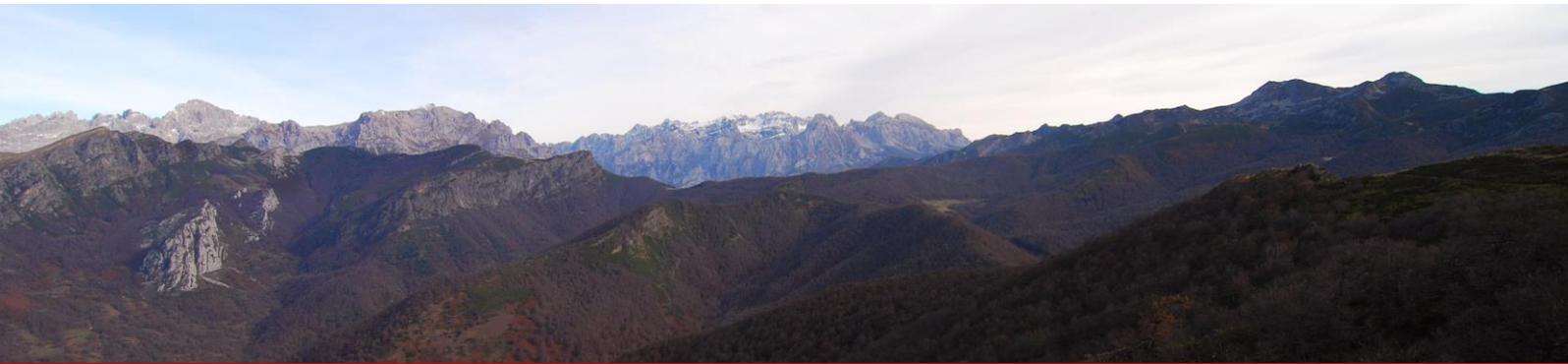


## Caracterización genética de la población de urogallo cantábrico (*Tetrao urogallus cantabricus*)



Abril de 2014

Caracterización genética de la población de urogallo cantábrico (*Tetrao urogallus cantabricus*).

Este documento ha sido realizado por el Laboratorio de Genética de Poblaciones del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. Autores: Ana Domínguez Sanjurjo, Trinidad Pérez Méndez, Jesús Albornoz Pons y Margarita Fernández Rodríguez.

El trabajo cuenta con la colaboración del Comité de Gestión del proyecto LIFE+ Urogallo cantábrico. El proyecto, coordinado por la Fundación Biodiversidad, está cofinanciado al 50% través del programa LIFE+, instrumento financiero de la Unión Europea para el medio ambiente, y cuenta como socios con las Comunidades Autónomas de Cantabria, Principado de Asturias y Castilla y León, esta última a través de la Fundación Patrimonio Natural de Castilla y León; el Consorcio Interautonómico para la Gestión Coordinada del Parque Nacional de los Picos de Europa; SEO/ BirdLife y con la financiación del Organismo Autónomo Parques Nacionales y la Fundación Iberdrola.

Se autoriza la reproducción parcial o total de este documento siempre que se cite su fuente. Queda prohibida su utilización con fines comerciales.

Cita recomendada: Ana Domínguez Sanjurjo, Trinidad Pérez Méndez, Jesús Albornoz Pons y Margarita Fernández Rodríguez. Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. 2014. Caracterización genética de la población de urogallo cantábrico (*Tetrao urogallus cantabricus*). Fundación Biodiversidad, Madrid, España. 59 páginas.

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>PARTE I. ASPECTOS GENÉTICOS SOBRE LA CONSTITUCIÓN, MANTENIMIENTO Y UTILIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE UROGALLO CANTÁBRICO CRIADA EN CAUTIVIDAD</b>	5
A) Criterios genéticos para la constitución y mantenimiento del stock cautivo	6
B) Análisis genético y programa de cruces de la población cautiva del Centro de Cría de Sobrescobio (Asturias)	7
C) Análisis de las posibilidades de manejo de la población cautiva con el software PM2000	12
D) Proyecciones de distintos escenarios de manejo de la población cautiva valorados con el software PM2000	17
E) Apuntes genéticos al Plan de Reforzamiento de la población silvestre de urogallo cantábrico	22
Conclusiones y recomendaciones	23
Anexo I.1. Genotipo de los ejemplares del centro de cría	24
Anexo I.2. Glosario	25
<b>PARTE II. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ACTUAL DE UROGALLO CANTÁBRICO. TENDENCIA Y PERSPECTIVAS DE FUTURO</b>	33
A) Muestreo y genotipado	33
B) Diversidad y estructura de la población	40
C) Capturas y recapturas de los individuos y desplazamientos de los ejemplares	47
D) Perspectivas futuras y recomendaciones	49
Anexo II.2. Genotipo de los ejemplares silvestres	51
Anexo II.3. Protocolo de recogida de los distintos tipos de muestra	55
Referencias	57

## INTRODUCCIÓN

La población cantábrica de urogallo (*Tetrao urogallus cantabricus*) ocupa el límite suroccidental de la distribución de la especie en Eurasia. A partir de su comparación con otras poblaciones europeas para ADN mitocondrial y marcadores microsátélites se ha determinado que está relacionada con las poblaciones de Pirineos y de los Balcanes (Duriez et al. 2006, Rodríguez Muñoz et al. 2007). En un estudio reciente realizado por nuestro grupo (Vázquez et al. 2012), hemos determinado que la población está fragmentada en dos grupos por las vías de comunicación que dividen su hábitat. Además la población presenta un patrón de aislamiento por distancia y presenta signos de una reducción reciente de su tamaño efectivo ( $N_e$ ), lo que se puede relacionar con el proceso de reducción y fragmentación que está sufriendo (Pollo et al. 2005, Quevedo et al. 2006). El urogallo cantábrico cambió su estatus legal de “vulnerable” a “en peligro de extinción” por la orden MAM/2231/2005 del 27 de junio y está calificada como “en peligro” por la “Internacional Union for Conservation of Nature” (Storch et al. 2006).

