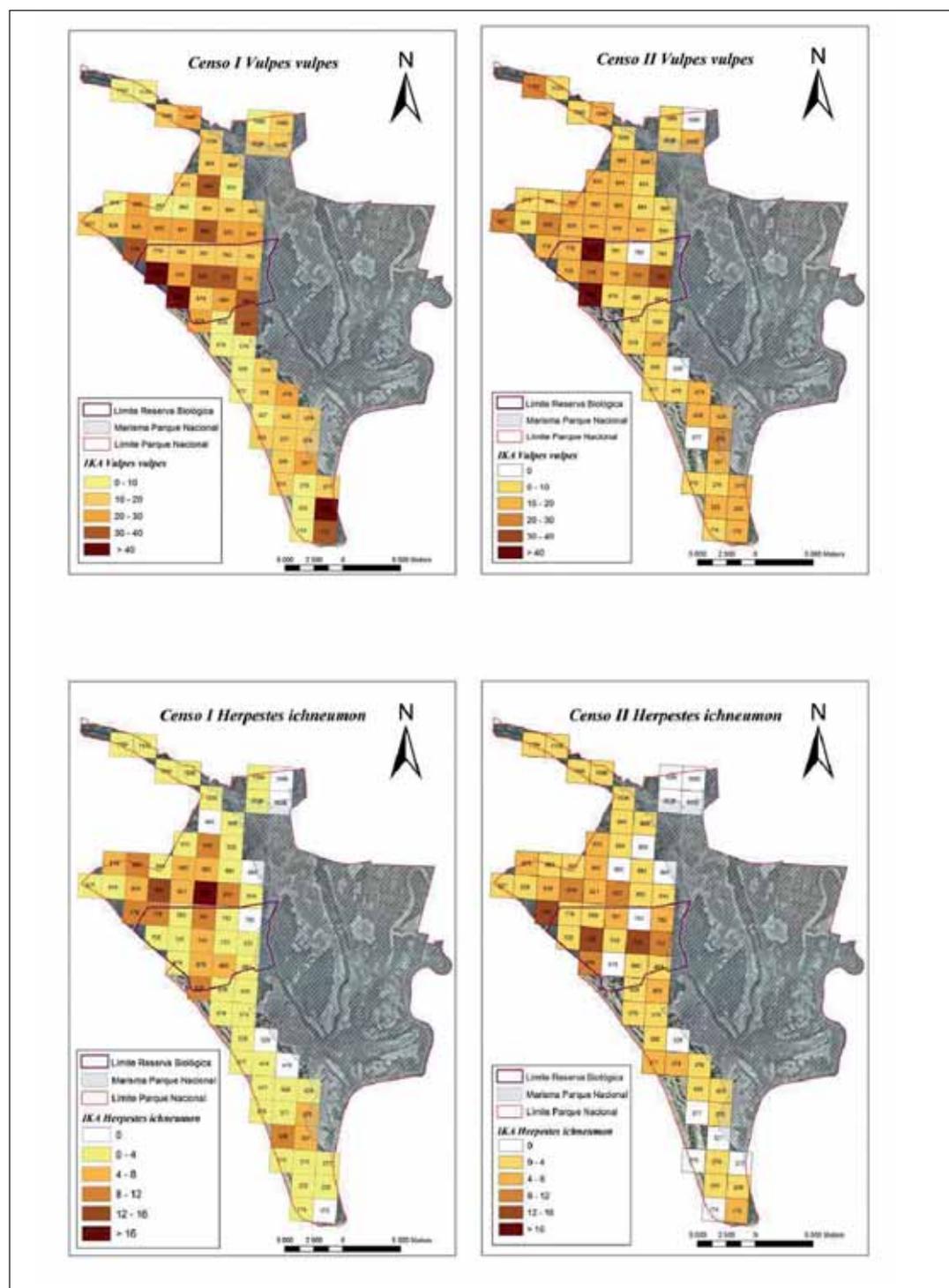
Los gatos del PND

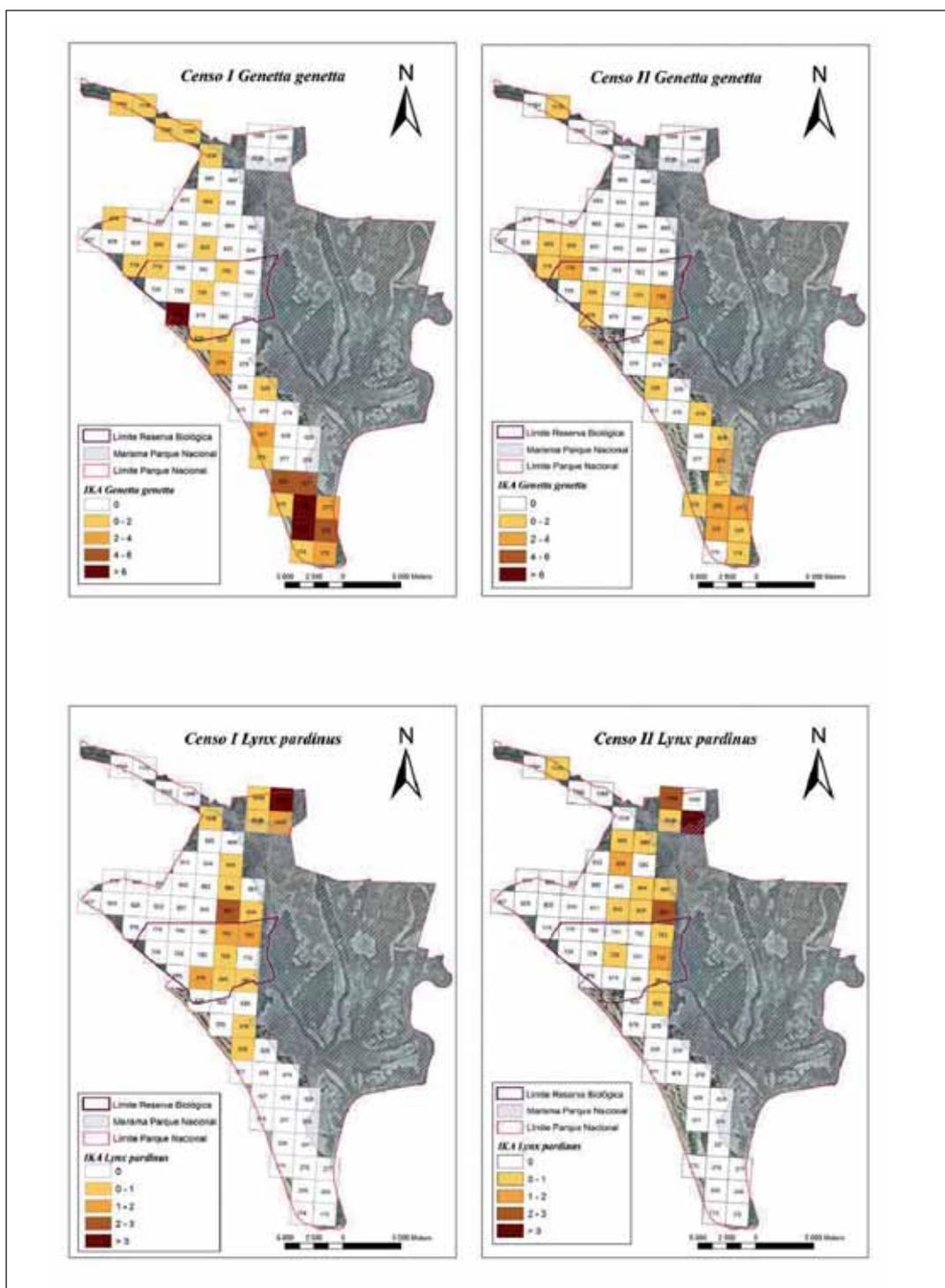
Como hemos visto anteriormente, se detectaron rastros de gatos en 12 y 21 cuadrículas de las 69 y 65 muestreadas en cada año de estudio, respectivamente. Independientemente