



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Ecología y genética de la conservación en poblaciones pequeñas: el caso del urogallo cantábrico (*Tetrao urogallus cantabricus*)

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Alberto Francisco Fameli

Directora de tesis: Dra. Patricia Mirol

Directora Asistente: Dra. María José Bañuelos

Consejero de estudios: Dr. Juan César Vilardi

Lugar de trabajo: Grupo de Genética y Ecología para la Conservación y Biodiversidad, Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2020

Ecología y genética de la conservación en poblaciones pequeñas: el caso del urogallo cantábrico (*Tetrao urogallus cantabricus*)

Resumen

El urogallo (*Tetrao urogallus*) es un ave galliforme de distribución paleártica, desde el oeste de Europa hasta el este de Siberia. Presenta un sistema de apareamiento poligínico, donde los machos se reúnen y realizan despliegues comportamentales en zonas de apareamiento. El área de ocupación de la especie en el centro y oeste de Europa se encuentra altamente fragmentado, en gran parte debido a modificaciones antrópicas, habiéndose extinto en varios países y encontrándose catalogada como “En peligro” o “En peligro crítico” en otros. Se han reconocido subespecies en base a particularidades morfológicas, siendo varias de ellas confirmadas por análisis genéticos. Entre las mismas se distingue el urogallo cantábrico (*T. urogallus cantabricus*), que además constituye el único grupo presente en la actualidad que habita en bosques exclusivamente caducifolios. El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar la población de urogallos cantábricos en un área que incluye zonas con diferente grado de presión antrópica, obteniendo datos aplicables a planes de manejo y dando recomendaciones para los mismos. Mediante el uso de muestras colectadas de forma no invasiva durante la temporada reproductiva de tres años consecutivos, y posterior análisis a través de microsatélites y sexado molecular, se detectaron 116 individuos (45 hembras, 68 machos, 3 indeterminados). Se encontró que no hay diferenciación suficiente entre zonas de muestreo para considerar la presencia de estructuración poblacional, por lo que los individuos del área de estudio pueden considerarse parte de una única unidad de manejo. Además, pudo demostrarse que los machos que comparten una zona de apareamiento están en promedio más emparentados entre sí que dos machos cualesquiera en el área de estudio, mientras que esta relación no se encontró para hembras. Se rechazó la hipótesis de que el grado de endogamia de los individuos está correlacionado con el grado de filopatría. Por último, se realizó un análisis de genética del paisaje encontrando que ciertos elementos del hábitat afectan la conectividad entre zonas de muestreo. En particular, la presencia de bosque deciduo junto con una alta exposición topográfica favorece la conectividad para los machos, mientras que una baja exposición topográfica reduce la conectividad. Para ambos sexos, la presencia de rutas pavimentadas genera la mayor disminución observada en la conectividad.

Palabras claves: genética de la conservación, microsatélites, estructuración genética, parentesco, endogamia, conectividad

Conservation genetics and ecology in small populations: the case of the Cantabrian capercaillie (*Tetrao urogallus cantabricus*)

Abstract

The capercaillie (*Tetrao urogallus*) is a galliform native to the palearctic region, from western Europe to eastern Siberia. Its distribution in western and central Europe is highly fragmented, mainly due to human landscape modifications. It has been reported extinct in several countries, and it is currently considered as “Endangered” or “Critically endangered” in many others. Different subspecies have been recognized based on morphological traits, and some of them have been confirmed through genetic analyses. Among them there is the Cantabrian capercaillie (*T. urogallus cantabricus*), which is the only group presently inhabiting purely deciduous forests. The aim of this dissertation was to study the Cantabrian capercaillie population in an area comprising zones with different levels of anthropogenic disturbance, in order to obtain information relevant to management practices and provide recommendations for them. Using non-invasive samples collected during breeding season of three consecutive years, and analyzing microsatellites and a sex marker, I identified 116 birds (45 females, 68 males and 3 that could not be sexed). I found that genetic differentiation among sampling zones is not enough to consider a scenario of genetic structuring. Therefore the individuals in the study area can be regarded as part of a single management unit. Besides, I showed that pairs of males sharing a mating arena are on average more related than any two males in the study area, but this pattern was not observed for females. I rejected the hypothesis of correlation between inbreeding level of individuals and their philopatric behavior. Finally, I performed a landscape genetic analysis showing that certain habitat features affect connectivity among sampling zones. In particular, deciduous forests in the presence of high levels of topographic exposure favor connectivity for males. Among the different landscape features analyzed, paved roads are the one that hampers connectivity the most for both sexes.

Key words: conservation genetics, microsatellites, genetic structure, relatedness, inbreeding, connectivity

Agradecimientos

Muchas personas aportaron a la realización de esta tesis y/o a mi salud mental durante esta etapa de mi vida caracterizada por momentos de extremos: los más angustiantes, los más emocionantes, los más solitarios y en los que me sentí más acompañado que nunca.

Quiero empezar por agradecer a la Dra. Patricia Mirol y a la Dra. María José Bañuelos por su dirección en esta tesis y por su paciencia frente a los errores que cometí, siempre ayudándome a aprender en el proceso. Patricia, que me dio un lugar de trabajo allá por el año 2009 para que hiciera mi tesis de licenciatura y estuvo guiándome en todas las instancias de mi formación, de la extracción de ADN al paper, se convirtió en una segunda madre. Mariajo, que también está presente desde mi tesis de licenciatura, me brindó la posibilidad de participar en este proyecto y estuvo guiándome a la distancia o en vivo y en directo durante mi estancia en Asturias, siempre con paciencia y la mejor predisposición.

También quiero agradecer al Dr. Juan Vilardi, mi consejero de estudios, con quien no sólo tuve la oportunidad de charlar sobre los cursos de doctorado sino que también me guió y aconsejó en cuanto a los análisis de datos.

Un agradecimiento especial a María Morán-Luis, quien no sólo me soportó en el laboratorio sino que colectó gran parte de las muestras, las genotipó y sexó. ¡Y me alojó en su casa durante mi estadía en España!

A Mario Quevedo, Rolando Rodríguez-Muñoz, Beatriz Blanco-Fontao y Alberto Fernández-Gil por todos los comentarios útiles durante la interpretación de los resultados y su participación en las diferentes instancias del proyecto, desde su concepción y pedido de subsidio, pasando por el trabajo de campo y laboratorio hasta la publicación de artículos. Hablando de trabajo de campo, hubo muchos involucrados en los muestreos. Aunque no alcancé a conocer a la mayoría de ellos, sólo a Damián Ramos, quiero expresar mi gratitud por su participación.

A las instituciones que han permitido desarrollar el trabajo que culmina con esta tesis: CONICET, el Gobierno del Principado de Asturias, Ministerio de Ciencia e Innovación de España, la Universidad de Oviedo y la Universidad de Buenos Aires.

A los jurados que leyeron esta tesis: Dra. Viviana Confalonieri, Dr. Darío Lijtmaer y Dr. Juan Ignacio Túnez. También a Graciela de la secretaría del EGE por toda su ayuda.

A mi familia... qué puedo decir para agradecer a las personas que me acompañaron durante toda mi vida y me moldearon más que nadie. Gracias a mis padres Rodolfo y Clotilde, a Carlos, Susana, mis hermanos Cecilia y Guillermo, mi tía Susana, Valeria, Tomás y Mirta.

A mis amistades de la vida: Fer, Bar, Flor, Vero, Lean, Nadia, Lucas, Al, Paul, Pablo y Andy. A esta altura ya son hermanos y hermanas para mí. En especial agradezco a Flor por estar

siempre presente para escuchar sobre mis problemas y brindarme apoyo y consejos. A mis amistades de la carrera: Gus, Pablo, Celes, Gaby R., Gaby L., Lean, Emi y Mary.

A Paulo Schwalm por su apoyo durante momentos críticos de esta tesis.

A la gente del GECobi: mis hermanos adoptivos Jime y Fer, que además de hacer mucho más tolerable (y en ocasiones más apasionante) el trabajo, me ayudan a discutir resultados y correr programas desde la época de la centrífuga que se frenaba con un papelito. A Javi que me dio la oportunidad de salir un poco de la genética e incursionar en otras áreas. A Lau que me ayuda cuando estoy frustrado, ya sea escuchando mis quejas o haciéndome reír. A Viri y los modelos 2014 plus: Jesi, Tato, Daro, Colo, Dani Pereyra, Dani Font y Mechi.

También agradezco a Tom Blacklock y Len Hansen por sus colaboraciones y por brindarme ánimo y enseñanzas valiosas.

A la Dra. Egle Villegas Castagnasso, el Lic. Julián Crespi y el Dr. Guillermo Giovambattista que me ayudaron en los inicios de esta tesis, confiaron en mí para realizar la extracción de ADN en muestras complicadas y me incluyeron en el trabajo que se publicó a partir de ellas.

A Jan Bernard Bulten por su amistad a la distancia y por brindarme palabras de aliento en los momentos oportunos.

A Scott Jaeger, quien además de brindarme ánimo y dejarme desahogar durante nuestras conversaciones, aportó un elemento clave en la realización de esta tesis: café.

A Nereida Melguizo-Ruiz, Gerardo Jiménez-Navarro y en especial a Elia Palop-Navarro por ayudarme a sentirme como en casa durante mi estadía en Oviedo. Fue un momento donde necesité amigos... ¡Gracias!

A quienes me hicieron

Índice

Introducción general	1
Conservación de especies en peligro: incorporando estudios a las acciones de manejo	3
Conservación del urogallo: consideraciones ecológicas y comportamentales de importancia en el manejo de la especie	
• Tetraónidas	6
• Urogallo (<i>Tetrao urogallus</i>)	10
• Objeto de estudio: el urogallo cantábrico (<i>Tetrao urogallus cantabricus</i>)	16
Capítulo 1 – Distribución de la variabilidad genética	23
Introducción	25
Materiales y métodos	26
Resultados	33
Discusión	41
Capítulo 2 – Parentesco a nivel de lek y evaluación de la correlación entre grado de endogamia y territorialidad	47
Introducción	49
Materiales y métodos	53
Resultados	58
Discusión	66
Capítulo 3 – Genética del paisaje	71
Introducción	73
Materiales y métodos	78
Resultados	86
Discusión	92
Discusión general	101
Bibliografía	107

Introducción general



Conservación de especies en peligro: incorporando estudios a las acciones de manejo

Un manejo efectivo de especies silvestres requiere información sobre la historia natural y la demografía de las mismas (Gilchrist *et al.* 2005), además de un entendimiento sobre patrones biogeográficos, estructura de la comunidad, comportamiento de los individuos y problemas de salud que afecten a la población (Deem *et al.* 2001). Sin embargo, los actores involucrados en estas acciones no siempre logran trabajar juntos de manera eficiente (Sanguinetti *et al.* 2014), y la relación entre gestores de vida silvestre e investigadores puede ser tensa en ocasiones. En el peor de los casos, los investigadores pueden concentrarse demasiado en estudiar aspectos teóricos de la biología de la especie, no aplicables a acciones de manejo, mientras que los encargados del manejo de la vida silvestre pueden adoptar acciones sin la suficiente base científica, lo que puede resultar en una inversión no efectiva de los esfuerzos de conservación, o incluso puede tener efectos adversos sobre la situación. Un claro ejemplo es la suplementación nutricional realizada como parte del proyecto de conservación del kakapo (*Strigops habroptilus*), psitácido no volador endémico de Nueva Zelanda que presenta un sistema de apareamiento poligínico, en el cual los machos se congregan en zonas específicas (“leks”) y realizan vocalizaciones con el fin de aparearse. La reproducción ocurre cada 3-4 años, en asociación con la fructificación masiva de la conífera comúnmente llamada rimu (*Dacrydium cupressinum*). En 1980, sólo dos poblaciones naturales persistían en islas separadas (Isla Sur y Steward), aunque con un alto riesgo de extinción debido a la presencia de mamíferos predadores introducidos por el hombre (Lloyd y Powlesland 1994). Frente a la situación crítica de la especie, y luego de un severo episodio de predación por gatos en la isla de Steward, se translocaron 22 individuos a la isla Little Barrier en 1982 con el fin de crear una población reproductiva (Clout y Merton 1998). Sin embargo, durante los siguientes 7 años no se registraron intentos de reproducción, con lo cual se decidió comenzar con suplementación alimentaria asumiendo que la misma aumentaría el éxito reproductivo. Si bien los primeros resultados fueron alentadores, con el correr de los años se demostró que el aporte nutricional extra puede facilitar la reproducción al elevar el estado energético de las aves por encima de un umbral necesario para la reproducción, pero la ocurrencia de la misma continúa siendo dependiente de la fructificación del rimu. La suplementación trajo consecuencias desfavorables para el proyecto de conservación: un importante sesgo hacia la producción de machos (Clout *et al.* 2002), mientras que el imperativo del plan de conservación era obtener tantas hembras como fuera posible (Clout *et al.* 2002). Estos resultados son esperables bajo la hipótesis Trivers-Willard (Trivers y Willard 1973): en especies donde el éxito reproductivo de los machos presenta una gran variabilidad (por ejemplo especies con poliginia de lek, donde sólo los machos en mejor condición física obtienen la mayoría de las cópulas) y la condición física de un individuo

está asociada al estado nutricional que tenía su madre, se ha demostrado que las hembras en mejor estado nutricional tienden a producir en promedio más hijos que hijas, los cuales presentarán también una buena condición física y un alto éxito reproductivo. El mecanismo parece estar asociado a la presencia de la hormona de estrés corticosterona (Love *et al.* 2005), la cual pasa de la madre a la yema de sus huevos, donde mayores niveles de dicha hormona se traducen en una mayor mortalidad embrionaria y menor peso al eclosionar (con crecimiento más lento durante el desarrollo postnatal) de machos.

El ejemplo de lo acontecido en el plan de conservación del kakapo demuestra que una decisión que puede parecer sensata en términos generales (más recursos energéticos generan mayor producción de pichones) pero que desestima conocimientos más profundos sobre biología evolutiva (hipótesis de Trivers-Willard) puede generar resultados contraproducentes a pesar del gran esfuerzo logístico y económico aplicado.

Afortunadamente este proyecto contó con un monitoreo adecuado que permitió evaluar los efectos de la suplementación nutricional y modificar la manipulación que estaba siendo perjudicial para los objetivos definidos, lo cual no es común. Como expone Macnab (1983), cualquier esquema de manejo es siempre un experimento, cuya validez se basa en suposiciones ecológicas. Sin embargo, los involucrados en estas acciones rara vez se encargan de plantear el resultado esperado; cuando lo hacen, el mismo se expresa en términos tan generales que impiden la verificación objetiva de los logros o falta de éstos. Además, la falta de controles genera que sea imposible determinar si el resultado obtenido fue causado por el tratamiento, por otro factor, o por una combinación de ambos. Según Kleiman *et al.* (2000) existe una resistencia al concepto de evaluación por parte de las organizaciones encargadas de llevar a cabo programas de conservación, mientras que Sutherland *et al.* (2004) exponen que la mayoría de las decisiones hechas en la práctica actual de la conservación no están basadas en evidencias. De modo similar, Pullin *et al.* (2004) encontraron, en su estudio llevado a cabo en el Reino Unido, que sólo el 23% de los encargados en realizar acciones de conservación usaron “siempre” o “usualmente” publicaciones científicas a la hora de crear planes de manejo. En cuanto a los participantes que dijeron no basarse en la literatura para asistir en la toma de decisiones, la mayoría (65%) argumentaron que el proceso de buscar y acceder a esta literatura consume demasiado tiempo. La mayoría (60%) también manifestó que leer esta información consume demasiado tiempo.

Además, los programas de conservación rara vez se someten a una evaluación externa, la cual debería incluir una revisión de los logros del proyecto y de la eficiencia del mismo (Kleiman *et al.* 2000). Lamentablemente, la información científica necesaria para diseñar planes de manejo efectivos es insuficiente para muchas poblaciones salvajes (Gilchrist *et al.* 2005). Esta información es naturalmente difícil de obtener cuando el objeto de estudio es poco abundante

o permanece sólo en lugares de difícil acceso para los humanos. Métodos de estudio indirectos (como análisis isotópicos o genéticos) presentan una solución a la hora de abordar investigaciones afectadas por dichos problemas, ya que posibilitan el uso de muestras obtenidas de forma no invasiva. Esto permite conseguir una mejor representatividad de la población y responder interrogantes demográficos importantes a la hora de diseñar planes de manejo adecuados con el menor gasto posible de recursos, en muchos casos complementando estudios directos. Los estudios de genética utilizando muestras obtenidas de forma no invasiva son especialmente atractivos debido a que pueden ser usados por un lado para reemplazar metodologías tradicionales aumentando el tamaño muestral (estimaciones de abundancia, proporción de sexos, capacidad de dispersión, uso de corredores de fauna, etc.), y por otro permiten obtener información que no puede ser obtenida fehacientemente por otros métodos (paternidad, depresión por endogamia, estructuración poblacional, hibridación, definición de unidades de manejo), de gran importancia en el manejo de poblaciones. El uso de estas “muestras no invasivas” es particularmente útil para científicos trabajando en los campos de biología de la conservación y etología, ya que mediante el uso de estas técnicas no se necesita crear un disturbio sobre los animales (Taberlet y Luikart 1999). De esta manera no se generan en los individuos situaciones de estrés que puedan afectar su supervivencia o reproducción, y en teoría no se inducen cambios en el comportamiento de los mismos (ej.: trampafilia, trampafobia, cambio en el área de acción) como se haría en estudios tradicionales que requieran captura y liberación.

La posibilidad de definir Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) mediante el uso de análisis genéticos también permite generar estrategias de conservación más efectivas a largo plazo. De acuerdo a Moritz (1994), una ESU puede ser vista como un conjunto de poblaciones que ha estado históricamente aislado y por lo tanto podría haber acumulado mutaciones que le brindan un potencial evolutivo diferente al resto de la especie. El autor además sugiere un criterio metodológico para la delimitación de estas unidades, planteando que las mismas “deben ser recíprocamente monofiléticas para ADN mitocondrial y mostrar divergencia significativa en las frecuencias alélicas de loci nucleares”. Como explican Alpers *et al.* (2004), acciones de manejo basadas en categorías subespecíficas que no reflejan la diversidad genética subyacente son, en el mejor de los casos, ineficientes. Por otro lado, en el peor escenario pueden reducir el potencial evolutivo de la especie. Los autores desvelaron una separación histórica para el antílope ruano (*Hippotragus equinus*) entre las poblaciones del oeste de África y las del resto del continente, sugiriendo que las prácticas de manejo deberían mantener la integridad de esta separación y evitar la homogeneización de la especie, de cara a mantener la diversidad genética, y con ella, el potencial evolutivo.

Un ejemplo interesante de la utilidad de los estudios genéticos en la conservación puede encontrarse en Westemeier *et al.* (1998). Los autores realizaron un estudio a largo plazo de una

pequeña población relictual de gallo de las praderas grande (*Tympanuchus cupido*), separada por aprox. 640 km de la población más cercana. Usando datos colectados durante un periodo de 35 años, los autores encontraron una marcada disminución en el tamaño poblacional, coincidente con un descenso en la fertilidad (huevos fértiles incubados/total de huevos), en el éxito de eclosión y en la diversidad genética. Luego de este periodo, se introdujeron 271 aves provenientes de tres grandes poblaciones mucho más diversas genéticamente que la población relictual en cuanto a heterocigosidad media y diversidad alélica. Los autores reportaron una restitución de la fertilidad y éxito de eclosión en los años posteriores a la translocación, sin encontrar una relación entre este incremento y las condiciones ambientales. Por lo tanto, concluyeron que un aumento en la variación genética es un factor crítico para mantener la viabilidad de poblaciones de esta especie.

Conservación del urogallo: consideraciones ecológicas y comportamentales de importancia en el manejo de la especie

Tetraónidas

Dentro de la familia Tetraonidae (orden Galliformes), a veces considerada una subfamilia dentro de Phasianidae, se reconocen generalmente 18 especies repartidas en siete géneros, todas ellas presentes únicamente en el Hemisferio Norte (Storch 2000). Presentan varias adaptaciones que les permiten sobrevivir en climas fríos sin la necesidad de migrar al sur durante el invierno boreal, como por ejemplo la presencia de plumas cubriendo los tarsos y fosas nasales, y el desarrollo durante el invierno de plumas o escamas especiales a los lados de los dedos que les permiten caminar sobre la nieve sin hundirse (Storch 2007). Se encuentran entre las especies de aves más estudiadas a nivel global, probablemente por su valor cinegético de gran importancia cultural en numerosos países (Storch 2007) y el comportamiento reproductivo conspicuo que presentan varias de estas especies. Nidifican en el suelo, la incubación es realizada exclusivamente por las hembras, y a excepción de una especie (el lagópodo común, *Lagopus lagopus*), la protección y el acompañamiento de las crías también son llevadas a cabo sólo por las hembras (Storch 2007). La dieta de los adultos está fuertemente basada en materia vegetal, para lo cual cuentan con intestinos particularmente largos y ciegos intestinales bien desarrollados con bacterias simbióticas que les permiten digerir celulosa. Se ha reportado que los ciegos del lagópodo escocés (*Lagopus lagopus scotica*) pueden llegar a alcanzar longitudes cercanas a los 75 cm (Moss y

Parkinson 1972), y los del urogallo (*Tetrao urogallus*) pueden sobrepasar el metro de longitud (McNab 1973). Las crías son precoces, dejando el nido poco después de eclosionar y alimentándose principalmente de invertebrados durante las primeras semanas de vida (del Hoyo *et al.* 1994).

Entre las diferentes estrategias reproductivas que podemos hallar en las aves, la poliginia de lek ha atraído en gran medida la atención de ecólogos, etólogos y biólogos evolutivos a pesar de que se encuentra presente tan solo en una pequeña proporción de especies (aproximadamente el 1,5%, Jiguet *et al.* 2000). En este sistema de apareamiento, los machos realizan despliegues comportamentales en áreas de cortejo más o menos definidas (“leks”), las cuales no parecen brindar ningún tipo de beneficio económico a las hembras (como territorio, alimento, nido, etc.). Además los machos no brindan recursos como cuidado parental, lo que presenta un escenario interesante para el estudio de los procesos que gobiernan la selección sexual: debido a que el único aporte reproductivo aparente son sus gametas (Reynolds y Gross 1990; Jiguet *et al.* 2000), se simplifica el número de factores involucrados en el modelado de estos procesos. Comúnmente se asume que los rasgos que eligen las hembras constituyen *a priori* una desventaja para la supervivencia de los machos debido a que su presencia implica un mayor costo energético y puede hacer a los machos más conspicuos o vulnerables frente a los depredadores, por lo que la presencia de estos rasgos, su grado de desarrollo y buen estado constituirían una “señal honesta” de la calidad de los machos que los portan (Zahavi 1975).

Si bien no todas las especies de tetraónidas muestran este sistema de apareamiento, el mismo es particularmente común en esta familia, encontrándose presente en la mitad de las especies (Wiley 1974; Storch 2007). De hecho, el vocablo Sueco *lek* (“jugar”) fue introducido al Inglés para dos especies de tetraónidas, el urogallo (*Tetrao urogallus*) y el gallo lira (*Lyrurus tetrrix*), por Llewelyn Lloyd en su libro “*The Game birds and wild fowl of Sweden and Norway*” (1867), denotando la temporada de apareamiento o “*lek-tid*” y el sitio donde ocurre el mismo o “*lek-ställe*” en estas especies.

En este sistema de apareamiento, las hembras muestran un elevado grado de consenso en cuanto al macho que eligen (Kirkpatrick y Ryan 1991). Debido a la gran inequidad en el éxito reproductivo de los machos, se considera a este sistema de apareamiento como una “poliginia extrema” (Rowe y Houle 1996; Jiguet *et al.* 2000; Lebigre *et al.* 2014). El tamaño poblacional efectivo (*sensu* Wright 1931), definido como el tamaño de una población teórica ideal cuya composición genética se vería afectada por procesos aleatorios en el mismo modo en que sucede en la población real que se está estudiando, disminuye cuanto mayor sea la varianza en el éxito reproductivo (Frankham 1995). Por lo tanto, el tamaño efectivo de una población que presenta poliginia de lek se

presupone mucho menor que el tamaño poblacional censal, aún menor que el esperable para una población poligínica sin leks (Stiver *et al.* 2008).

La elección continuada de un rasgo masculino por parte de las hembras debería disminuir la variabilidad genética del rasgo en cuestión, y así remover también los beneficios de la elección (Kirkpatrick y Ryan 1991; Pomiankowski y Møller 1995; Tomkins *et al.* 2004). En otras palabras: si todos los machos llegan a ser similares y aportan genes igualmente buenos a las crías, ¿cuál es el sentido de elegir uno de ellos? Sin embargo la elección persiste, en lo que se conoce como la “paradoja del lek”. Se han formulado varias explicaciones sobre cómo puede mantenerse la variabilidad en estas especies, resumidas y clasificadas en dos grandes grupos por Tomkins *et al.* (2004): selección fluctuante (el fenotipo óptimo escogido varía en espacio o tiempo) y balance entre mutación y selección (la primera creando variación genética tan rápido como la misma se pierde debido a selección). También se ha propuesto que las hembras podrían elegir machos genéticamente disímiles a ellas, produciendo así descendencia genéticamente diversa (ver Reid 2007), pero esto no explicaría el alto grado de consenso que las hembras de ciertas especies presentan a la hora de escoger pareja. Más recientemente, se introdujo la idea de “captura genética” para explicar tanto la retención de variabilidad poblacional como la elección persistente de ciertos caracteres que presentan los machos (Rowe y Houle 1996; ver también Andersson 1982; Bonilla *et al.* 2016): si los ornamentos elegidos por las hembras dependen de la condición física de los machos, y esta última no depende sólo de unos pocos genes sino de gran parte del genoma, existe la posibilidad de que se mantenga variabilidad genética entre los machos. Al estar involucrados numerosos genes, habría muchas combinaciones alélicas diferentes que permitirían tener una buena condición física, y muchos sitios donde pueden ocurrir mutaciones que compensen la pérdida de alelos. Aún más interesantes son los estudios que sugieren que los machos más elegidos por las hembras (es decir, aquéllos que tendrían mejor condición física) presentan un mayor grado de heterocigosidad (Brown 1997; Kotiaho *et al.* 2008). Por ejemplo, Reid *et al.* (2005) estudiaron el comportamiento reproductivo de gorriones melódicos (*Melospiza melodia*) en la isla de Mandarte, Canadá. En esta especie las hembras muestran preferencia por machos que tienen repertorios de canto más extensos. Los autores usaron el coeficiente de endogamia del macho como medida de su heterocigosidad y encontraron que el tamaño del repertorio está inversamente relacionado con el coeficiente de endogamia del macho en cuestión. Así, al preferir machos con un repertorio mayor, las hembras estarían indirectamente seleccionando aquéllos con un mayor grado de heterocigosidad. El próximo paso fue determinar qué efectos trae esta selección sobre la descendencia. Por lo tanto, en continuación a este estudio, Reid *et al.* (2006) hallaron evidencia de que la heterocigosidad de padres está correlacionada con la heterocigosidad de los hijos, lo cual no es un resultado directamente esperable ya que la heterocigosidad de un

individuo no es un componente genético aditivo (i.e. no es heredable). Los autores explican este fenómeno de la siguiente manera: los gorriones más endogámicos tienen posiblemente ancestros nativos de la isla donde se realizó el estudio, lo que los hace estar en promedio más relacionados con potenciales parejas de ese lugar. Contrariamente, los gorriones más exogámicos tienen posiblemente un inmigrante como ancestro reciente y por lo tanto poseen alelos inmigrantes, lo que los hace estar relativamente menos emparentados con el resto de parejas potenciales de la isla, y en consecuencia tienen más probabilidad de producir descendencia con mayor grado de heterocigosidad (ver también Reid 2007). De esta manera, al mostrar preferencia por machos con repertorios más extensos, de forma indirecta también estarían seleccionando aquellos menos relacionados con ellas, manteniendo de este modo la variabilidad genética de la población. Así, la estructuración genética de una especie (en este caso vista como el grado de diferenciación entre la población de aves nativas de la isla y la población fuente de inmigrantes) puede influenciar los beneficios genéticos de la selección sexual (Reid 2007).

Con respecto a las tetraónidas cabe destacar el trabajo de Höglund *et al.* (2002), donde se encontró que los machos de *L. tetrax* que nunca lograron tomar posesión de un territorio en algún lek tuvieron una heterocigosidad media significativamente menor que la de los machos que fueron observados en un territorio durante al menos una estación reproductiva. Más aún, de entre los machos que lograron obtener un territorio, los que estuvieron en posiciones cercanas al centro del lek y tuvieron mayor longevidad fueron aquéllos que tuvieron un d^2 medio significativamente mayor (este estadístico mide qué tan diferentes entre sí son los alelos de cada locus, ver por ejemplo Slate *et al.* 2000). Por lo tanto, siendo que las hembras prefieren aparearse con machos que ocupan territorios centrales en el lek (Höglund y Lundberg 1987), los machos con mayor d^2 tuvieron mayor éxito de cópulas a lo largo de su vida. Si bien los autores no pueden determinar si existe una desventaja de los machos con menor diversidad genética o si por el contrario hay una ventaja de los machos con mayor diversidad genética, bajo este escenario estaría operando una selección normalizadora, teniendo más éxito los machos heterocigotas, y en particular aquellos con gran diferencia entre sus alelos. Estos estudios que indican una preferencia de las hembras por machos con mayor heterocigosidad podrían poner fin a la paradoja del lek, ya que esta elección continuada no actuaría en detrimento del mantenimiento de variabilidad genética poblacional.

Es claro que la diversidad genética juega un rol particularmente importante en la biología de las especies con este tipo de comportamiento reproductivo, ya que interviene en cuestiones como la elección de pareja y el acceso a mejores territorios de cópula. Por lo tanto, el estudio y mantenimiento de estos niveles de diversidad son acciones de vital importancia para asegurar su supervivencia, y deben ser contempladas en proyectos que apunten a su conservación.

Urogallo (Tetrao urogallus)

El urogallo es la especie de mayor tamaño entre las tetraónidas (del Hoyo *et al.* 1994; Gjerde y Wegge 1989; Suter *et al.* 2002) y la que presenta mayor dimorfismo sexual (Figura 1, Moss 1986; Wegge y Rolstad 1986; Thiel *et al.* 2005), no sólo en coloración sino también en tamaño (los machos adultos pesan 3,9 - 4,3 kg mientras que las hembras no superan los 2 kg, del Hoyo *et al.* 1994). Se trata de aves no migratorias que habitan típicamente (aunque con excepciones) bosques de coníferas, en particular *Pinus sylvestris* (Moss 1986) y la especie ha sido tradicionalmente considerada como especialista en lo que respecta al hábitat, seleccionando bosques en etapas maduras (Swenson y Angelstam 1993; Storch 1997a; Storch 2002; Segelbacher *et al.* 2003a). Esta marcada asociación del urogallo con bosques de coníferas presenta como excepción a la población que habita la Cordillera Cantábrica, en el norte de España, y la presente en el sur de los montes Urales, aunque esta última podría estar extinta (Storch 2007). Los requerimientos específicos del hábitat, tanto en composición como en extensión, hacen que el urogallo sea utilizado como una especie paraguas para la biodiversidad, guiando acciones de manejo forestal (Suter *et al.* 2002; Pakkala *et al.* 2003).



Figura 1. Urogallos (*Tetrao urogallus*) congregados en una zona de cortejo (Foto: Ical).

De distribución exclusivamente Euroasiática (Figura 2), el rango longitudinal actual de la especie se extiende desde el este de Siberia hasta España, siendo la distribución continua entre Siberia y Escandinavia, y fragmentada en centro y oeste de Europa, donde está limitada a zonas montañosas (Storch 2007). Esta distribución se debe principalmente a que los bosques que habitan se distribuyen de manera discontinua, en gran parte debido a la modificación del hábitat mediante diversas actividades de origen antrópico, que han llevado a un aumento en el grado de aislamiento entre parches y a una constricción del rango de distribución, produciendo numerosas extinciones locales (Segelbacher *et al.* 2003a; Storch 2007). La especie se encuentra incluida en la Lista Roja de especies amenazadas en varios países del oeste y centro de Europa (Storch 2000; 2007). Por ejemplo, el urogallo está clasificado como “En peligro” en Suiza, y “En peligro crítico” en Alemania, Austria, Polonia y el Reino Unido (Głowaciński 2001; Eaton *et al.* 2005; Thiel *et al.* 2005). En España ha sido recientemente clasificado como “En situación crítica” por el Comité de Flora y Fauna Silvestres. Varias poblaciones se han reportado extintas en Suiza (Sachot *et al.* 2006), Bulgaria (Petrov 2008), Polonia y Alemania (ver Zawadzki y Zawadzka 2012). En cuanto a las Islas Británicas, se piensa que el urogallo se extinguió en Irlanda alrededor del año 1790 (Simms 1971), mientras que en Inglaterra la extinción se produjo un siglo antes (Cramp y Simmons 1980). El último registro de urogallos nativos de Escocia fue en 1784 (Pennie 1950), estando la especie representada en la actualidad por individuos descendientes de aves translocadas en el s. XIX (Moss *et al.* 2000).

La especie presenta tasas de dispersión bajas, y es considerada como altamente sedentaria (Liukkonen-Anttila *et al.* 2004; ver Storch 1995). Los machos muestran mayor fidelidad al territorio que las hembras (Castroviejo 1975; del Hoyo *et al.* 1994). Generalmente se realiza sólo una puesta de 7 a 11 huevos entre fines de Abril y principios de Junio, en una depresión poco profunda del suelo. Los pichones son nidífugos y capaces de volar a las 2-3 semanas, alcanzando su tamaño adulto a los 2-3 meses de edad (del Hoyo *et al.* 1994).

Se han reconocido 12 subespecies de urogallo en base a caracteres morfológicos (del Hoyo *et al.* 1994; ver también Duriez *et al.* 2007). Sin embargo, los análisis genéticos indican que esta subdivisión es excesiva (Duriez *et al.* 2007). Estudios recientes de ADN mitocondrial agrupan a todas las subespecies en dos linajes claramente diferenciados, el linaje “Sur” y el “Boreal”. La población de urogallos que habita la Cordillera Cantábrica, reconocida con estatus de subespecie (*Tetrao urogallus cantabricus*) es la única que está compuesta exclusivamente por el linaje mitocondrial “Sur”. Ambos linajes contactan en los Pirineos (frontera entre España y Francia), centro y sur de los Alpes Dináricos (Albania, Bosnia-Herzegovina, Croacia, Eslovenia, Montenegro y Serbia), Montes Cárpatos (Austria, República Checa, Eslovaquia, Polonia, Ucrania, Rumania, Serbia y norte de Hungría), Montes Ródope (Bulgaria y Grecia) y las Montañas Rila (Bulgaria). El resto del rango de

la especie está compuesto exclusivamente por aves del linaje “Boreal” (Duriez *et al.* 2007; Rodríguez-Muñoz *et al.* 2007; Segelbacher y Piertney 2007; Bajc *et al.* 2011; Klinga *et al.* 2015).

Las extinciones locales y descensos poblacionales han sido vinculados a un gran número de actividades antrópicas, enumeradas por Ilse Storch (2007). En primer lugar, la pérdida y deterioro de hábitat sería el factor preponderante en el descenso poblacional, como lo es para la mayoría de las especies en peligro (Brooks *et al.* 2002; Hanski 2011). En el caso de los urogallos, la relevancia de este factor es aún mayor debido a que los individuos requieren de grandes extensiones de terreno, además de ser especialistas en cuanto a las características del hábitat. Estas modificaciones incluyen desde la deforestación hasta la instalación de cercados eléctricos, los cuales han demostrado ser particularmente perjudiciales en el Reino Unido. Ciertas actividades humanas (como cambios en el uso del suelo y vacunación de animales silvestres contra la rabia) han beneficiado la proliferación de especies predatoras del urogallo (Kurki *et al.* 1997; Baines *et al.* 2004). La caza también ha tenido importancia histórica en el declive poblacional del urogallo. Actualmente, pese a la prohibición o regulación de la caza en cuanto a cantidad y periodo del año, se asume que un importante número de bajas son producidas fuera de los marcos legales, por lo que se hace necesario reforzar el cumplimiento de estas leyes (Rojas *et al.* 2011). La contaminación a gran escala y los disturbios por actividades recreativas (esquí, ciclismo, montañismo, etc.; Thiel *et al.* 2011) son vistos como problemas para la supervivencia de la especie. Se ha sugerido que ciertas actividades antrópicas pueden también disminuir la cantidad de insectos, en particular larvas de lepidópteros, los cuales son ítems alimentarios de gran importancia para los pichones (Wegge y Kastdalen 2008). El alto grado de fragmentación característico de las poblaciones del oeste y centro de Europa también se menciona como amenaza a la supervivencia, debido a la mayor vulnerabilidad que genera frente a procesos estocásticos (Szczepański *et al.* 2019). El cambio climático obviamente podría tener efectos adversos sobre los urogallos debido a sus hábitos especialistas (Moss *et al.* 2001; Summers *et al.* 2004). Por ejemplo, se espera bajo este escenario una reducción en el área cubierta por los bosques de coníferas con los cuales la especie tiene una estrecha relación (Anderson 1991). Cabe destacar también el estudio de Moss (1986), quien encontró una correlación positiva entre la mortalidad de los pichones y la abundancia de precipitaciones que los mismos experimentan. Esta correlación parece estar asociada al tamaño de los adultos: en especies que alcanzan un mayor tamaño como adultos, los pichones deben crecer más rápido y necesitan más recursos. Por lo tanto, debido a la mayor tasa de crecimiento en las especies que alcanzan mayor tamaño, las mismas son más sensibles a las condiciones climáticas que experimentan durante su crecimiento. Así, el hecho de que los urogallos sean las tetraónidas más grandes los haría más susceptibles a las condiciones climáticas en comparación con otras especies de la misma familia.

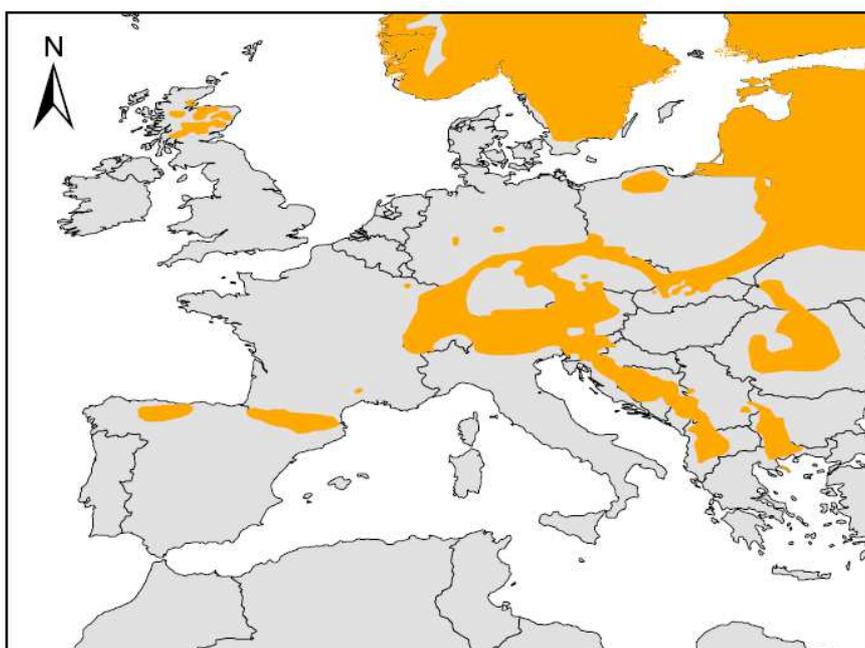


Figura 2. Distribución global del urogallo (BirdLife International 2016) y detalle de la distribución en el centro y oeste de Europa (mapa realizado con datos proporcionados por BirdLife International y NatureServe 2015).

Las acciones tendientes a conservar el urogallo son diversas debido a la gran cantidad de países donde la especie se encuentra. Además, los factores de riesgo varían en importancia a lo largo del rango de distribución. La ampliación del área protegida se establece como una de las medidas principales, además de un manejo forestal que cause menos impacto sobre la especie (Storch 2007).

Según lo expuesto por Pakkala *et al.* (2003), el urogallo posee en Finlandia un importante valor cultural y es considerado como una de las especies más carismáticas, por lo que excluir del área de explotación forestal aquellas zonas que contengan leks es bastante aceptable por los silvicultores. El control de predadores podría resultar en una mejora de la supervivencia del urogallo, aunque esta técnica es impracticable a gran escala y por lo tanto no puede considerarse un abordaje sustentable (Storch 2007). Otras medidas necesarias para disminuir la probabilidad de extinción son la aplicación de programas de monitoreo (poblacional y del hábitat) y de educación/divulgación, destinados principalmente a los propietarios de zonas productivas, silvicultores y asociaciones de turismo (Storch 2007).

La cría en cautiverio y posterior liberación ha sido realizada en países del centro de Europa en numerosas ocasiones, ya sea para suplementar poblaciones silvestres o reintroducir la especie en zonas donde se extinguió (ver Seiler *et al.* 2000). Si bien la práctica es común, no ha sido exitosa en esta región (Storch 2007; Merta *et al.* 2016). Como resume Storch (2007), sólo en Alemania se liberaron más de 5.000 aves criadas en cautiverio en el periodo comprendido entre la década de 1970 y el año 2007, sin haber logrado en ningún caso establecer una población autosustentable. La autora también menciona que las translocaciones de aves silvestres tampoco cuentan con un éxito considerable. Se ha demostrado además que los urogallos criados en cautiverio tienen intestino y ciegos intestinales más cortos, lo que podría afectar la supervivencia post-liberación (Liukkonen-Anttila *et al.* 2000).

La experiencia de reintroducción en Escocia merece una mención especial. Como fue comentado previamente, la extinción en este país (año 1784, Moss *et al.* 2006) implicó también la extinción definitiva en las islas británicas. Entre 1837 y 1838 se translocaron 65 aves adultas nativas de Suecia (Marshall y Edwards-Jones 1998), a lo cual siguieron otras translocaciones de individuos provenientes de Noruega, Finlandia y Austria (Moss *et al.* 2006). Si bien esta experiencia fue exitosa, logrando el establecimiento de una nueva población (se estima que la misma llegó a unos 20.000 individuos en la década de 1970, Moss *et al.* 2006), la misma ha estado disminuyendo dramáticamente durante los últimos 40 años. Se estima que entre el censo poblacional del periodo 1992-94 y el de 1998-99 hubo un descenso poblacional del 51% (Wilkinson *et al.* 2002), quedando alrededor de 1.000 urogallos a comienzos de este siglo, por lo que la especie se encuentra en la Lista Roja de aves del Reino Unido (Moss *et al.* 2000).

Una medida de suma importancia para la conservación de la especie, especialmente en las poblaciones pequeñas y cada vez más aisladas del centro y oeste de Europa, consiste en mantener la conectividad entre demos. En el caso del urogallo, se ha documentado que el flujo genético

entre partes de una metapoblación altamente fragmentada en los Alpes previene la aparición de una importante diferenciación genética (Segelbacher y Storch 2002).

Como se expuso en el apartado anterior, la diversidad genética puede jugar un rol particularmente importante en la biología de esta especie al intervenir en cuestiones como la elección de pareja y el acceso a mejores territorios de cópula, y existen mecanismos operando en escalas evolutivas que permiten mantener dicha diversidad. Hablando ahora de escalas de tiempo ecológicas y teniendo en cuenta el pequeño tamaño efectivo potencial que presentan las poblaciones de urogallo en el oeste y centro de Europa, pueden plantearse varias hipótesis no excluyentes para explicar cómo podría retenerse la variabilidad genética en una población/metapoblación. Una primera es que niveles funcionales de diversidad sean mantenidos por acción de las hembras, ya que se ha demostrado que éstas presentan mayor capacidad de dispersión que los machos en *T. urogallus* y otras especies con poliginia de lek (Herzog y Keppie 1980; Small y Rusch 1989; Caizergues y Ellison 2002; Liukkonen-Anttila *et al.* 2004; Segelbacher *et al.* 2008). Sin embargo, Mäki-Petäys *et al.* (2007) no encontraron evidencia que soporte la existencia de dispersión diferencial entre ambos sexos de *T. urogallus* en su estudio llevado a cabo en el norte de Finlandia. Por lo tanto, es posible que diferentes poblaciones de la misma especie presenten patrones de dispersión distintos, ya sea debido al paisaje en el cual habitan o a diferencias en su historia evolutiva (ej. diferentes subespecies pueden tener comportamientos distintos).