Ante esta situación se han planteado actuaciones de mejora del hábitat y protección del urogallo por las distintas administraciones públicas. Además, el apartado 5.1.3 de la Estrategia para la Conservación del Urogallo Cantábrico en España recoge el compromiso de establecer un Programa de Cría en Cautividad y un Protocolo de Reintroducción o Refuerzo de Poblaciones. En la primera parte del presente informe se consideran los requisitos que debería cumplir un stock cautivo, en lo referente a su constitución y manejo, para que sea viable desde el punto de vista genético. En la segunda parte se hace una valoración del estado actual de la población de urogallo cantábrico a partir de muestras de animales silvestres recogidas en el año 2011. Estos resultados se comparan con los correspondientes a los años 2004-2006 para valorar la evolución de la población en estos últimos años y sus perspectivas de futuro.

## **PARTE I**

### **ASPECTOS GENÉTICOS SOBRE LA CONSTITUCIÓN, MANTENIMIENTO Y UTILIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE UROGALLO CANTÁBRICO CRIADA EN CAUTIVIDAD**

## A) CRITERIOS GENÉTICOS PARA LA CONSTITUCIÓN Y MANTENIMIENTO DEL STOCK CAUTIVO

La cría en cautividad permite la conservación en aquellos casos en que una especie (o subespecie) se encuentra en peligro en su hábitat natural. La cría en cautividad puede tener dos objetivos: garantizar la conservación “ex situ” para evitar la desaparición total de una especie o el obtener animales para su reintroducción en la naturaleza. En este segundo caso, es necesario asegurar que las causas del declive poblacional en la naturaleza se eliminan y que las probabilidades de supervivencia de la población aumentan gracias al programa de reintroducción y no al contrario (IUCN, 2002). En todo caso se debe atender a las directrices de la IUCN para la reintroducción de galliformes (IUCN, 2009).

Se pretende que la población cautiva mantenga altos niveles de variabilidad genética, lo que depende de su constitución y manejo. Para que una población mantenga niveles altos de variabilidad es necesario obtener un número suficiente de fundadores y mantener un tamaño de población también suficiente. Esto depende de dos factores: la posibilidad de obtener individuos fundadores poco emparentados entre sí en número suficiente y la capacidad de carga del centro de cría.

### Fundadores

El número mínimo de fundadores recomendado para iniciar la cría en cautividad es de 20 o 30 (Frankham et al 2010). No se nos ha proporcionado información sobre la capacidad real del único centro existente en la actualidad (Centro de Sobrescobio). Se debería contar con el máximo número de ejemplares diferentes capturados en la naturaleza como fundadores. Teniendo en cuenta la estructura genética de la Población Cantábrica (Vázquez et al. 2012), la captura de ejemplares o huevos ha de realizarse en las dos áreas, occidental y oriental y en las vertientes norte y sur de la Cordillera Cantábrica procurando que las localidades de captura estén alejadas.

Tal y cómo se recoge en el documento elaborado por el “Grupo de Trabajo de Urogallo Cantábrico” los fundadores pueden ser individuos capturados directamente en la naturaleza o huevos. Teniendo en cuenta la situación de la población cantábrica, que se encuentra “en peligro”, sugerimos que la retirada parcial de puestas (2-3 huevos por puesta) sería la mejor alternativa. De esta forma no se afecta grandemente a la población silvestre y, a la vez, se evita el parentesco entre los individuos fundadores de la población cautiva.

### Mantenimiento

En el mantenimiento de una población cautiva hay que tener en cuenta varios riesgos: la estocasticidad demográfica, la depresión endogámica, la fijación de alelos al azar por deriva genética y la adaptación a la cautividad. La **estocasticidad demográfica** viene determinada porque una población pequeña está sujeta a variaciones en su número y relación de sexos simplemente por azar. Esto hace que, cuando se establece una población, sea necesario atender a criterios de expansión rápida de la población antes que a criterios de variación genética para evitar su pérdida. La **endogamia** y la **deriva genética** han de evitarse durante el mantenimiento de la población y para ello se tratará de aumentar el tamaño efectivo ( $N_e$ ) con el tamaño real disponible. Esto se puede conseguir haciendo los cruzamientos dirigidos para minimizar la coascendencia entre las parejas (ha de llevarse un libro genealógico de los individuos), igualando los tamaños de familia e igualando las contribuciones de distintos individuos a la población. Dado que los individuos fundadores pueden ser más o menos próximos genéticamente, también es aconsejable evaluar la proximidad genética entre individuos (relatedness) para aumentar la contribución de los individuos menos emparentados

con el grupo. Con estas medidas se evita la endogamia y se consigue mantener la diversidad del stock cautivo. La **adaptación a la cautividad** es una consecuencia de la reproducción en cautividad durante generaciones. Inevitablemente, se producirá una selección a favor de aquellos individuos que se adaptan mejor a las condiciones de vida en cautividad. Para evitar este problema se debe ir reforzando periódicamente la población con ejemplares silvestres.