de con qué especie de gato se corresponda, los datos indican que su abundancia es baja en el PND.

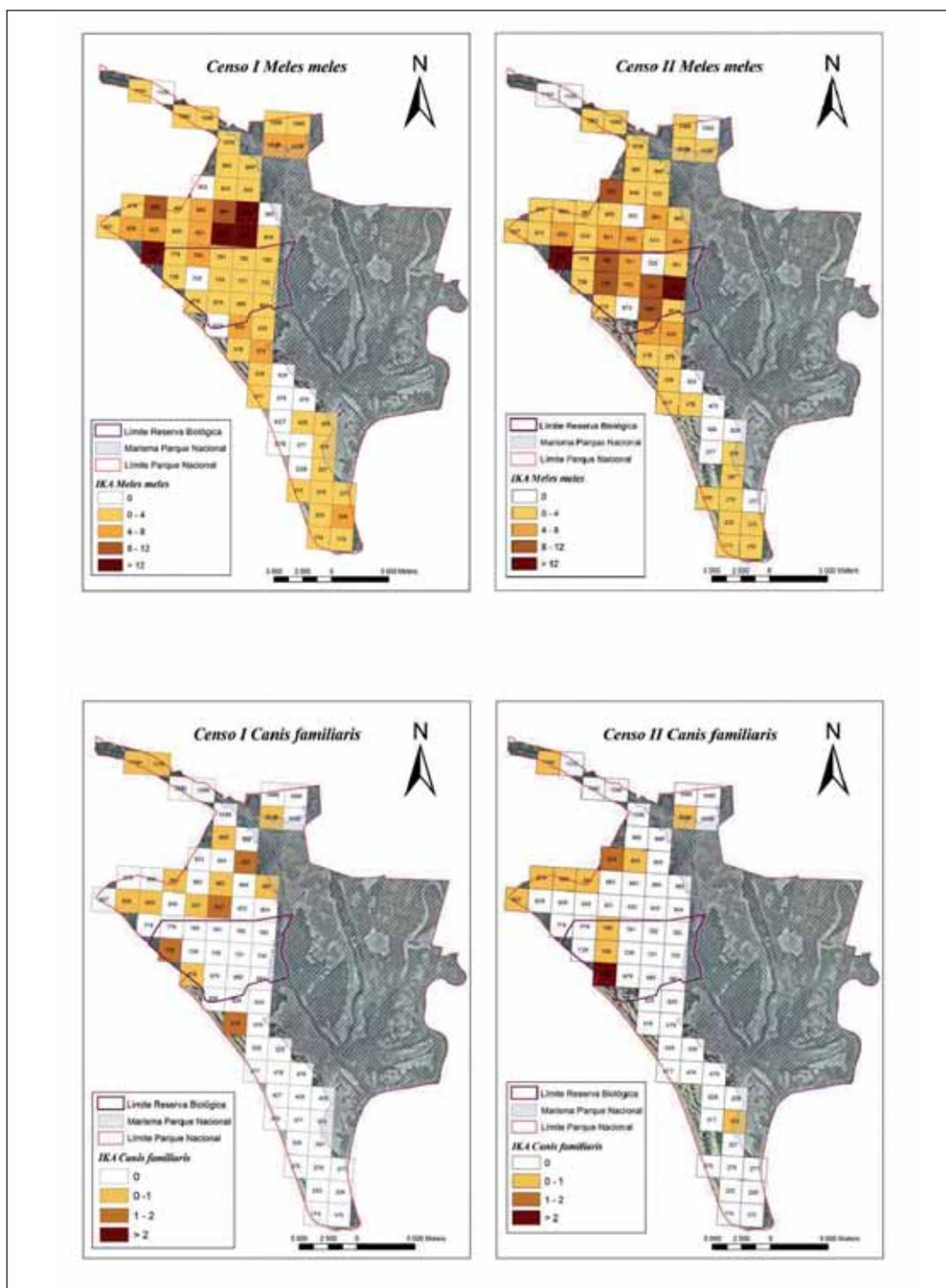
En total colocamos cámaras fotográficas en 166 puntos distintos del PND pertenecientes a 25