Otras dos hipótesis para explicar, al menos en parte, cómo se mantienen los niveles de diversidad genética en una población de este tipo son: 1) la existencia de un importante recambio genético con cierta periodicidad, donde un macho que gana posesión de la zona central del lek, convirtiéndose en dominante, sea genéticamente diferente al macho que ocupó ese lugar con anterioridad (ver Lebigre *et al.* 2008); y 2) el aporte genético debido a los machos subordinados que logran copular con algunas de las hembras que visitan el lek. Esta última hipótesis no ha sido puesta a prueba para el urogallo, pero sí en una especie cercanamente emparentada (*L. tetrrix*). En la misma se encontró que, si bien las cópulas que ocurren en un lek están ampliamente sesgadas a favor del macho de mayor jerarquía, también existen cópulas realizadas por otros machos (especialmente cuando la cantidad de machos por lek es alta, Alatalo *et al.* 1992). Sin embargo, en varias especies que presentan poliginia de lek, se ha encontrado que los machos subordinados son genéticamente similares al macho dominante, por lo que su aporte a mantener la diversidad genética sería pequeño (Höglund *et al.* 1999). Esta similitud entre machos encontrados en un mismo lek se explica por una estrategia evolutiva de “*kin selection*”: debido a que los leks con más machos atraen más hembras (Alatalo *et al.* 1991; Alatalo *et al.* 1992; Höglund y Alatalo 1995; Kokko y Lindström 1996), los machos subordinados estarían ganando en fitness indirecto al realizar cortejos y aumentar así

el número de hembras que visitan el lek, lo cual a su vez aumenta el éxito reproductivo del macho dominante con el cual están emparentados (Höglund *et al.* 1999). Bajo este modelo de asociación espacial entre machos emparentados, se esperaría que ambas hipótesis mencionadas (importante recambio genético entre machos que ganan posesión del lek y/o aporte genético de machos subordinados) tengan poco efecto en el mantenimiento de la variabilidad genética. Por un lado, existiría una baja probabilidad de que machos genéticamente diferentes se sucedan en la zona central del lek (Borecha *et al.* 2017), y por otro los machos subordinados que logran aparearse no aportarían, en promedio, alelos muy diferentes a los del macho dominante. Aquí es necesario aclarar que, si bien se asume que la mayoría de los machos en un mismo lek están cercanamente emparentados, también existe evidencia en contra (Lebigre *et al.* 2008; Bush *et al.* 2010). Nuevamente esta incongruencia podría deberse a que diferentes poblaciones presentan diferentes comportamientos.

Objeto de estudio: el urogallo cantábrico (Tetrao urogallus cantabricus)

Como fue mencionado anteriormente, esta subespecie se encuentra únicamente en la Cordillera Cantábrica, en el norte de España, formado el grupo más occidental de urogallos. La población de urogallos más cercana habita los Pirineos, en la frontera España-Andorra-Francia, a 300 km de la población cantábrica (Castroviejo 1975; Storch *et al.* 2006). La Cordillera Cantábrica está ubicada en el norte de España, y se extiende en dirección Este-Oeste aproximadamente paralela a la costa norte. Las elevaciones crean una barrera climática, donde el norte presenta clima oceánico mientras el sur tiene clima continental. Los bosques están caracterizados por un alto nivel de fragmentación, principalmente por deforestación histórica de origen antrópico (García *et al.* 2005). En la actualidad, los bosques dentro del área de la cordillera se encuentran restringidos a las montañas; por consiguiente, el hábitat de los urogallos está confinado a altitudes de entre 800 y 1.700 m.s.n.m. En ese rango de altitud, los bosques (principalmente hayedos de *Fagus sylvatica*, robledales de *Quercus petraea* y *Q. pyrenaica*, y abedulares de *Betula pubescens*), junto con algunas plantaciones de coníferas (principalmente *Pinus sylvestris*, que también aparece en un par de fragmentos autóctonos relictuales) se encuentran dispersos dentro de una matriz que incluye brezos (*Erica spp.*, *Calluna vulgaris*), escobas y piornos (*Genista spp.*, *Cytisus spp.*), praderas, canchales y zonas rocosas, carreteras y autopistas, pueblos, y lugares con actividades industriales entre las que destacan las minas de carbón a cielo abierto. La subespecie se distribuye en un rango de aproximadamente 1.700 km² (Storch *et al.* 2006), donde la fragmentación es intensa (Duriez *et al.* 2007). Presenta

una marcada diferencia con el resto de la especie en cuanto a sus características genéticas, morfológicas, ecológicas y alimentarias. Por ejemplo, se trata de la única subespecie que habita en bosques puramente caducifolios (Storch 2007), dependiendo durante el invierno de hojas de acebo, yemas de haya común, brotes de arándano y frondes de helecho (Blanco-Fontao *et al.* 2010), mientras que las otras subespecies se alimentan casi exclusivamente de acículas de coníferas durante esta estación (Rodríguez y Obeso 2000; ver Storch 2007). Las fuentes de alimento que utiliza el urogallo cantábrico son menos abundantes y están más dispersas que las acículas de coníferas, por lo que el gasto energético en la búsqueda de alimento es mayor en el primer caso (Rodríguez y Obeso 2000). Como explican Blanco-Fontao *et al.* (2010), esta diferencia en hábitat y alimentación trae aparejadas diferencias comportamentales: mientras que los urogallos cantábricos obtienen el 65% de sus recursos forrajeando en el suelo, los otros grupos lo hacen sólo en un 14-43%, dependiendo mucho más del forrajeo en árboles. Los autores proponen también que estas particularidades podrían hacer al urogallo cantábrico más vulnerable frente a la competencia con mamíferos herbívoros. Por otro lado, el riesgo de predación podría ser mayor para la subespecie. Estas peculiaridades sugieren que el urogallo cantábrico podría tener adaptaciones al hábitat atípico en el que se encuentra (González *et al.* 2010). En cuanto a la morfología, se ha descrito al urogallo cantábrico como poseedor de una coloración más clara y un pico más pequeño que las otras subespecies (Castroviejo 1975).

Se asume que la Península Ibérica actuó como uno de los principales refugios glaciales de Europa durante el Cuaternario (Taberlet *et al.* 1998). Durante este periodo, los urogallos ibéricos habrían divergido de los del resto de Europa, generándose zonas de contacto secundario al retroceder la capa de hielo (Rodríguez-Muñoz *et al.* 2007; Bajc *et al.* 2011). Como se mencionó previamente, las características genéticas de la subespecie cantábrica son también particulares: se trata de la única subespecie constituida enteramente por individuos del linaje mitocondrial “Sur”. Si bien algunos haplotipos que aparecen en la Cordillera Cantábrica también aparecen en los Pirineos, esta última se considera una zona de contacto secundario entre los dos clados mitocondriales existentes (Rodríguez-Muñoz *et al.* 2007; Duriez *et al.* 2007).

Todas estas características que separan al urogallo cantábrico del resto de la especie le confieren el estatus de Unidad Evolutivamente Significativa, ya que demuestran sus singularidades genéticas y sus adaptaciones particulares al hábitat en el que se encuentra (Rodríguez-Muñoz *et al.* 2007; Duriez *et al.* 2007). Sus características únicas resaltan la importancia de su conservación para mantener el potencial adaptativo de la especie, particularmente en un contexto de cambio climático donde otras poblaciones podrían perder los bosques de coníferas donde habitan. A pesar de su relevancia, la subespecie no ha sido estudiada tan extensamente como otras. Paradójicamente, se trata también de la única subespecie

que se encuentra globalmente “En peligro” de acuerdo a los criterios de la UICN (Storch *et al.* 2006; Storch 2007). Incluso luego de la prohibición de su caza en la región, varios estudios han mostrado que el declive poblacional se mantuvo, con disminución severa tanto en rango de distribución como en abundancia (Quevedo *et al.* 2006; Bañuelos y Quevedo 2008). Como exponen Pollo *et al.* (2005), la subespecie cantábrica ha sufrido una reducción del 66% en el área de ocupación durante un periodo de 22 años (1981-1982 a 2000-2003), y una reducción del 70% en el número de machos que se detectaron realizando cortejos.

Actualmente se distinguen dos núcleos poblacionales principales, uno en el este y otro en el oeste de la Cordillera Cantábrica, con un nivel de conexión bajo, presente únicamente en las laderas norte de la cordillera (Pollo *et al.* 2003; 2005). El descenso en el tamaño poblacional ha sido más drástico en el núcleo del este y la zona central, por lo que se ha recomendado focalizar los esfuerzos de conservación a las poblaciones del núcleo oeste (Pollo *et al.* 2003).

En España, la caza del urogallo está prohibida desde 1979, aunque la intensa presión a la que fue sometida la población especialmente durante los 30 años anteriores (principalmente caza de machos en el lek) y la caza ilegal posterior a la prohibición condujeron a una marcada disminución en la variabilidad genética (Rodríguez-Muñoz *et al.* 2015).

Entre los años 2010 y 2016 inclusive se llevó a cabo el proyecto LIFE+ Urogallo Cantábrico, sin duda el proyecto más ambicioso enfocado en la conservación de esta subespecie. En el marco de este proyecto se destacan actividades de modificación de hábitat, captura y radiomarcaje de individuos de ambos sexos, y el establecimiento del Centro de Cría y Reserva Genética del Urogallo Cantábrico, a partir del cual se realizaron reintroducciones. El resumen final del proyecto puede encontrarse en https://www.lifeurogallo.es/sites/default/files/resumen_ejecutivo_web.pdf.

Las acciones de modificación de hábitat tuvieron un especial énfasis en realizar desbroces selectivos con el fin de crear condiciones favorables para el crecimiento de arándanos (*Vaccinium myrtillus*), bajo los supuestos no investigados de que: 1) la presencia de esta planta es esencial para la supervivencia del urogallo, y 2) una menor disponibilidad de arándanos es un factor parcialmente responsable del declive poblacional del urogallo (Rodríguez-Muñoz *et al.* 2017). Otras acciones incluyeron la remoción de especies que podrían causar bajas por predación: captura y translocación de ejemplares de marta (*Martes martes*, 34 individuos), y caza de 2.781 jabalíes (*Sus scrofa*) y 981 zorros (*Vulpes vulpes*).

Con respecto al centro de cría, el resumen final del proyecto informa una baja tasa de supervivencia: de 204 huevos que se informan (sin contar los incubados en el año 2009, Figura 3), 170 fueron aptos para ser incubados. De los mismos, eclosionaron 56 (33% de éxito de incubación, no 35% como se informa en el resumen final) de los cuales sobrevivieron 23. Sin embargo, no se hicieron modificaciones en la temperatura de incubación hasta el año 2016 (último año del proyecto).

El éxito de reintroducción fue nulo: de los cinco ejemplares liberados, todos ellos hembras, cuatro murieron al poco tiempo y al quinto se le perdió el rastro. En su totalidad, el proyecto no logró los objetivos propuestos. No hay registro de que las acciones de mejora de hábitat hayan tenido un impacto positivo en la población de urogallos (Rodríguez-Muñoz *et al.* 2017). La dieta suministrada resulta llamativa, ya que incluyó ramas de coníferas, manzanas, huevo duro y diferentes tipos de pienso según la edad de los individuos (www.lifeurogallo.es/sites/default/files/plan-funcionamiento-centro-cria-urogallo-cantabrico.pdf). Como se mencionó previamente, otras subespecies de urogallo criadas en cautiverio han demostrado tener intestino y ciegos intestinales más cortos, además de hígado más liviano, que los encontrados en individuos salvajes; y por lo tanto los animales criados en cautiverio deberían recibir una dieta lo más similar posible a la de los animales silvestres, sobre todo si se espera realizar reintroducciones (Liukkonen-Anttila *et al.* 2000).

En coincidencia con lo expuesto en el comienzo de esta tesis, los resultados que podrían considerarse “poco exitosos” muestran una tendencia a no ser informados en detalle por los involucrados en la gestión de fauna. Los porcentajes anuales de éxito de incubación y supervivencia hasta la madurez no aparecen reflejados en los informes técnicos del proyecto LIFE+ Urogallo Cantábrico (<https://www.lifeurogallo.es/es/descargas/documentos-tecnicos>). Los datos anuales sobre éxito de incubación y supervivencia de los pichones sólo se encuentran accesibles en modo de declaraciones a la prensa, y en muchos casos no hay datos (Figura 3).

Desde el campo de la biología de la conservación se han lanzado críticas a las acciones llevadas a cabo por el proyecto LIFE+ Urogallo Cantábrico. Las mismas se debieron principalmente a que las acciones realizadas carecían de una base científica (Rodríguez-Muñoz *et al.* 2017).

Según el director del programa, Ignacio Torres, en el marco del proyecto no era posible hacer investigación. Sin embargo, de ser así no se explica la captura y radiomarcaje de seis machos informada en el resumen final del proyecto. El director también sugiere una diferencia entre gestores y científicos en el enfoque que los mismos tienen frente a la conservación, asegurando que “*Los gestores no nos podemos permitir no hacer nada, un científico sí se lo puede permitir, o se puede permitir diseñar marcas para vallas A, B y C para probar en cuáles hay menos colisiones (...) pero los gestores no podemos permitirnos una colisión de urogallo en el tipo de valla A para confirmar que las recomendables son B y C*” (fuente: periódico El Confidencial, 01 de enero de 2018, https://www.elconfidencial.com/tecnologia/ciencia/2018-01-01/crisis-urogallo-espana-extincion-proyecto-life_1499562/). Sin embargo, como se trató previamente y como se evidencia a partir de esta experiencia, las decisiones apresuradas sin contemplar los pocos conocimientos que sí se encuentran disponibles sobre la especie, y una falta de replanteos cuando las acciones no muestran

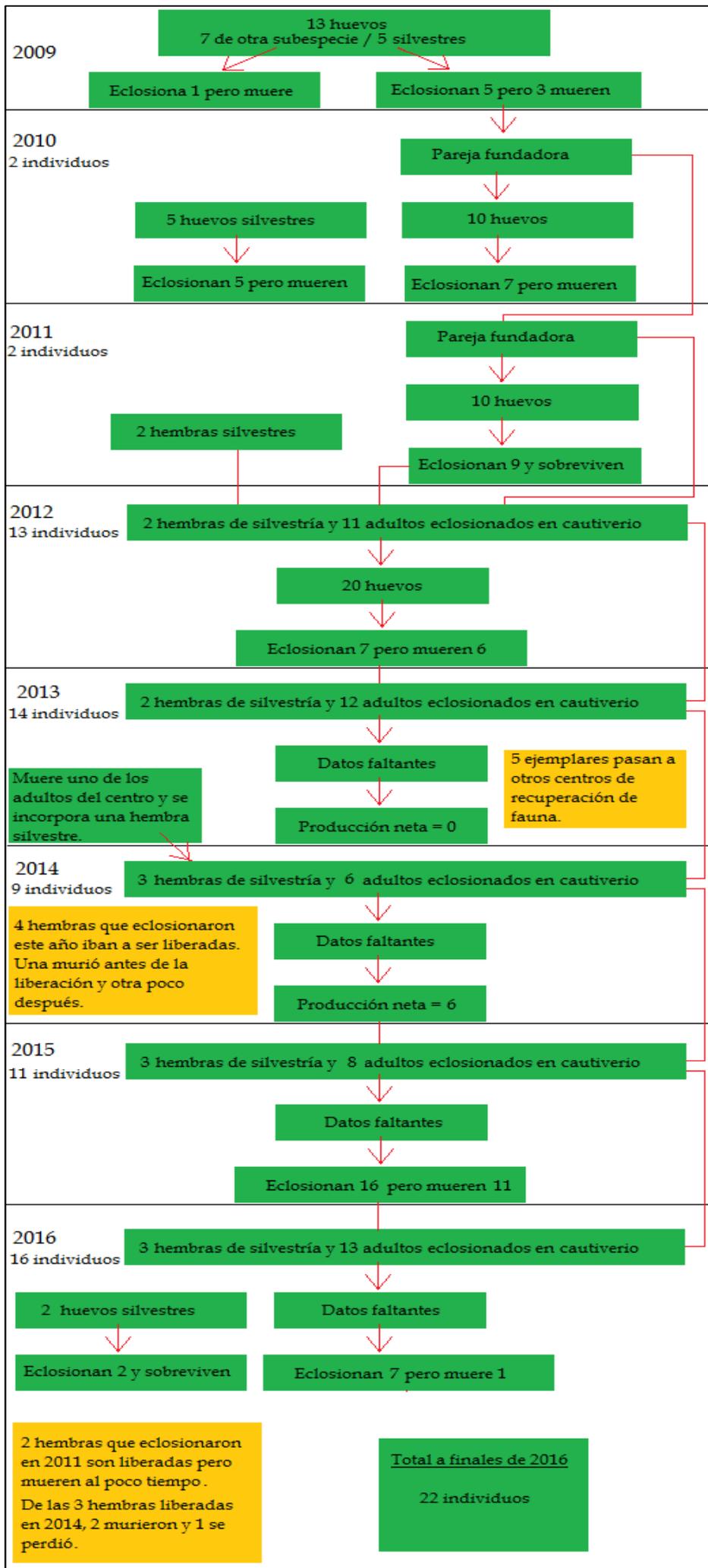


Figura 3. Resumen del proyecto LIFE+ Urogallo Cantábrico en lo referente a las actividades del centro de cría.

ser acertadas, pueden tener peores efectos que la acción más lenta pero con planeamiento y consideración de experiencias previas.

En el mes de julio de 2018, la Conferencia Sectorial de Medio Ambiente aprobó la creación de un nuevo centro de cría de urogallo cantábrico, esta vez en la comunidad de Castilla y León. Teniendo en cuenta la experiencia previa, puede concluirse que estas acciones de manejo deben estar respaldadas por lo que conocemos sobre la biología de la especie, y evitar así los errores del plan de cría y suplementación poblacional anterior.

Esta tesis tiene como objetivo estudiar la población de urogallos cantábricos que se encuentra en la zona oeste de la Cordillera Cantábrica, en un área que se supone óptima para la subespecie (Quevedo *et al.* 2006) y donde la estabilidad poblacional es mayor (Pollo *et al.* 2003), de forma tal de recaudar información aplicable en proyectos de conservación. En particular, se trabajó para definir la cantidad de unidades de manejo presentes en el área de estudio (Capítulo 1), la influencia del grado de heterocigosidad sobre la territorialidad de los individuos (Capítulo 2), la organización social en los leks durante la temporada de cría, en función del grado de parentesco (Capítulo 2), y la influencia de la configuración del paisaje sobre la variabilidad genética (Capítulo 3).

Capítulo 1

Distribución de la variabilidad genética

El presente capítulo corresponde a una extensión de la publicación “Conservation in the southern edge of *Tetrao urogallus* distribution: Gene flow despite fragmentation in the stronghold of the Cantabrian capercaillie”. Fameli, A., Morán-Luis, M., Rodríguez-Muñoz, R., Bañuelos, M. J., Quevedo, M., y Mirol, P. (2017). *European journal of wildlife research*, 63(3), 58.



Introducción

Al aumentar el grado de modificación antrópica de los hábitats naturales, más y más especies se enfrentan a condiciones ambientales desfavorables como la contaminación, los pesticidas y la pérdida de hábitat (Bijlsma y Loeschcke 2012). Esta última no sólo afecta la tasa de supervivencia y reproducción de los individuos, sino que también afecta negativamente el potencial evolutivo de la especie cuando poblaciones grandes sufren procesos de fragmentación, convirtiéndose en un conjunto de grupos aislados con un flujo génico limitado entre ellos. A medida que aumenta el grado de aislamiento, estos grupos pequeños son más proclives a perder variabilidad genética por acción de la deriva génica y los endocruzamientos. La diversidad genética favorece la adaptación y supervivencia a cambios ambientales, y existe también una correlación positiva entre la heterocigosidad y el fitness (Ehrlich 1988; Lande 1988; Ralls *et al.* 1988; Wayne *et al.* 1991; Hedrick y Miller 1992; Saccheri *et al.* 1998; Reed y Frankham 2003; Spielman *et al.* 2004). Por lo tanto, preservar la variación genética es una de las prioridades al trabajar en conservación de taxa amenazados (Frankham y Ralls 1998; Hedrick 2004). La subdivisión de una población puede también ocurrir naturalmente, especialmente cerca del límite de distribución de la especie, donde los hábitats favorables pueden estar dispersos (Lawton 1993; Samis y Eckert 2007). Como consecuencia, estas poblaciones periféricas pueden mostrar niveles de variabilidad genética que son históricamente más bajos que aquéllos de las poblaciones centrales (por una menor conexión con otras zonas y/o por efecto fundador), lo que las hace más vulnerables a la extinción (Lesica y Allendorf 1995; Eckert *et al.* 2008). Paradójicamente, se ha sugerido que estas poblaciones son de alta prioridad en conservación ya que pueden presentar características genéticas y fenotípicas únicas (Lesica y Allendorf 1995; Ehrlich 1988) dado que usualmente ocupan hábitats atípicos para la especie (Fraser 2000).

Pocos estudios han evaluado el estado del urogallo cantábrico en términos de variabilidad genética y los factores que determinan la distribución espacial de la misma. Alda *et al.* (2011) y Vázquez *et al.* (2012) investigaron la estructura genética de la subespecie incluyendo muestras colectadas a lo largo de todo su rango de distribución, pero estos estudios llegaron a conclusiones diferentes (ver Discusión). Elucidar estos patrones de diversidad genética a gran escala es importante, pero también lo es evaluar la estructura genética a escala fina para determinar las variables que afectan la distribución de la diversidad genética a un nivel local y de paisaje, así como también los patrones de flujo genético y recolonización de parches de hábitat adecuados. Es probable que los esfuerzos de manejo de hábitat tengan impacto a esta escala, lo que significa que arrojar claridad sobre los procesos que causan estructuración genética local puede ser útil para diseñar planes de conservación efectivos. Las dinámicas poblacionales que ocurren a pequeña escala

son influenciadas por factores sutiles, y a menudo su relevancia no puede ser predicha de antemano. De acuerdo a Taylor *et al.* (1993), la conectividad entre parches de hábitat es vital para mantener procesos ecológicos que ocurren a la escala de paisaje y deben ser considerados junto con la fisionomía y composición del paisaje. Debido a las distancias de dispersión relativamente cortas que se asumen para los urogallos (media <10 km para juveniles, <2 km para adultos, valores resumidos por Storch y Segelbacher 2000 a partir de una amplia revisión bibliográfica), sería de esperar que la configuración del paisaje afecte ampliamente el flujo génico de la especie incluso a pequeña escala. Movimientos a distancias mucho mayores (Borchtchevski y Moss 2014 citan distancias de 1000 km) han sido registrados sólo esporádicamente, por lo que podría asumirse que la escala de paisaje local es el mayor determinante de la dispersión y flujo génico.

El objetivo de este capítulo es explorar de manera exhaustiva, y a escala fina, la estructura y diversidad genética de los urogallos cantábricos que habitan la parte oeste de la Cordillera Cantábrica, un área que contiene algunos de los hábitats de mejor calidad para el urogallo (Quevedo *et al.* 2006). Este enfoque nos permite hacer inferencias sobre los factores que pueden estar afectando el flujo génico y la conectividad en tiempos ecológicos, precisamente en un área considerada como una fortaleza para la subespecie. Aquí los urogallos ocupan parches de bosque montanos, separados mayormente por una matriz de brezales (*Erica vagans*) y arbustos de genista (*Genista spp.*), con áreas de baja calidad concentradas en el fondo de los valles donde la actividad humana es más intensa. La hipótesis central es que la fragmentación de los bosques y las modificaciones por actividad humana en el área, combinadas con el sistema de apareamiento poligínico de leks que presentan los urogallos (del Hoyo *et al.* 1994), ha creado un escenario de unidades demográficas separadas con bajo flujo génico entre ellas.

Materiales y métodos

Muestreo

El estudio se llevó a cabo en la parte oeste de la Cordillera Cantábrica. Esta área corresponde al límite occidental del rango de distribución de la especie (del Hoyo *et al.* 1994). Se revisaron 62 leks de los cuales se sabía por registros previos que había presencia de urogallos, distribuidos en cinco zonas: Reserva Integral de Muniellos (de aquí en más, “Muniellos”), Hermo, Leitariegos, Degaña y Alto Sil (Figura 1). Estas cinco zonas están separadas unas de otras por valles donde las modificaciones antrópicas alcanzan niveles más altos (y constituyen posibles barreras al flujo génico).

Varias rutas pasan por los valles principales que separan a Hermo, Degaña, Muniellos y Alto Sil. Áreas deforestadas abundan principalmente entre las zonas de Hermo y Degaña, donde se encuentra también una mina de carbón a cielo abierto. La distancia lineal mínima entre leks pertenecientes a zonas adyacentes estuvo entre los 3,13 y los 4,16 km. El criterio para esta partición en cinco zonas de muestreo fue realizado considerando que un ave no pueda pasar de una zona a otra sin atravesar un valle.

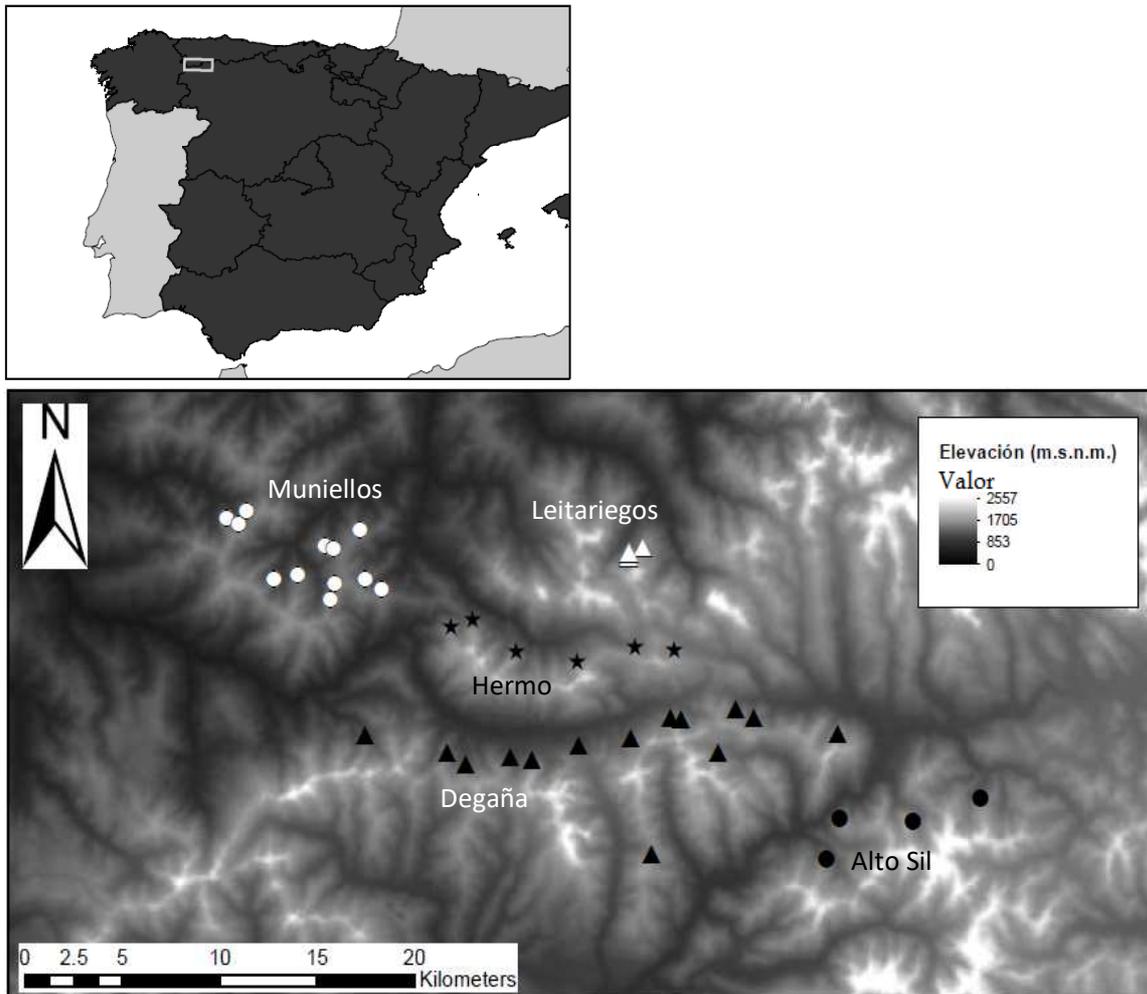


Figura 1. Área de estudio mostrando los 62 leks que fueron visitados durante los periodos de muestreo. Estos leks fueron clasificados en cinco zonas de muestreo diferentes: Muniellos (círculos blancos), Hermo (estrellas negras), Leitariegos (triángulos blancos), Degaña (triángulos negros) y Alto Sil (círculos negros). Tonos grises más oscuros representan menor altitud. El criterio para esta división en zonas fue realizado en base a la hipótesis de que las áreas de baja altitud (valles donde las modificaciones antrópicas son más severas) actúan como barreras al flujo génico.

Se colectaron muestras de materia fecal en los leks y área circundante durante la temporada de cortejo (Abril a Junio) de los años 2009, 2010 y 2011, incluyendo 71% de todos los leks conocidos en el área de estudio con datos de ocupación de los años 2005 a 2007 (datos brindados por la Agencia de Medio Ambiente de Asturias). Muestrear en este periodo aumenta la eficiencia para detectar individuos con un menor esfuerzo de muestreo, debido a que las aves tienden a congregarse alrededor de las áreas de cortejo. Se registró la localización de cada muestra colectada mediante un GPS ($\pm 5\text{m}$), y cada una de ellas fue introducida en un vial con sílica-gel o en una bolsa de papel, secada en estufa y almacenada hasta su análisis genético. Se seleccionaron las muestras a incluir en el análisis de acuerdo a su posición, tamaño y aspecto en un intento por maximizar la cantidad de individuos diferentes genotipados, siguiendo un método similar al usado por Bellemain *et al.* (2007). Cuando dos muestras presentaron un tamaño similar y parecieron haber estado en el campo por un periodo de tiempo similar, se decidió incluir a ambas sólo si la distancia entre ellas era de 25 m o más.

Trabajo de laboratorio

Se extrajo ADN de las muestras utilizando QIAamp Stool Mini Kits (QIAGEN), siguiendo instrucciones del fabricante con pequeños cambios en el protocolo (3 ml de buffer ASL y media tableta de InhibitEX por muestra). Se usó un locus de microsatélite (TUT1, Segelbacher *et al.* 2000) para probar el éxito de las extracciones de ADN: cuando una muestra falló en amplificar mediante dos PCRs independientes, la misma fue excluida del estudio. Las muestras fueron genotipadas utilizando nueve loci de microsatélites previamente diseñados para *Tetrao urogallus* (TUD2, TUD4, TUD5, TUT1 y TUT3, Segelbacher *et al.* 2000) y *Lyrurus tetrrix* (TTD2, TTD6, BG10 y BG15, Caizergues *et al.* 2001; Piertney y Höglund 2001). Cada cebador *forward* estuvo marcado con un fluorocromo en su extremo 5'. Las PCRs fueron realizadas en un volumen final de 10 μl conteniendo 1 \times Taq buffer [750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20]; 3 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada nucleótido; 4,2 pmol de cada cebador; 0,108 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA; 0,335 unidades de *Taq* polimerasa (Fermentas) y 2 μl de ADN. Las reacciones de amplificación estuvieron compuestas por una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguida de 35 ciclos cada uno de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 54°C (para BG10 y BG15) o 59°C (para el resto de los microsatélites), y 45 segundos a 72°C. La extensión final se realizó a 72°C durante 5 min. Se incluyó un control negativo en cada PCR. El genotipo final para cada muestra se obtuvo mediante un consenso basado en los resultados de varias PCRs independientes (método de multitubos, Navidi *et al.* 1992; Taberlet *et al.* 1996). Se asignó un genotipo heterocigota sólo luego de obtener un

resultado claro en dos oportunidades independientes, y se asignó un genotipo homocigota sólo luego de tres resultados claros (método modificado a partir de lo publicado por Frantz *et al.* 2003). Esto produjo que cada microsatélite se amplificara de dos a siete veces por muestra. Se genotiparon 212 muestras colectadas en 2009, 192 muestras colectadas en 2010 y 285 muestras colectadas en 2011 (total: 689 muestras). Los genotipos fueron leídos independientemente por tres investigadores utilizando los programas MegaBACE Fragment Profiler 1.2 (Amersham Biosciences) y GeneMarker v 1.3 (Soft Genetics LLC). En caso de haber diferencias en el genotipado realizado por diferentes investigadores, se alcanzó un consenso mediante repetición de la amplificación o eliminando el locus en cuestión para esa muestra.

Al genotipar muestras en multiplexes, es importante tener en cuenta que una señal de gran intensidad en un canal puede producir una señal falsa en otro canal (i.e. introgresión en la señal), conduciendo así a lecturas incorrectas. Se revisaron los cromatogramas para descartar la presencia de dichas introgresiones en las señales. Además, se estimó la calidad de las muestras mediante el método propuesto por Miquel *et al.* (2006). Este proceso se realiza comparando el genotipo obtenido en cada amplificación individual con el genotipo consenso; si el primero coincide con el segundo, se otorga un valor de 1 a la amplificación. En caso contrario (debido a la presencia de un alelo falso, falla en la amplificación, patrón extraño en la cromatografía, etc.) la amplificación individual recibe un valor de 0. Al promediar estos valores se obtiene un estimativo del éxito de genotipado correcto para el microsatélite en cuestión en esa muestra particular. Promediando para todos los microsatélites de la muestra, se obtiene un valor indicativo de la calidad de la misma.

La identificación del sexo de las muestras se realizó mediante la amplificación de un intrón del gen CHD1. Este gen está localizado en los cromosomas sexuales, y presenta un tamaño diferente dependiendo de si se trata de la variante del cromosoma Z o W. Se usaron los cebadores PU y P8mod, diseñados por Pérez *et al.* (2011). El cebador *forward* incluyó una marca fluorescente y los productos fueron analizados siguiendo el mismo protocolo usado para los microsatélites (i.e. un mínimo de dos PCRs independientes para asignar un genotipo heterocigota, y un mínimo de tres PCRs independientes para asignar un genotipo homocigota), obteniendo fragmentos sexo-específicos de 192 y 218 pb para el cromosoma Z y W, respectivamente.

Estadística descriptiva

Se realizó una primera ronda de análisis para identificar todos los individuos diferentes en el conjunto de muestras, usando la función *Regroup Genotypes* en el programa GIMLET, version 1.3.3 (Valière 2002). Aunque este programa generalmente funciona bien, puede a veces agrupar muestras

que tienen genotipos diferentes. Además, la forma en que muestra los genotipos dentro de un grupo es de difícil lectura cuando existen loci con datos faltantes. Por lo tanto, se compararon los resultados obtenidos mediante GIMLET con aquéllos obtenidos mediante el programa GENALEX v. 6 (Peakall y Smouse 2006). Por experiencia personal, este programa es más proclive a cometer errores, agrupando muestras que son en realidad diferentes, pero tiene la ventaja de crear un archivo de salida que permite comparar con facilidad los genotipos de las muestras y detectar así dichos errores. De este modo, combinar ambos programas permitió evaluar la precisión de los agrupamientos realizados y corregir cualquier error que pudiera haber ocurrido durante el proceso. Se incluyeron sólo aquéllas muestras que alcanzaron un genotipo consenso en al menos seis de los nueve microsatélites. Se calculó la probabilidad de identidad teórica ($P_{(ID)}$, Paetkau *et al.* 1995) y la probabilidad de identidad entre hermanos ($P_{(ID)sib}$, Evett y Weir 1998; Waits *et al.* 2001). Estas métricas permiten estimar la probabilidad de que dos individuos de la población presenten por azar el mismo genotipo multilocus para el grupo de microsatélites analizado, lo que generaría un error al asumir que varias muestras con el mismo genotipo multilocus pertenecen al mismo individuo cuando en realidad provienen de individuos diferentes. La probabilidad de error real se encuentra entre la $P_{(ID)sib}$ y la $P_{(ID)}$, siendo la $P_{(ID)sib}$ mayor que la real debido a que se calcula en base a hermanos (los cuales tienen mayor probabilidad de presentar el mismo genotipo multilocus). Siguiendo un enfoque conservador, se consideró a la $P_{(ID)sib}$ como representativa de la probabilidad de error real y se evaluó si la misma alcanzó un valor menor a 0,01 (umbral propuesto por Waits *et al.* 2001) usando el programa GIMLET. Dado que también se incluyeron muestras con genotipo consenso en siete u ocho loci, se revisó si estas combinaciones de microsatélites estuvieron también por debajo del umbral propuesto. Se incluyeron también aquéllas muestras con genotipo consenso en sólo seis loci, cuando el genotipo multilocus fue único (notar que en este caso no tiene sentido calcular probabilidad de identidad, ya que la misma se usa para evaluar que muestras con el mismo genotipo puedan pertenecer a diferentes individuos).

Los individuos representados por más de una muestra fueron asignados a una posición espacial correspondiente al centroide de la distribución de sus muestras. Se calcularon desviaciones de las proporciones de equilibrio H-W para todos los microsatélites utilizando el programa ARLEQUIN versión 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Problemas relacionados con la presencia de alelos nulos, fallo de amplificación en alelos de gran tamaño, o “tartamudeo” en la señal (presencia de picos producidos por amplificaciones incompletas de los fragmentos) fueron abordados con el programa MICRO-CHECKER versión 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004), usando el intervalo de confianza de 95% ajustado por Bonferroni. Estos errores son independientes de la calidad de la muestra y no se relacionan con el trabajo realizado en el laboratorio, sino con la identidad de los fragmentos

a amplificar (su secuencia y el tamaño relativo de los alelos que se presentan juntos en un individuo heterocigota). La riqueza alélica neta para cada zona de muestreo fue calculada con MICROSATELLITE TOOLKIT (Park 2001), y también se estimó la riqueza alélica rarefaccionada mediante la prueba implementada en HP-RARE 1.0 (Kalinowski 2005), que corrige por el efecto de diferencias en el tamaño muestral. El desequilibrio por ligamiento entre loci fue evaluado mediante el uso del programa ARLEQUIN, fijando un valor alfa de 0,01 y corrigiendo por el método de Bonferroni. Se estimó la presencia de errores de genotipado usando el programa GIMLET. Estos errores sí se relacionan con el trabajo realizado en el laboratorio y la calidad de las muestras usadas. Este procedimiento se basó en la selección al azar de 100 muestras para cada locus.

Variación temporal vs. espacial de las frecuencias alélicas

El diseño de muestreo puede crear fuertes desviaciones en la inferencia de estructuración poblacional (Schwartz y McKelvey 2009). Comparar individuos de diferentes estaciones de muestreo puede llevar a conclusiones erróneas, incluso cuando las muestras sólo están espaciadas por un periodo de un año (Florin y Höglund 2007). Dado que este estudio incluye muestras de tres años consecutivos, se evaluó la posibilidad de que la variación genética temporal pudiera evitar la detección de una variación genética espacial. Siguiendo el método de Florin y Höglund (2007) y Fedy *et al.* (2008), se computaron los F_{ST} pareados comparando datos de la misma área de muestreo entre los diferentes años de estudio. Para ello se utilizó el programa ARLEQUIN, 10 mil permutaciones y el valor de alfa corregido por Bonferroni.

Estructuración genética

Se calcularon los coeficientes de endogamia (F_{IS}) y se realizaron comparaciones entre poblaciones mediante el índice F_{ST} utilizando el programa ARLEQUIN. También se realizaron diferentes pruebas geográficamente explícitas mediante ALLELES IN SPACE (Miller 2005). Como una primera aproximación para cuantificar el patrón espacial de variación genética, se realizó un Análisis del Índice de Agregación Alélica con 10.000 permutaciones para poner a prueba la hipótesis de que la distribución de cada alelo en cada locus difiere significativamente de aquella esperada por distribución al azar, ya sea porque la distribución real es agregada o uniforme. Se corrieron pruebas de Mantel incluyendo la totalidad de los individuos y también para machos y hembras por separado, utilizando el mismo programa y efectuando 10.000

permutaciones. Se realizó también una Interpolación del Paisaje Genético con el mismo programa de manera separada para machos, hembras, y para el conjunto total de individuos, con el objetivo de visualizar patrones de diversidad genética y explorar la posibilidad de que existan barreras al flujo génico. Se usaron las dos redes de conectividad diferentes que pueden ser hechas con el programa: la red basada en ubicaciones pareadas (que compara cada individuo con todos los demás) y la red basada en la triangulación de Delaunay (la cual sólo compara cada individuo con aquéllos a su alrededor). Se representó el nivel de diferenciación genética entre individuos usando las distancias genéticas crudas. Los resultados se superpusieron a un mapa del área de estudio utilizando DIVA-GIS v. 7.5.0 (<http://www.diva-gis.org/>).

Se utilizaron dos métodos Bayesianos de asignación para evaluar la posibilidad de agrupamiento genético en el set de datos. STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) se corrió para $K = 1$ a 11, con 10 corridas por K , y un *burn-in* de un millón de pasos seguido por 3 millones de iteraciones. Se utilizó un modelo de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas, usando la opción LOCPRIOR y repitiendo el análisis sin esta opción, dejando el resto de los parámetros en su configuración default (infiriendo alfa y usando un valor de lambda igual a 1,0). Usando la opción LOCPRIOR, las muestras fueron clasificadas en las cinco zonas de muestreo y los tres individuos que aparecieron en más de una zona fueron asignados a la categoría "migrantes". Se repitió el análisis, esta vez infiriendo también el parámetro lambda. Los resultados fueron resumidos con STRUCTURE HARVESTER v. 0.6.94 (Earl y vonHoldt 2012). Se estimó la convergencia de las corridas realizadas para el mismo valor de K usando CLUMPAK (Kopelman *et al.* 2015). Para evaluar de manera explícita las discontinuidades en la distribución de muestras, se utilizó el programa TESS v.2.3.1 (Chen *et al.* 2007), el cual hace uso de las coordenadas geográficas de los individuos como *priors*. Todas las corridas con este programa se llevaron a cabo usando un parámetro de interacción espacial de 0,6 (Chen *et al.* 2007; Tau *et al.* 2017); el cual representa la fuerza de la autocorrelación espacial. Primero, se realizó una prueba para decidir qué modelo de mezcla se ajusta mejor a los datos: el autorregresivo condicional (CAR) o el de Besag, York and Mollié (BYM). Para ello se realizaron corridas con $K = 2$ a 10, 10 corridas por K , 4000 iteraciones de *burn-in* y 24.000 iteraciones en total para ambos modelos. El modelo CAR asume que la fracción del genoma de un individuo perteneciente a un grupo particular es una variable autocorrelacionada, lo que significa que los individuos que están geográficamente cercanos entre sí son más similares que aquéllos que se encuentran alejados. El modelo BYM (descrito por Durand *et al.* 2009) extiende el algoritmo usado en el modelo previo, incluyendo las distribuciones espaciales de las proporciones individuales de mezcla como *priors*. En otras palabras, el modelo BYM no sólo asume que las proporciones de mezcla individuales están autocorrelacionadas espacialmente, sino que también incluye otras tendencias espaciales al estimar esta variable. Habiendo decidido cuál es el mejor modelo para los

datos, se lo corrió de $K = 2$ a 10, con 10 réplicas por K , 51.000 iteraciones de *burn-in* y 300.000 iteraciones en total. Como medida de la robustez de la asignación a grupos, se calculó la asignación media de todos los individuos a su grupo más probable (q -hat) como fue hecho por Fedy *et al.* (2008).