Durante el mantenimiento ha de establecerse una base de datos que recoja la información de todos los individuos reclutados en la naturaleza para el centro de cría, así como todos los cruzamientos realizados, número de huevos puestos, número de huevos eclosionados e individuos nacidos. Para cada individuo deben de constar en la base de datos al menos los siguientes campos: Identificador individual, padre, madre, sexo, fecha de nacimiento, fecha de muerte y localidad de captura. Esta información es imprescindible para poder establecer un programa de cría en cautividad dado que sirve para determinar parámetros fundamentales de la historia vital (life history) en las condiciones reales de la cría. De esta información se obtiene también el pedigrí de los individuos de la población, una información que es **INDISPENSABLE** para proponer cualquier programa de manejo.

## **B) ANÁLISIS GENÉTICO Y PROGRAMA DE CRUCES DE LA POBLACIÓN CAUTIVA DEL CENTRO DE CRÍA DE SOBRESCOBIO (ASTURIAS)**

Como se ha expuesto, la elaboración de un programa de cruces para el manejo de una población cautiva requiere disponer de la máxima información sobre los individuos a manejar. La genealogía es especialmente relevante, dado que uno de los parámetros que se utiliza es la **coascendencia** o coeficiente de endogamia que tendría un descendiente de una pareja de individuos. Hemos solicitado información sobre las relaciones de parentesco de los individuos cautivos, pero no se nos ha facilitado. Todos los programas de manejo se basan en genealogías, en concreto el software específico más utilizado para diseñar programas de cría en todo el mundo, PM2000 (Pollak et al. 2007, [www.isis.org](http://www.isis.org)) requiere esa información.

### **Genotipado de los 13 ejemplares del centro**

Se ha determinado el genotipo de los 13 ejemplares cautivos a partir de muestras de sangre recibidas el 22 de septiembre de 2011. El análisis se ha realizado siguiendo el método, desarrollado en nuestro laboratorio, para la individualización genética de urogallo cantábrico (Pérez et al. 2010). Este método consiste en la amplificación de varios marcadores microsatélite, utilizando un protocolo de PCR semianidada (Bellemain y Taberlet 2004) en reacciones multiplex, y un marcador de sexo diseñado específicamente para urogallo en nuestro laboratorio.

Se analizaron los marcadores TUD1, TUD2, TUD3, TUD4, TUD5, TUD6, TUD7, TUT1 y TUT3, descritos por Segelbacher et al. (2000) para *Tetrao urogallus*, así como los BG4, B10, BG12, BG14, BG15, BG16 y BG18, descritos por Piertney y Jacob (2001) para *Tetrao tetrix*. En las reacciones de amplificación se utilizaron cebadores internos diseñados en nuestro laboratorio para optimizar el procedimiento.

Con los 16 marcadores analizados y para la población cantábrica, la probabilidad teórica de identidad entre individuos no emparentados es de  $1,36 \times 10^{-11}$  y de  $1,85 \times 10^{-5}$  entre hermanos. En el Anexo se presentan los genotipos de los 13 ejemplares del centro de cría de Sobrescobio.

### Comparación con la población silvestre

Se ha comparado el genotipo de estos individuos con los genotipos de la población cantábrica de *Tetrao urogallus* mediante el programa STRUCTURE y mediante un análisis de componentes principales. En el diagrama obtenido con STRUCTURE (Figura 1.1) se representa en el eje de ordenadas la probabilidad de asignación de los distintos individuos, representados en el eje de abscisas, a cada uno de los dos grupos poblacionales detectados. Estos dos grupos poblacionales se corresponden con el área de distribución occidental, en rojo, y el área oriental, en verde. Los ejemplares del centro de cría están a la derecha del eje de abscisas y se observa claramente que 12 de ellos son netamente “occidentales” y uno, la hembra 020 es de genotipo oriental.

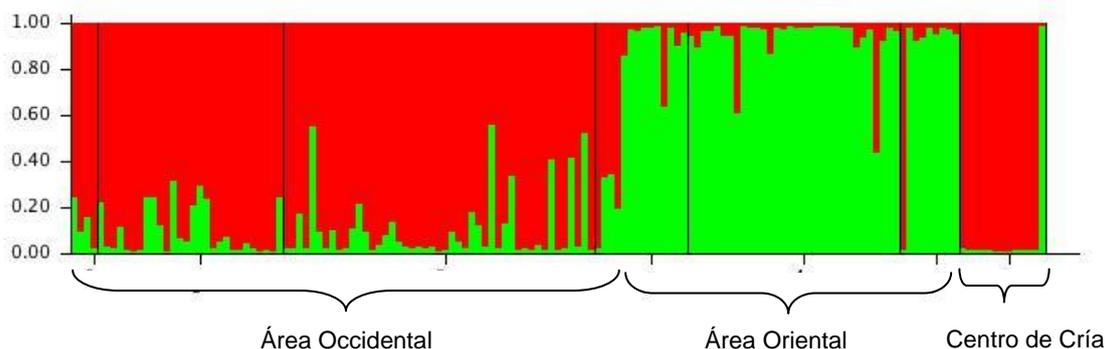


Figura 1.1.- Representación gráfica del resultado obtenido con el programa STRUCTURE a partir de 136 genotipos individuales. Cada barra vertical representa un individuo y su probabilidad de asignación a uno de los dos grupos.

El análisis de componentes principales (Figura 1.2) permite representar a los individuos según unas variables compuestas que condensan la mayor parte de la diferenciación entre los mismos, en nuestro caso entre las dos primeras variables contienen el 48% de la variación. En el gráfico se puede observar que la diversidad genética de los urogallos cautivos dista mucho de la que se observa en la población. La hembra 020, de genotipo oriental, es la que presenta mayor diferenciación con el resto de los ejemplares, que están bastante próximos entre sí.