cuadrículas distintas (Fig. 4). El número total de cámaras/día fue de 5.761, con un promedio por cámara de 24,4 (SE = 8,02 rango = 1-33), y el número total de fotos tomadas fue de 2.173, siendo el 71,9% de carnívoros. El zorro fue el carnívoro más fotografiado, seguido a distancia por meloncillos y ginetas (Tabla 5).

Las 30 fotos de gatos se hicieron en 12 estaciones distintas (16 eventos distintos; es decir, separados al menos 4 horas; Fig. 4). Veintiocho de las







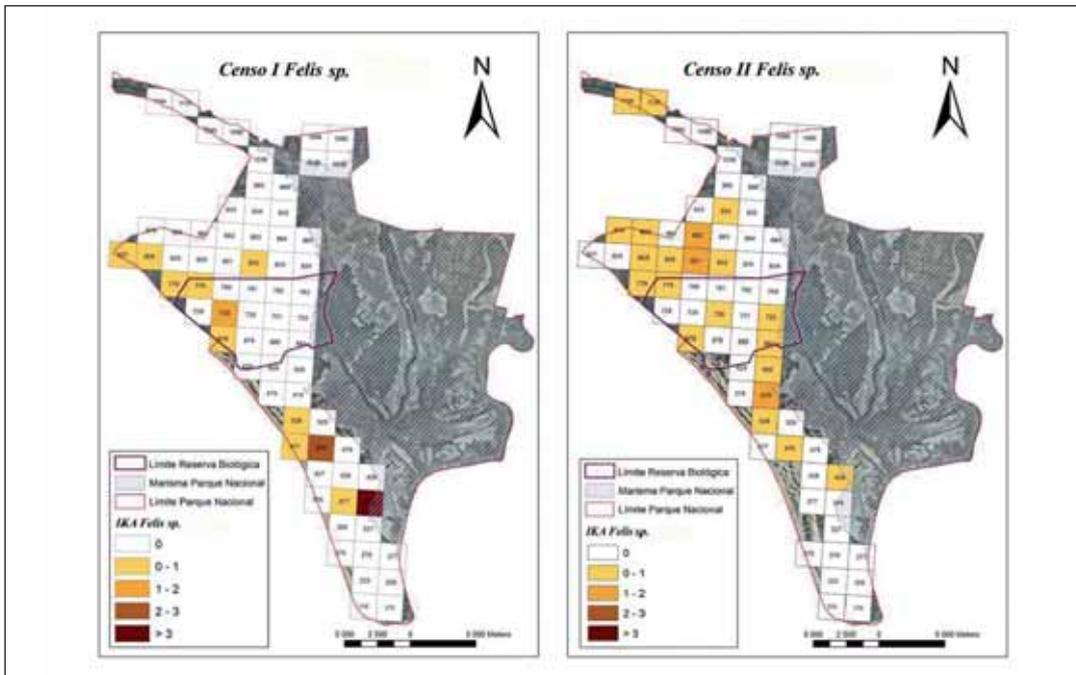


Figura 3. Mapas de distribución y abundancia relativa de las especies de carnívoros silvestres y domésticos presentes en el PND para las estaciones húmedas de 2007-2008 (Censo I) y 2008-2009 (Censo II).

Figure 3. Distribution and relative abundance maps of the domestic and wild carnivores of the Doñana National Park during the wet seasons of 2007-2008 (Censo I) and 2008-2009 (Censo II).