Resultados

Estadística descriptiva

De las 683 muestras genotipadas, se eliminaron aquéllas que no llegaron a un mínimo de seis genotipos consenso, aquéllas que tuvieron seis consensos pero su genotipo multilocus no fue único, las que presentaron un índice de calidad menor a 0,625 (Miquel *et al.* 2006), tres muestras para las cuales no se contó con datos de recolección (coordenadas o lek más cercano), dos muestras para las cuales no pudo asegurarse inequívocamente a qué individuo pertenecen (ya que cada una de ellas agrupó con dos conjuntos de muestras), y una muestra que difirió de otra sólo en el locus TUD4 (el menos informativo), quedando así 387 muestras que fueron incluidas en el análisis (56,66% del total de muestras genotipadas). A partir de las mismas se detectó un total de 116 genotipos multilocus diferentes (de ahora en más “individuos”, Tabla 1).

El número promedio de aves por lek fue de 3,94 y el número promedio de machos por lek fue 2,59. La $P_{(ID)sib}$ para el conjunto de nueve loci fue $1,51 \times 10^{-3}$ (Tabla 2), y varió entre $2,62 \times 10^{-3}$ y $7,43 \times 10^{-3}$ para las diferentes configuraciones de loci en casos donde sólo siete u ocho genotipos consenso pudieron ser obtenidos. Estos valores indican que la $P_{(ID)}$ real es considerablemente menor al umbral de 0,01 propuesto por Waits *et al.* (2001).

El número medio de alelos por locus varió entre 3,11 en Leitariegos y 3,89 en Degaña. El método de rarefacción en base a un tamaño mínimo muestral de 10 produjo valores similares de riqueza alélica para todas las zonas de muestreo (Tabla 1). Los loci BG10 y TUT1 mostraron un exceso significativo de homocigotas, mientras que el locus TUD4 tuvo un exceso de heterocigotas ($\alpha = 0,01$; Tabla 2).

MICRO-CHECKER no descartó la posibilidad de alelos nulos y posibles errores de genotipado por “tartamudeo” en los loci BG10 y TUT1. Los loci TUT3, TUD5, BG15 y TTD2 no mostraron evidencia de errores. En los loci restantes (TTD6, TUD4 y TUD2) más de la mitad de los alelos muestreados correspondieron a un mismo tamaño, por lo que no se pudo estimar la probabilidad de error.

Tabla 1. Urogallos detectados en el área de estudio. *AS*, Alto Sil; *D*, Degaña; *H*, Hermo; *L*, Leitariegos; *M*, Muniellos; *N*, número de individuos detectados; *A Neta*, promedio del número de alelos por locus; *A Rar*, riqueza alélica promedio sobre todos los loci calculada mediante HP-RARE (Kalinowski 2005); *Indet*, individuos en los que no se pudo determinar el sexo.

^a Un macho y dos hembras fueron detectados en dos zonas de muestreo y por lo tanto no aparecen representados en la tabla para ninguna de las zonas, pero sí para el total de individuos registrados.

Zona	N				A	
	<i>Individuos</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>Indet</i>	<i>Neta</i>	<i>Rar</i>
<i>AS</i>	18	13	5	0	3,78	3,04
<i>D</i>	47	28	18	2	3,89	2,88
<i>H</i>	18	9	7	1	3,44	3,05
<i>L</i>	6	4	2	0	3,11	2,97
<i>M</i>	24	13	11	0	3,67	2,83
Total	116 ^a	68 ^a	45 ^a	3	Media=3,58	

Se encontró evidencia de desequilibrio por ligamiento para uno de los 36 pares de loci (TUT1-BG10, α corregido por Bonferroni = $2,778 \times 10^{-4}$; $p < 1 \times 10^{-5}$). Por lo tanto, se decidió eliminar el locus TUT1 de las muestras bajo análisis. El número de individuos se mantuvo luego de esta remoción ($n = 116$), y la $P_{(ID)SIB}$ para las muestras con ocho o siete genotipos consenso estuvo nuevamente por debajo del umbral propuesto. Teniendo ésto en cuenta, asumimos que todas las muestras con el mismo genotipo multilocus pertenecen al mismo individuo. Exceptuando tres aves que fueron detectadas en diferentes zonas de muestreo, todas las muestras pertenecientes al mismo individuo fueron halladas agrupadas en el mismo lek o en leks adyacentes. El número promedio de muestras halladas para cada individuo fue 3,34 (DE = 4,24).

La mayoría de los errores de genotipado se debieron a fallo en la amplificación de un alelo (*Allelic Dropout*), que varió entre 0,014 para BG10 y 0,043 para BG15 y TUD5, justificando la necesidad de utilizar un método de multitubos para evitar que estos errores se vean reflejados en el genotipo final (Tabla 2). Todas las hembras mostraron un genotipo homocigota para el locus BG10 (y para el locus TUT1 ligado a él), mientras que entre los machos se encontraron tanto homocigotas como heterocigotas. Estos resultados sugieren que dichos loci se encuentran en el cromosoma sexual Z, para el cual los machos presentan dos copias y las hembras sólo presentan una copia. Esta observación fue corroborada para el locus BG10 por Strzala *et al.* (2015). De este modo se explica que ambos loci hayan mostrado evidencia de alelos nulos y desviación de las proporciones esperadas bajo equilibrio de H-W, con un exceso significativo de homocigotas.

Si bien los genotipos de estos marcadores aportaron información útil al momento de detectar individuos diferentes a partir de las muestras, los mismos no fueron utilizados en los análisis subsiguientes, que asumen herencia mendeliana.

Tabla 2. Diversidad genética en los nueve loci analizados. Tres microsatélites (TUD4, BG10 y TUT1) mostraron desviaciones significativas de las proporciones esperadas para equilibrio de Hardy-Weinberg. T_a , temperatura óptima de *annealing*; n , número de individuos genotipados con éxito para cada locus; A , número de alelos registrados; H_O heterocigosidad observada; H_E , heterocigosidad esperada; $p(HW)$, p-valor de la prueba de equilibrio H-W; $P_{(ID)}$, probabilidad de identidad teórica esperada; $P_{(ID)SIB}$, probabilidad de identidad entre hermanos; D , proporción de PCRs que mostraron fallo en la amplificación de un alelo (*Allelic Dropout*); $A.F.$, proporción de PCRs que mostraron alelos falsos.

<i>Primer</i>	T_a (°C)	n	A	H_O	H_E	$p(HW)$	$P_{(ID)}$	$P_{(ID)SIB}$	D	$A.F.$
TUD4	59	99	3	0,59	0,52	<0,001	3,44e-1	5,78e-1	0,030	0,014
BG10	54	109	6	0,37	0,70	<0,001	1,44e-1	4,34e-1	0,014	0,014
TTD6	59	109	4	0,49	0,59	0,08	2,25e-1	5,10e-1	0,024	0,003
TUD2	59	112	4	0,50	0,51	0,94	2,92e-1	5,69e-1	0,025	0,005
TUT1	59	106	5	0,34	0,72	<0,001	1,30e-1	4,24e-1	0,018	0,011
TTD2	59	113	4	0,65	0,64	0,46	2,02e-1	4,80e-1	0,042	0,011
TUT3	59	112	3	0,56	0,62	0,68	2,21e-1	4,93e-1	0,030	0,009
BG15	54	113	5	0,63	0,63	0,84	2,06e-1	4,86e-1	0,043	0,006
TUD5	59	115	6	0,69	0,71	0,81	1,21e-1	4,26e-1	0,043	0,014
Total			4,44	0,54	0,63		4,71e-7	1,51e-3	0,030	0,010
D.E.			1,13	0,12	0,08				0,011	0,004

Variación temporal vs. espacial de las frecuencias alélicas

La comparación entre años sólo se realizó para dos zonas de muestreo, Degaña (2009: $n=16$, 2010: $n=26$, 2011: $n=24$) y Muniellos (2009: $n=14$, 2010: $n=8$, 2011: $n=14$), ya que en las otras zonas los tamaños muestrales en alguno de los años fueron demasiado bajos. Las comparaciones pareadas de F_{ST} resultaron significativas al contrastar diferentes zonas (excepto entre Degaña 2009 y Muniellos 2011), y no significativas al comparar diferentes periodos de muestreo dentro de la misma zona (α corregido por Bonferroni = 0,0033; Tabla 3). En base a este último resultado, se decidió agrupar a todos los individuos detectados en cada zona de muestreo para realizar los análisis de estructuración poblacional, independientemente del año en el que fueron detectados.

Tabla 3. Comparaciones pareadas de F_{ST} entre años de muestreo para dos zonas de muestreo. Los valores de F_{ST} se encuentran encima de la diagonal, los p valores se encuentran debajo de la diagonal (en negrita los valores significativos). Fijando un α de 0,05 el ajuste de Bonferroni sugiere bajar este valor a 0,0033. M_{2009} , Muniellos muestreo 2009; M_{2010} , Muniellos muestreo 2010; M_{2011} , Muniellos muestreo 2011; D_{2009} , Degaña muestreo 2009; D_{2010} , Degaña muestreo 2010; D_{2011} , Degaña muestreo 2011.

	M_{2009}	M_{2010}	M_{2011}	D_{2009}	D_{2010}	D_{2011}
M_{2009}	---	-0,031	0,008	0,065	0,051	0,059
M_{2010}	0,979	---	0,010	0,097	0,075	0,088
M_{2011}	0,261	0,291	---	0,059	0,048	0,067
D_{2009}	0,002	0,003	0,008	---	-0,008	-0,010
D_{2010}	0,002	0,001	0,003	0,682	---	-0,010
D_{2011}	0,000	0,000	0,000	0,765	0,841	---

Estructuración genética

Para llevar a cabo los análisis que requieren asignar los individuos a una zona de muestreo particular, se excluyeron los tres urogallos detectados en dos zonas de muestreo diferentes y los seis urogallos hallados en Leitariegos, debido a que este tamaño muestral es muy pequeño para ser estadísticamente significativo. No se encontró evidencia de endogamia dentro de las zonas de muestreo (p-valor de F_{IS} varió entre 0,81 y 1 para las diferentes zonas de muestreo). Las comparaciones pareadas de F_{ST} mostraron diferencias significativas entre las zonas de muestreo (α corregido por Bonferroni= 0,008), excepto entre Alto Sil-Degaña y entre Muniellos-Hermo (Tabla 4). El Análisis del Índice de Agregación Alélica mostró que siete genotipos unilocus no siguieron una distribución espacial al azar, sino que se encontraron agregados espacialmente ($\alpha= 0,05$). Cuatro de estos genotipos agregados fueron detectados sólo en Hermo, Degaña, Alto Sil o combinaciones de estas zonas, lo que corresponde a la parte centro-sur del área de estudio (Figura 1). El test de Mantel no reveló una correlación significativa entre distancias geográficas y genéticas, ya sea al incluir a todos los individuos (p= 0,599), sólo los machos (p= 0,138) o sólo las hembras (p= 0,586).

Tabla 4. Comparaciones pareadas de F_{ST} entre zonas de muestreo, juntando los datos provenientes de los tres años de estudio. Los valores de F_{ST} se encuentran encima de la diagonal, los p valores se encuentran debajo de la diagonal (en negrita los valores significativos). Fijando un α de 0,05 el ajuste de Bonferroni sugiere bajar este valor a 0,008. *AS*, Alto Sil; *D*, Degaña; *H*, Hermo; *M*, Muniellos.

	<i>AS</i>	<i>D</i>	<i>H</i>	<i>M</i>
<i>AS</i>	-----	0,018	0,051	0,025
<i>D</i>	0,019	-----	0,035	0,041
<i>H</i>	0,001	0,000	-----	0,023
<i>M</i>	0,007	0,000	0,021	-----

Los resultados de la Interpolación del Paisaje Genético mostraron sólo leves diferencias al comparar mapas obtenidos a partir de los dos tipos de redes de conectividad (la red basada en ubicaciones pareadas y la red basada en la triangulación de Delaunay), siendo muy similares cuando todos los individuos fueron incluidos y cuando sólo se incluyeron los machos (Figura 2 a-d). En estos casos, se encontraron zonas de alta similitud genética entre individuos, tanto dentro de Muniellos (extremo NO del área de estudio) como dentro de Alto Sil y su conexión a la parte más próxima de Degaña (extremo SE del área de estudio). El patrón de distancias genéticas de los machos estuvo en concordancia con las barreras propuestas para el flujo genético (i.e. valles, Figura 2 c y d), excepto por el valle que separa a Degaña y Alto Sil. La zona central del área de estudio muestra altos niveles de diferencias genéticas entre individuos/machos. Al incluir sólo las hembras, las diferencias entre los resultados obtenidos con cada una de las redes fueron mucho más notorias (Figura 2 e y f). Esto indica que calcular las distancias genéticas considerando sólo a las hembras que son vecinas inmediatas (Delaunay) no representa el patrón intrincado de relaciones genéticas entre las hembras presentes en el área. Como rasgos coincidentes entre ambas redes, puede mencionarse una baja diferenciación genética dentro y entre Muniellos y Hermo (patrón opuesto al hallado para los machos). Degaña nuevamente aparece como una zona de grandes diferencias entre individuos, y también se encontraron diferencias notorias entre las hembras halladas juntas en los leks del extremo norte de Muniellos. La zona de Alto Sil aparece separada de Degaña mediante un área de alta diferenciación genética (nuevamente un patrón opuesto al hallado para los machos).

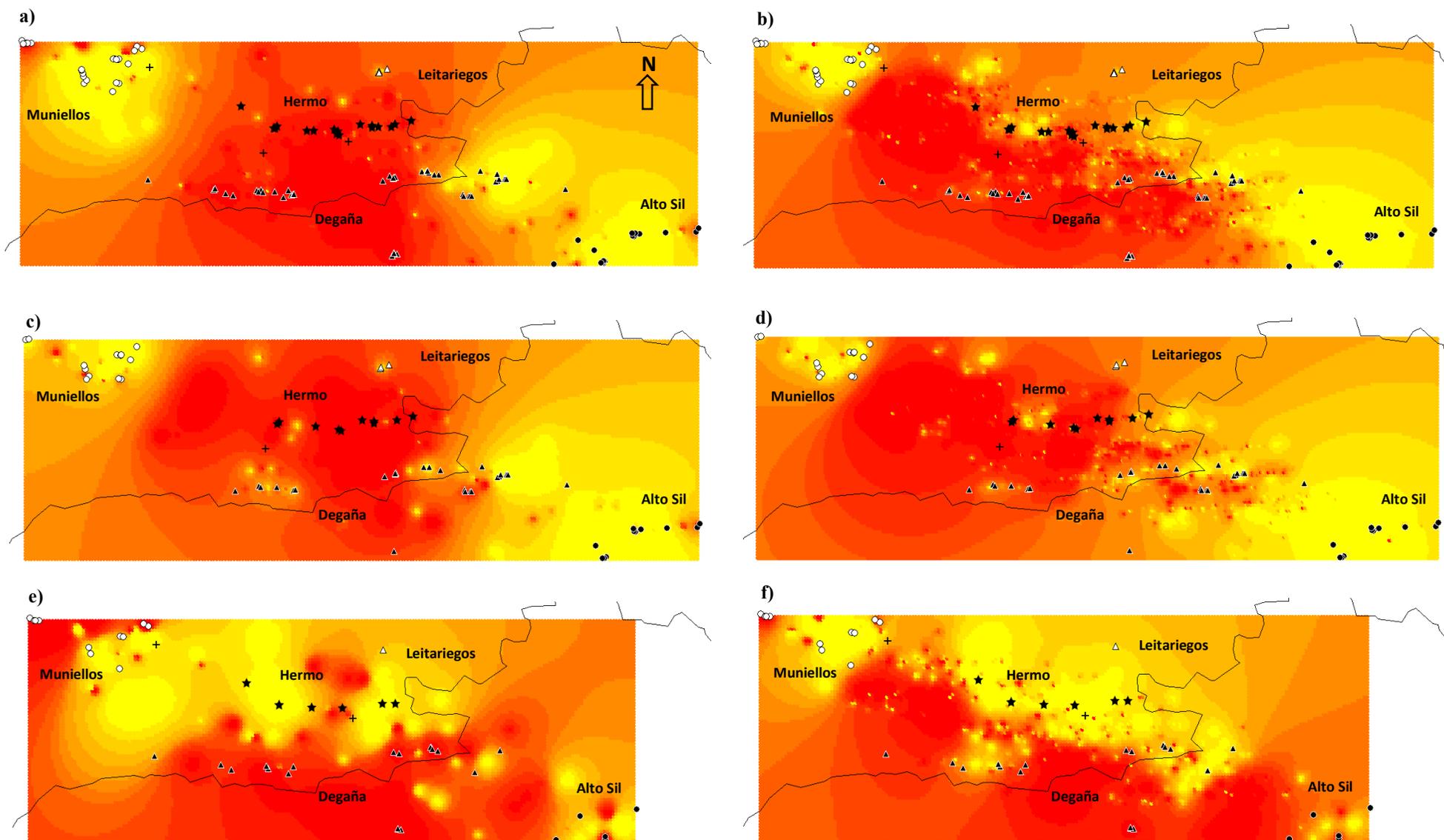


Figura 2. Área de estudio mostrando los resultados de la Interpolación del Paisaje Genético y los individuos detectados en cada zona de muestreo. Cada símbolo corresponde a la posición media de un individuo, teniendo en consideración todas las veces que el mismo fue detectado. Muniellos (círculos blancos), Hermo (estrellas negras), Leitariegos (triángulos blancos), Degaña (triángulos negros) y Alto Sil (círculos negros). Las cruces representan individuos que aparecieron en más de una zona de muestreo. Algunos individuos aparecen sobrepuestos a esta escala y por lo tanto no son evidentes en las figuras. En amarillo: bajos niveles de diferencias genéticas entre individuos. En rojo: altos niveles de diferencias genéticas entre individuos. **a.** Todos los individuos, triangulación de Delaunay; **b.** todos los individuos, ubicaciones pareadas; **c.** sólo machos, triangulación de Delaunay; **d.** sólo machos, ubicaciones pareadas; **e.** sólo hembras, triangulación de Delaunay; **f.** sólo hembras; ubicaciones pareadas.

Los resultados de STRUCTURE mostraron varios valores de subdivisión posibles para la población bajo análisis, ya sea infiriendo el valor de lambda o fijándolo en un valor de 1, con o sin LOCPRIOR (ver Figura 3 para los resultados sin LOCPRIOR). Sin embargo, al analizar los gráficos de barra correspondientes a la pertenencia de los individuos a los diferentes grupos genéticos, no se encontró un patrón que permita inferir estructuración (Figura 4). CLUMPAK mostró que la mayoría de las corridas para cada K convergieron al resultado que se muestra en la Figura 4, y las pocas corridas que convergieron a valores diferentes tampoco presentaron indicios que indiquen estructuración.

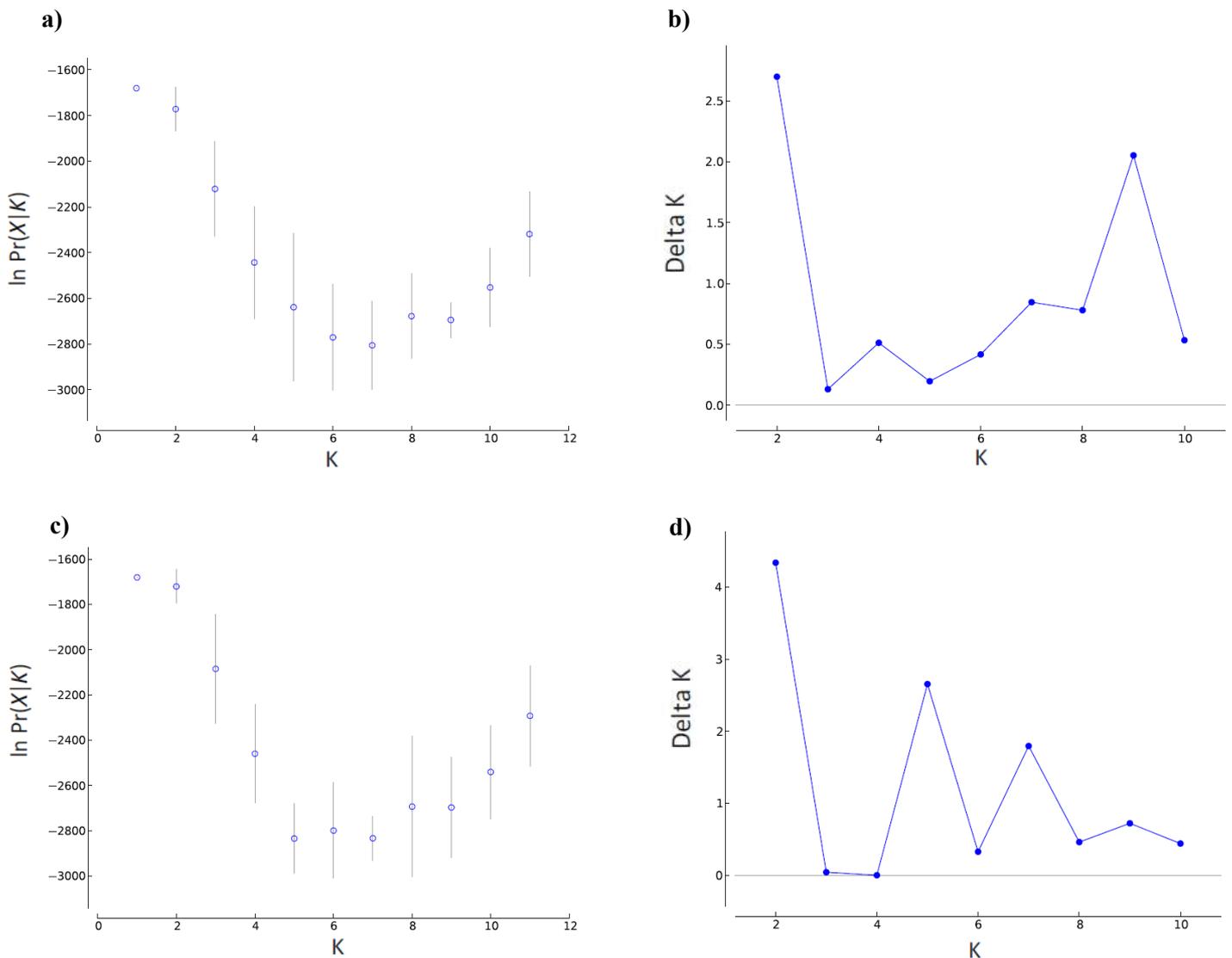


Figura 3. Gráficos usados para decidir el número óptimo de grupos genéticos (K) a partir de los resultados de STRUCTURE, sin LOCPRIOR. **a.** Promedio del logaritmo de verosimilitud $L(K)$ (\pm sd) basado en 10 corridas para cada valor de K (de 1 a 11), infiriendo alfa y fijando lambda en 1. **b.** Delta K de Evanno basado en 10 corridas para cada valor de K (de 1 a 11), infiriendo alfa y fijando lambda en 1. **c.** Promedio del logaritmo de verosimilitud $L(K)$ (\pm sd) basado en 10 corridas para cada valor de K (de 1 a 11), infiriendo alfa y lambda. **d.** Delta K de Evanno basado en 10 corridas para cada valor de K (de 1 a 11), infiriendo alfa y lambda.

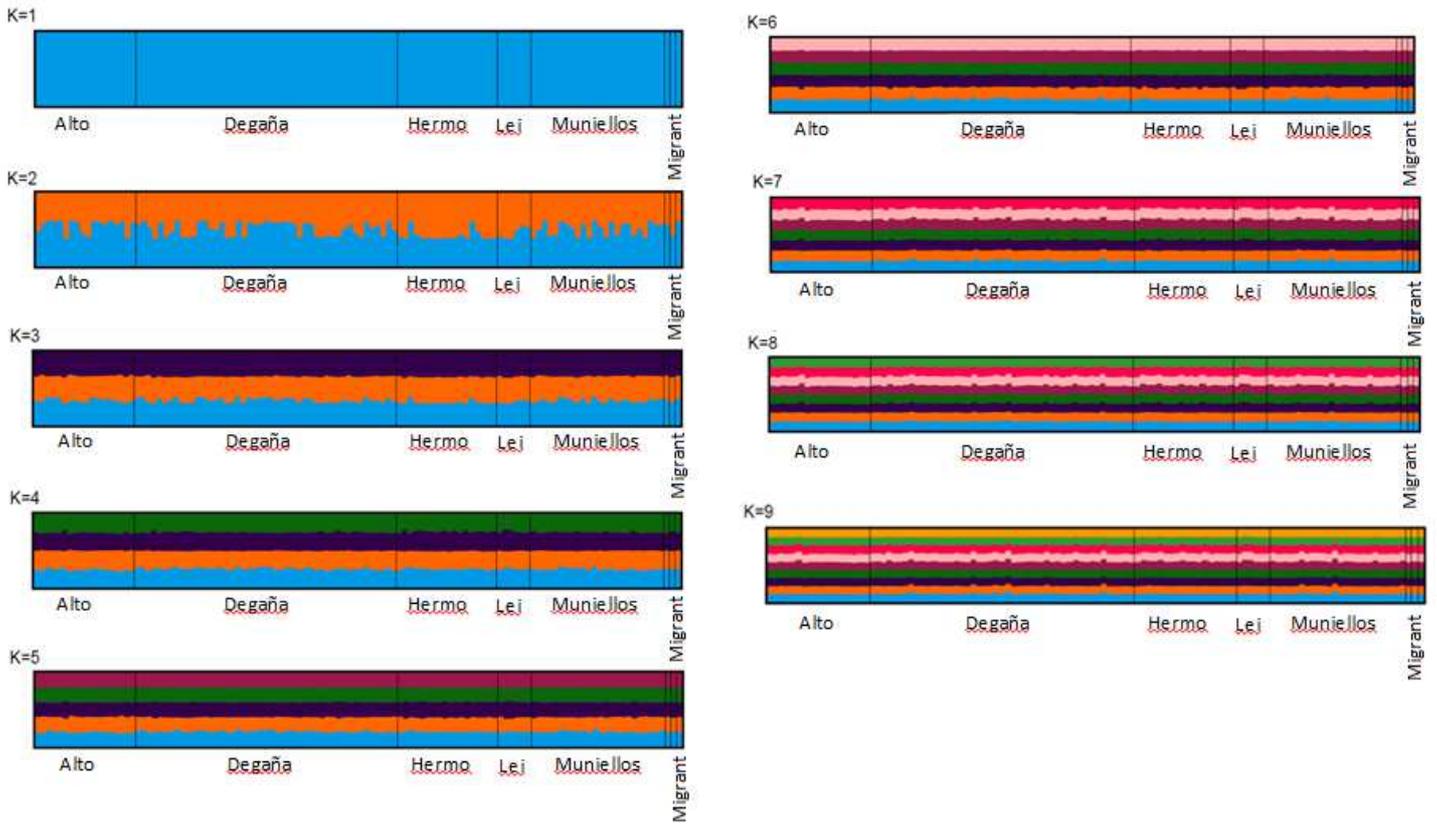


Figura 4. Gráficos de barra mostrando la pertenencia relativa de cada uno de los individuos a los diferentes grupos genéticos (K=1-9) según STRUCTURE, obtenidos a partir de 10 corridas para cada valor de K, sin LOCPRIOR, infiriendo alfa y fijando lambda en 1. Debido a que no se usó información sobre la zona de muestreo, pudieron incluirse todos los individuos (n=116), incluso los que aparecieron en más de una zona. Sólo a modo ilustrativo, los gráficos están divididos mostrando las zonas de muestreo en las cuales se detectaron los individuos (tres aves fueron detectadas en más de una zona y por lo tanto aparecen como “Migrantes”).

Entre las corridas de TESS, las 10 que presentaron los valores más bajos de DIC se obtuvieron para K= 5 (modelo de mezcla seleccionado: BYM, Figura 5a), pero el valor promedio de q-hat indica que esta asignación es poco robusta (Figura 5b). Examinando los gráficos de barra de la probabilidad de asignación para K= 5, pudo verse que ninguno de los individuos mostró indicios de pertenecer a un grupo particular, sugiriendo que K= 1 está probablemente reflejando el escenario real (Figura 5c).

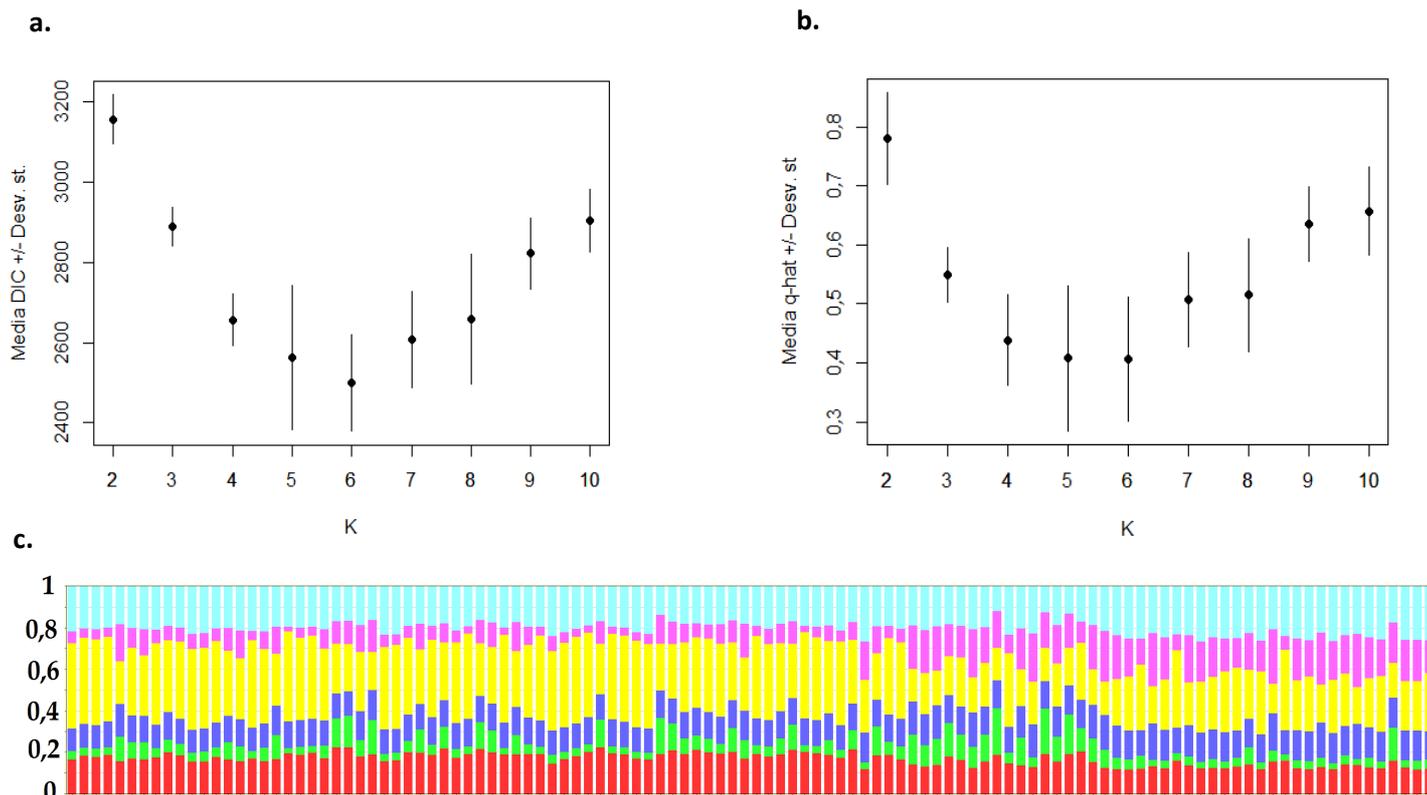


Figura 5. Gráficos usados para decidir el número óptimo de grupos (K) a partir de los resultados de TESS. **a.** DIC basado en 10 corridas para cada valor de K (2 a 10). **b.** Asignación promedio de todos los individuos a su grupo más probable (q-hat) en base a 10 corridas para cada valor de K (2 a 10). **c.** Gráfico de barras obtenido para la mejor corrida (i.e. aquélla con menor DIC) para K=6 en el análisis de agrupamiento. Cada barra corresponde a uno de los individuos que pudieron ser georreferenciados (n=114, ya que no hubo coordenadas registradas para 2 de ellos), y los diferentes colores representan la proporción estimada del genotipo del individuo asignada a cada uno de los K=6 grupos.

Discusión

Cualquier acción de manejo de fauna debe ser capaz de definir primero la extensión de las unidades afectadas por el programa de manejo. Por ejemplo, realizar reintroducciones en una zona puede tener efectos positivos sobre la población allí presente, pero los mismos no serán percibidos si las mediciones de estos efectos son realizadas en una zona que pertenece a otra unidad de manejo, aislada de aquélla que está siendo tratada. Por este motivo se establece la necesidad de realizar un análisis poblacional que pueda identificar discontinuidades genéticas producto de un proceso de fragmentación. Para ello, observaciones directas de movimiento entre subunidades de la población no son suficientes, ya que los movimientos de los animales pueden no ser efectivos (i.e. no generar conexión genética).

Se encontraron diferencias al comparar ciertas zonas de muestreo entre sí, pero no hubo subdivisión en grupos genéticos. Este hallazgo es compatible con un escenario donde las zonas se

encuentran conectadas por flujo génico. Estudios previos en otras partes de Europa encontraron que en poblaciones de urogallos puede presentarse diferenciación genética significativa incluso cuando las mismas están separadas por tan sólo 5-10 km (Segelbacher *et al.* 2003b). En el caso estudiado en esta tesis, la distancia mínima entre leks pertenecientes a diferentes zonas de muestreo fue aproximadamente la misma (Muniellos-Hermo = 3,98 km; Hermo-Degaña = 3,13 km, Degaña-Alto Sil = 3,96 km, Leitariegos-Hermo = 4,16 km).

La falta de estructuración genética en el set de datos puede ser explicada por: 1) una falta general de variabilidad genética en el área de estudio, por ejemplo debida a un cuello de botella demográfico, haciendo necesario el uso de más microsatélites para detectar subdivisión genética; 2) una restricción al flujo génico que sea demasiado reciente para ser detectada con esta metodología; o 3) suficiente nivel de flujo génico entre zonas de muestreo para prevenir diferenciación.

A excepción de los loci TUD4 y TUD2, el grupo de individuos detectados tuvo igual o mayor número de alelos que los encontrados por Vázquez *et al.* (2012) para los mismos microsatélites, a pesar de que nuestro estudio fue llevado a cabo a una escala más fina. Una apreciación similar puede realizarse al comparar los resultados con aquéllos obtenidos por Segelbacher *et al.* (2003a), donde los autores abordaron la diferenciación genética de poblaciones de urogallo a lo largo de Europa (aunque no se incluyeron urogallos cantábricos en ese estudio). Contrario a lo que se esperaría para una población periférica, nuestras zonas de muestreo tuvieron una riqueza alélica promedio que se encuentra dentro de lo hallado en dicho estudio para otras poblaciones. Por lo tanto, se descartó la explicación (1) para la falta de estructuración genética. Sin embargo, cabe destacar que los loci BG10 y TUT1 aparecieron ligados en nuestra base de datos, resultado que también obtuvieron Vázquez *et al.* (2012) al estudiar urogallos cantábricos. Mediante una búsqueda bibliográfica de publicaciones que usaran los loci BG10 y TUT1 se encontraron otros 13 artículos, de los cuales siete no probaron desequilibrio por ligamiento (Pérez *et al.* 2011; Rutkowski *et al.* 2015; Larsson *et al.* 2008; Strzała *et al.* 2015; Höglund *et al.* 2011; Jansman *et al.* 2004a; Jansman *et al.* 2004b) y los restantes seis sí lo probaron pero no lo encontraron entre BG10 y TUT1 en las especies *T. urogallus*, *L. tetrrix* o *Bonasa bonasia* (Svobodová *et al.* 2011; Strand *et al.* 2012; Rutkowski *et al.* 2012; Segelbacher *et al.* 2014; Rodríguez-Muñoz *et al.* 2015; Rutkowski *et al.* 2017). Asumiendo que las tres especies tienen los microsatélites en cuestión localizados en la misma posición cromosómica, es llamativo que el ligamiento entre esos loci sólo se haya encontrado en el urogallo cantábrico. Podría considerarse que el ligamiento hallado en esta subespecie sea una evidencia de un reciente evento de cuello de botella poblacional. Este fenómeno podría haber causado la pérdida de combinaciones alélicas de TUT1-BG10 incluso si la riqueza alélica se mantuvo y no se generó estructuración genética. Rodríguez-Muñoz *et al.* (2015) no detectaron ligamiento entre estos loci en urogallo cantábrico, pero su estudio incluyó una gran proporción de muestras no

contemporáneas (desde 1959 en adelante), lo que sería compatible con una idea de cuello de botella reciente.

Una restricción en el flujo génico demasiado reciente para dejar una marca en la composición genética es posible, especialmente si consideramos que ciertas modificaciones antrópicas como las minas de carbón a cielo abierto ocurrieron en los últimos 70-50 años. Aunque no se encontró evidencia de estructuración genética con STRUCTURE o TESS, cuatro zonas de muestreo mostraron diferencias significativas en sus frecuencias alélicas al compararlas con otras, excepto la comparación entre Muniellos-Hermo y entre Degaña-Alto Sil. Analizando los valles que dividen estas zonas, puede observarse que existen áreas donde la única interrupción en la cobertura forestal es una autopista. En el caso particular de Muniellos-Hermo, parte de la autopista se encuentra bajo un túnel, por lo que el hábitat entre esas zonas de muestreo se ve menos afectado por esta barrera. Por otro lado, los urogallos que crucen el valle entre Degaña y Hermo (las zonas de muestreo más cercanas entre sí) encontrarían un hábitat más degradado, con una autopista que corre a lo largo del valle y parches deforestados usados para agricultura, y/o zonas que han sufrido quemadas periódicas, especialmente en las laderas sur, junto con una mina de carbón a cielo abierto (Figura 6). Los movimientos de aves desde una de estas zonas a la otra probablemente estén más restringidos, pero definitivamente son posibles ya que se detectó un macho en Hermo, luego en Degaña, y finalmente en Hermo. Además, dado que la población es pequeña, subdividirla en zonas de muestreo puede tener un fuerte efecto de muestreo sobre las frecuencias genéticas, resultando en diferencias significativas al compararlas, aun cuando las aves se muevan libremente de una zona a la otra.

Por lo tanto, concluimos que la falta de estructuración genética refleja un escenario real de suficiente flujo génico entre zonas de muestreo para mantener la conectividad, a pesar de las modificaciones antrópicas en el área. Un análisis a lo largo del tiempo de los movimientos individuales y las relaciones de parentesco probablemente arrojaría cierta claridad sobre este asunto.

Alda *et al.* (2011) condujeron un análisis genético a gran escala, incluyendo muestras recolectadas a lo largo de la totalidad del rango aún existente del urogallo cantábrico. Encontraron evidencia para considerar tres grupos genéticos (uno en la ladera norte de la Cordillera Cantábrica, uno en la ladera sudeste y uno en la ladera sudoeste) con bajos niveles de flujo génico entre ellos. Sin embargo, encontramos dos problemas con este estudio. Primero, los autores reportaron una riqueza alélica mucho más alta que cualquier otro estudio de urogallo cantábrico (Rodríguez-Muñoz *et al.* 2007; Vázquez *et al.* 2012). Segundo, dos de los tres grupos genéticos estuvieron en gran parte o totalmente representados por muestras colectadas de un modo altamente agrupado. Teniendo en cuenta la escala del estudio, estos grupos genéticos podrían ser un artefacto del diseño de muestreo. Vázquez *et al.* (2012) también investigaron la estructura genética de los urogallos a lo largo de su distribución, usando más microsatélites que Alda *et al.* (2011) pero menos individuos. Encontraron evidencia de estructuración

genética, dividiendo la subespecie en dos grupos genéticos (uno oriental y otro occidental) con poco flujo génico entre ellos. Sin embargo, este trabajo fue realizado usando microsátélites ligados entre sí, y por lo tanto, los resultados deben ser analizados con precaución.

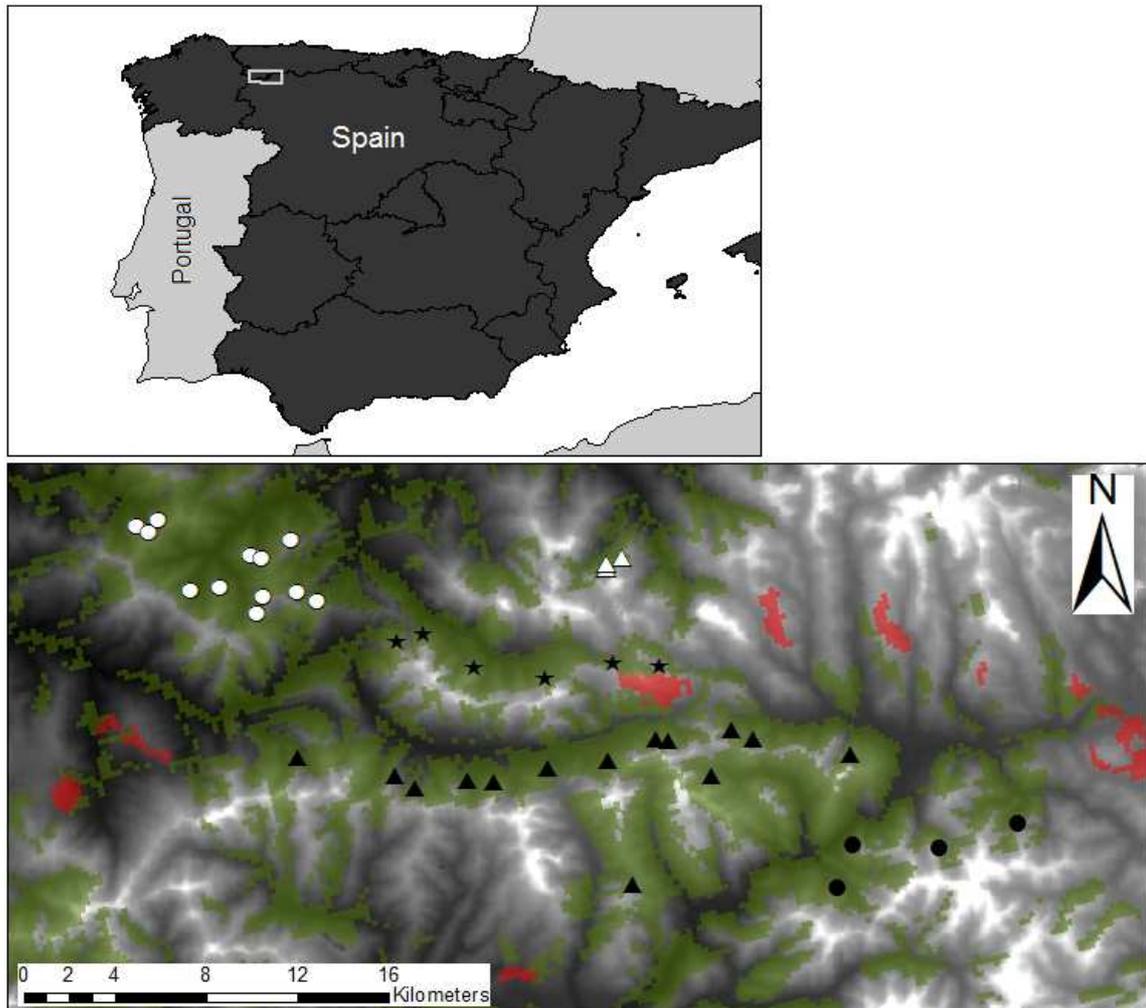


Figura 6. Área de estudio mostrando las superficies de bosque (verde) y de extracción mineral (rojo). Los símbolos representan los leks que fueron visitados y clasificados en cinco zonas de muestreo diferentes: Muniellos (círculos blancos), Hermo (estrellas negras), Leitariegos (triángulos blancos), Degaña (triángulos negros) y Alto Sil (círculos negros). Tonos grises más oscuros representan menor altitud. Zonas boscosas altamente fragmentadas pueden ser observadas entre Hermo y Degaña, mientras que hay un continuo de cobertura boscosa entre Degaña y Alto Sil.