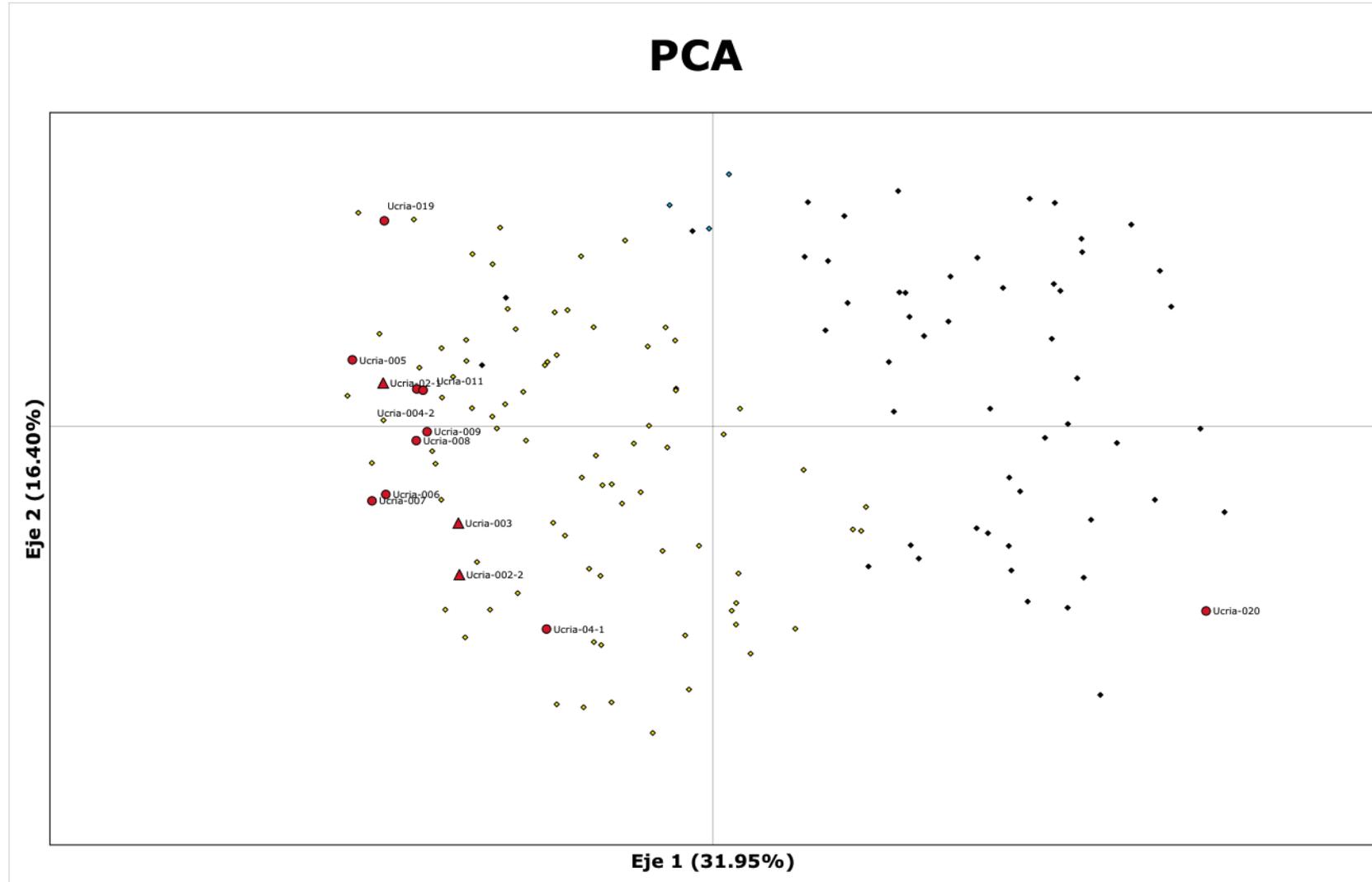


Figura 1.2.- Gráfica del análisis de componentes principales basada en 136 genotipos individuales. Cada punto representa a un individuo. En amarillo aparecen los ejemplares identificados en el área occidental del habitat, en negro los ejemplares identificados en el área oriental y en azul los identificados en el área central en torno a la línea de división formada por la autopista y la carretera nacional. En rojo los ejemplares del centro de cría, las hembras representadas por círculos y los machos por triángulos.

### Relaciones de parentesco entre los ejemplares del centro de cría

Se ha estimado el coeficiente de relación (relatedness; Queller y Goodnight, 1989) entre los ejemplares del centro de cría y se ha comparado con el de la población en general (Figura 1.3). En primer lugar podemos decir que las hembras 019 y 020 se corresponden con dos hembras que habían sido previamente genotipadas en nuestro laboratorio. La hembra 019 es la que nos fue enviada desde el Servicio de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León en mayo de 2011. Esta hembra fue recogida en Camposagrado el 2/V/2011 y su código de entonces era Hembra 8. La hembra 020 coincide con la que fue identificada a partir de una muestra de plumas una hembra de urogallo, capturada en Tarna/La Bolera (Caso, Asturias) por Oscar Rodríguez el 12 de Mayo de 2011, remitida por la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio del Principado de Asturias, .

A partir de la gráfica presentada en la Figura 1.3, es evidente que los ejemplares del centro están emparentados entre sí. El coeficiente que se representa está centrado en el valor cero para la población bajo estudio y se puede observar que los ejemplares del centro presentan una distribución bimodal con una de las modas en 0,6 que correspondería a la distribución de los individuos del centro que son parientes.