30 fotos de gatos podrían ser de monteses (en 14 eventos distintos). Todas las estaciones que realizaron fotos de gatos monteses estaban cebadas con paloma (n=6) o sardina fresca (n=4). Las únicas dos fotos de gato doméstico fueron realizadas en cámaras colocadas en el borde del Parque Nacional, en la zona limítrofe con la urbanización de Matalascañas (Fig. 4). De acuerdo con estos resultados podemos considerar que la mayor parte de los rastros de gato encontrados con los censos de huellas podrían corresponder a gatos con aspecto de monteses.

Se identificaron un mínimo de 6 individuos diferentes con aspecto de gato montés (Fig. 5) en base al patrón de su pelaje. Podía haber otros dos individuos distintos pero no fue posible asignarlos con fiabilidad (fotos 7 y 8 sobre Fig. 5).

Los análisis genéticos indicaron que el genotipo del gato capturado y radio-seguido coincidía al

Especie	Nº Fotos	Porcentaje
Gato montés	28	1,3
Gato doméstico	2	0,1
Lince ibérico	3	0,1
Gineta	60	2,8
Meloncillo	152	7,0
Tejón	26	1,2
Zorro	1.284	59,1
Perro	7	0,3
Otras especies	611	28,1
Total	2.173	100

Tabla 5. Número y porcentaje de fotografías de carnívoros y otras especies obtenidas durante el estudio de foto-trampeo de gatos en el PND.

Table 5. Number and percentage of carnivore pictures during the camera-trapping study of cats in the Doñana National Park.

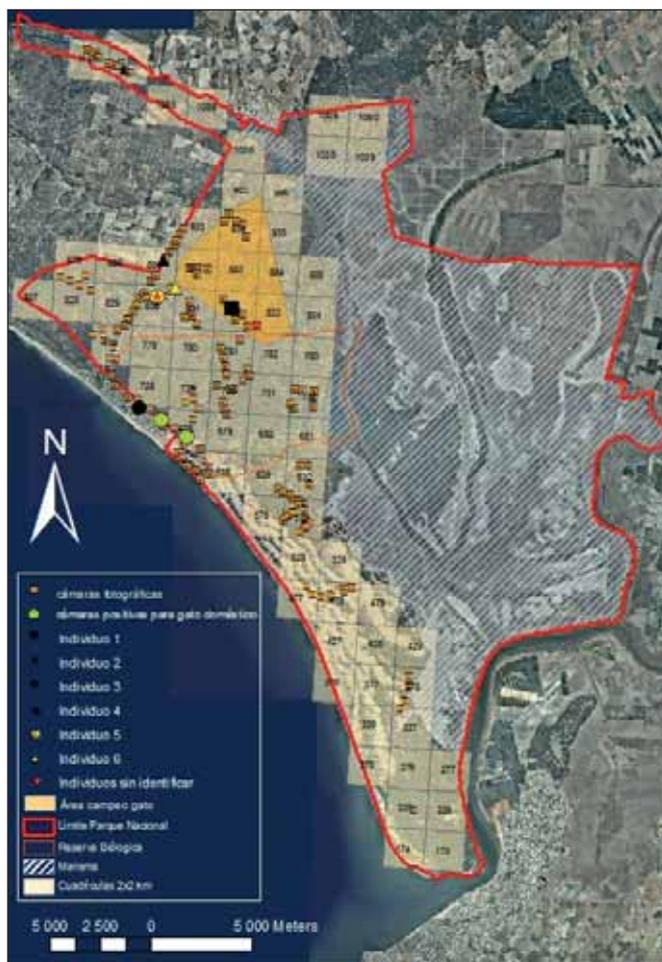


Figura 4. Localización de las 166 estaciones de foto-trampeo para detectar gatos entre junio de 2008 y noviembre de 2010 en el PND. Se representa dónde fueron fotografiados los 6 individuos con aspecto de gato montés identificados, los dos sin identificar y los dos individuos de gato doméstico durante el período de muestreo. También se representa el área de campeo en naranja del gato radio-seguido durante el estudio.

Figure 4. Location of the 166 camera stations used to detect cats between June 2008 and November 2010 in the Doñana National Park. Symbols represent sites where we photographed the six possible wild cats, two cats not identified, and two domestic cats. The home range of the radio-tracked cat is also shown in orange.

94% con lo esperado para los gatos monteses de la península Ibérica (Paulo Celio Alves, pers. com.). En total se obtuvieron 24 posiciones del animal, siendo el área de campeo estimada de 24 km², toda ella en la zona de matorral del centro-norte del PND (Fig. 4).

Evolución de las poblaciones de zorros en relación con las campañas de extracción

En los años 2007 y 2008, el personal del PND extrajo 17 y 1, y 4 y 7, respectivamente, zorros en las áreas de extracción previamente decididas de El Puntal y Los Sotos, respectivamente. En los años 2009 y 2010, no se extrajo ningún zorro.