No se encontraron diferencias entre machos y hembras en lo que respecta al patrón de aislamiento por distancia. Esto se contradice con los resultados hallados previamente, analizando muestras de los dos primeros periodos de muestreo (2009 y 2010, Fameli *et al.* 2017), donde los machos

mostraron un leve pero significativo patrón de aislamiento por distancia mientras que las hembras no, lo cual podría indicar una mayor capacidad de dispersión por parte de las mismas. Estudios en otras subespecies de urogallo (compilados por Storch y Segelbacher 2000) también revelaron una mayor capacidad de dispersión por parte de las hembras. Es posible que, al incluir los datos de los tres años de muestreo, y tratándose de un área pequeña con pocos individuos, el flujo génico entre zonas (mayormente producto de movimientos realizados por hembras) pueda contrarrestar el efecto del aislamiento por distancia (sin embargo, ver el apartado Discusión General).

Los resultados de la Interpolación del Paisaje Genético mostraron diferencias en el patrón hallado para machos y hembras. En los primeros (Figura 2 c y d), una zona de alta similitud genética en el sudeste del área de estudio incluyó a los machos de Alto Sil y parte de los machos de Degaña, lo cual es consistente con la falta de diferenciación genética hallada al realizar la comparación de F_{ST} pareadas entre estas zonas. En el caso de las hembras (Figura 2 e y f), hubo una zona de alta similitud genética que incluyó a aves de Muniellos y Hermo, lo cual nuevamente fue consistente con los resultados de las comparaciones de F_{ST} pareadas. Es notorio que las zonas más cercanas entre sí (Degaña y Hermo) hayan presentado diferencias significativas en las comparaciones pareadas de F_{ST} , lo cual puede estar relacionado con el alto grado de disturbio antrópico entre ellas.

Según Hampe y Petit (2005), existe una carencia de estudios llevados a cabo en el límite de baja latitud del rango de distribución de las especies, una observación que contrasta con la importancia de estas poblaciones que habitan el borde del rango (por ejemplo, los estimadores de cambio climático predicen mayor estabilidad en márgenes del rango a baja latitud que a alta latitud). Los autores sugieren que las estrategias de conservación deberían centrarse más en mantener tantas poblaciones locales del borde del rango como sea posible, dada su estructura genética particular, en vez de concentrarse en las poblaciones centrales. Esta es una de las razones por las cuales el urogallo cantábrico es una prioridad para las acciones de conservación. Los planes de manejo se beneficiarían de un conocimiento extenso sobre la distribución de la variabilidad genética y los factores que la determinan.

Aunque la subespecie cantábrica está amenazada, este trabajo sugiere que la variabilidad genética actual y el flujo génico en el área de estudio no se encuentran comprometidos al punto de requerir acciones de manejo específicas relacionadas con este tipo de problemas, a pesar del tamaño poblacional bajo (Morán-Luis *et al.* 2014). Sabiendo que esta población, habitando la llamada fortaleza de la subespecie (Quevedo *et al.* 2006), está “segura” en términos de variabilidad genética y flujo génico, la investigación puede ahora ser ampliada para incluir otras áreas menos prístinas, quizás priorizando la parte opuesta del rango de distribución de la subespecie donde se esperaría que existan diferentes alelos. Es importante tener en cuenta que este trabajo está basado en el análisis de marcadores neutrales. Una posibilidad a futuro sería abordar la variabilidad genética en términos de marcadores directamente relacionados con la viabilidad poblacional.

La población en el área de estudio puede ser tratada como una sola unidad de manejo, con todas las implicaciones aparejadas. Por ejemplo, sería esperable que enfermedades infecciosas que afecten a una de las zonas de muestreo creen un riesgo potencial para otras zonas. Por otro lado, los leks que queden vacantes podrían ser naturalmente reclamados por nuevos machos. Debido a la complejidad de esta área (i.e. zonas con diferentes niveles de conservación y calidad de hábitat, separadas unas de otras por diferentes tipos de modificaciones antrópicas), esperamos que los resultados obtenidos en este estudio puedan servir como un modelo para entender la conectividad genética y los factores que la determinan en esta subespecie amenazada. También esperamos que los resultados sean usados como parte de un programa sostenido de monitoreo genético.

Resumen:

1. Es posible que haya existido un fenómeno de cuello de botella poblacional reciente en el urogallo cantábrico.
2. Pese a las discontinuidades en la disposición espacial de los leks, no se distinguieron grupos genéticos que justifiquen considerar diferentes unidades de manejo.
3. El flujo génico entre zonas de muestreo es posible pero se encuentra limitado, excepto entre las dos zonas del sur y entre las dos zonas del norte (en base a los F_{ST} pareados e Interpolación del Paisaje Genético) lo cual parece estar asociado a la configuración del paisaje.
4. Al juntar los genotipos obtenidos durante los tres años de estudio, no se evidenció dispersión diferencial entre sexos (evaluada en forma indirecta en base a patrones de aislamiento por distancia).
5. En caso de usar los microsatélites BG10 y TUT1 para realizar estudios poblacionales, es necesario considerar que los mismos se encuentran en un cromosoma sexual.

Capítulo 2

Parentesco a nivel de lek y evaluación de la correlación entre grado de endogamia y territorialidad



Introducción

Entre las diversas herramientas que pueden ser utilizadas dentro de un plan de conservación, la reintroducción (entendida como la liberación de animales dentro del rango de distribución original de la especie, nacidos en cautiverio o en silvestría, Kleiman 1989) cuenta con una larga trayectoria de implementación, e incluso ha aumentado su popularidad en tiempos recientes (Kleiman *et al.* 1994; Wolf *et al.* 1996; Fischer y Lindenmayer 2000; Seddon *et al.* 2007; Soorae 2008; Bajomi *et al.* 2010; Weeks *et al.* 2011). Sin embargo esta técnica permanece cuestionable por diversos motivos. En primer lugar, las reintroducciones tienden a ser oportunistas (i.e. poco planeamiento y a menudo falta completa de monitoreo post-liberación, Seddon *et al.* 2007), siendo tradicionalmente llevadas a cabo como acciones exclusivamente de manejo, sin seguir un enfoque estratégico que permita también responder preguntas planteadas *a priori* (Armstrong y Seddon 2008). La falta de aplicación del método científico, réplicas, controles, monitoreo post-liberación adecuado o publicación de resultados en forma de artículos accesibles y revisados por pares evitó que pudiera aprenderse de las reintroducciones exitosas, o aún de las fallidas, las cuales tienden incluso a no ser documentadas (Macnab 1983; Scott y Carpenter 1987; Dodd y Siegel 1991; Reading *et al.* 1997; Seddon *et al.* 2007; Godefroid *et al.* 2011). Esta deficiencia de planeamiento cuidadoso, sumada a la falta de un método que permita obtener datos útiles de las reintroducciones realizadas, ha hecho que tradicionalmente muy pocas reintroducciones de especies amenazadas fuesen exitosas (Griffith *et al.* 1989; Dodd y Siegel 1991; Rahbek 1993). Frente a esta problemática se conformó en 1988 el Grupo de Especialistas en Reintroducción, como parte de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, el cual se encargó de formular lineamientos para la reintroducción que permitieran mejorar la práctica (Seddon *et al.* 2012). Esta acción logró incrementar el número de trabajos que realizan monitoreos post-liberación adecuados, así como también la proporción de reintroducciones (fallidas y exitosas) que se documentan debidamente en la literatura (Seddon *et al.* 2007; Seddon *et al.* 2012). A pesar de estos avances, el porcentaje de éxito de las reintroducciones continuó siendo bajo (Wolf *et al.* 1996; Singer *et al.* 2000; Jule *et al.* 2008; Germano y Bishop 2009; Godefroid *et al.* 2011) y la decisión inicial acerca de la reintroducción se mantiene en muchos casos como una elección pragmática más que científica (Sarrazin y Barbault 1996). Otros puntos en contra de las reintroducciones son su elevado costo económico (Kleiman 1989) y un planteo demasiado acotado de la conservación, centrado en una población o especie en vez de un ambiente (Hutto *et al.* 1987; Povilitis 1990). Por todos estos motivos, se establece dentro de la comunidad científica un consenso en el cual se admite que las reintroducciones biológicas no deben funcionar como herramienta única de conservación, sino como parte de un esfuerzo más extenso y comprehensivo (Kleiman 1989, Povilitis 1990, Seddon *et al.* 2007).

En cualquier caso, conocer ciertas características comportamentales, particularmente en lo que respecta a la organización social, territorialidad y elección de pareja, puede aumentar el éxito de programas de cría en cautiverio así como también el éxito de supervivencia y reproducción de los individuos reintroducidos. Como se mencionó en la introducción de esta tesis, en especies que presentan poliginia de lek las hembras muestran un grado elevado de consenso en su elección de pareja, lo que genera una gran inequidad en el éxito reproductivo de los machos, siendo sólo una pequeña proporción de los mismos quienes obtienen la mayoría de las cópulas (Bradbury y Gibson 1983; Kirkpatrick y Ryan 1991; Höglund y Alatalo 1995; Kokko y Lindstrom 1997; Segelbacher *et al.* 2007). Alatalo *et al.* (1991) encontraron que en el gallo lira (*Lyrurus tetrix*) la preferencia de las hembras por un macho en particular no puede ser explicada sólo en base a la morfología de los machos, ni por el nivel de actividad de cortejo. Los machos más preferidos por las hembras en cada lek fueron aquéllos que pasaron más tiempo peleando con machos vecinos pero aun así lograron mantener intactas las plumas de sus colas (durante sus peleas, los machos a menudo se arrancan unos a otros las plumas que funcionan como ornamentos de sus colas). Como lo exponen Rintamäki *et al.* (2001), la observación de que un alto nivel de cortejo (i.e. más tiempo invertido en canto y despliegue de ornamentos) no indique un mayor éxito reproductivo parece contra-intuitivo, pero se explica por el hecho de que los machos preferidos por las hembras no tienen mucho tiempo para realizar cortejos debido a las peleas en las que se ven envueltos con otros. Esta preferencia por machos que pasan más tiempo peleando también fue observada por Hämäläinen *et al.* (2012) y Lebigre *et al.* (2014) en otras poblaciones de la misma especie. Por otro lado, los leks con más machos atraen más hembras (Alatalo *et al.* 1992), y existe en algunas poblaciones de urogallo una asociación espacial entre machos emparentados que permite plantear un escenario de *kin selection*, donde ciertos machos aumentan el potencial reproductivo del macho dominante del lek, con el cual están emparentados (Hamilton 1964; Regnaut *et al.* 2006; Segelbacher *et al.* 2007). Esta asociación espacial en el lek no es explicable únicamente por las bajas distancias de dispersión que se asumen para los machos (Liukkonen-Anttila *et al.* 2004) debido a que fuera de la temporada reproductiva los individuos abandonan el lek y forman grupos (Widén 1987; Liukkonen *et al.* 2007) con representantes de diferentes leks aledaños, pero al finalizar el invierno los machos juveniles no necesariamente son reclutados por el lek más cercano (Wegge y Larsen 1987; Liukkonen *et al.* 2007). En otras palabras, existe la posibilidad de que los machos se asocien con individuos no emparentados, pero éste no es el patrón que se observa, lo que demuestra una preferencia por parte de los machos a agruparse con individuos emparentados, dando soporte a la idea de un mecanismo de *kin selection*.

Por lo tanto, si éste fuera también el caso del urogallo cantábrico, podría argumentarse en contra de la liberación de machos solitarios en zonas alejadas de leks activos, lo cual no representaría una buena estrategia si se pretende que los individuos reintroducidos realicen una contribución a la población silvestre en términos genéticos. En primer lugar, porque se espera que los machos no realicen grandes

desplazamientos desde la zona de liberación, teniendo en cuenta que los machos adultos muestran naturalmente distancias de dispersión cortas. Por otro lado, un macho solitario que se establezca en un territorio no resultaría “atractivo” para las hembras por lo expuesto previamente. Sin embargo, hay discrepancias entre estudios realizados en diferentes poblaciones respecto a la agregación espacial de machos emparentados y la capacidad de dispersión que este sexo posee, por lo que su aplicabilidad al caso del urogallo cantábrico permanece cuestionable. Estudiar el grado de parentesco entre individuos que naturalmente se congregan en un lek puede permitir mejorar la forma en que se realizan las liberaciones, recordando el éxito nulo del programa LIFE+ urogallo cantábrico en lo que respecta a la reintroducción de individuos. En este caso, todos los individuos reintroducidos fueron hembras, probablemente debido a que se asume que este sexo es el limitante en el crecimiento poblacional, mientras que los machos se encontrarían teóricamente en exceso (ya que sólo unos pocos monopolizan el total de las cópulas). Si en las poblaciones de urogallo el patrón natural de organización espacial a nivel de lek muestra una asociación de machos con alto grado de parentesco, sería recomendable que los programas de reintroducción intentaran generar este patrón.

A la hora de realizar reintroducciones, no sólo se deben tomar decisiones en cuanto a la forma en que las mismas se llevarán a cabo (en términos de cantidad de individuos y zona de liberación), sino también qué animales serán liberados. Siendo que el objetivo de cualquier reintroducción es aumentar de manera estable el número de individuos en silvestría, deberían liberarse aquéllos individuos con más probabilidades de sobrevivir y reproducirse de manera de disminuir la probabilidad de extinción de la población. Para tal fin, no sólo deben considerarse las condiciones sanitarias, sino también las características genéticas de los individuos en cuestión. Se ha reportado una asociación positiva entre el grado de heterocigosidad media y el éxito reproductivo a lo largo de la vida en ciervo colorado (Slate *et al.* 2000), entre la heterocigosidad media y la resistencia al parasitismo por nematodos gastrointestinales en ovejas de Soay adultas (Coltman *et al.* 1999), entre heterocigosidad media y habilidad para conseguir un territorio en gallo lira (Höglund *et al.* 2002), entre d^2 medio (una medida de cuán diferentes entre sí son los alelos de cada locus tipificado para un individuo) y el éxito de cópulas a lo largo de la vida en gallo lira (Höglund *et al.* 2002), y entre d^2 medio y el peso al nacer en ciervo colorado, el cual se relaciona con la supervivencia neonatal (Coulson *et al.* 1998). Por otro lado, se ha encontrado en los urogallos una correlación negativa entre el d^2 medio y la probabilidad de padecer infección por nematodos intestinales, y entre la heterocigosidad media y la intensidad de dicha infección (Isomursu *et al.* 2012). El éxito reproductivo de los individuos se ve negativamente relacionado con el grado de similitud genética de sus padres, incluso en vertebrados de vida larga que realizan múltiples intentos reproductivos (Amos *et al.* 2001), donde existen más oportunidades para que factores externos y el azar tengan influencia sobre el éxito reproductivo, lo que podría causar que el efecto de las características genéticas de cada animal fuese relativamente menor. Por todos estos

motivos, un análisis genético de los individuos mantenidos en cautiverio puede ayudar a seleccionar aquéllos que presentan mayor probabilidad de supervivencia y reproducción en condiciones silvestres, tanto en términos de parentesco entre animales liberados como en cuanto a características genéticas propias de cada animal (heterocigosidad media y d^2 medio).

Es posible que en el urogallo actúen mecanismos similares a los mencionados para el gallo lira (especie filogenéticamente cercana con la que el urogallo hibrida en la naturaleza; ver Haldane 1922, Peterle 1951), donde no todos los machos adultos pueden considerarse territoriales, ya que algunos sólo se unen a un lek por un periodo de tiempo corto o realizan desplazamientos siguiendo a hembras (Lebigre *et al.* 2008). Además, como mencionan Höglund *et al.* (2002) para la misma especie, los machos con mayor nivel de heterocigosidad media son quienes logran obtener un territorio, y entre ellos, los que poseen mayor d^2 medio tienen mayor éxito reproductivo, aunque los autores no pueden asegurar si estas diferencias se deben a una ventaja de los individuos más exogámicos o una desventaja de los individuos más endogámicos. Teniendo en cuenta estas observaciones se plantea para este capítulo la hipótesis de que el nivel de exogamia (medida como heterocigosidad media y d^2 medio) de los urogallos machos estará inversamente correlacionado con su grado de dispersión. En otras palabras, dado que los machos con mayor nivel de exogamia pueden tomar posesión de un lek, los que presenten menor nivel de exogamia se verán forzados a realizar desplazamientos. Además, se analizó la influencia del nivel de exogamia en el comportamiento dispersivo de las hembras. Por otro lado, se plantea como hipótesis que los machos que coexisten en un lek presentan un grado de parentesco más alto del esperado por azar, como revelan la mayoría de los estudios en esta especie y otras cercanamente emparentadas (Kokko y Lindström 1996; Höglund *et al.* 1999; Höglund 2003).

Un análisis comprensivo de los mecanismos subyacentes a la dispersión resulta útil como base para el diseño de un plan de conservación del urogallo, ya que este rasgo es de suma importancia en poblaciones fragmentadas (características del urogallo en Europa central). La dispersión efectiva no sólo actúa como conector de unidades demográficas, atenuando los efectos de la deriva génica y disminuyendo la probabilidad de extinción local, sino que también tiene gran influencia en el proceso de evolución y adaptación de las poblaciones (Charmantier *et al.* 2011). La dispersión es obviamente clave para la recolonización natural de zonas que vuelven a ser propicias para la especie luego de acciones de manejo de hábitat. Sin embargo, los movimientos dispersivos se asocian generalmente a un aumento en la mortalidad (Gros *et al.* 2008; Burgess *et al.* 2012).

Como se mencionó previamente, la viabilidad de una especie a largo plazo depende del mantenimiento de niveles funcionales de diversidad genética. Frente a la posibilidad de introducir urogallos criados en cautiverio en un futuro cercano (como se mencionó en la introducción general), el comportamiento reproductivo debe ser analizado a fin de escoger la estrategia que genere mayores probabilidades de establecimiento efectivo. Si bien esta tesis no cuenta con una metodología que permita

realizar estimaciones del éxito reproductivo de cada individuo, el presente capítulo pretende aumentar el entendimiento de la organización social del urogallo cantábrico a nivel de lek en un momento tan crítico como lo es la época de cortejo y cópula, mediante el análisis del grado de similitud genética (i.e. parentesco) entre pares de individuos que coexistieron en un mismo lek. Sería esperable que un proyecto de reintroducción aumente su éxito al crear condiciones que permitan a los individuos establecer comportamientos semejantes a los que presenta la población silvestre. También se estudió el grado de asociación entre ciertas características genéticas y comportamentales relacionadas con la territorialidad de los individuos. Un mejor conocimiento de estas relaciones entre genética y comportamiento podría ayudar a seleccionar qué individuos de una población en cautiverio es conveniente reintroducir.

Materiales y métodos

Parentesco entre individuos

Existen diferentes maneras de calcular el grado de similitud entre pares de individuos, pero es recomendable que esta estimación contemple las frecuencias alélicas de la población (es decir, qué tan común es cada alelo de los loci analizados), para distinguir entre casos donde los individuos son similares simplemente por azar de los casos donde los individuos tienen ancestría común. Por lo tanto, un primer paso para calcular el índice de parentesco entre un par de individuos es considerar qué frecuencias alélicas se utilizarán como referencia: las frecuencias alélicas globales (i.e. aquéllas obtenidas al incluir la totalidad de las muestras) o las frecuencias alélicas locales (i.e. correspondientes a cada zona de muestreo). Bajo un escenario donde existe cierto grado de diferenciación genética entre zonas de muestreo, el índice de parentesco entre un mismo par de individuos vecinos será mayor cuando se compara con las frecuencias alélicas globales, ya que dos individuos de la misma zona de muestreo parecerán muy similares al contrastarlos contra todos los demás individuos del estudio, pero no tan similares cuando se los contrasta sólo contra los otros individuos de su unidad demográfica. Por lo tanto, y sobre todo en el caso de animales con vagilidad menor, parece más indicado corregir por el efecto de posible diferenciación genética entre zonas, por mínimo que sea, y utilizar las frecuencias alélicas locales como referencia. Sin embargo, eso genera una partición arbitraria de los datos ya que esta subdivisión podría no reflejar la verdadera estructuración genética. Por otro lado, no siempre es posible realizar esta división debido a que un tamaño muestral bajo en una o varias zonas puede sesgar demasiado la estimación de las frecuencias alélicas locales. Cuando el tamaño poblacional es lo suficientemente grande y la diferenciación genética entre áreas de muestreo no es muy importante, las

estimaciones de parentesco calculadas con las frecuencias alélicas globales no deberían diferir mucho de las calculadas con las frecuencias alélicas locales (Lebigre *et al.* 2008).

Como se vio en el Capítulo 1, las frecuencias alélicas no mostraron diferencias significativas entre años. Por lo tanto se utilizaron los genotipos obtenidos para las muestras recolectadas en 2009, 2010 y 2011. Si bien se utilizó la información provista por los nueve microsatélites para realizar la identificación de los individuos, no se consideraron los genotipos obtenidos para TUT1 y BG10 al momento de estimar parentesco debido a que estos marcadores se encuentran en un cromosoma sexual.

En primer lugar se realizó una prueba piloto con el objetivo de determinar qué frecuencias alélicas tomar como referencia. Tanto las frecuencias alélicas por zona de muestreo como las globales fueron calculadas en base a todos los individuos correspondientes, independientemente de su sexo. Sin embargo, siguiendo un enfoque conservador, el análisis de parentesco para comparar resultados obtenidos con frecuencias locales vs. globales incluyó sólo datos de machos debido a que se asume que los mismos presentan una tasa de dispersión menor y por lo tanto una estructuración espacial mayor que las hembras, lo que puede generar que el índice de parentesco difiera mucho según se tome como referencia a toda el área de estudio o a la zona de muestreo correspondiente. Para cada macho se creó un historial de recapturas y luego se calculó el índice de parentesco entre pares de machos que estuvieron presentes en el mismo lek y en el mismo año, utilizando como referencia las frecuencias alélicas globales y luego las frecuencias de la zona de muestreo. Este índice de parentesco entre pares de individuos se estimó utilizando el programa COANCESTRY (Wang 2011), el cual utiliza siete métodos para estimar el grado de relación entre pares de individuos. Se calculó el estimador puntual QuellerGt (“ r_Q ”, descrito en Queller y Goodnight 1989), debido a que el mismo ha sido utilizado con fines similares en otras publicaciones (Amos *et al.* 2001; Segelbacher *et al.* 2007; Lebigre *et al.* 2008; Lebigre *et al.* 2014; Jeon *et al.* 2016), incluso en el proyecto LIFE+ Urogallo Cantábrico para caracterizar a individuos salvajes y provenientes del centro de cría (<https://www.lifeurogallo.es/sites/default/files/files/informe-genetica-life-urogallo.pdf>). Este estimador puede tomar valores que van entre -1 y 1, y se asume que individuos no relacionados tienen en promedio un r_Q cercano a 0. Se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) mediante el programa R (R Core Team 2017) entre los valores de parentesco obtenidos con cada tipo de referencia. Esta prueba no paramétrica se utiliza para comparar el grado de ajuste entre dos distribuciones de probabilidad, teniendo como hipótesis nula que dos muestras pertenecen a poblaciones con la misma distribución.

Habiendo determinado qué frecuencias alélicas es conveniente tomar como referencia, se utilizó ese dato para realizar una comparación entre el parentesco calculado para todos los pares macho-macho (independientemente de si convivieron en un lek) vs. los pares macho-macho que se encontraron en el mismo lek, mediante el programa COANCESTRY. Esto permitió poner a prueba la hipótesis de que los

machos que comparten lek están en promedio más relacionados entre sí que con machos cualesquiera de la población. Para ello se realizó también una prueba de K-S mediante el programa R.

Se realizó además una simulación de tres mil pares de individuos hermanos completos, tres mil pares de individuos no relacionados, y tres mil pares de medio-hermanos, con el programa COANCESTRY. Para todos estos pares de individuos se calculó el índice de parentesco (nuevamente utilizando el estimador puntual QuellerGt). Por otro lado, se usaron las mismas frecuencias alélicas de referencia para calcular el índice de parentesco entre individuos reales: pares de machos que coexistieron en el mismo lek, pares de hembras que coexistieron en el mismo lek, y pares hembra-macho que coexistieron en el mismo lek. Para cada grupo de comparaciones pareadas, se calculó la frecuencia de los diferentes valores del índice de parentesco. Finalmente se realizaron comparaciones entre el parentesco calculado para pares de individuos reales y para pares de individuos simulados, mediante pruebas de K-S en el programa R.

Influencia del sexo y variables genéticas sobre mediciones asociadas al comportamiento filopátrico

En primer lugar se analizó si existen diferencias entre los sexos en cuanto a la existencia de recapturas interanuales, teniendo en cuenta que machos y hembras pueden tener diferente esperanza de vida (Bañuelos *et al.* 2019). Además, el hecho de que las hembras pasen menos tiempo en el lek que los machos podría disminuir la capacidad de detectarlas. Utilizando todos los individuos sexados exitosamente ($n_{\text{hembras}} = 45$, $n_{\text{machos}} = 68$) se realizó una prueba de Chi^2 dividiendo a los individuos de cada sexo en dos categorías: “sin recaptura interanual” (individuos que sólo aparecieron en un año) o “con recaptura interanual” (individuos que aparecieron en más de un año). Este análisis se repitió realizando una prueba exacta de Fisher a fin de constatar los resultados obtenidos mediante la prueba de Chi^2 . La primera es el método aconsejado para casos donde se desea comparar casos pertenecientes a dos variables categóricas pero el tamaño muestral es bajo. Por ejemplo, van Nood *et al.* (2013) compararon tratamientos de pacientes con diarrea causada por *Clostridium difficile*, donde uno de los tratamientos permitió curar a 13 de los 16 pacientes que lo recibieron (81%), mientras que otro tratamiento sólo permitió curar a 4 de los 13 pacientes sometidos (31%), siendo esta diferencia significativa para la prueba exacta de Fisher.

Posteriormente se definieron tres características que podrían estar representando el comportamiento filopátrico de los urogallos, teniendo en cuenta que las mismas se encuentran altamente influenciadas por la detectabilidad de los individuos debido a la metodología utilizada. Estas características fueron: fidelidad al lek, número de leks en los que se registró al individuo y distancia mínima registrada entre detecciones del individuo. También se consideró la variable “número de años

en que se registró al individuo” para analizar la posibilidad de que el sexo y las variables genéticas tengan influencia sobre la capacidad de detección.

A continuación, se realizaron diferentes pruebas utilizando sólo los individuos que aparecieron en más de un año, ya que son éstos en los cuales puede evaluarse el grado de filopatría. Esta restricción se basó en la idea de que los machos juveniles/subadultos pueden visitar varios leks durante su primer temporada reproductiva antes de asentarse en un territorio (Wegge y Rolstad 1986; Wegge y Larsen 1987; Storch 1997b). De este modo, un macho que haya aparecido sólo en un año de muestreo y visitado varios leks podría haber sido un juvenil/subadulto, para el cual no podría evaluarse fehacientemente el comportamiento de fidelidad al lek. Diferente de esto es un macho adulto que no logra establecerse en un lek, apareciendo en diferentes territorios de un año a otro y por lo tanto no se considera filopátrico. Para distinguir entre estos dos casos se utilizaron sólo datos de individuos que aparecieron en más de un año.

Mediante una prueba exacta de Fisher (debido al tamaño muestral bajo) se analizó la posibilidad de que haya diferencias entre sexos en cuanto al número de años en que los individuos con recapturas interanuales fueron registrados (dos o tres años). Utilizando la misma prueba estadística se analizó la hipótesis de que existen diferencias entre sexos en cuanto a fidelidad al lek. Para asignarle a un individuo la condición de “fiel”, el mismo debió haber sido registrado siempre en el mismo lek. Como excepción, se incluyó en el grupo “fiel” a dos machos que aparecieron cada uno en dos leks diferentes durante su primer año de registro, pero en los años subsiguientes se mantuvieron sólo en uno de esos dos leks. Se los consideró fieles al lek asumiendo que en el primer año de registro los individuos eran juveniles/subadultos que estuvieron buscando un lugar donde asentarse, pero luego fueron fieles al lek que eligió cada uno. También se investigó si existen diferencias entre sexos en cuanto a la cantidad de leks visitados (usando nuevamente una prueba exacta de Fisher). Como consideración final, no es lo mismo visitar, por ejemplo, 3 leks muy cercanos entre sí que visitar 2 leks muy alejados uno del otro, por lo que el número de leks y la distancia recorrida pueden no estar correlacionados. Teniendo esto en cuenta, y usando una prueba de Mann-Whitney, se probó si hay diferencias entre sexos en cuanto a la distancia recorrida. Para calcular esta medida, se consideraron los leks en los que se registró cada individuo, se midió la distancia Euclidiana entre ellos, y se sumaron estos valores para obtener un total de la distancia recorrida. Cabe destacar que dentro de un mismo año de muestreo no se puede saber el orden en que un individuo visitó los leks donde fue registrado. En esos casos, se consideró un “orden” en la asistencia a los leks que minimice la distancia recorrida.

Varios trabajos han medido asociación entre variables genéticas y éxito reproductivo (Coulson *et al.* 1998; Coltman *et al.* 1999; Höglund *et al.* 2002; ver en particular Slate *et al.* 2000). Los mismos usaron todas o algunas de las siguientes variables genéticas:

- 1) Heterocigosidad media: analizando cada individuo, se le asigna a cada locus un valor de “0” si es homocigota o “1” si es heterocigota. Luego se hace un promedio sobre todos los loci del individuo.
- 2) Heterocigosidad media estandarizada: la heterocigosidad media de cada individuo es dividida por una heterocigosidad media poblacional calculada en base a todos los loci para los cuales ese individuo fue genotipado. Para calcular esta última se promedia entre todos los individuos la heterocigosidad por locus, y a estos valores unilocus se los promedia obteniendo una heterocigosidad para el conjunto de marcadores. Así se evitan sesgos que pueden introducir individuos que fallaron en la amplificación de uno o más loci, ya que para estos individuos la heterocigosidad poblacional no incluye los loci que fallaron en la amplificación.
- 3) d^2 medio: para cada locus se calcula la diferencia de tamaño entre alelos (medida en número de repeticiones del motif). A esa diferencia se la eleva al cuadrado y luego se promedia este valor entre todos los loci del individuo.
- 4) d^2 medio estandarizado: se calcula el d^2 para cada locus, pero se lo divide por la varianza en ese locus antes de realizar el promedio. Se asume que este tratamiento reduce la influencia de loci altamente polimórficos (Slate et al. 2000 en referencia a Pemberton et al. 1999).

Tomando como referencia los trabajos mencionados, se calcularon las cuatro variables genéticas explicadas. Es importante recordar que, entre los nueve marcadores de microsatélites utilizados en esta tesis, dos estuvieron en un cromosoma sexual, de modo que los machos poseen dos alelos pero las hembras sólo tienen uno. Por lo tanto, se calcularon las variables genéticas para el conjunto de nueve microsatélites (sólo utilizables para comparaciones entre machos) y para el conjunto de siete microsatélites autosómicos (utilizables para cualquier comparación entre individuos). Así se obtuvieron 8 variables genéticas (de ahora en más, variables explicatorias): “heterocigosidad media 7”, “heterocigosidad media estandarizada 7”, “ d^2 medio 7”, “ d^2 medio estandarizado 7”, “heterocigosidad media 9”, “heterocigosidad media estandarizada 9”, “ d^2 medio 9” y “ d^2 medio estandarizado 9”. Como variables dependientes (de ahora en más, “respuesta”) se utilizaron las mismas incluidas en las comparaciones entre sexos (i.e. número de años en que se registró al individuo en cuestión, fidelidad al lek, número de leks en los que se registró al individuo y distancia mínima recorrida).

Para analizar la influencia de estas variables genéticas sobre las variables respuesta, se procedió a calcular primero el grado de correlación entre las mismas (prueba no paramétrica de correlación de

Spearman, dado que la mayoría de las variables genéticas no siguieron una distribución normal). La influencia de las variables genéticas sobre las variables respuesta se puso a prueba utilizando dos conjuntos de datos y dos metodologías. En ambos casos, se usó el programa R y se incluyeron solamente datos provenientes de individuos que se detectaron en más de un año (ya que son los únicos para los cuales puede calcularse fidelidad al lek). En primer lugar, utilizando sólo los datos provenientes de machos, se probaron modelos lineales generalizados de la forma:

$$\text{Variable respuesta} = \text{función (variable genética)}$$

Debido a que las aves en general suelen presentar diferencias entre sexos en cuanto a la capacidad de dispersión (las hembras siendo menos filopátricas que los machos, Segelbacher *et al.* 2008), se probaron diferentes modelos lineales generalizados incluyendo el sexo como covariante, en la forma:

$$\text{Variable respuesta} = \text{función (variable genética; sexo)}$$

En los casos en que la variable respuesta se expresó de forma dicotómica (“fiel al lek” vs. “no fiel al lek”, “individuo registrado en dos años” vs. “individuo registrado en tres años”), los modelos se construyeron siguiendo una distribución binomial (Amos *et al.* 2001). Para la variable “número de leks visitados”, los modelos se construyeron en base a una distribución de Poisson, como se usa habitualmente para casos de conteos (Amos *et al.* 2001; Höglund *et al.* 2002). Por último, para la variable “distancia mínima recorrida” (variable continua) se usó una regresión lineal, pero debido a que los residuos del modelo no siguieron una distribución normal (violación a uno de los supuestos de la regresión lineal) se repitió el análisis utilizando: a) una regresión no paramétrica de Kendall-Theil como la usada por Borrell *et al.* (2004) para los modelos creados sólo analizando machos, y b) un modelo lineal generalizado con distribución gamma para los modelos que incluyeron machos y hembras, usando el sexo como covariante.

Es importante destacar que la presencia de estructura poblacional puede sesgar los resultados y generar correlaciones aparentes entre genotipos y fenotipos (Hoffman *et al.* 2010). En el Capítulo 1 de esta tesis se concluyó que no existe tal estructura en la población bajo estudio, por lo que no fue necesario corregir por dicho efecto en los análisis de correlación.

Resultados

En cada zona de muestreo, la cantidad de detecciones (número de muestras provenientes del mismo individuo, independientemente del año) fue menor en promedio para el caso de las hembras: $2,2 \pm 2,05$ contra $4,19 \pm 5,13$ para los machos (Tabla 1). La mayoría de las hembras (57,8%) estuvo representada sólo por una muestra, mientras que en los machos este porcentaje fue del 30,9%.

Tabla 1. Detección de urogallos en el área de estudio, discriminando entre sexos.

<i>Zona de muestreo</i>	<i>Nº machos detectados</i>	<i>Nº hembras detectadas</i>	<i>Promedio de detecciones-machos</i>	<i>Promedio de detecciones-hembras</i>
<i>Alto Sil</i>	13	5	2,2	1,2
<i>Degaña</i>	28	18	3,3	2,1
<i>Hermo</i>	9	7	5,3	3,3
<i>Leitariegos</i>	4	2	4,5	1,5
<i>Muniellos</i>	13	11	6,6	1,7
<i>Total*</i>	68	45	4,2	2,2

* El total del área de estudio no refleja la suma de los individuos asignados a cada zona, debido a que incluye también a un macho y dos hembras que no fueron asignados a una zona en particular, por haber sido detectados en más de una de ellas.

Parentesco entre individuos

El número de pares macho-macho que coincidieron en tiempo y lek fue de $n= 104$. Eliminando los pares que se repitieron en años subsiguientes y los datos provenientes del macho que apareció en dos zonas de muestreo diferentes, el número de comparaciones de a pares quedó reducido a $n= 84$. En la prueba piloto, como era de esperarse, el r_Q medio calculado en base a las frecuencias alélicas globales fue mayor al calculado con las frecuencias locales (0,19 vs 0,10 respectivamente). Sin embargo, la prueba de K-S no mostró diferencias significativas entre estos dos métodos ($p= 0,14$), por lo que se decidió usar las frecuencias globales como referencia para todos los análisis que requirieron cálculo de parentesco (ver Lebigre *et al.* 2008). Usar estas frecuencias globales permitió incluir en las comparaciones pareadas a los pocos individuos que fueron registrados en más de una zona de muestreo (dos hembras y un macho).

Habiendo seleccionado las frecuencias alélicas de referencia, se comparó mediante una prueba de K-S el parentesco calculado para pares de machos que compartieron el lek (promedio $r_Q= 0,19$) con el parentesco calculado para todos los pares de machos, hayan o no compartido lek (promedio $r_Q= -0,02$) obteniendo un valor significativo ($p<0,001$). Esto indica que dos machos que compartieron lek fueron en promedio más similares entre sí que dos machos cualesquiera.

En el caso de las comparaciones entre pares hembra-hembra que coincidieron en tiempo y lek ($n=24$) se excluyó del análisis a dos pares que se repitieron en diferentes años, quedando $n=22$ comparaciones (Figura 1). En contraposición a lo observado para los machos, el parentesco medio para

hembras que coexistieron en leks (promedio $r_Q = -0,04$) no fue estadísticamente diferente del calculado para todos los pares de hembras, hayan o no compartido lek (promedio $r_Q = -0,03$, p-valor de la prueba de K-S= 0,9998). Los valores del índice de parentesco observados no difirieron significativamente de aquéllos calculados para pares simulados de individuos no emparentados ($p = 0,76$) y sí difirieron significativamente de aquéllos calculados para pares simulados de hermanos completos y de medio hermanos ($p < 0,001$ en ambos casos).

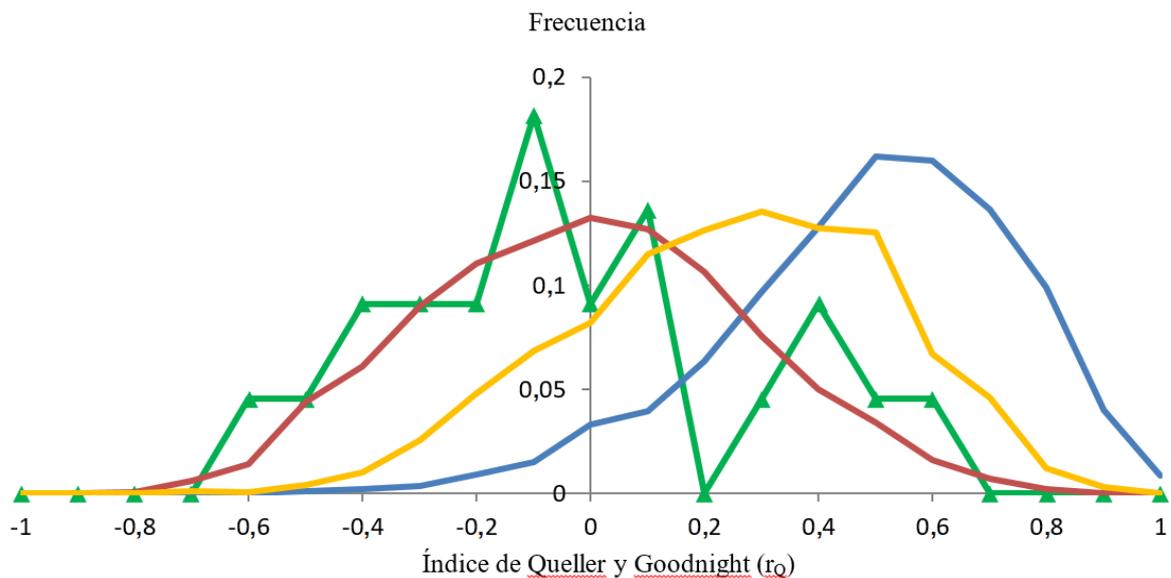


Figura 1. Frecuencia para diferentes valores del índice de parentesco entre pares de individuos. En verde: pares hembra-hembra observados ($n=22$). En rojo: pares simulados de individuos no emparentados ($n=3000$). En amarillo: pares simulados de medio-hermanos ($n=3000$). En azul: pares simulados de hermanos completos ($n=3000$).

Para las comparaciones entre pares macho-macho que coincidieron en tiempo y lek ($n = 86$ al incluir el macho que fue detectado en dos zonas de muestreo diferentes; Figura 2), el r_Q medio fue de 0,19. Los valores del índice de parentesco observados difirieron significativamente de aquéllos calculados para pares simulados de individuos no emparentados y para pares simulados de hermanos completos ($p < 0,001$ en ambos casos), mientras que la comparación entre valores observados y aquéllos calculados para pares simulados de medio hermanos tuvo un p-valor de 0,212.

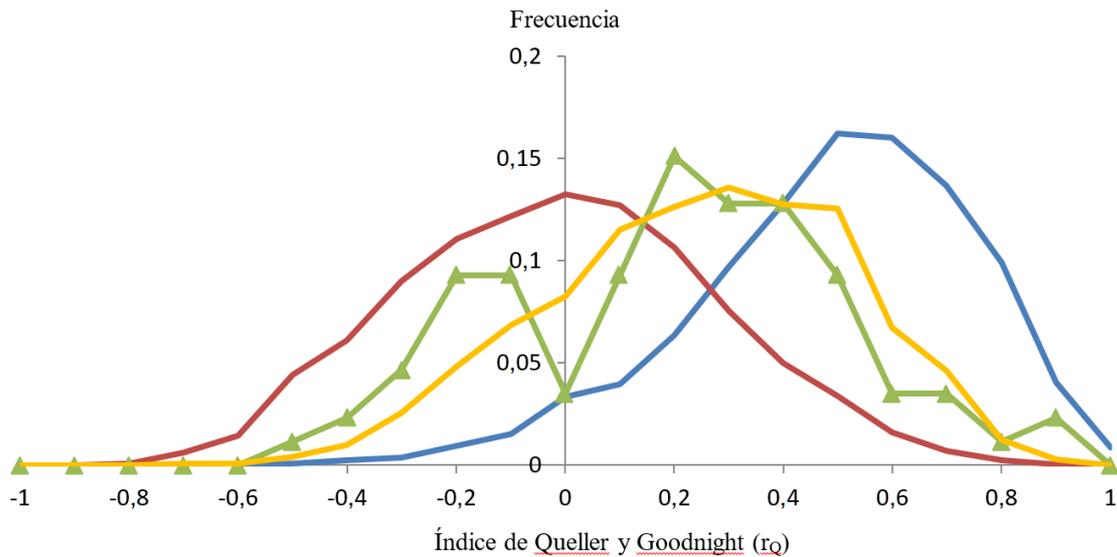


Figura 2. Frecuencia para diferentes valores del índice de parentesco entre pares de individuos. En verde: pares macho-macho observados (n=86). En rojo: pares simulados de individuos no emparentados (n=3000). En amarillo: pares simulados de medio-hermanos (n=3000). En azul: pares simulados de hermanos completos (n=3000).

En el caso de las comparaciones entre pares macho-hembra (n= 90 luego de eliminar los pares que se repitieron en diferentes años; Figura 3), el r_Q medio fue de 0,07. Los valores del índice de parentesco observados difirieron significativamente de aquéllos calculados para pares simulados de hermanos completos y pares de medio hermanos ($p < 0,001$), y no difirieron significativamente de los valores calculados para pares simulados de individuos no emparentados ($p = 0,16$).