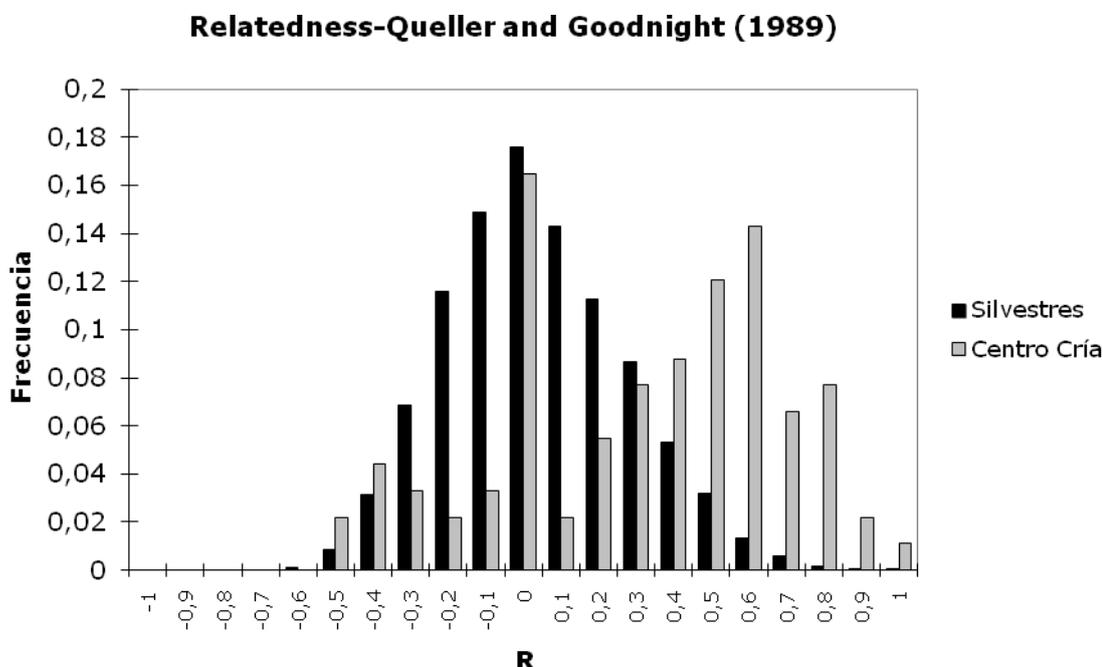


Figura 1.3.- Comparación del Coeficiente de Relación entre los ejemplares del centro de cría con los de la población silvestre.

	Ucrista-04-1	Ucrista-02-1	Ucrista-002-2	Ucrista-003	Ucrista-004-2	Ucrista-005	Ucrista-006	Ucrista-007	Ucrista-008	Ucrista-009	Ucrista-011	Ucrista-019
Ucrista-02-1		-0,11										
Ucrista-002-2		0,67	0,43									
Ucrista-003		0,62	0,54	0,84								
Ucrista-004-2		0,20	0,54	0,46	0,32							
Ucrista-005		0,22	0,60	0,29	0,34	0,72						
Ucrista-006		0,41	0,57	0,59	0,68	0,20	0,44					

<b>Ucra-007</b>	0,40	0,57	0,73	0,68	0,51	0,48	0,71					
<b>Ucra-008</b>	0,19	0,56	0,54	0,41	0,73	0,69	0,45	0,45				
<b>Ucra-009</b>	0,28	0,65	0,47	0,59	0,34	0,51	0,77	0,82	0,27			
<b>Ucra-011</b>	0,20	0,58	0,41	0,36	0,71	0,77	0,51	0,33	0,91	0,33		
<b>Ucra-019</b>	-0,03	0,24	0,07	0,19	0,09	0,11	0,22	0,39	-0,16	0,46	-0,10	
<b>Ucra-020</b>	-0,09	-0,48	-0,22	-0,36	-0,40	-0,44	-0,34	-0,32	-0,28	-0,53	-0,40	-0,53

Tabla 1.- Matriz de Coeficientes de Relación (R) entre pares de individuos del centro de cría.

Los coeficientes entre pares de ejemplares del centro se presentan en la Tabla 1, la media del coeficiente R en los ejemplares del centro es de 0,31. Según datos que figuran en la página web de la Fundación Biodiversidad y publicados en la prensa (La Nueva España, 4 de marzo de 2012), en el centro de cría se consiguió la reproducción de una pareja de la que sobreviven nueve descendientes.

Según esa información y a partir de la los coeficientes de la tabla se puede deducir que probablemente la familia estaría constituida por los ejemplares 02-1, 04-1, 002-2, 003, 004-2, 005, 006, 007, 008, 009 y 011. Los parentales podrían ser la hembra 04-1 y el macho 02-1, que no están emparentados entre sí. Cuando atendemos a los genotipos de esos 11 ejemplares vemos que los genotipos son compatibles para los 9 hermanos y para el macho 02-1. Sin embargo, vemos que el genotipo de la hembra 04-1 presenta tres marcadores incompatibles con esa descendencia, TUT1, BG10 y BG12. Estas tres incompatibilidades podrían explicarse si la hembra 04-1 fuese heterocigótica para alelos nulos en esos tres marcadores. La interpretación alternativa sería que 04-1 no es la madre de esa descendencia. Analizando los datos con el programa de análisis de paternidades PARENTE (Cercueil et al. 2002), con una tasa de error en genotipado igual a 0,06 (determinado en Vázquez et al. 2012) y permitiendo un marcador que no case, se deduce que el macho 02-1 es el padre más probable de los nueve supuestos descendientes. En consecuencia, la pareja formada por 02-1 y 04-1 serían los progenitores de 002-2 y 003 con probabilidades 0,84 y 0,95, respectivamente. Sin embargo, al individuo 04-1 no la devuelve el programa como madre de 004-2, 005, 006, 007, 008, 009 y 011, al no casar los genotipos para dos o tres marcadores según el descendiente de que se trate. En cualquier caso la hembra 04-1 presenta coeficientes R positivos con todos los supuestos descendientes nacidos en el Centro de Cría.