Entre febrero de 2008 y febrero de 2009 pudimos hacer 8 muestreos de huellas en todos o parte de los 16 transectos definidos (Fig. 6). En general el número de huellas de zorros varió a lo largo del tiempo, con una ligera tendencia a disminuir. Un modelo lineal generalizado (GLM) con el que examinamos los efectos sobre el número de huellas de zorros de las variables extracción de zorros, fecha de muestreo, su interacción y

la variable zona, anidada dentro de transecto, y esta a su vez anidada dentro de la variable día, para controlar estadísticamente la pseudoreplicación de los datos, nos indicó que la única variable que afectó significativamente al número de rastros de zorro fue la fecha del muestreo (Tabla 6). Las diferencias entre fechas de muestreo se encontraron entre los muestreos de febrero de 2008 y febrero de 2009 ($p = 0,008$, prueba de Tukey). Cuando hicimos el mismo análisis sustituyendo la variable extracción por zona, es decir, buscando si había diferencias en el número de rastros de zorros entre las diferentes zonas de muestreo, encontramos que la fecha del muestreo seguía afectando significativamente los resultados, y la zona casi alcanzaba

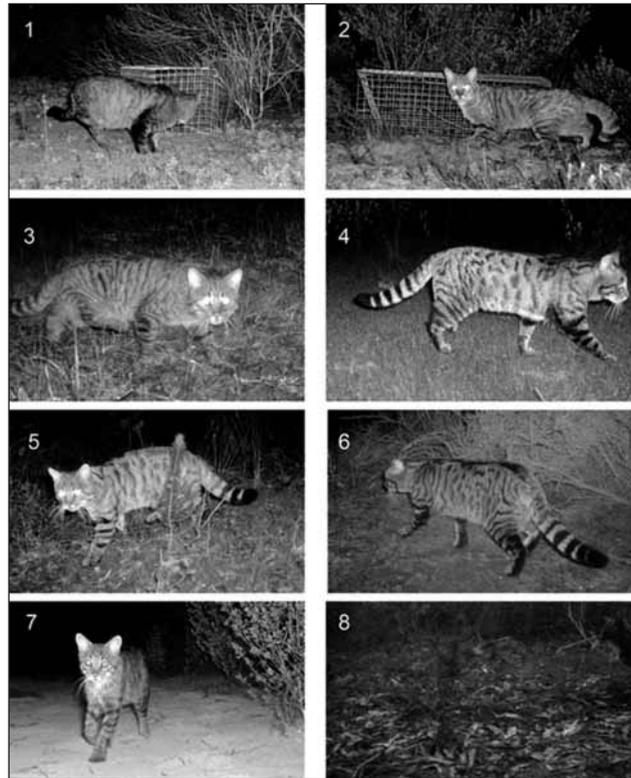


Figura 5. Imágenes de los seis individuos de gato montés identificados en base a su patrón de manchas en el pelaje, y otros dos gatos que no pudieron ser bien identificados durante el estudio en el PND.

Figure 5. Photographs of the six wild cats identified and the two cats not identified.

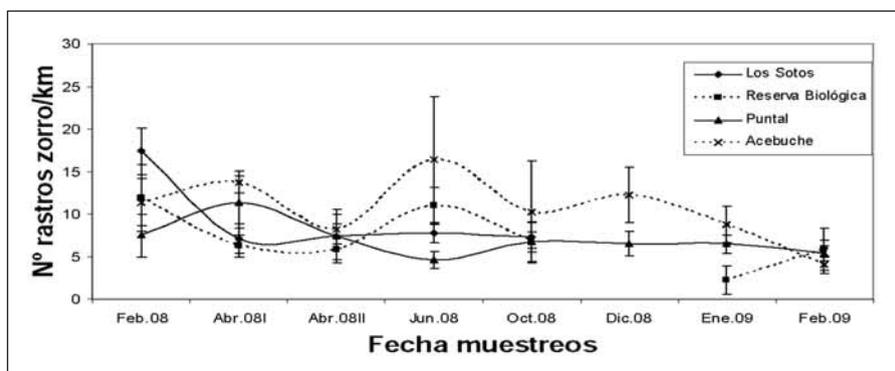


Figura 6. Número de rastros de zorro (\pm SE) por km en las áreas de extracción (Los Sotos y El Puntal; línea continua) y no extracción (RBD y Acebuche; línea de puntos) durante diferentes muestreos entre febrero 2008 y febrero 2009. En diciembre de 2008 no pudimos realizar los censos en las áreas de la Reserva Biológica y Los Sotos, ni en el de enero de 2009 en Los Sotos.

Figure 6. Number of fox tracks (\pm SE) per km in removal areas (Los Sotos and El Puntal; continuous line) and non-removal areas (RBD and Acebuche; dotted line) during different surveys between February 2008 and February 2009. Sampling in the areas of the Reserva Biológica and Los Sotos in December 2008, and Los Sotos in January 2009 could not be carried out.

Variable	gl	F	P
Modelo para zorros I			
Extracción	1,181	2,652	0,105
Fecha	7,181	2,429	0,021
Extracción*Fecha	7,181	1,381	0,216
Día (Transecto/Zona)	16,181	0,363	0,989
Modelo para zorros II			
Zona	3,180	2,625	0,052
Fecha	7,180	2,364	0,025
Extracción*Fecha	18,180	1,209	0,258
Día (Transecto/Zona)	4,180	0,345	0,848
Modelo para conejos			
Zona	3,177	1.169	0,323
Fecha	5,177	3.159	0,009
Zorro	1,177	0,001	0,979
Zona*Fecha	20,177	0.925	0,556
Día (Transecto/Zona)	4,177	0,148	0,964

Tabla 6. Resultados del GLM para examinar el efecto de diferentes variables sobre el número de rastros de zorro y conejos encontrados por km en áreas de extracción y no extracción de zorros en el PND.