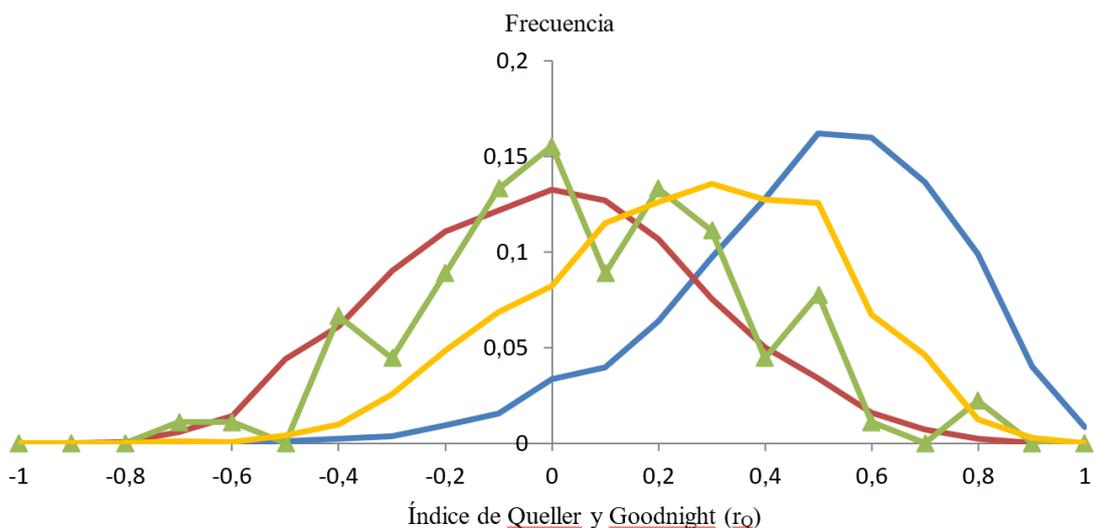


Figura 3. Frecuencia para diferentes valores del índice de parentesco entre pares de individuos. En verde: pares macho-hembra observados (n=90). En rojo: pares simulados de individuos no emparentados (n=3000). En amarillo: pares simulados de medio-hermanos (n=3000). En azul: pares simulados de hermanos completos (n=3000).

Influencia del sexo y variables genéticas sobre mediciones asociadas al comportamiento filopátrico

De las 45 hembras registradas, 35 fueron detectadas sólo en uno de los tres años de muestreo (Tabla 2), lo que equivale al 77,8% de las mismas, mientras que entre los 68 machos hubo 36 que fueron detectados sólo en uno de los tres años (52,9%). Sólo dos hembras fueron detectadas en los tres años de muestreo (4,4% de las hembras detectadas), siendo las únicas de las cuales se puede afirmar que hayan permanecido con vida durante la totalidad del periodo de estudio. En contraposición, hubo 15 machos de los que puede asegurarse que permanecieron con vida durante la totalidad del periodo bajo estudio (22,1% de los machos detectados), de los cuales ocho fueron detectados en los tres años de muestreo, y otros siete fueron detectados en 2009 y nuevamente en 2011.

Entre los individuos que aparecieron en más de un año se detectaron más machos que hembras (Tabla 2). La diferencia entre sexos respecto a si los individuos fueron registrados en uno vs. más años fue significativa, ya sea usando la prueba de χ^2 ($p_{\chi^2} = 0,007$) o la prueba exacta de Fisher ($p_{\text{Fisher}} = 0,009$), teniendo los machos más probabilidad de aparecer otro año (22,2% de las hembras tuvieron al menos una recaptura en otro año, mientras que entre los machos este valor fue de 47,1%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre sexos respecto a si los individuos fueron detectados en dos vs. tres años ($p_{\text{Fisher}} = 1$).

Tabla 2. Resumen del tamaño muestral para las categorías analizadas, discriminando por sexo.

	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>
<i>Sólo aparecieron en un año</i>	36	35
<i>Aparecieron en dos años</i>	24	8
<i>Aparecieron en los tres años</i>	8	2
<i>Total individuos con recapturas interanuales</i>	32	10
<i>Fieles al lek</i>	25	6
<i>No fieles al lek</i>	7	4
<i>Número de leks en que aparecieron</i>	1 - 4 (promedio = 1,44)	1 - 3 (promedio = 1,5)
<i>Distancia mínima recorrida (km)</i>	0 - 15,75 (promedio = 1,43)	0 - 11,59 (promedio = 2,06)

El 78% de los machos que aparecieron en más de un año fue catalogado como “filopátrico”, mientras que para las hembras este valor fue del 60%, pero esta diferencia no fue significativa ($p_{\text{Fisher}} = 0,413$).

En cuanto a los desplazamientos, 23 machos se detectaron sólo en un lek vs. nueve que aparecieron en dos o más leks (la distancia mínima recorrida por estos últimos varió entre 2,1 y 15,75 km), recordando como se explicó previamente que dos machos aparecieron en más de un lek dentro de su primer temporada de registro, pero fueron catalogados como "fieles" debido a que en años posteriores se mantuvieron en un mismo lek. Seis hembras se detectaron sólo en un lek vs. cuatro que aparecieron en dos o más leks (la distancia mínima recorrida por estas últimas varió entre 1,1 y 11,59 km). La diferencia entre sexos en cuanto al número de leks visitados no fue significativa ($p_{\text{Fisher}} = 0,670$), y la prueba de Mann-Whitney tampoco encontró diferencias entre sexos en cuanto a la distancia mínima recorrida ($p_{\text{M-W}} = 0,667$).

Cabe destacar que el único macho que apareció en más de una zona de muestreo (Hermo en 2009, Degaña en 2010, Degaña y Hermo en 2011), fue detectado en la primavera de 2011 en dos leks separados por 7,2 km. Esta distancia mínima de desplazamiento (calculada como la distancia Euclidiana entre leks) en una misma temporada de muestreo, sumada a los desplazamientos calculados entre años, indica que este individuo se movió al menos 15,75 km durante el total del periodo de estudio, lo que corresponde a la máxima distancia registrada a partir del set de datos. En el caso de las hembras, el individuo que mostró la mayor distancia de desplazamiento (sumando las distancias entre años) fue de 11,59 km.

En cuanto a las variables genéticas, tanto la heterocigosidad media como la heterocigosidad media estandarizada estuvieron correlacionadas con el d^2 medio y el d^2 medio estandarizado, ya sea cuando se calcularon usando todos los marcadores o sólo los siete autosómicos (Tabla 3). Por lo tanto, los modelos lineales generalizados que se diseñaron posteriormente sólo incluyeron una de estas variables por vez. Los individuos clasificados como fieles al lek tuvieron valores levemente mayores que los individuos no fieles para todas las variables genéticas utilizadas (la Figura 4 muestra esta comparación para la heterocigosidad media y el d^2 medio), aunque esta diferencia no fue significativa.

A continuación se usaron sólo los machos que aparecieron en más de un año, por lo tanto pudo calcularse fidelidad al lek y las otras variables interanuales. Debido a la diferente naturaleza de las variables respuesta (categóricas, numérica discreta y numérica continua) debieron utilizarse diferentes tipos de distribución, aplicando para cada una de ellas su función de enlace default. Dado que en este caso se usaron los datos sólo provenientes de machos, se incluyeron las heterocigosidades y d^2 calculados para los 9 loci y las calculadas sólo para los 7 loci autosómicos; por lo tanto se utilizaron ocho variables genéticas (todas ellas continuas, Tabla 4). Ninguna de estas variables pudo considerarse predictora de la fidelidad al lek (variable categórica con valores "fiel" y "no fiel", distribución binomial, función de enlace logit), del número de años en que el individuo fue registrado (variable categórica con valores "2" y "3", distribución binomial, función de enlace logit), de la cantidad de leks visitados (variable numérica discreta con valores entre 1 y 4,

Tabla 3. Correlaciones de Spearman entre las variables genéticas calculadas; r = coeficiente de correlación; p = p-valor.

	d^2 medio 7	d^2 medio estandarizado 7
<i>Heterocigosidad media 7</i>	r = 0,59 p = 3,94x10e-12	r = 0,52 p = 1,95x10e-09
<i>Heterocigosidad media estandarizada 7</i>	r = 0,58 p = 8,67x10e-12	r = 0,52 p = 1,82x10e-09
	d^2 medio 9	d^2 medio estandarizado 9
<i>Heterocigosidad media 9</i>	r = 0,56 p = 5,21x10e-07	r = 0,64 p = 3,53x10e-09
<i>Heterocigosidad media estandarizada 9</i>	r = 0,56 p = 7,76x10e-07	r = 0,65 p = 2,29x10e-09



Figura 4. Heterocigosidad media (a) y d^2 medio (b) calculados en base a todos los individuos y los siete microsatélites autosómicos. Las barras muestran el valor promedio para cada grupo de individuos (“fieles al lek” vs. “no fieles al lek”) y su desvío estándar.

distribución de Poisson, función de enlace log), o de la distancia mínima recorrida (variable continua, regresión no paramétrica de Kendall-Theil). Debido a que no pudo considerarse a alguna de las variables genéticas como explicativa, no fue necesario realizar una selección del mejor modelo usando el Criterio de Información de Akaike.

Al incluir a todos los individuos sexados con éxito que aparecieron en más de un año y crear modelos que combinaron sexo y una variable genética, tampoco se detectó un aporte significativo de las variables independientes (Tabla 5). Para el caso de la fidelidad al lek y el número de años en que el individuo fue registrado (dos tres) se usó un modelo lineal generalizado con distribución binomial, y para el número de leks visitados se utilizó un modelo lineal generalizado con distribución de Poisson. Para la distancia mínima recorrida se utilizó una regresión gamma (ver Figura 5).

Tabla 4. Las filas muestran las variables genéticas incluidas en los modelos lineales generalizados y su p-valor como medida de su poder para explicar las variables comportamentales. En estos modelos sólo se incluyeron machos, por lo que pudo probarse la influencia de las variables genéticas calculadas para los 9 loci.

	<i>Fidelidad al lek</i>	<i>Nº de años en que se registró</i>	<i>Cantidad de leks visitados</i>	<i>Distancia mínima recorrida</i>
<i>Heterocigosidad 9</i>	0,239	0,283	0,336	0,155
<i>Heterocigosidad 7</i>	0,206	0,261	0,291	0,109
<i>Heterocigosidad estandariz. 9</i>	0,240	0,291	0,338	0,155
<i>Heterocigosidad estandariz. 7</i>	0,206	0,270	0,293	0,109
<i>d² 9</i>	0,370	0,425	0,324	0,477
<i>d² 7</i>	0,393	0,446	0,338	0,477
<i>d² estandariz. 9</i>	0,879	0,442	0,810	0,813
<i>d² estandariz. 7</i>	0,768	0,663	0,957	0,722

Tabla 5. P-valor para la contribución de las variables independientes (sexo / variable genética) incluidas en los modelos de las distintas variables respuesta que representan el comportamiento territorial de los urogallos.

	<i>Fidelidad al lek</i>	<i>Nº de años en que se registró</i>	<i>Cantidad de leks visitados</i>	<i>Distancia mínima recorrida</i>
<i>Sexo / Heterocigosidad 7</i>	0,258 / 0,121	0,732 / 0,148	0,903 / 0,262	0,545 / 0,157
<i>Sexo / Heterocigosidad estandariz. 7</i>	0,258 / 0,122	0,732 / 0,154	0,902 / 0,264	0,546 / 0,161
<i>Sexo / d² 7</i>	0,252 / 0,241	0,746 / 0,102	0,879 / 0,239	0,600 / 0,152
<i>Sexo / d² estandariz. 7</i>	0,304 / 0,757	0,643 / 0,437	0,946 / 0,727	0,684 / 0,292

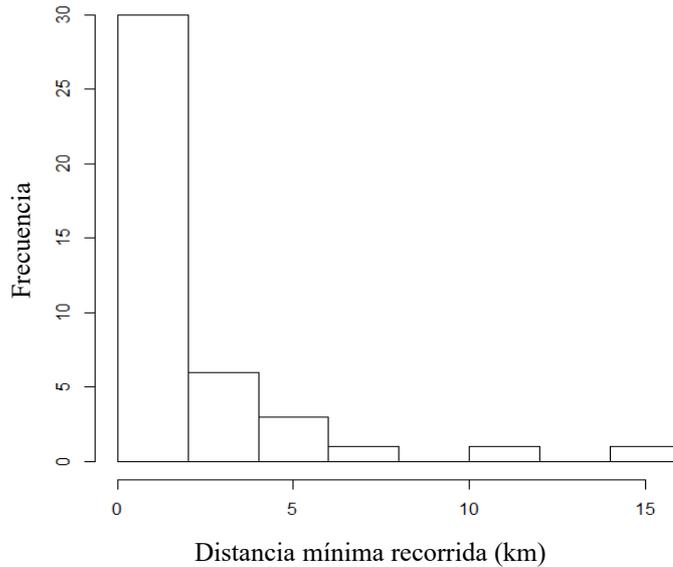


Figura 5. Distribución de frecuencias de la variable distancia mínima recorrida, obtenida a partir del conjunto de todos los individuos sexados que aparecieron en más de un año ($n = 42$).

Discusión

Cualquier acción de manejo que se lleve a cabo en una población silvestre debe contar con una clara noción sobre la dimensión espacial y temporal que esa acción tendrá, así como también la magnitud de su efecto y la sustentabilidad del mismo. Devra Kleiman, una de las mayores exponentes en el campo de la Biología de la Conservación, explicitó en su trabajo de 1989 las condiciones pre-liberación necesarias para el éxito de un programa de reintroducción con fines de conservación: 1) una población autosustentable en cautiverio con una amplia representación genética, 2) un hábitat adecuado disponible para las reintroducciones, 3) la eliminación de los factores que causaron el declive en primer lugar, 4) estudios de factibilidad que identifiquen necesidades críticas para la especie mediante estudios ecológicos y comportamentales de animales silvestres; y 5) elección del sitio de liberación. A su vez, las decisiones sobre cuántos animales serán reintroducidos en cada liberación, la composición de los grupos que serán reintroducidos, y la organización temporal de las liberaciones (tanto en lo que respecta a la época del año como en lo relativo al tiempo que deberá transcurrir entre liberaciones) requieren conocimiento sobre el sistema de apareamiento, la organización social y las relaciones espaciales de la especie. Los estudios tendientes a llenar estos vacíos en el conocimiento se incluyen en el campo de la Etología de la Conservación, una disciplina de surgimiento relativamente reciente (ver Caro 1999 para un resumen sobre cómo las actividades de manejo pueden beneficiarse del conocimiento sobre la etología de la especie en cuestión; ver Berger-Tal *et al.* 2011 para un modelo conceptual de la Etología de la Conservación).

En lo que respecta al caso del urogallo, se asume que las hembras presentan una dispersión mayor que los machos, expresada no sólo en forma de una menor filopatría sino también en una mayor distancia de desplazamientos (Storch 1995; Moss *et al.* 2006; Segelbacher *et al.* 2008). Por otro lado, se asume que las hembras tienen una mayor mortalidad adulta (Moss *et al.* 2000). En este estudio se encontraron más machos que hembras (68 vs. 45, respectivamente), lo cual podría en principio deberse a dicha mortalidad diferencial o ser producto de una menor detectabilidad de las hembras, por estar haciendo uso de conteos de individuos en base a muestras no invasivas. Bañuelos *et al.* (2019) realizaron estimaciones del número de machos y hembras presentes en el área de estudio, analizando las mismas muestras incluidas en esta tesis, y utilizando modelos cerrados (estimando el número de individuos en cada año por separado) o abiertos (analizando recapturas interanuales entre los tres años de estudio). Los resultados obtenidos por ambos modelos arrojaron estimaciones similares en cuanto al número de individuos de cada sexo, las cuales muestran una menor abundancia de hembras que de machos. Si bien los autores encontraron que la detectabilidad de las hembras es efectivamente menor (los promedios de los modelos abiertos indican que hay un 17% de machos que nunca fueron detectados vs. un 26% de hembras que nunca fueron detectadas), esta diferencia en la detección fue incorporada en los modelos para estimar el número de individuos. Teniendo en cuenta que el número de recapturas de machos y hembras fue suficiente para realizar estimaciones, que la probabilidad de recapturabilidad entre años fue similar entre sexos, y que los resultados obtenidos por ambos modelos son similares en distintos años, los autores concluyen que los muestreos fueron lo suficientemente intensivos para lograr una buena representación de ambos sexos, existiendo una menor proporción de hembras que de machos. Por lo tanto, el haber encontrado en esta tesis que hubo diferencias significativas entre sexos en cuanto a si los individuos se detectaron sólo en un año vs. en más años, podría atribuirse a una menor supervivencia aparente de las hembras y no a una menor detectabilidad. Si la detectabilidad de las hembras fuese efectivamente mucho menor a la de los machos, no se explicaría la falta de diferencias significativas entre sexos al comparar entre individuos detectados en dos años vs. en tres años. Por eso puede concluirse que en las hembras existe una menor supervivencia aparente que en los machos luego del primer año de vida, ya que sí se encontraron diferencias entre sexos al comparar individuos que aparecieron sólo en un año vs. en más de un año. Bañuelos *et al.* (2019) encontraron una supervivencia aparente menor para hembras que para machos, la cual podría deberse a una mayor mortalidad interanual de las hembras, mayor emigración, o ambas.

El 28% de los 68 machos registrados dispersaron al menos una vez durante su vida, valor similar al encontrado en un estudio reciente realizado en una población de la misma especie, localizada al este de Francia, donde se encontró que el 30% de los 61 machos detectados dispersaron al menos una vez (Cayuela *et al.* 2019).

Pudo verse que los machos no se distribuyen al azar en los leks sino que existe una asociación espacial entre individuos emparentados, evidenciada al comparar el parentesco entre machos que

compartieron leks con el parentesco entre todos los machos del área de estudio. Ya sea por filopatría, dispersión conjunta, o establecimiento definitivo en sitios donde hay otros machos emparentados (reconocimiento de parientes), esa es la estructura social que se observa en esta área de estudio.

Además, el hecho de que el parentesco entre machos encontrados en el mismo lek no haya diferido significativamente al calcularse tomando como referencia las frecuencias alélicas de toda el área o las de cada zona de muestreo refuerza la conclusión de ausencia de estructuración genética (Capítulo 1). Regnaut *et al.* (2006) realizaron un estudio sobre la estructuración poblacional de urogallos en el macizo de Jura (entre Francia y Suiza). En esta zona, los urogallos pertenecen a una población relictual que ha estado fragmentada durante siglos debido a actividades ganaderas y silviculturales, (Sachot *et al.* 2006), reduciéndose drásticamente desde la década de 1960 y quedando restringida a una franja de altitud entre los 1.200 y 1.500 m.s.n.m. Los autores obtuvieron una distribución de frecuencias para el parentesco entre machos del mismo lek similar a la presentada en esta tesis (Figura 2), concluyendo que el patrón observado representa dos curvas unimodales: una centrada en cero generada por machos no relacionados y otra centrada en 0,4 generada por machos con un parentesco promedio entre lo esperado para medio-hermanos (0,25) y hermanos completos/padre-hijo (0,5). En esta tesis, la distribución de frecuencias para el parentesco entre machos en el urogallo cantábrico se explicaría también por la presencia de individuos no relacionados e individuos con un alto grado de parentesco (medio hermanos), pero en nuestro caso esta última categoría resultó más frecuente que la hallada en el trabajo de Renaut *et al.* (2006). Esta menor frecuencia de machos poco emparentados que comparten lek quizás indique que, en el área de la Cordillera Cantábrica bajo análisis, los movimientos de los urogallos machos podrían estar aún más restringidos que en el macizo de Jura.

Cabe resaltar que en esta tesis se incluyeron algunos machos que probablemente no puedan ser considerados “territoriales” (individuos de uno o dos años de edad que aún no se han asentado en un lek, ver Wegge y Larsen 1987; Lebigre *et al.* 2008), por lo que si se eliminaran estos individuos del análisis de parentesco, el grado de relación entre machos en cada lek podría ser aún mayor. De cualquier modo, esta distribución espacial de machos generaría una estructura propicia para que operen los mecanismos de selección de parentesco que han sido propuestos para otras especies que presentan poliginia de lek. Como sugieren Regnaut *et al.* (2006), esta estructura de parentesco debe ser tomada en cuenta en planes de conservación, ya sea para la creación de leks artificiales en cautiverio o para realizar reintroducciones. Podría por ejemplo pensarse en la recuperación de leks abandonados mediante la liberación de grupos de machos emparentados, sabiendo que esa es la estructura que se observa en condiciones naturales.

Las distancias de desplazamiento documentadas en esta tesis concuerdan con lo que exponen Rösner *et al.* (2014) para el urogallo en los parques nacionales Šumava (República Checa) y Bosque

Bávaro (Alemania): algunos movimientos de larga distancia pero la mayor parte de los individuos se detectaron en años sucesivos prácticamente en el mismo lugar.

Varios trabajos han realizado análisis de autocorrelación espacial en urogallos discriminando entre sexos y encontrando una mayor autocorrelación genética entre machos que entre hembras (Rösner *et al.* 2014,). Sin embargo, existen sólo unos pocos estudios donde se analiza parentesco entre hembras que visitan el mismo lek (Segelbacher *et al.* 2008; Cayuela *et al.* 2019). Las muestras utilizadas en esta tesis sugieren que los pares de hembras que coexistieron en los leks presentan un grado de parentesco análogo al encontrado entre individuos no relacionados. Llama la atención entonces que no se hayan detectado diferencias entre sexos en cuanto a las variables usadas para representar el comportamiento territorial (i.e. fidelidad al lek, el número de leks visitados y la distancia mínima recorrida), ya que estos resultados no parecen reflejar la diferencia en el patrón de parentesco hallado para cada sexo, además de contradecirse con la caracterización tradicional de los machos de urogallo como altamente filopátricos (ej. Höglund y Alatalo 1995). Incluso se destaca que el animal para el cual se registraron más desplazamientos fue un macho que se detectó en los tres años de estudio. La metodología de estudio no permite registrar individuos menores al año de edad, por lo que en su primer registro (2009) este individuo tendría como mínimo un año, y en 2011 este animal realizó un importante desplazamiento pese a ser ya adulto. Este dato inesperado que muestra una gran capacidad de dispersión para un adulto incluso dentro de una misma temporada reproductiva debe ser tomado en cuenta en caso de realizar seguimientos de individuos liberados.

Como se mencionó en la introducción, existen precedentes donde no se encontraron diferencias entre sexos en la capacidad dispersiva (en el este de Francia, Cayuela *et al.* 2019, y en el norte de Finlandia, Mäki-Petäys *et al.* 2007, en ambos casos usando estimas basadas en datos genéticos). Es posible que las hembras de urogallo cantábrico tengan una capacidad de dispersión mayor que los machos, pero tratándose de dispersión natal, o de adultos pero incluyendo movimientos realizados durante el periodo no reproductivo. Debido a que en esta tesis sólo se analizaron datos durante la etapa reproductiva provenientes de aves de un año o más de edad, estas diferencias en capacidad de dispersión no pudieron evidenciarse. Por ejemplo, Moss *et al.* (2006) encontraron que después del primer año de vida, las hembras se vuelven más sedentarias, ocurriendo la mayor dispersión en el estado juvenil (primer otoño).

Cualquiera sea el proceso involucrado, puede concluirse que hay pocas probabilidades de cruzamientos entre aves cercanamente emparentadas, ya que los niveles de parentesco encontrados entre pares macho-hembra que coexistieron en leks coincidieron con lo esperado para individuos no relacionados. Estos resultados son congruentes con los publicados por Lebigre *et al.* (2010), quienes encontraron que existen muy pocas cópulas entre individuos emparentados de *L. tetrrix*, además de concluir que estos resultados se deben a una mayor dispersión natal de las hembras y no a una capacidad de las mismas de distinguir el grado de parentesco con los machos del lek.

Con respecto a las medidas de exogamia (heterocigosidad media, d^2 y sus versiones estandarizadas) ninguna pudo explicar las diferencias entre individuos en cuanto a las medidas utilizadas para representar el comportamiento territorial. Si bien los individuos catalogados como fieles al lek mostraron un mayor grado de exogamia para todas las variables analizadas (lo cual concuerda con lo esperado en base a la hipótesis de que los machos más endogámicos se ven forzados a realizar mayores desplazamientos), ésta no fue significativamente diferente a la de los individuos no fieles al lek. Teniendo en cuenta la gran cantidad de publicaciones que han encontrado una correlación positiva entre el estado físico y diferentes medidas de exogamia, es posible que el hecho de analizar los desplazamientos únicamente en base a individuos que asisten a leks genere un sesgo muy grande en los datos. La lógica detrás de este razonamiento es que si los individuos con un bajo grado de exogamia presentan un estado físico peor que la media poblacional, posiblemente no alcancen un estado energético que les permita concurrir a las zonas de cortejo y permanecer allí el tiempo suficiente para ser detectados. Este sesgo podría disminuirse si se realizaran muestreos en otras áreas además de los leks, pero incluso así es posible que muchos individuos con bajo grado de exogamia ni siquiera alcancen la edad adulta, por lo que este sector de la población permanecería de cierto modo inaccesible. Una posibilidad a futuro que permitiría comprender mejor la relación entre genética y comportamiento, aunque metodológicamente de difícil aplicación, sería incluir en el análisis muestras de pichones y juveniles (por ejemplo utilizando cáscaras de huevo o plumones como fuente de ADN). Esta mejora permitiría estudiar la dispersión natal e investigar la posibilidad de que los individuos más endogámicos sufran mayor mortalidad juvenil, lo que podría explicar el bajo reclutamiento de los urogallos cantábricos pese a que la población adulta (ya habiendo pasado por el filtro de la mortalidad juvenil) muestra niveles de heterocigosidad normales pese al bajo tamaño poblacional.

Resumen:

- 1- El 60% de las hembras permanecieron en la misma área de cortejo, mientras que en los machos esa cifra fue del 78%. Sin embargo esta diferencia no fue significativa, como tampoco lo fueron el número de leks visitados ni las distancias mínimas recorridas por ambos sexos.
- 2- No se encontró correlación entre las variables genéticas, medidas como heterocigosidad media y d^2 medio, y las comportamentales tales como distancia mínima recorrida, fidelidad al lek y cantidad de lek visitados.
- 3- Hay una clara diferencia en los niveles de parentesco dentro de un mismo lek entre machos y hembras. Los niveles de parentesco en hembras resultaron similares a los esperados para individuos no emparentados, mientras que los machos fueron similares a los esperados para medio hermanos.
- 4- El parentesco entre machos y hembras dentro de un mismo lek (i.e. individuos que podrían procrear entre sí) fue similar al esperado para individuos no emparentados.

Capítulo 3

Genética del paisaje



Introducción

La elaboración de un plan de conservación efectivo debe contar con un entendimiento detallado de los factores que operan sobre el declive de la población, los cuales deben ser eliminados o controlados, especialmente cuando se desea realizar reintroducciones (Kleiman 1989; Dodd y Siegel 1991; IUCN 2013). En la mayoría de las especies, la destrucción de sus hábitats constituye la principal amenaza para la supervivencia (Kleiman 1989; Hannah *et al.* 1995a; Sechrest y Brooks 2001), y por lo tanto las actividades de conservación *in situ* se están volcando crecientemente hacia técnicas que buscan proteger procesos a escala de paisaje, tales como mejorar el hábitat remanente y evitar que más áreas sean perdidas (Goldman 2009). Históricamente, las regiones templadas han sufrido más deforestación que los trópicos: aproximadamente el 70% de los bosques y las praderas templadas y los bosques mediterráneos originales ya habían sido perdidos hacia 1950, siendo Europa el continente que más porcentaje perdió de sus bosques nativos (MEA 2005a, Figura 1).

Con frecuencia los ambientes que sufren impacto por acciones antrópicas no se pierden por completo, sino que persisten en forma fragmentada y con una reducción en su extensión (Laurance 2010), contenidos dentro de una matriz con menor valor de biodiversidad. Como se mencionó en el Capítulo 1 de esta tesis, la fragmentación del hábitat tiene efectos negativos a largo plazo sobre las poblaciones, incrementando los niveles de endogamia y pérdida de variabilidad genética. De este modo, las poblaciones en fragmentos son más propensas a extinguirse que aquéllas en hábitats continuos, a menos que los fragmentos estén lo suficientemente bien conectados como para contrarrestar los efectos de esta partición (Etienne 2004).

Si bien la fragmentación afecta actualmente a todos los biomas, los bosques y los grandes sistemas de agua dulce se ven particularmente dañados por este proceso (MEA 2005b). En tal escenario de fragmentación se establece la necesidad de mantener ciertos niveles de intercambio genético entre fragmentos para evitar los efectos negativos de la endogamia y atenuar la deriva demográfica. Estas acciones tendientes a disminuir los efectos de las modificaciones antrópicas sobre el ambiente pueden incluir la protección de nuevas áreas mediante creación de parches o aumento del tamaño de parches existentes, la mejora en la calidad de los parches o el incremento de la conectividad entre ellos (Etienne y Heesterbeek 2001; Etienne 2004; Thomson *et al.* 2009). Sin embargo, en la mayoría de los casos adquirir territorio para destinarlo a crear reservas estrictas no es una estrategia de conservación posible (Redford y Ritcher 1999; Rosenzweig 2003). Por lo tanto, las únicas estrategias posibles en gran parte del mundo se basan en lograr prácticas de uso del suelo que causen un menor impacto sobre procesos naturales y biodiversidad (Bawa y Seidler 1998; Ranius y Kindvall 2006; Lombard *et al.* 2010), mejorar la calidad de los parches remanentes (Philpott y Foster 2005; Brazill-Boast *et al.* 2013; Saunders *et al.* 2014) o aumentar su grado de conectividad (Sanderson *et al.* 2003; Loss *et al.* 2011). El

número de trabajos que estudian esta última posibilidad ha cobrado auge en años recientes (Adriaensen *et al.* 2003; Gilbert-Norton *et al.* 2010), principalmente analizando el efecto de corredores (entendidos como segmentos de terreno que facilitan el movimiento entre hábitats más grandes, Simberloff *et al.* 1992). Si bien hay argumentos que advierten sobre posibles efectos negativos de los corredores para la conservación (por ejemplo Simberloff y Cox 1987), como pueden ser la rápida propagación de enfermedades contagiosas, existen meta-análisis que concluyen que los corredores constituyen herramientas valiosas para disminuir el riesgo de extinción (Gilbert-Norton *et al.* 2010; Beier y Noss 1998), no sólo en casos de estudios a escala de “microcosmos” sino también a escala de paisaje (Gregory y Beier 2014).

Como ejemplo interesante de esta última categoría puede mencionarse el estudio de Carola Haas (1995) en Dakota del Norte, el cual se realizó en un área de 8 x 11 km representada por 16 pequeños parches de hábitat arbolado artificial, distribuidos en una matriz agrícola (pastoreo y plantaciones de granos). Considerando combinaciones pareadas de parches, hubo dos pares que estuvieron conectados por segmentos arbolados naturales (árboles que crecen en las márgenes de arroyos) y 12 pares de parches que fueron vecinos inmediatos pero que no estuvieron conectados por estos segmentos. Durante 3 años se capturaron y marcaron 564 especímenes pertenecientes a tres especies de passeriformes que realizan migraciones de corta distancia, y que anidan en los parches arbolados mencionados (naturales o artificiales). La mayoría de los movimientos registrados fueron intra-parche. Sin embargo, al analizar los movimientos entre parches, se obtuvo que los mismos fueron significativamente más frecuentes entre los dos pares de parches conectados que entre los 12 pares de parches que eran vecinos inmediatos pero no estaban conectados. Más precisamente, los movimientos ocurrieron con una frecuencia 15 veces mayor entre el par de parches conectados que entre los 12 no conectados. Si bien el número de pares de parches es bajo, el estudio sugiere un efecto positivo de los corredores sobre la conectividad poblacional. Esto toma aún más relevancia cuando se tiene en mente que: a) se asume que los corredores tienen poco efecto para favorecer movimiento de aves migratorias, ya que las mismas tienen la capacidad de volar sobre grandes extensiones de hábitat desfavorable (independizándose de corredores a escalas espaciales pequeñas); y b) las especies analizadas anidan en pequeños parches arbolados rodeados de zonas abiertas, por lo tanto se podría esperar que sean menos dependientes de corredores arbolados, al menos en comparación con especies que sólo anidan en zonas extensas de bosque maduro. Sin embargo, los resultados del trabajo mostraron un gran efecto de las zonas arboladas naturales para promover la conectividad, incluso en las especies analizadas.

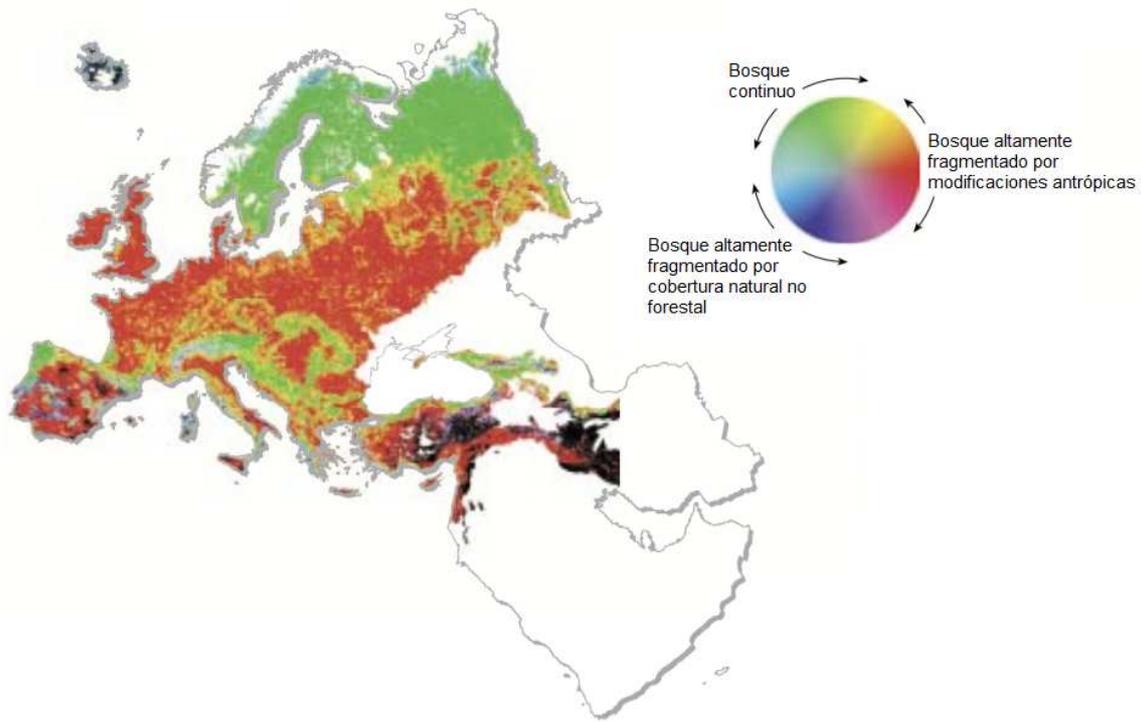


Figura 1. Estimaciones de fragmentación forestal por causas antrópicas (Europa), tomado de MEA 2005b. El análisis se realizó exclusivamente en biomas de bosque; las zonas negras representan áreas no forestales en la cercanía del área analizada.

Los proyectos de conservación que pretenden crear corredores sólo pueden ser exitosos si contemplan el comportamiento de la especie focal en cuanto a cómo los movimientos de los individuos se ven afectados por las diferentes características de la matriz ambiental en la que están inmersos (i.e. el “componente comportamental” de la conectividad, según Crooks y Sanjayan 2006). Sin embargo, como exponen Blumstein y Fernández-Juricic (2004), las acciones de mejora de hábitat pocas veces se realizan teniendo en cuenta de qué modo la especie en cuestión percibe el hábitat, o las consecuencias comportamentales de dichas intervenciones.

Existen diversas maneras de medir el éxito de los corredores como herramienta para la conservación de una especie. Gregory y Beier (2014) categorizaron a las variables respuesta en cuatro grupos: (a) presencia de la especie focal en el corredor, (b) movimientos entre parches utilizando el corredor, (c) flujo génico entre parches y (d) ocupación en parches conectados por corredores vs. parches no conectados. Los autores compararon estas maneras de medir el éxito de los corredores según su costo de evaluación, relevancia en cuanto a los objetivos de conservación (por ejemplo mantener o restaurar flujo génico entre parches, promover recolonización de parches, promover expansión del rango frente a cambios ambientales), y el retraso temporal (número mínimo de generaciones que deben pasar para que una respuesta positiva al corredor sea evidente). Las variables respuesta (a) y (b) tienen el menor retraso temporal, entre dos y tres generaciones de la especie focal,

pero son poco/moderadamente adecuadas para medir si los corredores alcanzan los objetivos de conservación que los autores mencionan. Las variables respuesta relacionadas con (d) son las más relevantes para medir los efectos de los corredores en relación a los objetivos de conservación, pero tanto los retrasos temporales como los costos son extremadamente altos, ya que requieren trabajar en una escala espacial mayor (sistema de parches donde algunos están conectados y otros no). Los autores concluyen que las variables respuesta relacionadas con el flujo génico mantienen una buena relación entre el costo de evaluación, la relevancia de las estimaciones poblacionales en cuanto a los objetivos de conservación, y el retraso temporal. En teoría, la divergencia genética entre parches aislados debería evidenciarse luego de 10 generaciones para tamaños poblacionales efectivos de 60 individuos por parche, y luego de 20 generaciones cuando los tamaños poblacionales efectivos son de aproximadamente 100 individuos por parche (Gregory y Beier 2014). Existe entonces el problema de que en muchos casos no podrá evaluarse el efecto de los corredores para conservación por lo menos hasta que hayan pasado 10-50 años desde la creación de los corredores. Por otro lado, los análisis que usan medidas de flujo génico tienen un costo probablemente menor o similar que los estudios que hacen uso de variables respuesta (b), con el beneficio agregado de permitir la estimación de otras medidas relevantes a la conservación (tamaño efectivo y tamaño censal). Por lo tanto, los autores sugieren que la mejor manera de analizar la efectividad de corredores para conservación consiste en una combinación entre medir flujo génico, ocupación de parches y riqueza de especies en parches conectados vs. no conectados (>50 años de aislamiento) aunque los corredores no hayan sido originalmente diseñados con objetivos de conservación.

Además de estas diferentes variables respuesta que pueden utilizarse para estudiar la efectividad de los corredores, existen diferentes métodos que pueden ser aplicados. Un método frecuentemente utilizado para evaluar la conectividad entre zonas es el análisis de caminos de menor costo (popularmente conocidos por su nombre en Inglés: *least-cost paths*). El mismo se basa en dividir el área de estudio en celdas y asignar un valor de fricción a cada una de ellas, en base a las características del hábitat que contienen, a modo de representar el efecto de la celda para facilitar o disminuir la movilidad de los individuos. Posteriormente se puede evaluar la diferencia entre caminos alternativos conectando dos locaciones, y eligiendo aquel que represente una menor fricción para los organismos en cuestión. Los valores de fricción pueden modelarse a partir de conocimientos previos sobre como el hábitat afecta a la especie (LaRue y Nielsen 2008; Wang *et al.* 2009; Geiser *et al.* 2013), probando diferentes valores relativos para cada tipo de ambiente, y luego viendo qué modelo ajusta mejor a los datos empíricos (por ejemplo medidas de flujo génico o datos obtenidos mediante radiotransmisores).

Más recientemente, Emaresi *et al.* (2011) propusieron un método diferente al de caminos de menor costo, basado en analizar diferentes líneas rectas de ancho variable conectando dos individuos/poblaciones. En cada uno de estos segmentos se contabiliza la cantidad de celdas que

contienen una determinada característica paisajística. Finalmente, cada par de individuos/poblaciones queda representado por una medida de distancia genética y una medida de abundancia de cada característica paisajística en el segmento lineal entre ellos. Mediante el uso de modelos lineales generalizados se estudia la relación entre la medida de distancia genética (variable respuesta) y la medida de abundancia para cada característica paisajística (variable explicatoria), obteniendo así una aproximación de cuánto las características del ambiente afectan la conectividad. Esta metodología de segmentos rectos presenta una gran ventaja ya que no requiere asignar valores de fricción, es decir, realizar suposiciones sobre el efecto relativo de las diferentes características ambientales sobre la conectividad. Su eficacia fue puesta a prueba por Geiser *et al.* (2013), quienes estudiaron la diferenciación genética entre poblaciones de lución (*Anguis fragilis*) en Suiza y compararon los resultados obtenidos por el método de segmentos rectos con los obtenidos por análisis de caminos de menor costo, en este último caso asignando valores de fricción por: (a) opinión de expertos o (b) probando múltiples valores de fricción para cada característica paisajística (“escenario *naïve*”). Los autores encontraron que el análisis de caminos de menor costo basado en opinión de expertos tuvo muy mal desempeño, mientras que el escenario *naïve* logró explicar mejor el impacto de las características paisajísticas, aunque requiere una gran inversión de tiempo para probar una multitud de modelos posibles. En cuanto al método que se basa en segmentos rectos, los autores destacan como virtud del mismo la practicidad para evaluar cada variable ambiental por separado. Los resultados de este método fueron en general consistentes con los hallados para el análisis de camino de menor costo, pero con ciertas discrepancias entre ambos. Según los autores, el método de segmentos rectos puede fallar en detectar el efecto de ciertas barreras cuando las mismas son delgadas (por ejemplo ríos y autopistas) y perpendiculares al segmento que se analiza, ya que de este modo las mismas ocuparían una porción muy pequeña del segmento, lo que puede conducir a un fallo en la detección de su efecto.

Con respecto al urogallo, Braunisch *et al.* (2010) también optaron por utilizar el método de segmentos rectos en su estudio de estas aves realizado en Alemania, analizando el efecto del paisaje sobre la similitud genética (medido como parentesco) entre pares de individuos. Los resultados obtenidos fueron evaluados de dos maneras diferentes: por un lado, usando datos genéticos no incluidos previamente en el análisis de segmentos rectos y por otro usando datos de presencia de individuos posiblemente dispersantes (i.e. aquéllos detectados a >1 km de las áreas habitadas por urogallos). Si bien la similitud genética entre individuos presentó una gran variabilidad, y sólo un pequeño porcentaje de la misma pudo ser explicado por la distancia Euclidiana o la configuración del paisaje, se detectó un efecto significativo de una característica topográfica (grado de exposición topográfica) y de varios tipos de uso de suelo sobre el parentesco entre individuos.

Como se vio en el Capítulo 1 de esta tesis, el grado de diferenciación genética entre zonas de muestreo no es suficiente como para considerar grupos genéticos aislados. Sin embargo, hay evidencia

para considerar que el flujo génico entre zonas podría estar comprometido, al menos en parte (en base a los F_{ST} pareados y resultados de la interpolación del paisaje genético). Dentro del mismo proyecto en el que se enmarca la presente tesis, María Morán-Luis estudió en su tesis doctoral (2017) movimientos individuales a dos escalas temporales (dentro y entre temporadas reproductivas), estimados a partir de captura y recaptura genética. En ese trabajo se dividió el área de estudio en parches de bosque y se estudiaron los movimientos de urogallos entre ellos mediante un análisis de caminos de menor costo, utilizando como mapa de fricción la inversa del mapa de idoneidad de hábitat (obtenido por Quevedo *et al.* 2006). No se encontraron diferencias entre sexos en lo que respecta a los movimientos de larga distancia (aquellos mayores a 1 km). Además, los resultados apuntan a que la conexión entre valles depende de la existencia de pequeños parches de hábitat (modelo *stepping-stone*). Entre las áreas de estudio, la conexión que se asume más demandante para los urogallos (i.e. aquella con menos densidad de parches de hábitat) es la que se encuentra en el valle entre Degaña y Hermo. La autora plantea que los efectos negativos sobre la conectividad en esa zona pueden deberse a la presencia de minas de carbón a cielo abierto, pérdida de hábitat por quemas reiteradas (de origen antrópico), carreteras y poblados.

El objetivo del presente capítulo fue analizar cómo diferentes características del ambiente (topográficas y de uso de suelo) podrían estar afectando la conectividad entre zonas de muestreo. Estas consideraciones preliminares son de suma importancia para guiar futuros análisis de movimientos individuales y plantear estrategias de mejora de hábitat para el urogallo cantábrico.