### Programa de cruces entre los ejemplares del centro de cría

Según los datos presentados en los apartados anteriores, entre los ejemplares del Centro de Cría sólo hay cuatro fundadores, un macho y tres hembras. A partir de la Figura 1.2 se puede comprobar que estos ejemplares no representan más que una parte de la variación presente en la población silvestre. En la Tabla 2 se compara la diversidad en el Centro con la población silvestre. El número medio de alelos en el centro es de 2,88 frente a los 4,75 de media en la población silvestre (un 60%) y la diversidad genética es de 0,46 frente a 0,60 (un 77 %). Se recomienda incrementar progresivamente el número de fundadores hasta llegar al máximo de la capacidad de carga del centro, para capturar el máximo de la diversidad de la población y evitar la endogamia como ya se expuso anteriormente.

Marcador	N		N alelos		He	
	Silvestres	Centro Cría	Silvestres	Centro Cría	Silvestres	Centro Cría
<b>TUD1</b>	134	13	4	3	0,63	0,50
<b>TUD2</b>	134	13	8	3	0,61	0,54
<b>TUD3</b>	134	13	3	2	0,50	0,36
<b>TUD4</b>	133	13	6	2	0,49	0,50
<b>TUD5</b>	128	13	8	5	0,74	0,62

<b>TUD6</b>	103	12	3	1	0,44	0,00
<b>TUD7</b>	130	13	3	2	0,55	0,50
<b>TUT1</b>	122	13	7	3	0,68	0,65
<b>TUT3</b>	132	13	3	2	0,55	0,14
<b>BG4</b>	122	13	5	4	0,75	0,43
<b>BG10</b>	133	13	7	3	0,77	0,54
<b>BG12</b>	134	13	3	3	0,41	0,38
<b>BG14</b>	118	13	3	3	0,51	0,64
<b>BG15</b>	129	13	4	4	0,69	0,67
<b>BG16</b>	130	13	4	3	0,60	0,57
<b>BG18</b>	129	13	5	3	0,60	0,27
<b>Media</b>			<b>4,75</b>	<b>2,88</b>	<b>0,60</b>	<b>0,46</b>
<b>SE</b>			<b>0,47</b>	<b>0,24</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>

Tabla 2.- Diversidad en el Centro de Cría comparada con la población silvestre valorada en 2006.

Once de los ejemplares del centro están estrechamente emparentados entre sí, con una relación parental-hijo o hermanos completos, por tanto todos los pares tendrían una **coascendencia** igual a  $\frac{1}{4}$ , o, lo que es lo mismo, un descendiente de uno de esos pares tendría un coeficiente de endogamia de 0,25, que es muy elevado y podría resultar en la aparición de signos de depresión endogámica. Los cuatro individuos fundadores tienen, en principio, una coascendencia teórica de 0 y podemos observar que el coeficiente de relación entre pares es reducido, con media -0,167 (véase la Tabla 1). Teniendo en cuenta que sólo se dispone de tres machos, los tres emparentados entre sí, y que tenemos 10 hembras, ocho de las cuales están altamente emparentadas con los tres machos disponibles, se recomienda cruzar únicamente la hembra 04-1 y las hembras no emparentadas 019 y 020. Atendiendo a evitar la endogamia estrecha y elegir las parejas con menor coeficiente R se proponen los siguientes cruzamientos:

Macho 02-1 x Hembra 04-1

Macho 002-2 x Hembra 019

Macho 003 x Hembra 020

El primero de los cruzamientos sería entre los mismos progenitores que ya han sido cruzados con anterioridad y por tanto generaría más hermanos completos de la misma familia, no obstante, y teniendo en cuenta que el número actual de individuos es muy pequeño, creemos que es conveniente realizar este cruzamiento para cubrir eventuales problemas demográficos relacionados con el reducidísimo tamaño de la población cautiva. Es imprescindible llevar un libro genealógico completo del centro anotando en él todas las eventualidades.

### C) ANÁLISIS DE LAS POSIBILIDADES DE MANEJO DE LA POBLACIÓN CAUTIVA CON EL SOFTWARE PM2000

Para mantener una población en cautividad es necesario valorar parámetros demográficos y genéticos. Actualmente se dispone de recursos informáticos específicos para analizar diferentes escenarios de mantenimiento: se valora el número de cruzamientos necesario para alcanzar determinados objetivos demográficos y se estudian distintos planes de emparejamiento para alcanzar unos objetivos prefijados respecto al mantenimiento de la diversidad genética en la población cautiva y evitar la endogamia. Uno de los programas más utilizados para valorar distintos escenarios de cría en cautividad es el "Manejo de Poblaciones 2.000" (PM2000; [www.isis.org](http://www.isis.org)) y lo utilizaremos para valorar distintos escenarios de mantenimiento de una población cautiva de urogallo.