Table 6. Results of the GLM for testing the effect of different variables on the number of fox and rabbit tracks per km in removal and non-removal areas of the Doñana National Park.

una significación con un nivel de probabilidad del 0,05 (Tabla 6). Haciendo comparaciones dos a dos entre áreas, la prueba de Tukey solo encontró diferencias significativas entre las áreas del Acebuche y del Puntal ($p = 0,036$), correspondientes a zonas de no extracción y extracción, respectivamente. Estos resultados sugieren que las diferencias encontradas en la abundancia relativa de zorros a lo largo del tiempo y entre áreas se deben a factores distintos que las campañas de extracción efectuadas.

Por otro lado, ya que las extracciones de zorros se justifican como una medida para disminuir el posible efecto negativo de la predación sobre las poblaciones de conejos, hicimos otro GLM donde examinamos el efecto que sobre el número de rastros de conejo había de las diferentes variables consideradas (Tabla 6). La única va-

riable que afectó significativamente al número de huellas de conejo fue la fecha del muestreo. Por lo tanto podría no haber un efecto de las extracciones de zorros sobre las poblaciones de conejos.

Los collares colocados en los dos zorros localizaron la posición de los mismos en el 56 y 81% de las ocasiones en las que estaban programados para ello, que representaron 1.888 y 2.686 localizaciones totales, para 42 y 51 días de funcionamiento, respectivamente (Tabla 7). Usando todas las localizaciones disponibles, el área de campeo total de los zorros fue de 10,7 km² para uno de ellos y de 12,4 km² para el otro (Fig. 7).

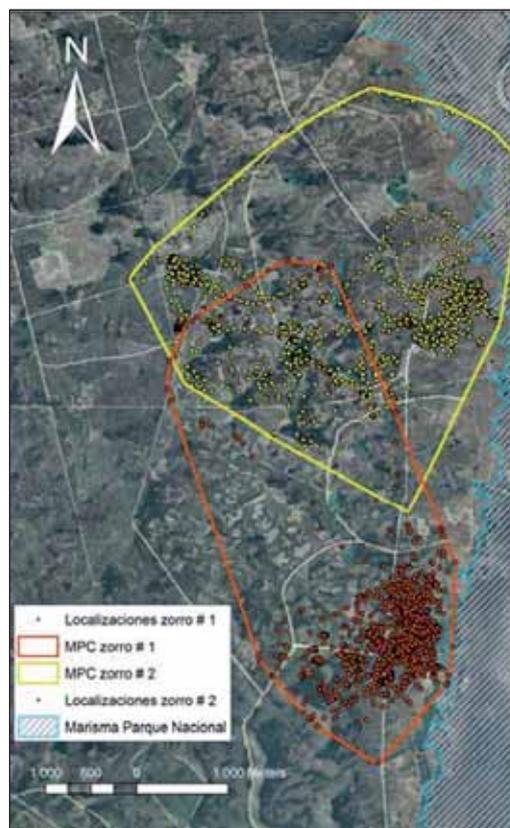


Figura 7. Áreas de campeo de los dos zorros estudiados durante este proyecto usando el método del mínimo polígono convexo y el 100% de las localizaciones.

Figure 7. Home ranges of the two foxes radio-tracked during this study using minimum convex polygons on all locations.

	No seguimientos intensivos	Distancia recorrida (km) ± DE	Área campeo diaria (km ²)	No cruces/km ± DE	No cruces/km carril ± DE	No cruces/km cortafuego ± DE
Zorro 1	6	16,4±5,27	2,6±3,1	8,6±4,3	11,3±6,2	4,7±1,8
Zorro 2	10	10,2±4,36	2,1±2,4	10,2±15,9	5,9±6,0	16,9±32,7
Conjunto	16	12,6±5,5	2,3±2,6	9,6±12,6	7,9±6,3	12,3±26,1

Tabla 7. Tasas de cruce de caminos y otras estadísticas obtenidas con los seguimientos intensivos de los dos zorros marcados con collares GPS.

Table 7. Road crossing rates and other statistics from intensive radio-tracking of two foxes radio-tagged with GPS collars.

Pudimos obtener información sobre movimientos diarios para un total de 6 y 10 seguimientos con localizaciones cada 5 minutos para cada zorro, respectivamente. En promedio, la distancia recorrida fue de algo más de 16 y 10 km para cada zorro, y el número total de cruces detectados por carriles o cortafuegos de 61 y 33, respectivamente (Tabla 7). Con un GLM examinamos qué variables podían afectar al número de cruces diarios de caminos en los zorros, encontrando que dependió de la longitud del periodo y de la distancia recorrida durante el seguimiento intensivo, y de la densidad de caminos en el área de campeo diaria de los zorros ($p < 0,05$). Por tanto usamos tasas de cruce (es decir, cruces por km disponible de caminos dentro del área de campeo diaria de los zorros) para controlar por el

efecto de estas variables. No encontramos diferencias significativas en las tasas de cruce entre zorros ni para la tasa de cruce conjunta de cualquier tipo de camino, ni separando los caminos entre carriles y cortafuegos ($p > 0,104$; prueba de Mann-Whitney). Por tanto, considerando el conjunto de los dos zorros, las tasas de cruce fueron de aproximadamente 10 cruces por km de camino (Tabla 7), aunque debido a la elevada variabilidad de los datos, el intervalo de confianza del 95% osciló entre 3 y 16 cruces por kilómetro de camino disponible.