Existe una necesidad de homogeneizar ciertas metodologías a fin de obtener resultados comparables entre estudios en otras poblaciones/subespecies. Por lo tanto, para este capítulo se decidió seguir una metodología lo más parecida posible a la usada por Braunisch *et al.* (2010) en su estudio de urogallos en la Selva Negra (Alemania).

Materiales y métodos

Manejo de capas topográficas y de uso de suelo

Utilizando el programa QGIS (QGIS *Development Team* 2019) se creó una capa de puntos con 114 de los 116 individuos detectados, representándolos por sus coordenadas medias y una zona buffer de 2 km alrededor de cada uno. Dos individuos no fueron incluidos en el análisis por no poseer sus coordenadas. Se trazó un polígono (de ahora en más “Área de estudio”) envolviendo a todos los círculos buffer alrededor de los individuos.

Como capas base para representar el paisaje se utilizaron:

a) un fragmento de una capa de uso de suelo para toda Europa obtenida de <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/clc-2000-raster> (Büttner *et al.* 2004, pixeles de 110 x 110 m);

b) un fragmento de una capa de elevación correspondiente al norte de España (pixeles de 29 x 29 m);

c) una capa con polígonos representando todas las zonas urbanas dentro del área de estudio, creada utilizando GoogleEarth y agregando una zona buffer de 100 m alrededor de cada polígono, la cual fue rasterizada (capa “Urbano”);

d) una capa vectorial mostrando diferentes modificaciones antrópicas del terreno (autovías, caminos sin pavimentar, tendidos eléctricos, túneles, senderos para peatones, etc.), descargada desde OpenStreetMap, y sobre la cual se trabajó para depurar todos los elementos que no fueran carreteras pavimentadas (revisando cada segmento en GoogleEarth, y asumiendo que los caminos de tierra no generan un efecto sobre los desplazamientos de los urogallos), agregando una zona buffer de 100 m alrededor de cada carretera. A esta capa rasterizada se la denominó “Caminos”.

Todas las capas fueron reproyectadas al sistema de coordenadas usado para la capa del área de estudio: EPSG: 25829 - ETRS89 (zona UTM 29N), alineadas tomando como referencia la capa de uso de suelo (ya que ésta es la que presenta menor resolución), y recortadas usando como máscara el área de estudio.

A partir de la capa de uso de suelo recortada (Figura 2), se obtuvo una capa raster para cada clase de ambiente (Tabla 1), donde cada pixel representó la presencia/ausencia del rasgo ambiental en cuestión. La capa “Tendido urbano continuo” fue descartada por superponerse enteramente con la capa “Urbano” creada en GoogleEarth. Las clases “Vegetación esclerófila” y “Bosque de coníferas” no fueron incorporadas en los análisis debido a que ocuparon una porción mínima del área de estudio, <0,05%. Las demás clases que ocuparon menos del 5% del área de estudio fueron agrupadas en una capa raster llamada “Otros” al igual que lo hecho por Braunschweig *et al.* (2010). Por ejemplo, se incluyó en esta capa al uso de suelo “Bosque mixto”, que corresponde a zonas de bosque deciduo y coníferas, las cuales ocuparon el 1,071% del área de estudio (Tabla 1). Se agruparon las capas “Tierra principalmente ocupada por agricultura”, “Patrones complejos de cultivo” y “Pasturas”, creando así la capa “Agricultural”. También teniendo en cuenta el trabajo citado, se creó una capa representando una zona buffer de 100 m hacia cada lado del margen de los bosques (capa denominada “Borde de bosque”).

De este modo, el uso de suelo quedó representado por nueve categorías: “Bosque deciduo”, “Transición bosque-arbustal”, “Páramo y brezal”, “Praderas naturales”, “Caminos”, “Urbano”, “Agricultural”, “Borde de bosque” y “Otros”.

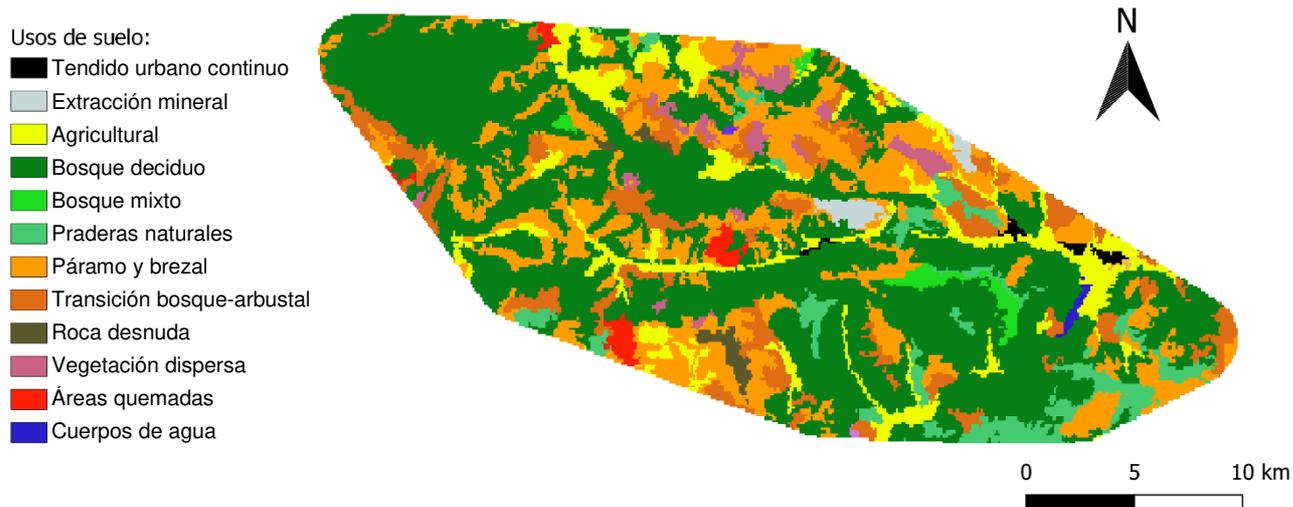


Figura 2. Tipos de uso de suelo en el área de estudio (Corine Land Cover 2000). A partir de esta capa se creó una para cada tipo de uso de suelo, con valores de 1 (presencia) y 0 (ausencia).

El hecho de crear un buffer para las zonas urbanas, los caminos y el margen de los bosques generó superposición de diferentes tipos de uso de suelo, por lo que fue necesario tomar una decisión en cuanto al tipo de uso de suelo asignado en estos casos. Al igual que en la metodología usada por Braunisch *et al.* (2010), donde se considera que las zonas con más modificación antrópica generan más fricción, la superposición de tipos de suelo fue tratada de la siguiente manera: cuando las áreas consideradas urbanas superpusieron con cualquier otro tipo de uso del suelo, los píxeles fueron asignados a la categoría “Urbano”. Del mismo modo, cuando hubo superposición de píxeles de la capa “Caminos” con cualquier otra capa de uso de suelo excepto “Urbano”, los mismos fueron considerados como parte de la capa “Caminos”. Por último, todos los píxeles donde la capa “Borde de bosque” coincidió con otros usos de suelo, los mismos se consideraron como pertenecientes al borde del bosque (excepto al superponerse con zonas urbanas o caminos).

A partir de la capa de elevación se crearon rasters describiendo la elevación, la pendiente y el grado de exposición topográfica (considerando una distancia de 2000 m, ver Braunisch *et al.* 2010). Ésta última medida es utilizada en terrenos montañosos y se representa mediante el índice TOPEX2000, el cual se calcula de la siguiente manera: para cada píxel se mide el ángulo vertical para el cual comienza el horizonte visible, observando el terreno hasta una distancia de 2000 metros en dirección de los ocho principales puntos cardinales (Hannah *et al.* 1995b; Mitchell *et al.* 2001). Estos ocho ángulos verticales son luego sumados, obteniendo el índice de exposición para cada píxel. Un índice TOPEX alto para un píxel muestra que esta zona tiene elevaciones relativamente cerca, las cuales aumentan el ángulo al que se percibe horizonte visible y por lo tanto la zona se encuentra menos

expuesta a los vientos (zona “cóncava”), lo cual repercute en la comunidad vegetal y animal asociada. Al igual que en el trabajo de Braunisch *et al.* (2010), se utilizó un valor umbral de 50 para dividir la capa de exposición topográfica en dos: valores de TOPEX2000 menores a 50 representan zonas mayormente convexas/expuestas (capa “CONVEX”) y valores mayores a 50 representan zonas mayormente cóncavas/protegidas (capa “CONCAV”). También se consideró un valor umbral de 1.080 m para dividir la capa de elevación en dos categorías en base a la definición realizada por Schlenker y Müller (1978), como fue utilizada por Braunisch *et al.* (2010), al igual que un valor umbral de 30 para la pendiente. De este modo, la topografía del área de estudio quedó representada por las capas “CONVEX”, “CONCAV”, “Elevación>1.080m”, “Elevación<1.080m”, “Pendiente>30”.

Todas las capas fueron trabajadas como categóricas (presencia/ausencia). Debido a que los tipos de uso del suelo son mutuamente excluyentes, cada pixel del área de estudio quedó representado por una clase de uso de suelo y tres atributos topográficos (exposición, elevación y pendiente, Tabla 1).

Comparaciones entre pares de individuos

Los sexos se analizaron inicialmente por separado al considerar que puede haber diferencias entre ellos en cuanto a la distancia de dispersión, la frecuencia de dispersión, y los efectos que el paisaje tiene sobre la dispersión (evidenciadas en los resultados de interpolación del paisaje genético obtenidos en el Capítulo 1). Este supuesto fue probado y se consideró la posibilidad de continuar analizando los sexos por separado juntarlos.

Se utilizaron los genotipos mencionados en los capítulos previos, obtenidos a partir de muestras recolectadas en cinco zonas (Reserva Integral Muniellos, Hermo, Degaña, Leitariegos y Alto Sil) durante la temporada reproductiva de los años 2009, 2010 y 2011. Para describir la similitud genética se utilizó el estimador del grado de parentesco utilizado en el Capítulo 2 (“ r_Q ”, descrito por Queller y Goodnight 1989), analizando machos y hembras por separado, sin incluir los microsatélites BG10 y TUT1 por encontrarse en un cromosoma sexual. Luego se procedió a realizar una regresión lineal entre r_Q y la distancia geográfica. Por último, se calcularon los residuales del modelo, con el objetivo de corregir de esta manera la similitud genética por el efecto de la distancia geográfica, y poder así evaluar la influencia de las características topográficas/paisajísticas sobre la similitud entre individuos. Estos residuales del parentesco (de ahora en más, “similitud genética”) fueron la variable respuesta que se intentó modelar, en función de los efectos de las diferentes variables explicativas (abundancia de características ambientales).

Tabla 1. Capas topográficas y de uso de suelo utilizadas, con su representación en el área de estudio (total de píxeles = 43705).

	Nº píxeles con presencia	Porcentaje de presencia
<i>Tipos de uso de suelo (a partir de la capa descargada)</i>		
Bosque deciduo	21927	50,170
Transición bosque-arbustal	3838	8,782
Páramo y brezal	9132	20,895
Praderas naturales	2246	5,139
Vegetación esclerófila †	17	0,039
Bosque de coníferas †	21	0,048
Bosque mixto ⁺	468	1,071
Cuerpos de agua ⁺	86	0,197
Áreas quemadas ⁺	468	1,071
Roca desnuda ⁺	319	0,730
Vegetación dispersa ⁺	800	1,830
Extracción mineral ⁺	333	0,762
Tendido urbano continuo †	165	0,378
Tierra principalmente ocupada por agricultura *	1017	2,327
Patrones complejos de cultivo *	842	1,927
Pasturas*	1975	4,519
<i>Tipos de uso de suelo (capas creadas)</i>		
Caminos	3321	7,599
Urbano	1102	2,522
Agricultural	3834	8,773
Borde de bosque	13770	31,507
Otros	2474	5,661
<i>Capas topográficas</i>		
Elevación <1080m	10394	23,782
Elevación >1080m	33311	76,218
Pendiente >30	8036	18,387
CONCAV	34266	78,403
CONVEX	9439	21,597

† Capas que fueron descartadas.

⁺ Capas que fueron agrupadas bajo el nombre “Otros”.

* Capas que fueron agrupadas bajo el nombre “Agricultural”.

Utilizando el programa FRICTIONNATOR (<https://www2.unil.ch/biomapper/frictionnator/frictionnator.html>) se analizaron los segmentos de terreno que separaron a cada par de individuos (machos y hembras por separado), calculando el número absoluto de píxeles de cada característica topográfica y de uso de suelo (C_p). Además del C_p de cada característica ambiental, se calculó la proporción de las mismas en el segmento (P_p , número de píxeles de la variable/número total de píxeles en el segmento). En el primer caso se asume un efecto aditivo de la característica ambiental sobre las celdas intervinientes, mientras que en el caso de la proporción de píxeles se ponen a prueba efectos no aditivos (Braunisch *et al.* 2010). Este proceso se realizó fijando el ancho de los segmentos entre individuos en 1 ó 5 píxeles, lo que corresponde a 110 y 550 m respectivamente. No se probaron segmentos más anchos debido a que el área de estudio es relativamente pequeña y algunos individuos se encontraron a poca distancia entre sí.

De esta manera, para cada par de individuos del mismo sexo se obtuvieron dos medidas de la abundancia de cada característica topográfica/paisajística (número absoluto de píxeles y proporción de píxeles con presencia) y una medida de la distancia genética, tanto para segmentos de 1 píxel de ancho como para segmentos de 5 píxeles.

Punto de partida para la creación de modelos multivariados

Como primer paso para estudiar el efecto del paisaje sobre la similitud genética de los individuos, fue necesario tomar una serie de decisiones sobre si considerar a machos y hembras por separado, usar segmentos de 1 ó 5 píxeles de ancho, y si usar C_p o P_p para describir la presencia de cada característica topográfica/paisajística. Con el único objetivo de asistir en la toma de esas decisiones, se procedió a analizar la correlación entre C_p y similitud genética, y entre P_p y similitud genética, mediante test de Mantel realizados en R, usando el paquete ECODIST (Goslee y Urban 2007). Este proceso se realizó para segmentos de 1 y 5 píxeles de ancho, analizando machos y hembras por separado.

En base a los resultados obtenidos en estas correlaciones (ver Resultados), se decidió proceder con la realización de los modelos univariados utilizando segmentos de 1 píxel de ancho, la medida P_p para describir la abundancia de cada característica topográfica/paisajística, y continuar analizando machos y hembras por separado.

Utilizando el programa Fstat v. 2.9.4 (Goudet 2003) se realizaron regresiones lineales univariadas (asignando grado de significancia en base a 2000 randomizaciones), tomando la similitud genética entre pares de individuos como variable respuesta y la abundancia de cada característica topográfica/paisajística como variable explicativa, del modo:

$$R_p = \beta_0 + \beta_1 P_p + \varepsilon_p \quad (1)$$

donde R_p es la medida de similitud genética (residual de la regresión entre parentesco y distancia geográfica) entre el par “ p ” de individuos; β_0 es el coeficiente de intercepción del eje Y en la regresión lineal; β_1 es la pendiente de la regresión lineal para la característica topográfica/paisajística; P_p es la proporción de píxeles conteniendo la característica topográfica/paisajística en el segmento que separa al par “ p ” de individuos; y ε_p es el término de error entre el par “ p ” de individuos.

El único objetivo de analizar estos modelos univariados fue seleccionar las variables topográficas y paisajísticas a incluir en los modelos multivariados.

Modelos multivariados y cálculo de la permeabilidad

El set de datos con las comparaciones pareadas entre machos fue dividido aleatoriamente en dos: el 70% se tomó para la creación de los modelos multivariados y el 30% restante para la evaluación de los mismos. Lo mismo se hizo para el set de datos con las comparaciones pareadas entre hembras. Se crearon para cada sexo modelos multivariados de la forma:

$$R_p = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i P_{p,i} + \varepsilon_p \quad (2)$$

donde R_p es la medida de similitud genética (residual de la regresión entre parentesco y distancia geográfica) entre el par “ p ” de individuos; β_0 es el coeficiente de intercepción del eje Y en la regresión lineal; n es el número de características topográficas/paisajísticas incluidas; β_i es la pendiente de la regresión lineal para la característica topográfica/paisajística “ i ”; $P_{p,i}$ es la proporción de píxeles conteniendo la característica topográfica/paisajística “ i ” en el segmento que separa al par “ p ” de individuos; y ε_p es el término de error entre el par “ p ” de individuos.

Cada una de las regresiones multivariadas incluyó solamente características topográficas/paisajísticas que resultaron significativas en las regresiones univariadas. Para realizar las mismas se utilizó nuevamente el programa Fstat v. 2.9.4, asignando el grado de significancia en base a 2000 randomizaciones. Para el caso “Elevación” y “TOPEX2000” (divididas en dos arbitrariamente considerando un valor umbral), cuando una variante resultó significativa en la regresión univariada, ambas fueron incluidas en la regresión multivariada. Por ejemplo, si “Elevación>1080m” fue

significativa en la regresión univariada, “Elevación<1080m” también fue evaluada en la construcción de los modelos multivariados.

Una vez realizado el análisis multivariado, se calculó la permeabilidad (L) en cada pixel del área de estudio (x), utilizando la metodología descrita en Braunisch *et al.* (2010). La permeabilidad, o conectividad, se define como el grado en el cual el paisaje facilita o dificulta el movimiento de los individuos entre parches de hábitat favorable (Taylor *et al.* 1993).

Para el cálculo de permeabilidad se asumió que:

- a) el efecto que cada variable/combinación de variables tiene sobre la similitud genética se correlaciona con la permeabilidad que el paisaje presenta para la especie y el sexo que se analiza; y
- b) existe un efecto aditivo de las variables topográficas/paisajísticas sobre la permeabilidad.

De este modo, se calculó la permeabilidad por pixel de la siguiente manera:

$$L(x) = \sum_{i=1}^n \beta_i O_{x,i} \quad (3)$$

donde $L(x)$ corresponde a la permeabilidad del píxel x ; β_i es el coeficiente representando el aporte de la variable “ i ” a la pendiente de la regresión (calculados en la ecuación 2); y $O_{x,i}$ es 1 cuando la variable en cuestión está presente en el píxel, y 0 en caso contrario. Sólo se consideran en esta ecuación los coeficientes β que fueron significativos en la regresión multivariada (es decir, los coeficientes que no fueron significativos se computaron como 0 en la ecuación 3). Con estos valores de L se creó un mapa de permeabilidad.

Validación de los modelos multivariados

Una vez construidos los modelos con aquellas variables del paisaje que afectan la conectividad y, a partir de ellos, calculada la permeabilidad, es necesario evaluar la validez del mapa de permeabilidad obtenido. En nuestro caso donde la permeabilidad implica flujo génico, la validación consiste en analizar la correlación entre la permeabilidad y la similitud genética. La validación se realizó utilizando los datos entre pares macho-macho que no se incluyeron en la construcción de los modelos. Para ello se corrió el programa FRICTIONNATOR analizando segmentos de 1 píxel de ancho entre pares de individuos (por lo expuesto en el apartado “*Punto de partida para la creación de modelos multivariados*”), contando el número de píxeles que contuvieron las combinaciones de características paisajísticas

incluidas en las regresiones multivariadas. Teniendo en cuenta el valor de permeabilidad L calculado para cada píxel, se obtuvo el valor de permeabilidad para cada segmento entre individuos, sumando los valores de permeabilidad de todos los píxeles contenidos y dividiendo este número por la cantidad total de píxeles del segmento (“permeabilidad media”, μ_L). Mediante el paquete ECODIST de R se realizó un test de Mantel entre μ_L (variable explicativa) y la similitud genética (residuales de la regresión lineal entre el coeficiente de parentesco y la distancia geográfica). También se realizó un test de Mantel entre la distancia geográfica (variable explicativa) y el coeficiente de parentesco (variable respuesta). De este modo puede verse si la distancia geográfica tiene un efecto sobre la similitud genética (i.e. parentesco), y si la similitud genética que no llega a ser explicada por la distancia geográfica (residuales del parentesco) puede ser explicada por la permeabilidad calculada.

Resultados

Punto de partida para la creación de modelos multivariados

Los test de Mantel usando segmentos de 1 ó 5 píxeles de ancho arrojaron resultados prácticamente idénticos, tanto para las comparaciones de similitud genética vs. C_p (Figura 3) como para las comparaciones similitud genética vs. P_p (Figura 4, ver también Tabla 2). En ambos casos se encontró además que la clase de uso de suelo “Otros” (bajo la cual se habían agrupado seis clases poco representadas en el área) mostró una correlación significativa con la similitud genética para el caso de los machos. Por lo tanto, se decidió analizar también estas seis clases por separado.

En los machos y utilizando el número absoluto de píxeles de cada característica topográfica y de uso de suelo (C_p), la similitud genética mostró una correlación positiva con la capa “Páramo y Brezal” y negativa con la capa “Otros”. En cambio, utilizando la proporción de píxeles de cada característica (P_p), se encontró que la similitud genética correlacionó negativamente con las capas “Otros”, “Urbano”, “CONCAV” y “Bosque mixto”, y positivamente con las capas “Bosque deciduo” y “CONVEX”. Finalmente, la capa “Caminos” fue la única que tuvo una correlación significativa y negativa con la similitud genética tanto en machos como en hembras.

Como patrón general, se encontraron más correlaciones significativas usando la proporción de presencia de las características de uso de suelo/topográficas. La única excepción fue la capa “Páramo y brezal”, que tuvo una correlación significativa con la similitud genética entre machos al usar C_p y no al usar P_p .

Las regresiones univariadas (Tabla 3) mostraron resultados similares a los obtenidos en los test de Mantel (Tabla 2), tanto para segmentos de 1 píxel como para segmentos de 5 píxeles.

Para el caso de los machos, la presencia de bosque deciduo mostró una relación positiva con la similitud genética entre pares de individuos. Por otro lado la presencia de carreteras pavimentadas, zonas urbanas, áreas con índice TOPEX2000 mayor a 50 (i.e. mayormente cóncavas/ protegidas), y bosque mixto (recordando que el mismo sólo ocupó una superficie pequeña del área de estudio) se relacionaron de manera negativa con la similitud genética (Tabla 3). En el caso de las hembras, tanto la presencia de carreteras pavimentadas como de zonas de elevación menor a 1.080 msnm mostraron una relación negativa con la similitud genética.

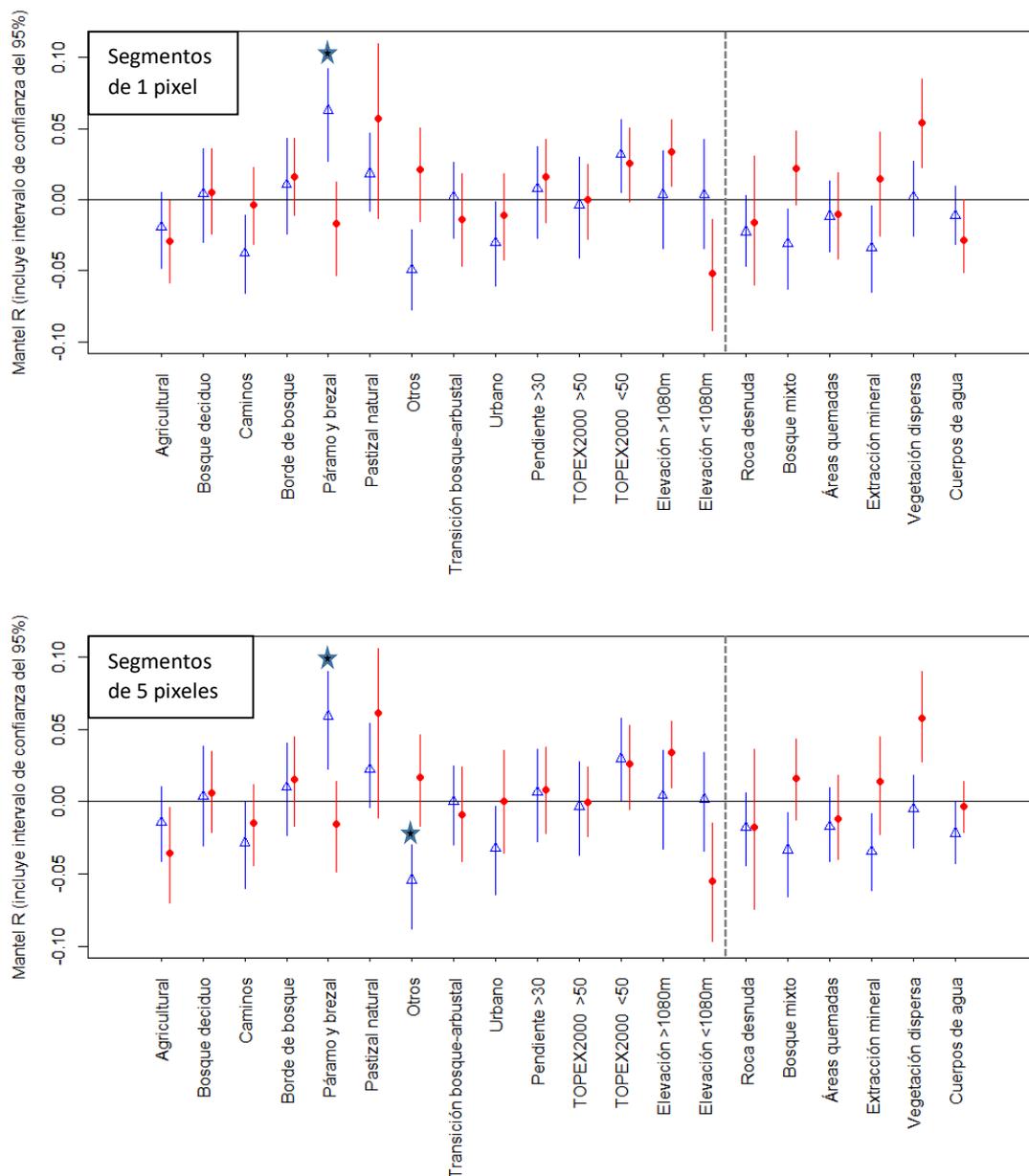


Figura 3. Resultados de los test de Mantel entre el número absoluto de píxeles de cada característica de uso de suelo/topográfica (C_p) y la similitud genética entre individuos. Triángulos: coeficiente de correlación de Mantel y su intervalo de confianza (95%) para pares macho-macho. Círculos: coeficiente de correlación de Mantel y su intervalo de confianza (95%) para pares hembra-hembra. Las estrellas indican las correlaciones significativas ($\alpha=0,05$). Las características de uso de suelo ubicadas a la derecha de la línea punteada son aquéllas inicialmente agrupadas bajo el nombre “Otros”.

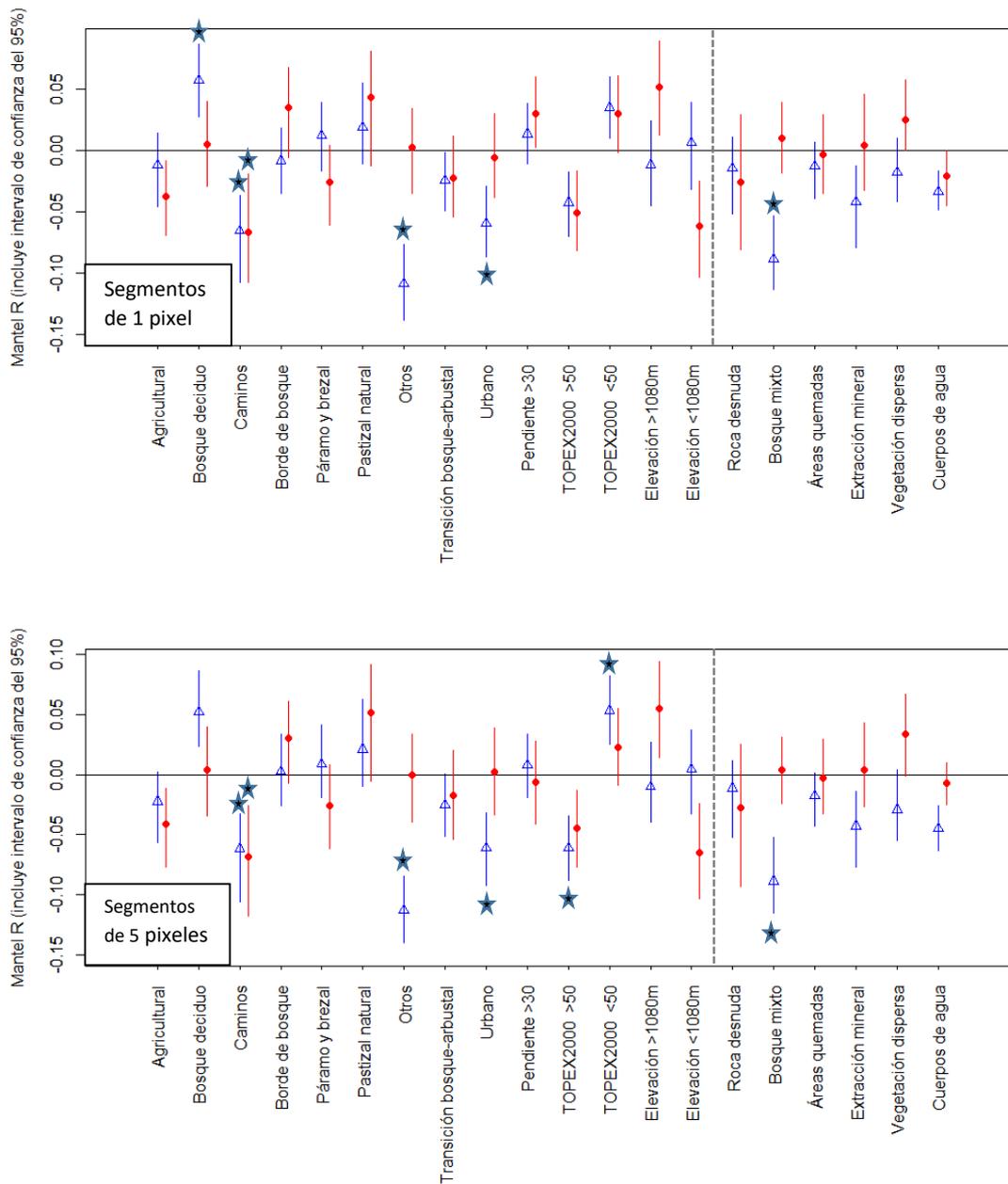


Figura 4. Resultados de los test de Mantel entre la proporción de píxeles de cada característica de uso de suelo/topográfica (P_p) y la similitud genética entre individuos. Triángulos: coeficiente de correlación de Mantel y su intervalo de confianza (95%) para pares macho-macho. Círculos: coeficiente de correlación de Mantel y su intervalo de confianza (95%) para pares hembra-hembra. Las estrellas indican las correlaciones significativas ($\alpha=0,05$). Las características de uso de suelo ubicadas a la derecha de la línea punteada son aquellas inicialmente agrupadas bajo el nombre “Otros”.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en los test de Mantel, indicando para cada característica de uso de suelo/topográfica si la misma presentó una correlación significativa positiva (+) o negativa (-) con la similitud genética en machos, hembras, o ambos sexos ($\alpha=0,05$).

	C_p (segmentos de 1 pixel)	C_p (segmentos de 5 pixeles)	P_p (segmentos de 1 pixel)	P_p (segmentos de 5 pixeles)
Agricultural	-----	-----	-----	-----
Bosque deciduo	-----	-----	♂♂ (+)	-----
Caminos	-----	-----	♂♂ y ♀♀ (-)	♂♂ y ♀♀ (-)
Borde de bosque	-----	-----	-----	-----
Páramo y brezal	♂♂ (+)	♂♂ (+)	-----	-----
Praderas naturales	-----	-----	-----	-----
Otros	-----	♂♂ (-)	♂♂ (-)	♂♂ (-)
Transición bosque-arbustal	-----	-----	-----	-----
Urbano	-----	-----	♂♂ (-)	♂♂ (-)
Pendiente >30	-----	-----	-----	-----
CONCAV	-----	-----	-----	♂♂ (-)
CONVEX	-----	-----	-----	♂♂ (+)
Elevación >1080m	-----	-----	-----	-----
Elevación <1080m	-----	-----	-----	-----
Roca desnuda ⁺	-----	-----	-----	-----
Bosque mixto ⁺	-----	-----	♂♂ (-)	♂♂ (-)
Áreas quemadas ⁺	-----	-----	-----	-----
Extracción mineral ⁺	-----	-----	-----	-----
Vegetación dispersa ⁺	-----	-----	-----	-----
Cuerpos de agua ⁺	-----	-----	-----	-----

⁺ Capas que fueron inicialmente agrupadas bajo el nombre “Otros” por cubrir una zona muy pequeña del área de estudio.

Tabla 3. Resultados de las regresiones univariadas entre la similitud genética y la abundancia de características topográficas/paisajísticas (medida como P_p , proporción de píxeles con presencia de la característica, en segmentos de 1 píxel de ancho). R: coeficiente de regresión de la variable, β_1 : pendiente de la regresión. Los resultados significativos se muestran en negrita ($\alpha=0,05$).

Variable	Machos			Hembras		
	R	β_1	p-valor (β_1)	R	β_1	p-valor (β_1)
Agricultural	-0,012	-0,160	0,576	-0,037	-0,474	0,268
Bosque deciduo	0,057	0,084	0,004	0,005	0,007	0,892
Camino	-0,066	-0,447	0,001	-0,067	-0,272	0,041
Borde de bosque	-0,008	-0,018	0,711	0,035	0,078	0,282
Páramo y brezal	0,012	0,047	0,591	-0,026	-0,108	0,423
Praderas naturales	0,019	0,181	0,365	0,043	0,820	0,186
Otros	-0,109	-0,465	0,001	0,002	0,016	0,939
Transición bosque-arbustal	-0,025	-0,197	0,245	-0,023	-0,151	0,477
Urbano	-0,059	-0,798	0,006	-0,006	-0,069	0,851
Pendiente >30	0,013	0,038	0,521	0,030	0,081	0,352
CONCAV	-0,043	-0,121	0,046	-0,051	-0,150	0,133
CONVEX	0,035	0,101	0,111	0,030	0,093	0,343
Elevación >1080m	-0,012	-0,022	0,567	0,052	0,072	0,107
Elevación <1080m	0,006	0,012	0,763	-0,062	-0,087	0,048
Roca desnuda ⁺	-0,014	-0,491	0,505	-0,026	-0,411	0,407
Bosque mixto ⁺	-0,089	-0,428	0,001	0,010	0,096	0,760
Áreas quemadas ⁺	-0,013	-0,190	0,551	-0,003	-0,041	0,916
Extracción mineral ⁺	-0,042	-0,402	0,056	0,004	0,053	0,892
Vegetación dispersa ⁺	-0,018	-0,362	0,413	0,025	0,584	0,435
Cuerpos de agua ⁺	-0,034	-2,745	0,108	-0,021	-6,744	0,524

⁺ Capas que fueron inicialmente agrupadas bajo el nombre “Otros” por cubrir una zona muy pequeña del área de estudio.

Modelos multivariados y cálculo de la permeabilidad

Los modelos multivariados incluyeron sólo aquellas variables que mostraron un aporte significativo para explicar la similitud genética en los modelos univariados: bosque deciduo, caminos, urbano y bosque mixto como variables de uso de suelo y TOPEX2000 y elevación como variables topográficas. Si bien “CONVEX” y “Elevación>1080m” no resultaron significativas en los modelos

univariados, sus contrapartes sí lo fueron. Por lo tanto, se decidió incluir ambas variantes en los modelos multivariados.

En primer lugar, es muy importante remarcar que el tipo de relación (positiva o negativa) entre las variables ambientales y la similitud genética no cambió al pasar de modelos univariados a multivariados (ver Tabla 3 y Tabla 4).

En la construcción de los modelos multivariados, algunas variables que fueron significativas en los modelos univariados perdieron su significancia (Tabla 4). Este es el caso de “CONCAV” y “CONVEX” para los machos, que al combinarse tanto con “Caminos” como con “Bosque Mixto” resultaron ser no significativas. Lo mismo ocurrió en el caso de “Elevación<1080m” y “Elevación1080m” en las hembras, que resultaron no significativas al combinarse con “Caminos”.

Los valores de permeabilidad calculados para los machos se encuentran representados en la Tabla 4 y en el mapa de la Figura 5. La menor permeabilidad se encontró en píxeles que tuvieron rutas pavimentadas, ya sea en combinación con baja o alta exposición topográfica ($L = -0,720$ y $L = -0,726$ respectivamente), ya que el grado de exposición no resultó significativo en estos modelos. La presencia de bosque mixto también generó una baja permeabilidad independientemente del grado de exposición topográfica. Bosque deciduo tuvo un efecto positivo sobre la similitud genética, pero al combinarse con baja exposición topográfica (efecto negativo sobre la similitud genética) la permeabilidad neta fue cercana a cero. La mayor permeabilidad se obtuvo para celdas que combinaron la presencia de bosque deciduo con alta exposición topográfica. Dado que en las hembras la única variable explicativa significativa en los modelos bivariados fue la presencia de rutas pavimentadas (que tuvo una relación negativa con la similitud genética), no se creó un mapa de permeabilidad para este sexo.

Validación de los modelos multivariados

La permeabilidad media μ_L calculada para los segmentos lineales entre machos correlacionó significativamente con su similitud genética corregida por la distancia Euclidiana (Tabla 5). Sin embargo, el porcentaje de variación explicado por la permeabilidad media fue menor al explicado por la distancia Euclidiana. En el caso de las hembras, los datos utilizados exclusivamente para la validación mostraron una correlación significativa entre la permeabilidad calculada (la cual estuvo dada únicamente por la abundancia de caminos, que afectan negativamente la permeabilidad) y el parentesco corregido por la distancia geográfica. Sin embargo, no se encontró efecto de la distancia Euclidiana sobre el parentesco.

Tabla 4. Resultados de las regresiones multivariadas entre la similitud genética y la abundancia de características topográficas/paisajísticas (medida como P_p , proporción de pixeles con presencia de la característica, en segmentos de 1 pixel de ancho). R_1 : coeficiente de regresión de la variable 1, R_2 : coeficiente de regresión de la variable 2, β_1 : pendiente de la regresión para la variable 1, β_2 : pendiente de la regresión para la variable 2, L : permeabilidad calculada para el pixel que contiene la combinación de variables en cuestión. Los resultados significativos se muestran en negrita ($\alpha= 0,05$).

Variable 1	Variable 2	R_1	R_2	β_1	β_2	p-valor (β_1)	p-valor (β_2)	L
<i>Machos</i>								
Bosque deciduo	CONCAV	0,057	-0,057	0,121	-0,178	0,004	0,021	-0,057
Caminos	CONCAV	-0,096	-0,016	-0,720	-0,046	<0,001	0,530	-0,720
Urbano	CONCAV	-0,040	-0,023	-0,505	-0,076	0,133	0,296	0,000
Bosque mixto ⁺	CONCAV	-0,106	-0,042	-0,544	-0,119	<0,001	0,099	-0,544
Bosque deciduo	CONVEX	0,057	0,051	0,116	0,161	<0,001	0,039	0,277
Caminos	CONVEX	-0,096	0,011	-0,726	0,033	<0,001	0,653	-0,726
Urbano	CONVEX	-0,040	0,022	-0,510	0,062	0,131	0,395	0,000
Bosque mixto ⁺	CONVEX	-0,106	0,035	-0,542	0,107	<0,001	0,139	-0,542
<i>Hembras</i>								
Caminos	Elevación >1080m	-0,123	0,065	-0,423	0,091	0,003	0,091	-0,423
Caminos	Elevación <1080m	-0,123	-0,065	-0,423	-0,091	0,004	0,098	-0,423

⁺ Capa que inicialmente fue agrupada con otras por cubrir una zona muy pequeña del área de estudio.

Discusión

Los resultados presentados constituyen una base para analizar el impacto que diferentes características ambientales tienen sobre conectividad en la población de urogallos cantábricos que habita el área de estudio. Como se mencionó en la introducción de este capítulo, la conectividad entre zonas va a estar determinada no sólo por el componente físico (i.e. distribución espacial de los elementos del paisaje) sino también por el componente comportamental de la especie (la respuesta de los individuos al ambiente físico, Crooks y Sanjayan 2006). Esta respuesta comportamental puede estimarse mediante métodos directos, como el análisis de movimientos, o indirectos (por ejemplo, midiendo similitud genética entre individuos). Los resultados de estos análisis son de gran relevancia para plantear estrategias de mejora de hábitat que permitan aumentar el efecto rescate, permitir la colonización de parches vacantes y disminuir los efectos de la endogamia y estocasticidad demográfica. Sin embargo, debido al estado de conservación del urogallo en la mayor parte de Europa, puede ser desaconsejable

aplicar técnicas de telemetría para estudiar los movimientos de las aves de forma directa, ya que su captura podría generar mortalidad o una modificación de los patrones de movimiento. Ims *et al.* (1993) incluso llegaron a proponer el estudio del topillo nórdico (*Microtus oeconomus*) como modelo experimental para estudiar los efectos de la fragmentación ambiental sobre el uso de hábitat por parte del urogallo, ya que los autores encontraron similitudes entre ambas especies en cuanto a su respuesta a la fragmentación del hábitat. Sin embargo, el uso de técnicas de muestreo no invasivas junto con análisis de genética del paisaje pueden permitir aumentar nuestro entendimiento sobre el uso de hábitat del urogallo sin correr el riesgo de generar un incremento en la probabilidad de mortalidad de los individuos.

Tabla 5. Evaluación de la permeabilidad calculada, utilizando el 30% de los datos (los cuales fueron reservados exclusivamente para la validación). En negrita se muestran los resultados significativos ($\alpha=0,05$).

Variable explicativa	Variable dependiente	Estadístico de Mantel (IC 95%)	p-valor	R ²
<u>Machos</u>				
<i>Distancia Euclidiana</i>	Parentesco	-0,110 (-0,151 a 0,056)	0,010	1,21%
<i>Permeabilidad media (μ_L) de los segmentos lineales</i>	Parentesco corregido por la distancia geográfica (i.e. residuales)	0,095 (0,054 a 0,137)	0,014	0,89%
<u>Hembras</u>				
<i>Distancia Euclidiana</i>	Parentesco	-0,061 (-0,126 a -0,002)	0,204	0,38%
<i>Permeabilidad media (μ_L) de los segmentos lineales</i>	Parentesco corregido por la distancia geográfica (i.e. residuales)	-0,155 (-0,219 a -0,084)	0,006	2,43%

Se asume que la fragmentación del hábitat ha tenido importantes efectos negativos sobre las poblaciones de urogallo en gran parte del oeste y centro de Europa (Wegge *et al.* 1992; Kurki *et al.* 2000; Segelbacher *et al.* 2003a). Estos efectos adversos de la fragmentación no sólo se ven reflejados en una pérdida de variabilidad genética (Rutkowski *et al.* 2005; Segelbacher *et al.* 2008). Por ejemplo, Kurki *et al.* (2000) y Baines *et al.* (2016) encontraron evidencias de que el incremento poblacional de

zorro rojo (*Vulpes vulpes*) y marta (*Martes martes*) causado por la fragmentación de bosques se asocia con una disminución en el éxito reproductivo del urogallo. Actividades tendientes a mejorar la conectividad entre parches de hábitat podrían, al menos, disminuir los efectos de la endogamia (en caso de que exista) y permitir la recolonización de parches que han quedado vacantes.