### - Variables demográficas

El programa PM2000 sirve para orientar el manejo de la cría en cautividad teniendo en cuenta parámetros demográficos y genéticos. El componente demográfico incorpora parámetros de la historia vital de la especie en estudio como son la tasa de mortalidad anual ( $Q_x$ ) y la tasa de fecundidad anual ( $M_x$ ). El componente genético atiende a la genealogía de los individuos en la población cautiva y a partir de aquí se estima la diversidad genética, la endogamia acumulada y la coascendencia entre pares de individuos.

Parámetro	Valor	Referencia
Edad de las hembras en la primera puesta	2	Castroviejo 1975 Marshall and Edwards-Jones 1998
Edad de los machos en la primera puesta	3	Cramp y Simmons 1980 Marshall and Edwards-Jones 1998
Edad máxima	11	Moss and Picozzi 1994
Número medio de huevos por puesta	6.5	Rodríguez-Muñoz 2011
% mortalidad de hembras de 0-1 año	70	Marshall and Edwards-Jones 1998
% mortalidad de hembras de más de 1 año	34	Marshall and Edwards-Jones 1998
% mortalidad de machos de 0-1 año	80	Marshall and Edwards-Jones 1998
% mortalidad de machos de más de 1 año	34	Marshall and Edwards-Jones 1998

Tabla 1.3.- Parámetros demográficos utilizados para modelar la población de urogallo

Hemos utilizado los parámetros demográficos obtenidos para distintas poblaciones silvestres de urogallos (Tabla 3) asumiendo que la población cautiva tuviese unas expectativas de supervivencia y reproducción iguales a los que se dan en poblaciones silvestres. Los valores reproductivos, es decir el número esperado de descendientes del mismo sexo producidos ese año y en el futuro por un individuo de edad  $x$ , se presentan en la Figura 1.4. Con estos parámetros se obtendría una tasa de crecimiento poblacional de 1.1284.

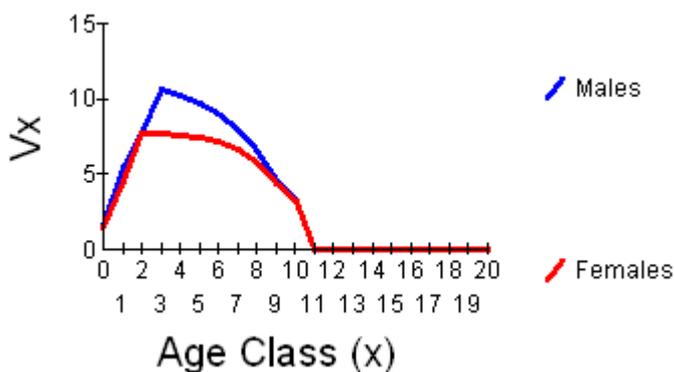


Figura 1.4.- Valor reproductivo de machos y hembras.

### - Parámetros genéticos de los trece individuos que están actualmente en el centro basados en su genealogía

(Nota: Los parámetros que se presentan están basados en el pedigrí que hemos deducido anteriormente, que podría no ser el real.)

La población del centro presenta una diversidad de 0.8018 como proporción de la población silvestre, el coeficiente medio de coascendencia es de 0,1982 y el número de equivalentes de genomas fundadores (fge, founder genome equivalents) o lo que es lo

mismo, el número de fundadores que producirían la misma cantidad de diversidad es 2.52. Con estos individuos el número potencial de fge es de 4 y la diversidad potencial 0.8750.

	Población actual	Población potencial
Fundadores	4	-
Individuos vivos	13	-
Diversidad Genética (GD)	0.8018	0.875
Valor genetico (GV)	0.8006	-
Número de fundadores equivalente (fge)	2.52	4
Fundadores vivos	2.00	4
Coeficiente de endogamia medio (F)	0.0000	-

Tabla 1.4.- Estadística poblacional

En la tabla 5 se presentan los valores de cada individuo para una serie de parámetros demográficos y genéticos. Entre ellos el KV( Kinship value), que se podría traducir como valor de coascendencia, mide la coascendencia ponderada de un animal, siendo el factor de ponderación el valor reproductivo. El coeficiente KV predice la pérdida de diversidad que se espera en la generación siguiente si un animal se reprodujera al azar con el resto de los individuos de la población. El coeficiente GU (Genome Uniquedness) nos mide la singularidad de un genoma en la población. Como es lógico los genomas más importantes desde este punto de vista son los de las dos hembras capturadas en 2011 y que todavía no han producido descendencia.

Studbook ID	Sex	Vx	F	MK	KV	GU - All
04-1	F	7.59	0	0.2115	0.2059	0.0010
02-1	M	10.27	0	0.2115	0.2189	0.0010
019	F	7.75	0	0.0385	0.0376	1.000
020	F	7.75	0	0.0385	0.0376	1.000
004	F	7.75	0	0.2308	0.2312	0.0000
005	F	7.75	0	0.2308	0.2312	0.0000
006	F	7.75	0	0.2308	0.2312	0.0000
007	F	7.75	0	0.2308	0.2312	0.0000
008	F	7.75	0	0.2308	0.2312	0.0000
009	F	7.75	0	0.2308	0.2312	0.0000
011	F	7.75	0	0.2308	0.2312	0.0000
002-2	M	7.67	0	0.2308	0.2310	0.0000
003	M	7.67	0	0.2308	0.2310	0.0000

Tabla 1.5.- Estadística individual

A partir de los valores individuales y de los coeficientes de coascendencia de todos los pares de individuos de la población (Tabla 6) se deben diseñar los cruzamientos a efectuar. Atendiendo a la endogamia de la descendencia, han de elegirse los pares con coascendencia 0 y evitar los pares con una coascendencia de 0.25 o mayor, dado que producirían individuos muy endogámicos. El programa MateRx permite elegir los cruzamientos a realizar y calcular los efectos que tendrían sobre la diversidad genética de la población,. Es, por lo tanto, una herramienta útil a la hora de tomar decisiones.