Aunque con los datos obtenidos no podemos estar seguros de que las tasas de cruce obtenidas sean generalizables a cualquier zorro, zona de estudio y cualquier época del año en Doñana,

Muestreo	Los Sotos		Reserva Biológica		Puntal		Acebuche	
	Rastros/km	Zorros/km ²	Rastros/km	Zorros/km ²	Rastros/km	Zorros/km ²	Rastros/km	Zorros/km ²
Feb. 08	17,4	0,8	11,9	0,5	7,5	0,3	11,4	0,5
Abr. 08I	7,1	0,3	6,3	0,3	11,4	0,5	13,8	0,6
Abr. 08II	7,4	0,3	5,9	0,3	7,4	0,3	8,3	0,4
Jun. 08	7,8	0,4	11,0	0,5	4,6	0,2	16,4	0,7
Oct. 08	7,3	0,3	6,9	0,3	6,8	0,3	10,3	0,5
Dic. 08	–	–			6,5	0,3	12,3	0,6
Ene. 09	–	–	2,3	0,1	6,5	0,3	8,8	0,4
Feb. 09	6,0	0,3	5,8	0,3	5,4	0,2	4,0	0,2
Media	8,8±1,73	0,4±0,08	7,1±1,25	0,3±0,06	7,0±0,71	0,3±0,03	10,6±1,33	0,5±0,06

Tabla 8. Número de rastros de zorro por km de censo y densidad estimada según las tasas de cruce por caminos en los dos zorros radio-marcados con collares GPS en las cuatro áreas donde se muestreó la abundancia relativa de zorros y para cada fecha de muestreo. Se indica el error estándar de los valores medios.

Table 8. Number of fox tracks/km and estimated density from crossing rates in four areas where fox relative abundance was estimated. Standard errors are reported for mean values.

sí podemos usarlas para hacer una estima aproximada de la densidad de zorros en las áreas de extracción donde realizamos censos de huellas, y por tanto disponemos de unas tasas de cruce observadas. Si en promedio cada zorro radiomarcado con los collares GPS se movió diariamente por una superficie de 2,3 km² y su tasa de cruce fue de 9,6 cruces/km de camino, eso significa que cada vez que encontráramos ese número de rastros en un km de censo habría 0,43 zorros/km². Con este factor de conversión, obtenemos que en las cuatro zonas donde muestreamos huellas de zorro tendríamos a lo largo del periodo de estudio entre 0,3 y 0,5 zorros/km² (Tabla 8).

Aún admitiendo que no hubiera diferencias en las tasas de cruce entre zorros, zonas o periodos del año, es conveniente tener en cuenta que estos valores tienden a sobreestimar la densidad real. Nuestra resolución temporal en el muestreo de los animales radio-marcados es de 5 minutos, tiempo durante el cual entendemos que un zorro puede cruzar más de una vez un camino dado. Por tanto, estaremos sobreestimando el número

de zorros que hay en el área. Si nuestros datos son correctos, la densidad de zorros puede ser menor que lo admitido hasta ahora para Doñana. No obstante hay que ser cautos con estos resultados ya que se han obtenido a partir de pocos individuos y un periodo de tiempo relativamente corto, y sería deseable una mayor base de datos para obtener una conclusión satisfactoria. Sin embargo, si podemos concluir que este método podría ser una forma fácil y realista de estimar la abundancia de zorros en el PND.

AGRADECIMIENTOS

El estudio fue financiado por el proyecto 17/2005 del Ministerio de Medio Ambiente (Programa de Parques Nacionales). Land-Rover España S.A. cedió dos vehículos para el trabajo de campo. Estamos muy agradecidos a J.C. Rivilla, S. Desnica, B. Adrados y S. Conradi por su asistencia con el trabajo de campo, laboratorio y gestión del proyecto. C. Soto disfrutó de una beca JAE-Predocctoral del CSIC, y José V. López-Bao de una beca FPU del Ministerio de Educación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. 1998. Guidelines for the capture, handling, and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists. *Journal of Mammalogy* 74: 1416-1431.
- BEYER, H.L. 2004. Hawth's Analysis Tools for ArcGIS. <http://www.spatial ecology.com/htools>.
- CARMICHAEL, L.E., CLARK, W. & STROBECK, C. 2000. Development and characterization of microsatellite loci from lynx (*Lynx canadensis*), and their use in other felids. *Molecular Ecology* 9: 2197-2199.
- FAIRCLOTH, B.C., REID, A., VALENTINE, T., EO, S.H., TERHUNE, T.M., GLENN, T.C., PALMER, W.E., NAIRN, C.J. & CARROLL, J.P. 2005. Tetranucleotide, trinucleotide, and dinucleotide loci from the bobcat (*Lynx rufus*). *Molecular Ecology Notes* 5: 387-389.
- FERRERAS, P., BELTRÁN, J.F., ALDAMA, J.J. & DELIBES, M. 1997. Spatial organization and land tenure system of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*, Temminck, 1824). *Journal of Zoology* 243: 63-189.
- GAÑÁN, N., SESTELO, A., GARDE, J.J., MARTÍNEZ, F., VARGAS, A., SÁNCHEZ, I., PÉREZ-ASPA, M.J., LÓPEZ-BAO, J.V., PALOMARES, F., GOMENDIO, M., & ROLDÁN, E.R.S. 2010. Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction* 139: 275-285.
- GÖRTZ, F., HILDEBRANDT, T., JEWGENOW, K., WAGNER, N., HERMES, R., STRAUSS, G., & MEYER, H.H. 1997. Transrectal ultrasonographic examination of the female urogenital tract in non-