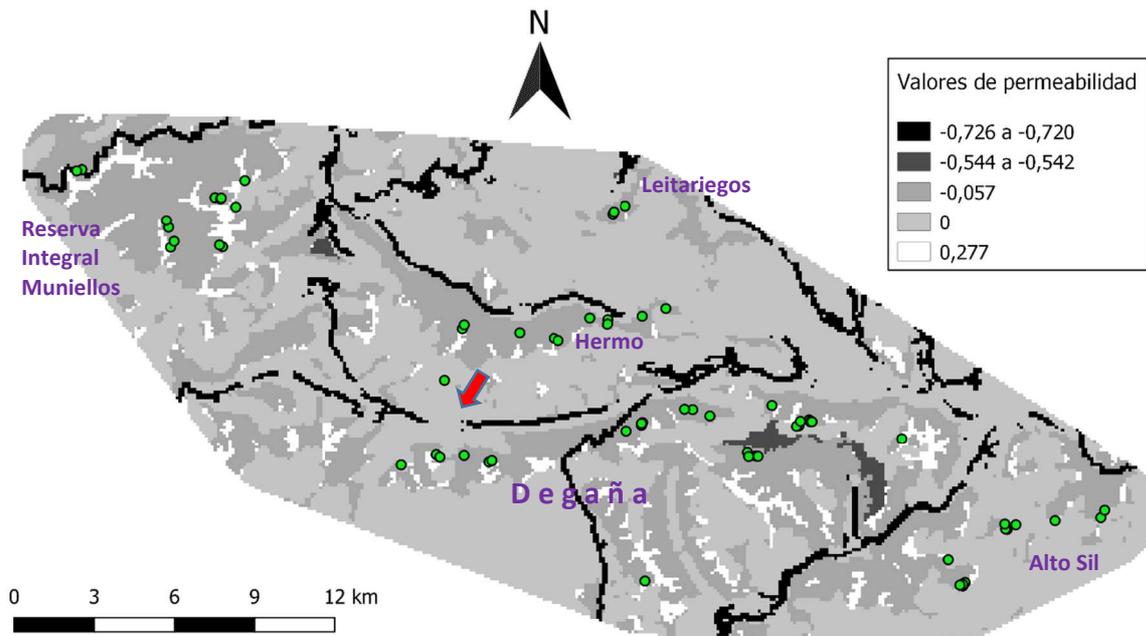


Figura 5. Mapa de permeabilidad creado para los machos. Los círculos representan la posición asignada a cada uno de los 67 machos cuyas muestras fueron georreferenciadas. Un individuo fue registrado en Hermo (2009), luego en Degaña (2010 y 2011) y nuevamente en Hermo (2011), por lo que su posición media cae entre medio de estas dos zonas de muestreo. La flecha indica una de las áreas donde existe una carretera pavimentada, pero la misma no aparece en el mapa debido a su cercanía a un centro urbano (recordando que esta última categoría no tuvo una relación significativa con la similitud genética, y por lo tanto su aporte a la permeabilidad es nulo).

En este capítulo se estudió de manera indirecta (i.e. midiendo similitud genética) el efecto que diferentes características físicas del área de estudio pueden tener sobre la conectividad entre núcleos poblacionales del urogallo cantábrico, con el propósito de aumentar el conocimiento sobre el comportamiento de esta subespecie de forma que permita mejorar planes de conservación *in situ*. Se construyó un mapa de permeabilidad que permite identificar no sólo las regiones prioritarias en términos de conservación dentro de la matriz ambiental bajo estudio, sino también las acciones de manejo *in situ* más apropiadas. Se optó por utilizar una metodología puesta a prueba por Braunisch *et al.* (2010) en su estudio de una población de urogallos en rápido declive (Segelbacher *et al.* 2008)

presente en un hábitat fragmentado de la Selva Negra, Alemania. Esto permitió realizar comparaciones entre ambos trabajos, encontrando diferencias que pueden ser atribuidas a las características particulares del urogallo cantábrico y la desigualdad de escala del área estudiada (en esta tesis se trata de un área más pequeña), y similitudes que probablemente sean comunes a toda la especie.

Nuestros resultados demuestran que el grado de similitud genética entre individuos se correlaciona con ciertas características topográficas y de uso de suelo (i.e. efecto del paisaje sobre los patrones de flujo génico). El porcentaje de variación explicado por estas características fue bajo: utilizando exclusivamente los datos para la evaluación de los modelos, la permeabilidad media en segmentos lineales explicó un 0,89% de la variabilidad para machos y un 2,40% para hembras. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Braunisch *et al.* (2010) para urogallos en la Selva Negra, donde la permeabilidad explicó el 1,21% y 0,43% de la variación en machos y hembras respectivamente.

Los test de Mantel realizados en este capítulo mostraron diferentes patrones de correlación paisaje-similitud genética entre machos y hembras. Si bien la similitud genética en los machos se correlacionó, positiva o negativamente, con diversas variables del paisaje, la similitud genética entre pares de hembras sólo presentó una correlación negativa con la variable “Caminos”. Este resultado podría estar indicando que a la escala de este trabajo (aprox. 20 x 40 km), menor que la estudiada en el trabajo de Braunisch *et al.* (2010) que fue de aprox. 60 x 150 km, las hembras se ven afectadas en sus desplazamientos por menos características de paisaje, en comparación con los machos. Por lo tanto, fue necesario analizar cada sexo por separado mediante los modelos multivariados para lograr estimar la permeabilidad en el área de estudio.

En primer lugar, y en contra de lo esperado, las zonas urbanas no presentaron una contribución significativa al cálculo de la permeabilidad, la cual si fue registrada para el estudio realizado en la Selva Negra. Es posible que esta diferencia se deba a que las zonas urbanas en el área de estudio de esta tesis poseen un número de habitantes mucho menor. En la localidad de Villablino (la zona urbana más poblada en el área de estudio) se censaron 8.919 personas en 2018, siendo las demás zonas urbanas de mucho menor porte (máximo 1.037 habitantes en Caboalles de Abajo, datos censales del mismo año). Por otro lado el pueblo de Baden-Baden, la zona más poblada de la Selva Negra, contaba con 55.123 habitantes en 2018, y en segundo lugar se encuentra el pueblo de Bad Wildbad con 10.130 habitantes censados en el mismo año.

Para los machos, la única característica topográfica que tuvo influencia sobre la permeabilidad fue la exposición: un mayor grado de exposición (“CONVEX”, zonas donde el índice de exposición topográfica TOPEX2000 fue menor a 50) tuvo un efecto positivo sobre la permeabilidad, mientras que una menor exposición (“CONCAV”) tuvo el efecto contrario. Esto apoya la hipótesis mencionada en Braunisch *et al.* (2010), quienes plantean que los patrones de movimiento de las aves podrían estar asociados a las cimas de las elevaciones como estrategia para ahorrar energía

al mismo tiempo que se mantiene altitud. Sin embargo, la exposición topográfica sólo tuvo incidencia sobre la permeabilidad al combinarse en el modelo multivariado con la presencia de bosque decido. La combinación de este tipo de bosque y una mayor exposición topográfica evidenció favorecer la conectividad entre zonas. El urogallo cantábrico es la única subespecie que habita bosque puramente decido, por lo que su asociación con la conectividad es totalmente esperable. Este resultado puede verse claramente en los análisis univariados, donde se encontró tanto con el test de Mantel como con la regresión lineal, una asociación positiva y significativa entre presencia de bosque decido y similitud genética. Fueron los análisis multivariados los que ofrecieron un resultado realmente interesante: la combinación de bosque decido con alta exposición constituye el único modelo que favorece la conectividad en el área de estudio. En esta matriz, ambas características por separado ocupan una superficie importante del área de estudio (50,170% para bosque decido y 21,596% para “CONVEX”, Tabla 1). Sin embargo, los píxeles que combinan ambas características se encuentran restringidos principalmente a las laderas norte de la cordillera (Figura 6). Si bien las condiciones climáticas de las laderas sur en zonas con alta exposición topográfica son más xéricas, permiten la formación de bosques deciduos, en general con especies de menor porte como robles (*Quercus pirenaica* y *Q. orocantabrica*). Estas laderas sur han sufrido quemadas repetidas por acción antrópica con mayor frecuencia, lo que explica la menor abundancia de bosque en ellas.

Esta información estaría sugiriendo que las actividades de mejora de hábitat con el fin de aumentar la conectividad deberían enfocar sus esfuerzos en reducir el efecto negativo de ciertas modificaciones antrópicas, ya que el incremento en abundancia de zonas que favorecen la conectividad está fuera del alcance de cualquier acción de manejo. Al mismo tiempo, es necesaria una acción de conservación que preserve los pocos parches de bosque decido y alta exposición topográfica.

Las zonas donde hay presencia de bosque decido pero en combinación con baja exposición topográfica tuvieron un efecto neto negativo sobre la permeabilidad pero cercano a cero ($L = -0,057$), por la contraposición entre el bosque decido que favorece la conectividad y la menor exposición topográfica que disminuye la conectividad.

Con respecto al bosque mixto, su contribución al cálculo de la permeabilidad está sujeta a un alto grado de incertidumbre por tratarse de un elemento paisajístico muy poco abundante en el área de estudio (1,071%). Por lo tanto consideramos que el efecto negativo de esta variable sobre la permeabilidad, aunque de valor absoluto importante ($-0,544$; Tabla 4 y Figura 5) es despreciable a la escala del estudio.

Si bien la metodología aquí utilizada ya se ha usado para estudiar otra población de urogallos, la misma puede ser criticada por no evaluar la correlación de las variables que se incluyen en los modelos multivariados. En el caso de esta tesis, las zonas urbanas y carreteras se encuentran mayormente en zonas de valles (topográficamente “cóncavas”), por lo tanto existe una correlación entre

esos usos de suelo y el grado de exposición topográfica. Teniendo este problema de multicolinealidad en los datos de partida, no podría en principio asegurarse que la presencia de carreteras pavimentadas sea el factor que afecta la conectividad, o si por el contrario se trata de la presencia de valles. Sin embargo, otros valles del área de estudio no tuvieron un efecto negativo sobre la similitud genética, por ejemplo en la Reserva Integral Muniellos (ver Figuras 2 y 5). Por lo tanto, podría considerarse que no hay datos suficientes para evaluar la presencia de carreteras pavimentadas por sí solas (independientemente del grado de exposición topográfica) pero su presencia combinada con terreno cóncavo afecta negativamente la conectividad. En el caso de los machos, esta combinación produjo el mayor impacto sobre la similitud genética, generando la menor permeabilidad detectada. Incluso para las hembras, cuya similitud genética mostró una menor dependencia de las estructuras ambientales, la presencia de carreteras pavimentadas fue la única característica de uso del suelo a la que pudo atribuirse un efecto significativo sobre la conectividad. Esta observación cobra especial relevancia cuando se tiene en cuenta la distribución espacial de esta característica y la metodología utilizada: como se mencionó en la introducción, Geiser *et al.* (2013) sugieren que el método basado en segmentos rectos entre puntos puede fallar en detectar barreras lineales (por ejemplo: rutas y ríos). Esto se debe a que las barreras estrechas que se extiendan perpendicularmente a la recta que une dos puntos, estarían representando una parte muy pequeña del hábitat incluido en el segmento entre dichos puntos, lo cual puede conducir a un fallo en la detección del efecto que generan estas características. El hecho de que los análisis realizados en el presente capítulo hayan logrado detectar un fuerte efecto negativo de las carreteras pavimentadas, a pesar de utilizar el método de segmentos rectos entre puntos, podría estar dando testimonio de la gran importancia que esta modificación antrópica tiene como limitante del flujo génico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por María Morán-Luis en su tesis doctoral (2017), analizando movimientos individuales y calculando caminos de menor costo. En ese estudio se encontró que la ruta de movimiento más importante (en términos de parches de hábitat atravesados por los individuos) fue la que conecta las zonas de Muniellos y Hermo. Coincidentemente, existe una conexión entre ambas zonas en cuanto a la ausencia de caminos pavimentados dada por el hecho de que la carretera AS-15 pasa por un túnel, sobre el cual se extiende bosque deciduo.

En este escenario donde los caminos constituyen una importante barrera al flujo génico, cobra valor la posibilidad de usar pasos de fauna silvestre como herramienta de conservación. En América del Norte, la instalación de estas estructuras tiene su origen en 1950 y la región cuenta con cerca de 460 pasos para especies terrestres, mostrando un incremento en las últimas décadas en cuanto al número de especies consideradas y el tiempo de monitoreo post-instalación de los pasos de fauna (Cramer y Bissonette 2005). En lo que respecta a Europa, numerosos países (en particular Francia, Países Bajos, Suiza y Alemania) demandan procesos de planificación intensivos de autopistas que incorporan infraestructuras como los pasos de fauna para mitigar los efectos perjudiciales al ecosistema (Tepper 2011).

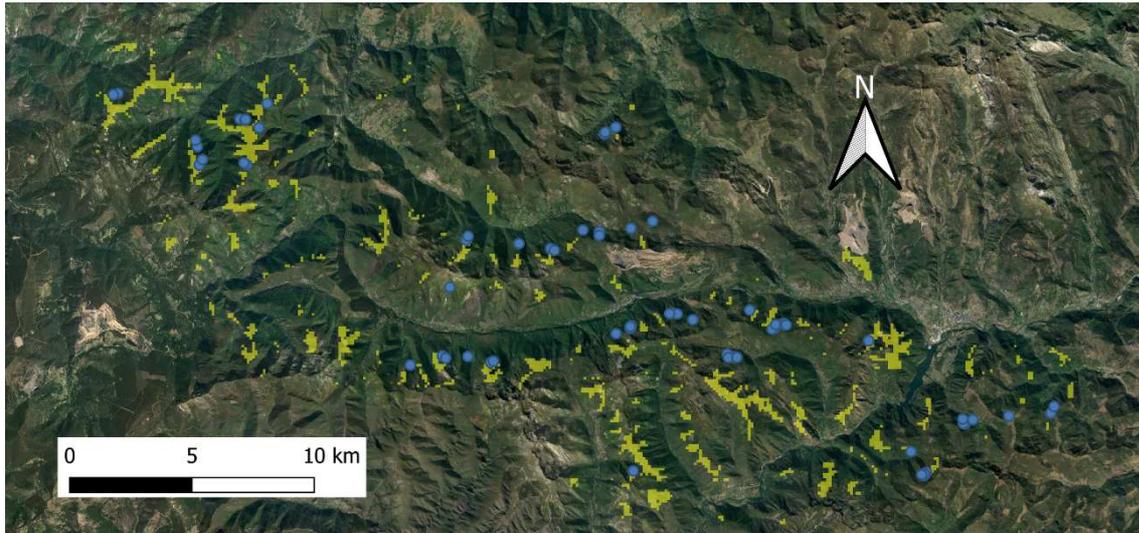


Figura 6. Imagen satelital del área de estudio. Los círculos representan la posición asignada a cada uno de los 67 machos cuyas muestras fueron georreferenciadas. Un individuo fue registrado en Hermo (2009), luego en Degaña (2010 y 2011) y nuevamente en Hermo (2011), por lo que su posición media cae entre medio de estas dos zonas de muestreo. Las zonas en amarillo representan los pixeles donde coinciden la presencia de bosque deciduo y terreno convexo/mayor exposición topográfica (única combinación para la cual se encontró un efecto positivo sobre la conectividad).

Existen diversas maneras de medir el uso de los pasos de fauna por las especies de interés (resumidas en el trabajo de Jumeau *et al.* 2017), entre las que se encuentran el uso de sustratos especiales que permitan distinguir e identificar las huellas dejadas por los animales, cámaras infrarrojas, radiotelemetría, estudios genéticos y el uso de cámaras trampa, siendo este último el método más común. Si bien se considera que los pasos de fauna deben contribuir en la prevención del aislamiento genético entre subpoblaciones, pocos estudios han logrado evaluar su eficacia en términos de movimientos efectivos (Sawaya *et al.* 2014). Como exponen Corlatti *et al.* (2009), es necesario implementar estudios que sigan un enfoque más experimental, en los cuales se investigue primero si existe un efecto sobre la estructura genética que pueda ser atribuible a la presencia de carreteras, continuando por el establecimiento de pasos de fauna en caso afirmativo y realizando un monitoreo de uso de los pasos de fauna prolongado en el tiempo (luego de un periodo de habituación por parte de la/s especie/s en cuestión), para culminar con una reevaluación de la diversidad genética años después.

Sawaya *et al.* (2014) estudiaron el efecto que tienen una importante autopista (*Trans-Canada Highway*, la principal ruta de transporte Este-Oeste del país) y los pasos de fauna en ella, sobre dos especies de osos (*Ursus arctos* y *U. americanus*). Utilizando muestras no invasivas, los autores analizaron la posibilidad de estructuración genética asociada a la autopista, el movimiento de los osos

(por detección de individuos en los pasos de fauna, detección de un mismo individuo a ambos lados de la autopista, y asignación genética de un individuo al lado de la autopista opuesto a donde fue detectado), y la paternidad. Los resultados indicaron que existe estructuración genética en *U. arctos* asociada a la autopista, pero no en *U. americanus*. Sin embargo, ambas especies hicieron uso de los pasos de fauna y lograron reproducirse con éxito. Los autores concluyeron que los pasos de fauna efectivamente generan conectividad genética a través de la autopista.

Si bien los estudios sobre la efectividad de pasos de fauna no suelen incluir especies de aves, asumiendo que las carreteras no generan grandes efectos en animales voladores, Reijnen *et al.* (1996) demostraron que incluso varias especies de passeriformes evitan las carreteras y áreas adyacentes en respuesta al aumento en el volumen de tránsito vehicular. Con resultados similares, Delaney *et al.* (2010) encontraron que el flujo génico en poblaciones de tres especies de lagartijas y una especie de ave se ve reducido significativamente por la presencia de caminos y autopistas, a pesar de las diferencias entre estas especies en cuanto a su movilidad. Para el caso particular de tetraónidas como el urogallo, Hovick *et al.* (2014) realizaron una revisión de trabajos publicados hasta el momento sobre el efecto que diferentes estructuras antrópicas tienen sobre las poblaciones. Los autores concluyeron que el mayor impacto negativo sobre estas especies (observado en forma de evasión de ciertas áreas) se debe a la presencia de estructuras asociadas a la extracción de gas y petróleo, aunque también reportan un efecto negativo de caminos. Debido a que los autores agruparon diversos tipos de caminos independientemente de su superficie y nivel de tránsito vehicular (por ejemplo incluyendo caminos sin asfaltar), los mismos advierten que el efecto negativo de esta modificación antrópica puede ser aún mayor. Es decir, los caminos con tránsito mínimo podrían tener muy poco efecto sobre las especies de tetraónidas mientras que otros tipos de caminos probablemente causen un fuerte efecto, pero al combinar todos los caminos en el análisis sus efectos se promedian. En cuanto al uso de pasos de fauna por estas especies, Wang *et al.* (2017) registraron mediante el uso de trampas cámara, la presencia de grévol común (*Bonasa bonasia*) en un túnel conectando dos reservas naturales separadas por una autopista.

A la luz de estos trabajos previos y los resultados presentados en este capítulo, podría sugerirse la implementación de pasos de fauna que disminuyan el efecto negativo de las carreteras sobre la permeabilidad ambiental calculada para el urogallo cantábrico en el área de estudio. Si bien la especie requiere de bosques en etapas maduras (deciduos para el caso de la subespecie cantábrica), en este trabajo no se encontró evidencia para considerar que otras estructuras paisajísticas tengan un efecto negativo sobre la permeabilidad, lo que facilitaría el establecimiento de dichos pasos de fauna. Teniendo en cuenta el uso cada vez más común de esta estrategia de conservación, principalmente en América del Norte y varios países de Europa, la aplicación de la misma parece factible en términos económicos y logísticos.

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, actualmente se reconocen dos núcleos poblacionales de urogallo en la Cordillera Cantábrica (Pollo *et al.* 2003), con un nivel de conexión escaso o nulo. Sería interesante estudiar las características del hábitat en el área que separa ambos grupos y la posibilidad de reestablecer la conectividad entre ellos teniendo en consideración los resultados de genética del paisaje obtenidos.

Resumen:

1. Se detectaron diferencias entre sexos en cuanto al efecto de diferentes características topográficas/de uso de suelo sobre la similitud genética de los individuos.
2. El porcentaje de variación en la similitud genética explicado por las características topográficas/de uso de suelo fue bajo pero comparable con un estudio realizado a mayor escala.
3. Para los machos, la combinación bosque deciduo + alta exposición topográfica tuvo un efecto positivo sobre la permeabilidad. Por otro lado, la combinación bosque deciduo + baja exposición topográfica tuvo un efecto neto negativo sobre la similitud genética (positivo por la presencia de bosque deciduo pero contrarrestado por la baja exposición topográfica), aunque el mismo fue cercano a cero.
4. La presencia de carreteras pavimentadas tuvo el mayor impacto negativo sobre la similitud genética para ambos sexos.
5. La implementación de pasos de fauna que disminuyan los efectos de las carreteras pavimentadas podría tener efectos positivos sobre la conectividad, y por lo tanto la persistencia, del urogallo cantábrico en el área de estudio.

Discusión general



La Biología de la Conservación es un área que reviste de numerosas problemáticas metodológicas que la convierten en un campo de investigación particularmente complicado. En primer lugar, los permisos para colecta de muestras de especies protegidas son más difíciles de conseguir que para especies no protegidas (Petersen *et al.* 2008), incluso cuando se propone utilizar métodos de colecta no invasivos. Los recursos económicos necesarios para investigación suelen estar sesgados hacia el estudio de especies carismáticas (Ducarme *et al.* 2013; Colléony *et al.* 2017). En ciertos casos, esto puede ser usado a favor de la conservación en un sentido más holístico cuando la especie carismática genera un aumento en el grado de interés en conservación por parte de la población (especies “bandera”, ver Williams *et al.* 2000). Cuando además la especie necesita áreas extensas de hábitat compatible con los requerimientos de otros integrantes menos carismáticos del ecosistema, se espera que estos últimos se beneficien de las medidas tendientes a conservar la especie bandera (en esta situación, la especie carismática se denomina “paraguas”, Suter *et al.* 2002). En lo que respecta a dar ese paso desde la investigación científica a la aplicación de pautas de manejo, existe el problema de que los intereses de conservación pueden ser contrapuestos a los intereses económicos de la región, prácticas culturales, o desarrollo social. Además, la necesidad de incluir los resultados de la investigación científica en el diseño de planes de manejo, políticas gubernamentales, análisis veterinarios, actividades de divulgación y educación requiere la interacción de numerosos agentes pertenecientes a diversos ámbitos, quienes en muchos casos no toman en cuenta los conocimientos específicos sobre la biología de la especie (Pullin *et al.* 2004). Sin embargo, es posible que al facilitar el acceso a la información sobre la biología de una especie, dando pautas claras sobre qué acciones pueden tener un impacto positivo en la conservación, esta información sea tomada en cuenta por los agentes abocados a diseñar planes de manejo.

El objetivo planteado en esta tesis (obtener información claramente aplicable al diseño de planes de manejo para el urogallo cantábrico) fue cumplido en cada capítulo, e incluso, a partir de esta información, pueden darse recomendaciones sobre cómo mejorar el monitoreo de la población. Además de los resultados específicos obtenidos, el volumen de bibliografía resumido en esta tesis puede resultar de utilidad para guiar búsquedas de información por parte de los encargados de realizar acciones de manejo.

Los resultados evidenciaron que los urogallos presentes en el área no se encuentran estructurados desde el punto de vista genético. Esto permite definir a las cinco zonas estudiadas como una única unidad de manejo (UM, Moritz 1994). El urogallo cantábrico ya fue propuesto como una Unidad Evolutivamente Significativa diferente del resto de las poblaciones europeas (Rodríguez-Muñoz *et al.* 2007). Sin embargo, no existen estudios previos acerca de la existencia o no de distintas UM en la población cantábrica. Las Unidades de Manejo se definen como aquellas poblaciones que, aunque no sean recíprocamente monofiléticas para haplotipos mitocondriales, han sufrido divergencia significativa e importante desde el punto de vista de la conservación, y se encuentran

en la actualidad conectadas por niveles tan bajos de flujo génico que pueden ser consideradas funcionalmente independientes. Así, las UM incluyen poblaciones que presentan problemas de manejo a corto plazo, y que deben gestionarse en forma independiente. En el Capítulo 1 se encontraron evidencias de que toda la región estudiada puede ser manejada en su conjunto con las mismas herramientas de conservación.

Por otra parte, al ser una única Unidad de Manejo, fue posible realizar las comparaciones de pares entre el total de los individuos vs. aquellos que compartieron leks (Capítulo 2), al igual que las comparaciones entre pares de individuos realizadas para estudiar el efecto de diferentes características topográficas/paisajísticas sobre la similitud genética (Capítulo 3). En un escenario donde hay diferentes grupos genéticos, no hubiese sido metodológicamente correcto calcular parentesco entre aves pertenecientes a diferentes grupos, debido a que los mismos difieren en sus frecuencias alélicas. Por lo tanto, los planes de manejo que incluyan un análisis de la efectividad de sus actividades (por ejemplo estimando el tamaño poblacional) se beneficiará de estos resultados, al poder definir mejor el área sobre la cual tienen injerencia las mismas.

No se encontró relación entre el grado de exogamia y las medidas utilizadas para describir el comportamiento filopátrico. Este análisis fue motivado por el estudio de Höglund *et al.* (2002), quienes capturaron machos de *L. tetrrix* en Finlandia durante sucesivas temporadas reproductivas y también durante el invierno, encontrando que el grado de exogamia de los individuos correlaciona con su territorialidad en la temporada reproductiva (comparando machos observados ocupando un territorio vs. machos que no se observaron en un territorio). Debido a que esta tesis hace uso de muestras obtenidas de forma no invasiva, para las cuales hay mayor éxito en la detección de individuos en comparación con observaciones directas (Solberg *et al.* 2006; Morán-Luis *et al.* 2014), se intentó determinar si los machos que fueron registrados en un solo lek (“territoriales”) presentaban un nivel de exogamia diferente de aquéllos que visitaron varios leks. Como se mencionó en el Capítulo 2, es posible que analizar únicamente los desplazamientos ente leks en la temporada reproductiva sea un método que genere demasiados sesgos sobre esta característica. De esta manera y por el momento no puede hacerse un aporte a los planes de conservación futuros en cuanto a la selección de individuos a reintroducir en base a su grado de exogamia. Sin embargo, sí pudo determinarse que los machos que comparten el lek están en promedio más relacionados de lo esperado por azar, lo cual es congruente con un escenario donde opera el mecanismo de *kin selection*. En caso de que vuelvan a realizarse suplementaciones poblacionales a partir de individuos criados en cautiverio, sería interesante plantear la posibilidad de recuperar leks inactivos mediante la liberación de grupos de machos emparentados, en vez de individuos aislados en tiempo y espacio.

Finalmente, en el Capítulo 3 se encontró evidencia para considerar que los caminos pavimentados presentan baja permeabilidad para movimientos de urogallos machos y

hembras. Por otro lado, la presencia de zonas de alta exposición topográfica en combinación con bosque deciduo genera alta permeabilidad para urogallos machos, pero en las laderas sur de la cordillera las quemadas reiteradas han hecho que pocos lugares cuenten con estas características. Si se pretende realizar actividades que promuevan la conectividad entre leks/zonas de muestreo, sería aconsejable intentar mitigar los efectos negativos de los caminos pavimentados.

En cuanto a cuestiones metodológicas, se destacan dos cuestiones principales. Primero, teniendo en cuenta el número creciente de trabajos que muestran una correlación entre el grado de endogamia y supervivencia/potencial reproductivo, se plantea un interrogante: ¿tiene sentido estudiar el grado de endogamia en especies amenazadas analizando sólo adultos, cuando las cohortes podrían estar pasando por un filtro, sobreviviendo sólo los menos endogámicos? O en el caso particular del urogallo, ¿tiene sentido realizar estimaciones de endogamia poblacional solamente a partir de adultos que concurren a los leks? Sin duda esta metodología es útil para lograr una buena representación de la población de individuos que potencialmente pueden reproducirse, pero dado que los mismos podrían ser mayoritariamente aquéllos con un grado de exogamia que les permitió alcanzar ese estado, podría haber un sesgo importante cuando lo que se desea es estimar el grado de variabilidad genética. Utilizando la metodología tradicional, no se encontró evidencia de endogamia en la población de urogallos cantábricos en el área de estudio (Capítulo 1), pero esta metodología debería ser replanteada, incluyendo muestras de otros sectores etarios de la población. Obtener muestras de pichones y juveniles en estado silvestre es metodológicamente difícil, pero posible.

Por otro lado, el hecho de que el locus BG10 esté en un cromosoma sexual (Strzała *et al.* 2015), al igual que el locus TUT1 (este trabajo) debería desalentar su uso en análisis poblacionales que asumen herencia mendeliana de los marcadores. Sin embargo, estos marcadores continúan siendo usados para tal fin (por ejemplo Cayuela *et al.* 2019) y fueron utilizados por el proyecto LIFE+ urogallo cantábrico para realizar estimaciones de parentesco, estructuración poblacional y tamaño efectivo (<https://www.lifeurogallo.es/sites/default/files/files/informe-genetica-life-urogallo.pdf>). Más allá de los sesgos que este error pueda haber causado en las conclusiones de esos estudios, puede destacarse como punto positivo de incluir estos loci el descubrimiento de un patrón interesante: como se mencionó en el capítulo 1 el desequilibrio por ligamiento entre TUT1 y BG10 sólo se encontró hasta el momento en urogallo cantábrico y no para otras subespecies. Además, un estudio de urogallo cantábrico pero utilizando muestras más antiguas (50% del periodo 1959-1988, y el resto del periodo 1998-2007) no detectó este ligamiento (Rodríguez-Muñoz *gv'cn* 2015). Los resultados expuestos en esta tesis dan sustento a la idea de que la población cantábrica (al menos en el área de estudio) atravesó recientemente un cuello de botella. Este proceso habría promovido la pérdida de combinaciones de alelos entre BG10 y TUT1, y dichas combinaciones aún no se han recuperado por mutación o recombinación (la cual parece poco común, indicando que estos loci pueden ocupar

posiciones bastante cercanas en el cromosoma). Y si aún no pudo restablecerse la variabilidad genética en microsatélites, para los cuales se asume una tasa de mutación alta (por ejemplo Weber y Wong 1993 encontraron una tasa de mutación de $1,2 \times 10^{-3}$ en humanos), sería esperable que la variabilidad en loci que se expresan tampoco se haya regenerado. Según plantean Rodríguez-Muñoz *et al.* (2015), la pérdida de diversidad genética reciente se debió a la caza por deporte durante la temporada reproductiva, especialmente entre las décadas de 1940 y 1970. De acuerdo a los autores, esta actividad estuvo principalmente dirigida a la caza de machos realizando despliegues en leks, removiendo individuos de alto valor reproductivo. Sería interesante investigar si genes ubicados en el cromosoma Z que afectan la supervivencia o fertilidad presentan una frecuencia menor en la población, luego de disminuir el número de machos de alto valor reproductivo.

En el Capítulo 1 no se encontró una correlación significativa entre distancia genética cruda y distancia geográfica (Euclidiana) para los machos ni para hembras, por lo tanto se concluyó que no hay diferencias entre sexos en cuanto a la capacidad dispersiva en el área de estudio. La misma metodología y programa (ALLELES IN SPACE) utilizados aquí han sido reportados en numerosos estudios recientes de vertebrados (Lewallen *et al.* 2007; Brown *et al.* 2009; Nicholson *et al.* 2011; Barroca *et al.* 2012), e incluso para *T. urogallus* en una población de Alemania (Segelbacher *et al.* 2008) donde se encontró un patrón de aislamiento por distancia en machos pero no en hembras, sugiriendo mayores distancias de dispersión y tasa de flujo génico en estas últimas. Por otro lado, el Capítulo 3 muestra una relación significativa entre distancia geográfica y genética para machos, utilizando el mismo análisis estadístico (prueba de Mantel) pero midiendo la distancia genética como parentesco entre individuos. Este patrón de aislamiento por distancia no se encontró en hembras, resultado que concuerda con el obtenido a partir de datos genéticos en Alemania (Segelbacher *et al.* 2008) y mediante otras técnicas (resultados resumidos por Storch y Segelbacher 2000). Por lo tanto, es posible que la metodología usada en el Capítulo 1 no haya detectado diferencias entre sexos en la capacidad dispersiva por tratarse de un área de estudio muy pequeña, pero al utilizar una medida de similitud genética que contempla las frecuencias alélicas poblacionales (parentesco), estas diferencias entre sexos fueron evidentes.

Mediante el uso de análisis genéticos que permitan responder interrogantes ecológicos, en este trabajo se intentó traducir los resultados obtenidos a propuestas concretas de gestión para la conservación del urogallo cantábrico: trabajo en toda el área como una única Unidad de Manejo, liberación de machos emparentados en el mismo lek en el caso de reintroducciones y construcción de pasos de fauna para mejorar la conectividad entre núcleos poblacionales. Los organismos, estatales o privados, encargados de la gestión para la conservación de la especie son ahora los encargados de los siguientes pasos.

Bibliografía

- Adriaensen, F., Chardon, J. P., De Blust, G., Swinnen, E., Villalba, S., Gulinck, H., y Matthysen, E. (2003). The application of 'least-cost' modelling as a functional landscape model. *Landscape and urban planning*, 64(4), 233-247.
- Amos, W., Worthington Wilmer, J., Fullard, K., Burg, T. M., Croxall, J. P., Bloch, D., y Coulson, T. (2001). The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1480), 2021-2027.
- Alda F., Sastre P., De La Cruz-Cardiel P.J., Doadrio I. (2011). Population genetics of the endangered Cantabrian capercaillie in northern Spain. *Animal Conservation* 14, 249–260
- Alatalo, R. V., Höglund, J., y Lundberg, A. (1991). Lekking in the black grouse—a test of male viability. *Nature*, 352(6331), 155-156.
- Alatalo, R. V., Hoglund, J., Lundberg A., y Sutherland W. J. (1992). Evolution of black grouse leks: female preferences benefit males in larger leks. *Behavioral Ecology* 3, 53-59.
- Alpers, D. L., Van Vuuren, B. J., Arctander, P., y Robinson, T. J. (2004). Population genetics of the roan antelope (*Hippotragus equinus*) with suggestions for conservation. *Molecular ecology*, 13(7), 1771-1784.
- Andersson, M. (1982). Sexual selection, natural selection and quality advertisement. *Biological Journal of the Linnean Society*, 17(4), 375-393.
- Anderson, J. M. (1991). The effects of climate change on decomposition processes in grassland and coniferous forests. *Ecological Applications*, 1(3), 326-347.
- Armstrong, D. P., y Seddon, P. J. (2008). Directions in reintroduction biology. *Trends in ecology & evolution*, 23(1), 20-25.
- Baines, D., Moss, R., y Dugan, D. (2004). Capercaillie breeding success in relation to forest habitat and predator abundance. *Journal of Applied Ecology*, 41(1), 59-71.
- Baines, D., Aebischer, N. J., y Macleod, A. (2016). Increased mammalian predators and climate change predict declines in breeding success and density of Capercaillie *Tetrao urogallus*, an old stand specialist, in fragmented Scottish forests. *Biodiversity and Conservation*, 25(11), 2171-2186.
- Bajc M., Čas M., Ballian D., Kunovac S., Zubić G., Grubešić M., Zhelev P., Paule L., y Kraigher H. (2011). Genetic differentiation of the western capercaillie highlights the importance of south-eastern Europe for understanding the species phylogeography. *PLoS One*. 6: e23602-10.1371/journal.pone.0023602.
- Bajomi, B., Pullin, A. S., Stewart, G. B., y Takács-Sánta, A. (2010). Bias and dispersal in the animal reintroduction literature. *Oryx*, 44(3), 358-365.
- Bañuelos M.J. y Quevedo M. (2008). Update of the situation of the Cantabrian capercaillie *Tetrao urogallus cantabricus*: an ongoing decline. *Grouse News* 25, 5–7

- Bañuelos, M. J., Blanco-Fontao, B., Fameli, A., Fernández-Gil, A., Mirol, P., Morán-Luis, M., Rodríguez-Muñoz, R. y Quevedo, M. (2019). Population dynamics of an endangered forest bird using mark–recapture models based on DNA-tagging. *Conservation Genetics*, 20(6), 1251-1263.
- Barroca, T. M., Santos, G. B., Duarte, N. V. R., y Kalapothakis, E. (2012). Evaluation of genetic diversity and population structure in a commercially important freshwater fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae) using complex hypervariable repeats. *Genetics and Molecular Research*, 11(4), 4456-4467.
- Bawa, K. S. y Seidler, R. (1998). Natural forest management and conservation of biodiversity in tropical forests. *Conservation biology*, 12(1), 46-55.
- Beier, P. y Noss, R. F. (1998). Do habitat corridors provide connectivity?. *Conservation biology*, 12(6), 1241-1252.
- Bellemain, E., Nawaz, M.A., Valentini, A., Swenson, J.E., y Taberlet, P. (2007). Genetic tracking of the brown bear in northern Pakistan and implications for conservation. *Biological Conservation* 134:537–547
- Berger-Tal, O., Polak, T., Oron, A., Lubin, Y., Kotler, B. P., y Saltz, D. (2011). Integrating animal behavior and conservation biology: a conceptual framework. *Behavioral Ecology*, 22(2), 236-239.
- Bijlsma, R. y Loeschke, V. (2012). Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evolutionary Applications*, 5(2), 117-129.
- BirdLife International (2016). *Tetrao urogallus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22679487A85942729.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-.RLTS.T22679487A85942729.en>.
- BirdLife International y NatureServe (2015). Bird species distribution maps of the world. BirdLife International, Cambridge, UK and NatureServe, Arlington, USA.
- Blanco-Fontao, B., Fernández-Gil, A., Obeso, J. R., y Quevedo, M. (2010). Diet and habitat selection in Cantabrian Capercaillie (*Tetrao urogallus cantabricus*): ecological differentiation of a rear-edge population. *Journal of Ornithology*, 151(2), 269-277.
- Blumstein, D. T. y Fernández-Juricic, E. (2004). The emergence of conservation behavior. *Conservation Biology*, 18(5), 1175-1177.
- Bonilla, M. M., Zeh, J. A., y Zeh, D. W. (2016). An epigenetic resolution of the lek paradox. *BioEssays*, 38(4), 355-366.
- Borchtchevski, V. y Moss, R. (2014). Age structure of Capercaillie males (*Tetrao urogallus*) in NW Russia may reflect two-way movements—a hypothesis. *Ornis Fennica* 91, 14–28
- Borecha, D. E., Willebrand, T., y Nielsen, O. K. (2017). Lek site defines annual spatial use of male Black Grouse (*Tetrao tetrix*). *Ornis Fennica* 94, 150–160.
- Borrell, Y. J., Pineda, H., McCarthy, I., Vazquez, E., Sanchez, J. A., y Lizana, G. B. (2004). Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Heredity*, 92(6), 585.
- Bradbury, J. W. y Gibson, R. M. (1983). Leks and mate choice. *Mate choice*. Cambridge University Press, Cambridge, 109-138.
- Braunisch, V., Segelbacher, G., y Hirzel, A. H. (2010). Modelling functional landscape connectivity from genetic population structure: a new spatially explicit approach. *Molecular Ecology*, 19(17), 3664-3678.

- Brazill-Boast, J., Pryke, S. R., y Griffith, S. C. (2013). Provisioning habitat with custom-designed nest-boxes increases reproductive success in an endangered finch. *Austral Ecology*, 38(4), 405-412.
- Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Rylands, A. B., Konstant, W. R., ... y Hilton-Taylor, C. (2002). Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation biology*, 16(4), 909-923.
- Brown, J. L. (1997). A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behavioral Ecology*, 8(1), 60-65.
- Brown, S. K., Hull, J. M., Updike, D. R., Fain, S. R., y Ernest, H. B. (2009). Black bear population genetics in California: signatures of population structure, competitive release, and historical translocation. *Journal of Mammalogy*, 90(5), 1066-1074.
- Burgess, S. C., Treml, E. A., y Marshall, D. J. (2012). How do dispersal costs and habitat selection influence realized population connectivity?. *Ecology*, 93(6), 1378-1387.
- Bush, K. L., Aldridge, C. L., Carpenter, J. E., Paszkowski, C. A., Boyce, M. S., y Coltman, D. W. (2010). Birds of a feather do not always lek together: genetic diversity and kinship structure of greater sage-grouse (*Centrocercus urophasianus*) in Alberta. *The Auk*, 127(2), 343-353.
- Büttner, G., Feranec, J., Jaffrain, G., Mari, L., Maucha, G., y Soukup, T. (2004). The CORINE land cover 2000 project. *EARSeL eProceedings*, 3(3), 331-346
- Caizergues, A. y Ellison, L. N. (2002). Natal dispersal and its consequences in black grouse *Tetrao tetrix*. *Ibis*, 144(3), 478-487.
- Caro, T. (1999). The behaviour–conservation interface. *Trends in ecology & evolution*, 14(9), 366-369.
- Castroviejo J. (1975). El urogallo en España. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Caizergues, A., Dubois, S., Loiseau, A., Mondor, G., y Rasplus, J.Y. (2001). Isolation and characterization of microsatellite loci in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Mol Ecol Notes* 1:36–38
- Cayuela, H., Boualit, L., Laporte, M., Prunier, J. G., Preiss, F., Laurent, A., ... y Jacob, G. (2019). Kin-dependent dispersal influences relatedness and genetic structuring in a lek system. *Oecologia*, 191(1), 97-112.
- Charmantier, A., Buoro, M., Gimenez, O., y Weimerskirch, H. (2011). Heritability of short-scale natal dispersal in a large-scale foraging bird, the wandering albatross. *Journal of Evolutionary Biology* 24, 1487–1496.
- Chen, C., Durand, E., Forbes, F., y François, O. (2007). Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes* 7, 747–756
- Clout, M. N. y Merton, D. V. (1998). Saving the Kakapo: the conservation of the world's most peculiar parrot. *Bird Conservation International*, 8(3), 281-296.
- Clout, M. N., Elliott, G. P., y Robertson, B. C. (2002). Effects of supplementary feeding on the offspring sex ratio of kakapo: a dilemma for the conservation of a polygynous parrot. *Biological Conservation*, 107(1), 13-18.
- Colléony, A., Clayton, S., Couvet, D., Saint Jalme, M., y Prévot, A. C. (2017). Human preferences for species conservation: Animal charisma trumps endangered status. *Biological Conservation*, 206, 263-269.
- Coltman, D. W., Pilkington, J. G., Smith, J. A., y Pemberton, J. M. (1999). Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living island population. *Evolution*, 53(4), 1259-1267.

- Corlatti, L., Hacklaender, K., y Frey-Roos, F. (2009). Ability of wildlife overpasses to provide connectivity and prevent genetic isolation. *Conservation Biology*, 23(3), 548-556.
- Coulson, T. N., Pemberton, J. M., Albon, S. D., Beaumont, M., Marshall, T. C., Guinness, F. E., y Clutton-Brock, T. H. (1998). Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1395), 489-495.
- Cramer, P. C. y Bissonette, J. A. (2005). Wildlife crossings in North America: the state of the science and practice.
- Cramp, S. y Simmons, K.E.L. (eds.) (1980). *The Birds of the Western Palearctic*, vol. II. Oxford: Oxford University Press.
- Crooks, K. R., & Sanjayan, M. (eds.) (2006). *Connectivity conservation* (Vol. 14). Cambridge University Press.
- Deem, S. L., Karesh, W. B., y Weisman, W. (2001). Putting theory into practice: wildlife health in conservation. *Conservation biology*, 15(5), 1224-1233.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., y Sargatal, J. (eds.) (1994). *Handbook of the birds of the world*, vol 2. Lynx Ediciones, Barcelona.
- Delaney, K. S., Riley, S. P., y Fisher, R. N. (2010). A rapid, strong, and convergent genetic response to urban habitat fragmentation in four divergent and widespread vertebrates. *Plos one*, 5(9).
- Dodd Jr, C. K., y Seigel, R. A. (1991). Relocation, repatriation, and translocation of amphibians and reptiles: are they conservation strategies that work?. *Herpetologica*, 336-350.
- Ducarme, F., Luque, G. M., y Courchamp, F. (2013). What are “charismatic species” for conservation biologists. *BioSciences Master Reviews*, 10(2013), 1-8.
- Durand, E., Jay, F., Gaggiotti, O.E., y François, O. (2009). Spatial inference of admixture proportions and secondary contact zones. *Molecular Biology and Evolution* 26, 1963–1973
- Duriez, O., Sachet, J.M., Ménoni, E., Pidancier, N., Miquel, C., y Taberlet, P. (2007). Phylogeography of the capercaillie in Eurasia: what is the conservation status in the Pyrenees and Cantabrian Mounts? *Conservation Genetics* 8, 513–526
- Earl, D.A. y vonHoldt, B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359–361
- Eaton, M. A., Gregory, R. D., Noble, D. G., Robinson, J. A., Hughes, J., Procter, D., ... y Gibbons, D. W. (2005). Regional IUCN red listing: the process as applied to birds in the United Kingdom. *Conservation Biology*, 19(5), 1557-1570.
- Eckert, C.G., Samis, K.E., y Loughheed, S.C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* 17, 1170–1188
- Ehrlich, P. R. (1988). The loss of diversity. *Biodiversity. National Academy of Sciences, National Academies Press, Washington, DC*, 21-22.
- Emaresi, G., Pellet, J., Dubey, S., Hirzel, A. H., y Fumagalli, L. (2011). Landscape genetics of the Alpine newt (*Mesotriton alpestris*) inferred from a strip-based approach. *Conservation Genetics*, 12(1), 41-50.
- Etienne, R. S. (2004). On optimal choices in increase of patch area and reduction of interpatch distance for metapopulation persistence. *Ecological Modelling*, 179(1), 77-90.

- Etienne, R. S. y Heesterbeek, J. A. P. (2001). Rules of thumb for conservation of metapopulations based on a stochastic winking-patch model. *The American Naturalist*, 158(4), 389-407.
- Evett, I.W. y Weir, B.S. (1998). Interpreting DNA evidence: statistical genetics for forensic scientists. Sinauer, Sunderland
- Excoffier, L., Laval, G., y Schneider, S. (2005). ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47–50
- Fameli, A., Morán-Luis, M., Rodríguez-Muñoz, R., Bañuelos, M. J., Quevedo, M., y Mirol, P. (2017). Conservation in the southern edge of *Tetrao urogallus* distribution: Gene flow despite fragmentation in the stronghold of the Cantabrian capercaillie. *European journal of wildlife research*, 63(3), 58.
- Fedy, B.C., Martin, K., Ritland, C., y Young, J. (2008). Genetic and ecological data provide incongruent interpretations of population structure and dispersal in naturally subdivided populations of white-tailed ptarmigan (*Labapus leucura*). *Molecular Ecology* 17, 1905–1917
- Fischer, J. y Lindenmayer, D. B. (2000). An assessment of the published results of animal relocations. *Biological conservation*, 96(1), 1-11.
- Florin, A.B. y Höglund, J. (2007). Absence of population structure of turbot (*Psetta maxima*) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology* 16, 115–126
- Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetics Research*, 66(2), 95-107.
- Frankham, R. y Ralls, K. (1998). Conservation biology: inbreeding leads to extinction. *Nature* 392, 441–442
- Frantz, A.C., Pope, L.C., Burke, T.A., Wilson, G.J., Delahay, R.J., y Roper, T.J. (2003). Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) from faecal DNA. *Molecular Ecology* 12, 1649–1661
- Fraser, D.F. (2000). Species at the edge: the case for listing of “peripheral” species. En: Darling L (eds.) At Risk: Proceedings of a Conference on the Biology and Management of Species and Habitats at Risk. British Columbia Ministry of Environment, Lands and Parks, Victoria, 49–53.
- García, D., Quevedo, M., Obeso, J. R., y Abajo, A. (2005). Fragmentation patterns and protection of montane forest in the Cantabrian range (NW Spain). *Forest Ecology and Management*, 208(1-3), 29-43.
- Geiser, C., Ray, N., Lehmann, A., y Ursenbacher, S. (2013). Unravelling landscape variables with multiple approaches to overcome scarce species knowledge: a landscape genetic study of the slow worm. *Conservation genetics*, 14(4), 783-794.
- Germano, J. M. y Bishop, P. J. (2009). Suitability of amphibians and reptiles for translocation. *Conservation Biology*, 23(1), 7-15.
- Gilbert-Norton, L., Wilson, R., Stevens, J. R., y Beard, K. H. (2010). A meta-analytic review of corridor effectiveness. *Conservation biology*, 24(3), 660-668.
- Gilchrist, G., Mallory, M., y Merkel, F. (2005). Can local ecological knowledge contribute to wildlife management? Case studies of migratory birds. *Ecology and Society*, 10(1).
- Gjerde, I., y Wegge, P. (1989). Spacing pattern, habitat use and survival of capercaillie in a fragmented winter habitat. *Ornis Scandinavica*, 219-225.
- Głowaciński, Z. (eds.) (2001). Polish Red Data Book of Animals: Vertebrates. Państwowe Wydawn. Rolnicze i Leśne.

- Godefroid, S., Piazza, C., Rossi, G., Buord, S., Stevens, A. D., Aguraiuja, R., ... y Johnson, I. (2011). How successful are plant species reintroductions?. *Biological Conservation*, 144(2), 672-682.
- Goldman, M. (2009). Constructing Connectivity: Conservation Corridors and Conservation Politics in East African Rangelands. *Annals of the Association of American Geographers*, 99(2), 335–359.
- González, M. A., Olea, P. P., Robles, L., y Ena, V. (2010). The Mediterranean *Quercus pyrenaica* oak forest: a new habitat for the Capercaillie?. *Journal of Ornithology*, 151(4), 901-906.
- Goslee, S. C. y Urban, D. L. (2007). The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software*, 22(7), 1-19.
- Goudet, J. (2003). Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Disponible en <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Gregory, A. J. y Beier, P. (2014). Response variables for evaluation of the effectiveness of conservation corridors. *Conservation Biology*, 28(3), 689-695.
- Griffith, B., Scott, J. M., Carpenter, J. W., y Reed, C. (1989). Translocation as a species conservation tool: status and strategy. *Science*, 245(4917), 477-480.
- Gros, A., Hovestadt, T., y Poethke, H. J. (2008). Evolution of sex-biased dispersal: the role of sex-specific dispersal costs, demographic stochasticity, and inbreeding. *Ecological Modelling*, 219(1-2), 226-233.
- Haas, C. A. (1995). Dispersal and use of corridors by birds in wooded patches on an agricultural landscape. *Conservation biology*, 9(4), 845-854.
- Haldane, J. B. (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of genetics*, 12(2), 101-109.
- Hämäläinen, A., Alatalo, R.V., Lebigre, C., Siitari, H., y Soulsbury, C.D. (2012). Fighting behaviour as a correlate of male mating success in black grouse *Tetrao tetrix*. *Behavioral ecology and sociobiology* 66, 1577–1586
- Hamilton, W. D. (1964). The genetical theory of social behavior. I and II. *Journal of theoretical biology* 7, 1–52
- Hampe, A. y Petit, R.J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters* 8, 461–467
- Hannah, L., Carr, J. L., y Lankerani, A. (1995a). Human disturbance and natural habitat: a biome level analysis of a global data set. *Biodiversity & Conservation*, 4(2), 128-155.
- Hannah, P., Palutikof, J.P., Quine, C.P., (1995b). Predicting wind-speeds for forest areas in complex terrain. *Wind and trees* 113-129
- Hanski, I. (2011). Habitat loss, the dynamics of biodiversity, and a perspective on conservation. *Ambio*, 40(3), 248-255.
- Hedrick, P.W. (2004). Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecology and Management* 197, 3–19
- Hedrick, P.W. y Miller, P.S. (1992). Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications* 2, 30–46
- Herzog, P. W., y Keppie, D. M. (1980). Migration in a local population of Spruce Grouse. *Condor*, 366-372.

- Hoffman, J. I., Forcada, J., Trathan, P. N., y Amos, W. (2007). Female fur seals show active choice for males that are heterozygous and unrelated. *Nature*, 445(7130), 912.
- Höglund, J. (2003). Lek-kin in birds—provoking theory and surprising new results. *Annales Zoologici Fennici* 249-253.
- Höglund, J. y Alatalo, R.V. (1995). Leks. Princeton University Press.
- Höglund, J., y Lundberg, A. (1987). Sexual selection in a monomorphic lek-breeding bird: correlates of male mating success in the great snipe *Gallinago media*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 21(4), 211-216.
- Höglund, J., Alatalo, R. V., Lundberg, A., Rintamäki, P. T., y Lindell, J. (1999). Microsatellite markers reveal the potential for kin selection on black grouse leks. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 266(1421), 813-816.
- Höglund, J., Piertney, S. B., Alatalo, R. V., Lindell, J., Lundberg, A., y Rintamäki, P. T. (2002). Inbreeding depression and male fitness in black grouse. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269(1492), 711-715.
- Höglund, J., Larsson, J. K., Corrales, C., Santafé, G., Baines, D., y Segelbacher, G. (2011). Genetic structure among black grouse in Britain: implications for designing conservation units. *Animal Conservation*, 14(4), 400-408.
- Hovick, T. J., Elmore, R. D., Dahlgren, D. K., Fuhlendorf, S. D., y Engle, D. M. (2014). Evidence of negative effects of anthropogenic structures on wildlife: a review of grouse survival and behaviour. *Journal of Applied Ecology*, 51(6), 1680-1689.
- Hutto, R., Reel, S., y Landres, P. B. (1987). A critical evaluation of the species approach to biological conservation. *Endanger. Species*, 4, 1-4.
- Ims, R. A., Rolstad, J., y Wegge, P. (1993). Predicting space use responses to habitat fragmentation: can voles *Microtus oeconomus* serve as an experimental model system (EMS) for capercaillie grouse *Tetrao urogallus* in boreal forest?. *Biological Conservation*, 63(3), 261-268.
- Isomursu, M., Rätti, O., Liukkonen, T., y Helle, P. (2012). Susceptibility to intestinal parasites and juvenile survival are correlated with multilocus microsatellite heterozygosity in the Capercaillie (*Tetrao urogallus*). *Ornis Fennica*, 89(2), 109.
- IUCN (2013). Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. IUCN SSC, Gland, Switzerland, ed. 1.0. Disponible en <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2013-009.pdf>.
- Jansman, H. A. H., Bovenschen, J., Boerwinkel, M. C., Haro, M. P., Niewold, F. J. J., y Koelewijn, H. P. (2004a). Genetische diversiteit binnen de fokpopulatie van Korhoenders op Nationaal Park De Hoge Veluwe in relatie tot referentiepopulaties. (No. 2004-1). *Alterra*
- Jansman, H. A. H., Niewold, F. J. J., Bovenschen, J., y Koelewijn, H. P. (2004b). Korhoenders op de Sallandse Heuvelrug; een populatie-genetische analyse van het wel en wee van Nederlands laatste populatie (No. 1122). *Alterra*.
- Jeon, H. B., An, J., Kweon, S. M., Kim, S., Yu, J. N., Kim, B. J., Kawase, S. y Suk, H. Y. (2016). Development of novel microsatellite loci and analyses of genetic diversity in the endangered *Tanakia somjinensis*. *Biochemical systematics and ecology*, 66, 344-350.
- Jiguet, F., Arroyo, B., y Bretagnolle, V. (2000). Lek mating systems: a case study in the Little Bustard *Tetrax tetrax*. *Behavioural Processes*, 51(1-3), 63-82.

- Jule, K. R., Leaver, L. A., y Lea, S. E. (2008). The effects of captive experience on reintroduction survival in carnivores: a review and analysis. *Biological conservation*, 141(2), 355-363.
- Jumeau, J., Petrod, L., y Handrich, Y. (2017). A comparison of camera trap and permanent recording video camera efficiency in wildlife underpasses. *Ecology and Evolution*, 7(18), 7399-7407.
- Kalinowski, S.T. (2005). HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes* 5, 187–189
- Kirkpatrick, M., y Ryan, M. J. (1991). The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature*, 350(6313), 33-38.
- Kleiman, D. G. (1989). Reintroduction of captive mammals for conservation. *BioScience*, 39(3), 152-161.
- Kleiman D.G., Price M.R.S. y Beck B.B. (1994) Criteria for reintroductions. En: Olney P.J.S., Mace G.M., Feistner A.T.C. (eds.) *Creative Conservation*. Springer, Dordrecht
- Kleiman, D. G., Reading, R. P., Miller, B. J., Clark, T. W., Scott, J. M., Robinson, J., ... y Felleman, F. (2000). Improving the evaluation of conservation programs. *Conservation Biology*, 14(2), 356-365.
- Klinga, P., Mikoláš, M., Zhelev, P., Höglund, J., y Paule, L. (2015). Genetic differentiation of western capercaillie in the Carpathian Mountains: the importance of post glacial expansions and habitat connectivity. *Biological Journal of the Linnean Society* 116, 873–889
- Kokko, H. y Lindstrom, J. (1997). Measuring the mating skew. *The American Naturalist*, 149(4), 794-799.
- Kokko, H. y Lindstrom, J. (1996). Kin selection and the evolution of leks: whose success do young males maximize?. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 263(1372), 919-923.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., y Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* 15, 1179–1191
- Kotiaho, J. S., LeBas, N. R., Puurtinen, M., y Tomkins, J. L. (2008). On the resolution of the lek paradox. *Trends in ecology & evolution*, 23(1), 1-3.
- Kurki, S., Helle, P., Lindén, H., Nikula, A., y Linden, H. (1997). Breeding success of black grouse and capercaillie in relation to mammalian predator densities on two spatial scales. *Oikos*, 79(2), 301. DOI:10.2307/3546014
- Kurki, S., Nikula, A., Helle, P., y Lindén, H. (2000). Landscape fragmentation and forest composition effects on grouse breeding success in boreal forests. *Ecology*, 81(7), 1985-1997.
- Lande, R. (1988). Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241, 1455–1460
- Larsson, J. K., Jansman, H. A., Segelbacher, G., Höglund, J., y Koelewijn, H. P. (2008). Genetic impoverishment of the last black grouse (*Tetrao tetrix*) population in the Netherlands: detectable only with a reference from the past. *Molecular Ecology*, 17(8), 1897-1904.
- LaRue, M. A. y Nielsen, C. K. (2008). Modelling potential dispersal corridors for cougars in midwestern North America using least-cost path methods. *Ecological modelling*, 212(3-4), 372-381.
- Laurance, W. F. (2010). Habitat destruction: death by a thousand cuts. *Conservation biology for all*, 1(9), 73-88.

- Lawton, J.H. (1993). Range, population abundance and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 8, 409–413
- Lebigre, C., Alatalo, R. V., Forss, H. E., y Siitari, H. (2008). Low levels of relatedness on black grouse leks despite male philopatry. *Molecular Ecology*, 17(20), 4512-4521.
- Lebigre, C., Alatalo, R. V., y Siitari, H. (2010). Female-biased dispersal alone can reduce the occurrence of inbreeding in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology*, 19(9), 1929-1939.
- Lebigre, C., Alatalo, R. V., Soulsbury, C. D., Höglund, J., y Siitari, H. (2014). Limited indirect fitness benefits of male group membership in a lekking species. *Molecular ecology*, 23(21), 5356-5365.
- Lesica, P., Allendorf, F.W. (1995). When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology* 9, 753–760
- Lewallen, E. A., Anderson, T. W., y Bohonak, A. J. (2007). Genetic structure of leopard shark (*Triakis semifasciata*) populations in California waters. *Marine Biology*, 152(3), 599-609.
- Liukkonen, T., Bisi, J. y Kurki, S. (2007). Observations on the flocking and mobility of Capercaillie (*Tetrao urogallus*) – hunters' fairytales or true observations? — *Ethology Ecology & Evolution* 3, 245–255.
- Liukkonen-Anttila, T., Saartoala, R., y Hissa, R. (2000). Impact of hand-rearing on morphology and physiology of the capercaillie (*Tetrao urogallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 125(2), 211-221.
- Liukkonen-Anttila, T., Rätti, O., Kvist, L., Helle, P., y Orell, M. (2004). Lack of genetic structuring and subspecies differentiation in the capercaillie (*Tetrao urogallus*) in Finland. *Annales Zoologici Fennici* 619-633.
- Lloyd, L. (1867). Game Birds and Wild Fowl of Sweden & Norway. Ed. Frederick Warne y CO. Londres.
- Lloyd, B. D. y Powlesland, R. G. (1994). The decline of kakapo *Strigops habroptilus* and attempts at conservation by translocation. *Biological Conservation*, 69(1), 75-85.
- Lombard, A. T., Cowling, R. M., Vlok, J. H., y Fabricius, C. (2010). Designing conservation corridors in production landscapes: assessment methods, implementation issues, and lessons learned. *Ecology and Society*, 15(3).
- Loss, S. R., Terwilliger, L. A., y Peterson, A. C. (2011). Assisted colonization: integrating conservation strategies in the face of climate change. *Biological conservation*, 144(1), 92-100
- Love, O. P., Chin, E. H., Wynne-Edwards, K. E., y Williams, T. D. (2005). Stress hormones: a link between maternal condition and sex-biased reproductive investment. *The American Naturalist*, 166(6), 751-766.
- Mäki-Petäys, H., Corander, J., Aalto, J., Liukkonen, T., Helle, P., y Orell, M. (2007). No genetic evidence of sex-biased dispersal in a lekking bird, the capercaillie (*Tetrao urogallus*). *Journal of evolutionary biology*, 20(3), 865-873.
- Marshall, K., y Edwards-Jones, G. (1998). Reintroducing capercaillie (*Tetrao urogallus*) into southern Scotland: identification of minimum viable populations at potential release sites. *Biodiversity & Conservation*, 7(3), 275-296.
- Macnab, J. (1983). Wildlife management as scientific experimentation. *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)*, 11(4), 397-401.
- McNab, J. M. (1973). The avian caeca: a review. *World's Poultry Science Journal*, 29(3), 251-263.

- MEA (Millennium Ecosystem Assessment) (2005a). Ecosystems and human well-being: synthesis. Island Press, Washington, DC.
- MEA (Millennium Ecosystem Assessment) (2005b). Ecosystems and human well-being: Biodiversity Synthesis. Island Press, Washington, DC.
- Merta, D., Kobielski, J., Theuerkauf, J., y Gula, R. (2016). Towards a successful reintroduction of capercaillies—activity, movements and diet of young released to the Lower Silesia Forest, Poland. *Wildlife Biology*, 22(3), 130-136.
- Miller, M. P. (2005). Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, 96(6), 722-724.
- Miquel C, Bellemain E, Poillot C, Bessiere 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
- Mitchell, S. J., Hailemariam, T., y Kulis, Y. (2001). Empirical modeling of cutblock edge windthrow risk on Vancouver Island, Canada, using stand level information. *Forest Ecology and Management*, 154(1-2), 117-130.
- Morán-Luis, M., Fameli, A., Blanco-Fontao, B., Fernández-Gil, A., Rodríguez-Muñoz, R., Quevedo, M., Mirol, P., y Bañuelos, M.J. (2014) Demographic status and genetic tagging of endangered capercaillie in NW Spain. *PLoS One* 9:e99799
- Moritz, C. (1994). Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends in ecology & evolution*, 9(10), 373-375.
- Moss, R. (1986). Rain, breeding success and distribution of capercaillie *Tetrao urogallus* and black grouse *Tetrao tetrix* in Scotland. *Ibis*, 128(1), 65-72.
- Moss, R., y Parkinson, J. A. (1972). The digestion of heather (*Calluna vulgaris*) by red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*). *British Journal of Nutrition*, 27(2), 285-298.
- Moss, R., Picozzi, N., Summers, R. W., y Baines, D. (2000). Capercaillie *Tetrao urogallus* in Scotland—demography of a declining population. *Ibis*, 142(2), 259-267.
- Moss, R., Oswald, J., y Baines, D. (2001). Climate change and breeding success: decline of the capercaillie in Scotland. *Journal of Animal Ecology*, 47-61.
- Moss, R., Picozzi, N., y Catt, D. C. (2006). Natal dispersal of capercaillie *Tetrao urogallus* in northeast Scotland. *Wildlife Biology*, 12(2), 227-233.
- Navidi, W., Arnheim, N., y Waterman, M. S. (1992). A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. *American journal of human genetics*, 50(2), 347.
- Nicholson, K. L., Krausman, P. R., Munguia-Vega, A., y Culver, M. (2011). Spatial and temporal interactions of sympatric mountain lions in Arizona. *European journal of wildlife research*, 57(6), 1151-1163.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. y Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4, 347–354
- Pakkala, T., Pellikka, J., y Lindén, H. (2003). Capercaillie *Tetrao urogallus*—a good candidate for an umbrella species in taiga forests. *Wildlife Biology*, 9(4), 309-316.
- Park, S.J. (2001). The excel microsatellite toolkit. University of Dublin, Dublin

- Peakall, R. y Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288–295
- Pemberton, J. M., Coltman, D. W., Coulson, T. N., y Slate, J. (1999). Using microsatellites to measure the fitness consequences of inbreeding and outbreeding. En: *Microsatellites: evolution and applications* (ed. D. B. Goldstein y C. Schl tterer), 151-164. Oxford University Press.
- Pennie, I.D. (1950). The history and distribution of the capercaillie in Scotland. *Scottish Naturalist* 62, 65-87, 157-178; 63, 4-17.
- Pérez, T., Vázquez, J. F., Quirós, F., y Domínguez, A. (2011). Improving non-invasive genotyping in capercaillie (*Tetrao urogallus*): redesigning sexing and microsatellite primers to increase efficiency on faeces samples. *Conservation Genetics Resources*, 3(3), 483-487.
- Peterle, T. J. (1951). Intergeneric galliform hybrids: a review. *The Wilson Bulletin*, 63(3), 219-224.
- Petersen, J. H., DeAngelis, D. L., y Paukert, C. P. (2008). An overview of methods for developing bioenergetic and life history models for rare and endangered species. *Transactions of the American Fisheries Society*, 137(1), 244-253.
- Petrov, I. K. (2008). Distribution and numbers of capercaillie, *Tetrao urogallus* L., 1758 (Aves: Galliformes) in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica Suppl*, 2, 35-40.
- Philpott, S. M. y Foster, P. F. (2005). Nest-site limitation in coffee agroecosystems: Artificial nests maintain diversity of arboreal ants. *Ecological applications*, 15(4), 1478-1485.
- Piertney, S.B. y Höglund, J. (2001). Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes* 1, 303–304
- Pollo, C., Robles, L., Seijas, J., García-Miranda, A., & Otero, R. (2003). Cantabrian capercaillie *Tetrao urogallus cantabricus* population size and range trend. Will the capercaillie survive in the Cantabrian Mountains, *Grouse News*, 26, 3-5.
- Pollo, C. J., Robles, L., Seijas, J. M., García-Miranda, A., y Otero, R. (2005). Trends in the abundance of Cantabrian Capercaillie *Tetrao urogallus cantabricus* at leks on the southern slope of the Cantabrian Mountains, north-west Spain. *Bird Conservation International*, 15(4), 397-409.
- Pomiankowski, A y M ller, A. P. (1995). A resolution of the lek paradox. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 260(1357), 21-29.
- Povilitis, T. (1990). Is captive breeding an appropriate strategy for endangered species conservation. *Endangered Species Update*, 8(1), 20-23.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959
- Pullin, A. S., Knight, T. M., Stone, D. A., y Charman, K. (2004). Do conservation managers use scientific evidence to support their decision-making? *Biological conservation*, 119(2), 245-252.
- QGIS Development Team (2019). QGIS Geographic Information System.
- Queller, D. C. y Goodnight, K. F. (1989). Estimating relatedness using molecular markers. *Evolution* 43, 258-275.
- Quevedo, M., Bañuelos, M.J. y Obeso, J.R. (2006). The decline of Cantabrian capercaillie: how much does habitat configuration matter? *Biological Conservation* 127, 190–200
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- Ranius, T. y Kindvall, O. (2006). Extinction risk of wood-living model species in forest landscapes as related to forest history and conservation strategy. *Landscape Ecology*, 21(5), 687-698.
- Ralls, K., Ballou, J.D. y Templeton, A. (1988). Estimates of lethal equivalents and the costs of inbreeding in mammals. *Conservation Biology* 2, 185–193
- Rahbek, C. (1993). Captive breeding—a useful tool in the preservation of biodiversity?. *Biodiversity & Conservation*, 2(4), 426-437.
- Reading, R. P., Clark, T. W., y Griffith, B. (1997). The influence of valuational and organizational considerations on the success of rare species translocations. *Biological Conservation*, 79(2-3), 217-225
- Redford, K. H., y Richter, B. D. (1999). Conservation of biodiversity in a world of use. *Conservation biology*, 13(6), 1246-1256.
- Reed, D. y Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17, 230–237
- Regnaut, S., Christe, P., Chapuisat, M., y Fumagalli, L. (2006). Genotyping faeces reveals facultative kin association on capercaillie's leks. *Conservation Genetics*, 7(5), 665-674.
- Reid, J. (2007). Secondary sexual ornamentation and non-additive genetic benefits of female mate choice. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 274(1616), 1395-1402.
- Reid, J., Arcese, P., Cassidy, A. E., Marr, A., Smith, J. M., y Keller, L. (2005). Hamilton and Zuk meet heterozygosity? Song repertoire size indicates inbreeding and immunity in song sparrows (*Melospiza melodia*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1562), 481-487.
- Reid, J., Arcese, P. y Keller, L. F. (2006). Intrinsic parent-offspring correlation in inbreeding level in a song sparrow (*Melospiza melodia*) population open to immigration. *The American Naturalist*, 168(1), 1-13.
- Reijnen, R., Foppen, R., y Meeuwsen, H. (1996). The effects of traffic on the density of breeding birds in Dutch agricultural grasslands. *Biological conservation*, 75(3), 255-260.
- Reynolds, J. y Gross, M. (1990). Costs and benefits of female mate choice: is there a lek paradox?. *The American Naturalist*, 136(2), 230-243.
- Rintamäki, P. T., Höglund, J., Alatalo, R. V., y Lundberg, A. (2001). Correlates of male mating success on black grouse (*Tetrao tetrix* L.) leks. *Annales Zoologici Fennici* 99-109.
- Rodríguez, A. E., y Obeso, J. R. (2000). Diet of the Cantabrian capercaillie: geographic variation and energetic content. *Ardeola*, 47(1), 77-83.
- Rodríguez-Muñoz, R., Mirol, P. M., Segelbacher, G., Fernández, A., y Tregenza, T. (2007). Genetic differentiation of an endangered capercaillie (*Tetrao urogallus*) population at the Southern edge of the species range. *Conservation Genetics*, 8(3), 659-670.
- Rodríguez-Muñoz, R., Del Valle, C. R., Bañuelos, M. J., y Mirol, P. (2015). Revealing the consequences of male-biased trophy hunting on the maintenance of genetic variation. *Conservation genetics*, 16(6), 1375-1394.
- Rodríguez-Muñoz, R., Bañuelos, M. J., Blanco-Fontao, B., González, M. A., y Quevedo, M. (2017). A reply on the 10 main results of the LIFE+ Cantabrian Capercaillie Project. *Grouse News*, 54, 10-12.
- Rojas, M., González, I., Pavón, M. Á., Pegels, N., Hernández, P. E., García, T., y Martín, R. (2011). Development of a real-time PCR assay to control the illegal trade of meat from protected capercaillie species (*Tetrao urogallus*). *Forensic science international*, 210(1-3), 133-138.

- Rosenzweig, M. L. (2003). Reconciliation ecology and the future of species diversity. *Oryx*, 37(2), 194-205.
- Rösner, S., Brandl, R., Segelbacher, G., Lorenc, T., y Müller, J. (2014). Noninvasive genetic sampling allows estimation of capercaillie numbers and population structure in the Bohemian Forest. *European journal of wildlife research*, 60(5), 789-801.
- Rowe, L. y Houle, D. (1996). The lek paradox and the capture of genetic variance by condition dependent traits. *Proceedings of the Royal Society of London*, 263(1375), 1415-1421.
- Rutkowski, R., Niewęłowski, H., Dziedzic, R., Kmiec, M., y Goździewski, J. (2005). Genetic variability of Polish population of the Capercaillie *Tetrao urogallus*. *Acta Ornithologica*, 40(1), 27-34.
- Rutkowski, R., Keller, M., y Jagołkowska, P. (2012). Population genetics of the hazel hen *Bonasa bonasia* in Poland assessed with non-invasive samples. *Central European Journal of Biology*, 7(4), 759-775.
- Rutkowski, R., Krzan, P., y Suchecka, E. (2015). Charakterystyka genetyczna populacji głuszca w Tatrzańskim Parku Narodowym na tle innych karpaccich populacji tego gatunku Population genetic of Capercaillie from Tatra National Park in comparison with other Carpathian strongholds. *Nauka Tatrom*, 47.
- Rutkowski, R., Zawadzka, D., Suchecka, E., y Merta, D. (2017). Conservation genetics of the capercaillie in Poland-Delineation of conservation units. *PloS one*, 12(4), e0174901.
- Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W., y Hanski, I. (1998). Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392, 491-494
- Sachot, S., Perrin, N., y Neet, C. (2006). Viability and management of an endangered Capercaillie (*Tetrao urogallus*) metapopulation in the Jura Mountains, Western Switzerland. *Biodiversity & Conservation*, 15(6), 2017-2032.
- Samis, K.E. y Eckert, C.G. (2007). Testing the abundant center model using range-wide demographic surveys of two coastal dune plants. *Ecology* 88, 1747-1758
- Sanderson, J., Alger, K., Fonseca, G., Galindo-Leal, C., Inchausti, V. H., y Morrison, K. (2003). Biodiversity Conservation Corridors. *Washington: Conservation International*.
- Sanguinetti, J., Buria, L., Malmierca, L., Valenzuela, A. E., Núñez, C., Pastore, H., ... y Chehébar, C. (2014). Manejo de especies exóticas invasoras en Patagonia, Argentina: Priorización, logros y desafíos de integración entre ciencia y gestión identificados desde la Administración de Parques Nacionales. *Ecología austral*, 2014, 24(2), 183-192.
- Sarrazin, F., y Barbault, R. (1996). Reintroduction: challenges and lessons for basic ecology. *Trends in ecology & evolution*, 11(11), 474-478.
- Saunders, D. A., Mawson, P. R., y Dawson, R. (2014). Use of tree hollows by Carnaby's Cockatoo and the fate of large hollow-bearing trees at Coomallo Creek, Western Australia 1969-2013. *Biological Conservation*, 177, 185-193.
- Sawaya, M. A., Kalinowski, S. T., & Clevenger, A. P. (2014). Genetic connectivity for two bear species at wildlife crossing structures in Banff National Park. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1780), 20131705.
- Schlenker, G., y Muller, S. (1978). Erläuterungen zur Karte der Regionalen Gliederung von Baden-Württemberg. III. Wuchsgebiet Schwarzwald. *Mitteilungen*.

- Schwartz, M.K. y McKelvey, K.S. (2009). Why sampling scheme matters: the effect of sampling scheme on landscape genetic results. *Conservation Genetics* 10, 441–452
- Scott, J. M. y Carpenter, J. W. (1987). Release of captive-reared or translocated endangered birds: what do we need to know?. *The Auk*, 104(3), 544-545.
- Sechrest, W. W., y Brooks, T. M. (2001). Biodiversity–threats. *ENCICLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. Nature publishing Group. www.els.net
- Seddon, P. J., Armstrong, D. P., y Maloney, R. F. (2007). Developing the science of reintroduction biology. *Conservation biology*, 21(2), 303-312.
- Seddon, P. J., Strauss, W. M., e Innes, J. (2012). Animal translocations: what are they and why do we do them. *Reintroduction Biology: integrating science and management*, 12(1).
- Segelbacher, G., y Piertney, S. (2007). Phylogeography of the European capercaillie (*Tetrao urogallus*) and its implications for conservation. *Journal of Ornithology*, 148(2), 269-274.
- Segelbacher, G., y Storch, I. (2002). Capercaillie in the Alps: genetic evidence of metapopulation structure and population decline. *Molecular Ecology*, 11(9), 1669-1677.
- Segelbacher, G., Paxton, R.J., Steinbrück, G., Trontelj, P. y Storch, I. (2000). Characterization of microsatellites in capercaillie *Tetrao urogallus* (AVES). *Molecular Ecology* 9, 1934–1935
- Segelbacher, G., Höglund, J. y Storch, I. (2003a). From connectivity to isolation: genetic consequences of population fragmentation in capercaillie across Europe. *Molecular Ecology* 12, 1773–1780
- Segelbacher, G., Storch, I., Tomiuk, J. (2003b). Genetic evidence of capercaillie *Tetrao urogallus* dispersal sources and sinks in the Alps. *Wildlife Biology* 9, 267–273
- Segelbacher, G., Wegge, P., Sivkov, A. V., y Höglund, J. (2007). Kin groups in closely spaced capercaillie leks. *Journal of Ornithology*, 148(1), 79-84.
- Segelbacher, G., Manel, S., y Tomiuk, J. (2008). Temporal and spatial analyses disclose consequences of habitat fragmentation on the genetic diversity in capercaillie (*Tetrao urogallus*). *Molecular ecology*, 17(10), 2356-2367.
- Segelbacher, G., Strand, T. M., Quintela, M., Axelsson, T., Jansman, H. A., Koelewijn, H. P., y Höglund, J. (2014). Analyses of historical and current populations of black grouse in Central Europe reveal strong effects of genetic drift and loss of genetic diversity. *Conservation genetics*, 15(5), 1183-1195.
- Seiler, C., Angelstam, P., y Bergmann, H. H. (2000). Conservation releases of captive-reared grouse in Europe—What do we know and what do we need. *Cahiers d’Ethologie*, 20, 235-252.
- Simberloff, D. y Cox, J. (1987). Consequences and costs of conservation corridors. *Conservation biology*, 1(1), 63-71.
- Simberloff, D., Farr, J. A., Cox, J., y Mehlman, D. W. (1992). Movement corridors: conservation bargains or poor investments?. *Conservation Biology*, 6(4), 493-504.
- Simms, E. (1971) Woodland Birds. London: Collins
- Singer, F. J., Papouchis, C. M., y Symonds, K. K. (2000). Translocations as a tool for restoring populations of bighorn sheep. *Restoration Ecology*, 8(4S), 6-13.
- Slate, J., Kruuk, L. E. B., Marshall, T. C., Pemberton, J. M., y Clutton-Brock, T. H. (2000). Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1453), 1657-1662.

- Small, R. J. y Rusch, D. H. (1989). The natal dispersal of ruffed grouse. *The Auk*, 72-79.
- Solberg, K. H., Bellemain, E., Drageset, O. M., Taberlet, P., y Swenson, J. E. (2006). An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biological Conservation*, 128(2), 158-168.
- Soorae, P. S. (eds.). (2008). Global re-introduction perspectives: re-introduction case-studies from around the globe. IUCN.
- Spielman, D., Brook, B.W., Briscoe, D.A. y Frankham, R. (2004). Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? *Conservation Genetics* 5, 439–448
- Stiver, J. R., Apa, A. D., Remington, T. E., y Gibson, R. M. (2008). Polygyny and female breeding failure reduce effective population size in the lekking Gunnison sage-grouse. *Biological Conservation*, 141(2), 472-481.
- Storch, I. (1995). Annual home ranges and spacing patterns of capercaillie in central Europe. *The Journal of wildlife management*, 392-400.
- Storch, I. (1997a). The importance of scale in habitat conservation for an endangered species: the capercaillie in Central Europe. *Wildlife and landscape ecology* 310-330.
- Storch, I. (1997b). Male territoriality, female range use, and spatial organisation of capercaillie *Tetrao urogallus* leks. *Wildlife Biology*, 3(3/4), 149-162.
- Storch, I. (2000). Conservation status and threats to grouse worldwide: an overview. *Wildlife biology*, 6(4), 195-204.
- Storch, I. (2002). On spatial resolution in habitat models: can small-scale forest structure explain capercaillie numbers?. *Conservation Ecology*, 6(1).
- Storch, I. (2007). Grouse–Status Survey and Action Plan 2006-2010 IUCN. *Gland Switzerland and Cambridge UK. and World Pheasant Association, Fordinbridge, UK.*
- Storch, I. y Segelbacher, G. (2000). Genetic correlates of spatial population structure in central European capercaillie *Tetrao urogallus* and black grouse *T. tetrix*: a project in progress. *Wildlife Biology* 6, 305–310
- Storch, I., Bañuelos, M. J., Fernández-Gil, A., Obeso, J. R., Quevedo, M., y Rodríguez-Muñoz, R. (2006). Subspecies Cantabrian capercaillie *Tetrao urogallus cantabricus* endangered according to IUCN criteria. *Journal of Ornithology*, 147(4), 653-655.
- Strand, T. M., Segelbacher, G., Quintela, M., Xiao, L., Axelsson, T., y Höglund, J. (2012). Can balancing selection on MHC loci counteract genetic drift in small fragmented populations of black grouse?. *Ecology and evolution*, 2(2), 341-353.
- Strzała, T., Kowalczyk, A., & Łukaszewicz, E. (2015). Reintroduction of the European capercaillie from the capercaillie breeding centre in Wisła Forest district: Genetic assessments of captive and reintroduced populations. *PloS one*, 10(12), e0145433.
- Summers, R. W., Green, R. E., Proctor, R., Dugan, D., Lambie, D., Moncrieff, R., ... y Baines, D. (2004). An experimental study of the effects of predation on the breeding productivity of capercaillie and black grouse. *Journal of Applied Ecology*, 41(3), 513-525.
- Suter, W., Graf, R. F., y Hess, R. (2002). Capercaillie (*Tetrao urogallus*) and avian biodiversity: testing the umbrella-species concept. *Conservation Biology*, 16(3), 778-788.
- Sutherland, W. J., Pullin, A. S., Dolman, P. M., y Knight, T. M. (2004). The need for evidence-based conservation. *Trends in ecology & evolution*, 19(6), 305-308.

- Svobodová, J., Segelbacher, G., y Höglund, J. (2011). Genetic variation in Black Grouse populations with different lekking systems in the Czech Republic. *Journal of Ornithology*, 152(1), 37-44.
- Swenson, J. E., y Angelstam, P. (1993). Habitat separation by sympatric forest grouse in Fennoscandia in relation to boreal forest succession. *Canadian journal of zoology*, 71(7), 1303-1310.
- Szczepański, S., Santorek, A., Dulisz, B., Żurek, Z., Armatus, P., y Rutkowski, R. (2019). How many of them? Genetic diversity, survival and effective population size of the capercaillie population from the Gorce Mountains. *Fragmenta Faunistica*, 62(2), 135-144.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., ... y Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic acids research*, 24(16), 3189-3194.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., y Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular ecology*, 7(4), 453-464.
- Taberlet, P. y Luikart, G. (1999). Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological journal of the Linnean society*, 68(1-2), 41-55.
- Tau, T., Wally, A., Fanie, T. P., Ngono, G. L., Mpoloka, S. W., Davison, S., y D'Amato, M. E. (2017). Genetic variation and population structure of Botswana populations as identified with AmpFLSTR Identifiler short tandem repeat (STR) loci. *Scientific reports*, 7(1), 6768.
- Taylor, P.D., Fahrig, L., Henein, K. y Merriam, G. (1993). Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos* 68, 571–573
- Tepper, L. (2011). Road Ecology: Wildlife Habitat and Highway Design. *Places Journal*.
- Thiel, D., Jenni-Eiermann, S., y Palme, R. (2005). Measuring corticosterone metabolites in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 96-108.
- Thiel, D., Jenni-Eiermann, S., Palme, R., y Jenni, L. (2011). Winter tourism increases stress hormone levels in the Capercaillie *Tetrao urogallus*. *Ibis*, 153(1), 122-133.
- Thomson, J. R., Moilanen, A. J., Veski, P. A., Bennett, A. F., y Nally, R. M. (2009). Where and when to revegetate: a quantitative method for scheduling landscape reconstruction. *Ecological Applications*, 19(4), 817-828.
- Tomkins, J. L., Radwan, J., Kotiaho, J. S., y Tregenza, T. (2004). Genic capture and resolving the lek paradox. *Trends in ecology & evolution*, 19(6), 323-328.
- Trivers, R. L. y Willard, D. (1973). Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* 179, 90–92
- Valière, N. (2002). GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2, 377–379
- Van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., ... y Speelman, P. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine*, 368(5), 407-415.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P., y Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538
- Vázquez, J.F., Pérez, T., Quirós, F., Obeso, J.R., Albornoz, J. y Domínguez, A. (2012). Population genetic structure and diversity of the endangered Cantabrian Capercaillie. *The Journal of Wildlife Management* 76, 957–965

- Waits, L.P., Luikart, G., y Taberlet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10, 249–256
- Wang, J. (2011). COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources*, 11, 141–145.
- Wang, I. J., Savage, W. K., y Bradley Shaffer, H. (2009). Landscape genetics and least-cost path analysis reveal unexpected dispersal routes in the California tiger salamander (*Ambystoma californiense*). *Molecular ecology*, 18(7), 1365-1374.
- Wang, Y., Guan, L., Piao, Z., Wang, Z., y Kong, Y. (2017). Monitoring wildlife crossing structures along highways in Changbai Mountain, China. *Transportation research part D: transport and environment*, 50, 119-128.
- Wayne, R. K., Lehman, N., Girman, D., Gogan, P. J. P., Gilbert, D. A., Hansen, K., ... y Krumenaker, R. J. (1991) Conservation genetics of the endangered Isle Royale gray wolf. *Conservation Biology* 5, 41–51
- Weber, J. L. y Wong, C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human molecular genetics*, 2(8), 1123-1128.
- Weeks, A. R., Sgro, C. M., Young, A. G., Frankham, R., Mitchell, N. J., Miller, K. A., ... y Breed, M. F. (2011). Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. *Evolutionary Applications*, 4(6), 709-725.
- Wegge, P. y Kastdalen, L. (2008). Habitat and diet of young grouse broods: resource partitioning between Capercaillie (*Tetrao urogallus*) and Black Grouse (*Tetrao tetrix*) in boreal forests. *Journal of Ornithology*, 149(2), 237.
- Wegge, P. y Larsen, B. B. (1987). Spacing of adult and subadult male common capercaillie during the breeding season. *The Auk*, 104(3), 481-490.
- Wegge, P. y Rolstad, J. (1986). Size and spacing of capercaillie leks in relation to social behavior and habitat. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19(6), 401-408.
- Wegge, P., Rølstad, J., y Gjerde, I. (1992). Effects of boreal forest fragmentation on capercaillie grouse: empirical evidence and management implications. *Wildlife 2001: populations* 738-749.
- Westemeier, R. L., Brawn, J. D., Simpson, S. A., Esker, T. L., Jansen, R. W., Walk, J. W., ... y Paige, K. N. (1998). Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science*, 282(5394), 1695-1698.
- Widén, P. (1987). Goshawk predation during winter, spring and summer in a boreal forest area of central Sweden. *Ecography*, 10(2), 104-109.
- Wiley, R. H. (1974). Evolution of social organization and life-history patterns among grouse. *The Quarterly Review of Biology*, 49(3), 201-227.
- Wilkinson, N. I., Langston, R. H., Gregory, R. D., Gibbons, D. W., y Marquiss, M. (2002). Capercaillie *Tetrao urogallus* abundance and habitat use in Scotland, in winter 1998–99. *Bird Study*, 49(2), 177-185.
- Williams, P. H., Burgess, N. D., y Rahbek, C. (2000). Flagship species, ecological complementarity and conserving the diversity of mammals and birds in sub-Saharan Africa. *Animal Conservation forum* 3(3): 249-260
- Wolf, C. M., Griffith, B., Reed, C., y Temple, S. A. (1996). Avian and mammalian translocations: update and reanalysis of 1987 survey data. *Conservation biology*, 10(4), 1142-1154.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 16, 97-159.

Zahavi, A. (1975). Mate selection—a selection for a handicap. *Journal of theoretical Biology*, 53(1), 205-214.

Zawadzki, J. y Zawadzka, D. (2012). Population decline of capercaillies *Tetrao urogallus* in the Augustów Forest (NE Poland). *Acta ornithologica*, 47(2), 196-201.