- pregnant and pregnant captive bears (*Ursidae*). *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 51: 303-312.
- GÖRITZ, F., DEHNHARD, M., HIDLDEBRANT, M., NAIDENKO, S.V., VARGAS, A., MARTÍNEZ, F., LÓPEZ, J.V., PALOMARES, F., & JEWGENOW, K. 2009. Non cat-like ovarian cycle in the Eurasian and the Iberian Lynx - ultrasonographical and endocrinological analysis. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 (Suppl. 2): 87-91.
- HILDEBRANDT, T.B., HERMES, R., JEWGENOW, K., & GÖRITZ, F. 2000. Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies. *Theriogenology* 53: 73-84.
- HÖSS, M., & PÄÄBO, S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research* 21: 3913-3914.
- HOWARD, J.G. 1993. Semen collection and analysis in carnivores. In *Zoo and Wildlife Medicine*, 3 edn, pp 390-398. Ed. M.E .Fowler. Philadelphia, PA:WB Saunders.
- LÓPEZ-BAO, J.V., RODRÍGUEZ, A. & PALOMARES, F. 2008. Behavioural response of a trophic specialist, the Iberian lynx, to supplementary food: patterns of food use and implications for conservation. *Biological Conservation* 141: 1857-1867.
- LÓPEZ-BAO, J.V., RODRÍGUEZ, A. & PALOMARES, F. 2009. Competitive asymmetries in the use of supplementary food by the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Plos One* 4:e7610.
- LÓPEZ-BAO, J.V., PALOMARES, F., RODRÍGUEZ, A. & DELIBES, M. 2010 Effects of food supplementation on home range size, productivity and recruitment in a small population of Iberian lynx. *Animal Conservation* 13: 35-42.
- MELI, M.L., CATTORI, V., MARTÍNEZ, F., LÓPEZ, G., VARGAS, A., SIMÓN, M.A., ZORRILLA, I., MUÑOZ, A., PALOMARES, F., LÓPEZ-BAO, J.V., PASTOR, J., TANDON, R., WILLI, B., HOFMANN-LEHMANN, R., & LUTZ, H. 2009. A feline leukemia virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynxes (*Lynx pardinus*). *PLoS-ONE*, 4 (3): e4744.
- MENOTTI-RAYMOND, M., DAVID, V.A., LYONS, L.A., SCHAFFER, A.A., *et al.* 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57: 9-23.
- MILLER, C.R., JOYCE, P., & WAITS, L.P. 2002. Assessing allelic dropout and genotyping reliability using maximum likelihood. *Genetics* 160: 357-249.
- MIQUEL, C., BELLEMAIN, E., POILLOT, C., BESSIÈRE, J., DURAND, A. & TABERLET, P. 2006. Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach. *Molecular Ecology Notes* 6: 985-988.
- PALOMARES, F., DELIBES, M., FERRERAS, P., FEDRIANI, J.M., CALZADA, J. & REVILLA, E. 2001. Spatial ecology of Iberian lynx and abundance of European rabbits in south western Spain. *Wildlife Monographs*. 148: 1-36.
- PALOMARES, F., GODOY, J.A., PIRIZ, A., O'BRIEN, S.J., & JOHNSON, W.E. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* 11: 2171-2182.
- PALOMARES, F., REVILLA, E., CALZADA, J., FERNÁNDEZ, N. & DELIBES, M. 2005. Reproduction and pre-dispersal survival of Iberian lynx in a subpopulation of the Doñana National Park. *Biological Conservation* 122: 53-59.
- PALOMARES, F., LÓPEZ-BAO, J.V., & RODRÍGUEZ, A. 2011. Feline leukaemia virus outbreak in the endangered Iberian lynx and the role of feeding stations: a cautionary tale. *Animal Conservation* 14: 242-245.
- PIGGOTT, M., BELLEMAIN, E., TABERLET, P., & TAYLOR, A. 2004. A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. *Conservation Genetics* 5: 417-420.
- PILGRIM, K.L., MCKELVEY, K.S., RIDDLE, A.E., & SCHWARTZ, M.K. 2005. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Molecular Ecology Notes* 5: 60-61.

- TABERLET, P., GRIFFIN, S., GOOSSENS, B. *et al.* 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24: 3189-3194.
- VALIÈRE, N. 2002. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology* 2: 377-379.
- WHITE, G.C. & GARROTT, R.A. 1990. Analysis of wildlife radio-tracking data. San Diego, CA, Academic Press.