### Valor de los posibles cruzamientos entre los individuos actualmente en el centro de cría según el programa MateRx

El software PM2000 permite exportar los datos a un programa independiente llamado MateRx (Ballou, et al., 2000) con el que se puede calcular un índice (MSI, mate suitability index) para cada uno de los posibles cruzamientos en una población.

ID	02-1	002-2	003	04-1	019	020	004	005	006	007	008	009	011
02-1	0.5	0.25	0.25	0	0	0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
002-2	0.25	0.5	0.25	0.25	0	0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
003	0.25	0.25	0.5	0.25	0	0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
04-1	0	0.25	0.25	0.5	0	0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
019	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
020	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0
004	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
005	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
006	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25
007	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25
008	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25
009	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25
011	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5

Tabla 1.6.- Matriz de coeficientes de coascendencia entre pares de individuos del centro

Este índice se calcula a partir del coeficiente medio de coascendencia, la diferencia entre los coeficientes de coascendencia medio entre macho y hembra y el coeficiente de endogamia de la descendencia. Los valores posibles del índice son los siguientes:

#### MSI Score Definitions:

1 = very beneficial pair

2 = moderately beneficial pair;

3 = slightly beneficial pair;

4 = slightly detrimental pair;

5 = detrimental pair, should only be used if demographically necessary;

6 = very detrimental pair, (should only be used if demographic considerations override preservation of genetic diversity per se).

“-“ = so detrimental the pair should never be made.

El análisis de los individuos de Sobrescobio con el programa arroja la siguiente alerta:

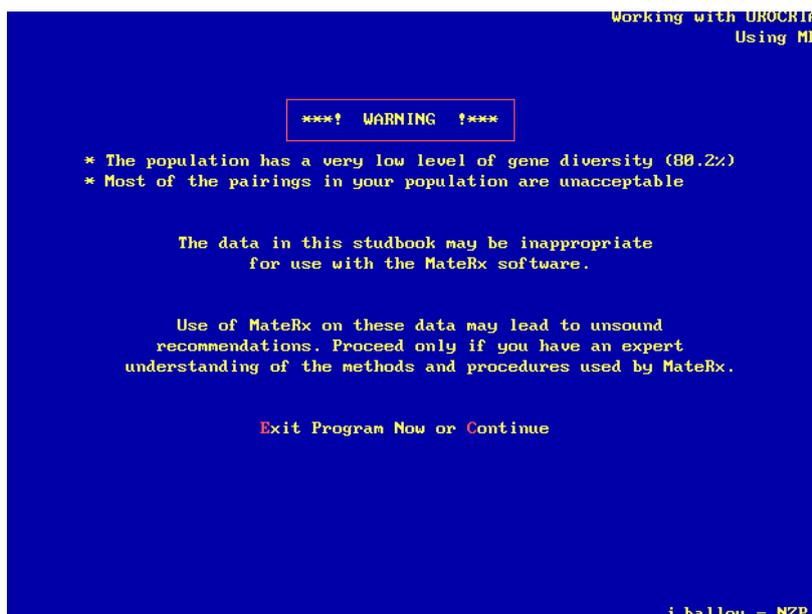


Figura 1.5.- Alerta del programa sobre la baja diversidad de la población

La alerta advierte del bajo nivel de diversidad en la población y de que la mayor parte de los cruzamientos posibles son inaceptables. El histograma que representa el índice de todos los posibles cruzamientos (Figura 1.6) nos muestra que la mayor parte de los posibles son totalmente inaceptables. Esto se debe a que producirían descendencia con un coeficiente de endogamia de 0.25, como ya se advirtió en la página 14.

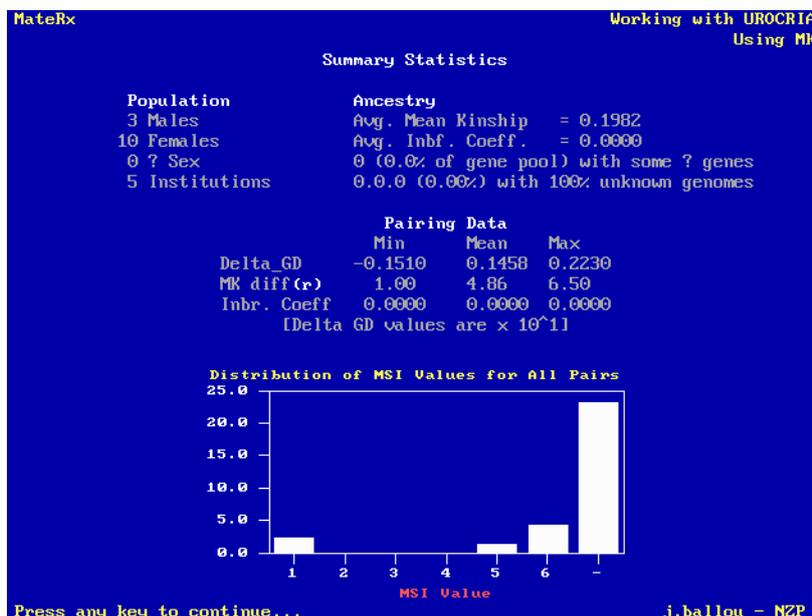


Figura 1.6.- Distribución del índice MSI en los pares posibles entre individuos de Sobrescobio

Sólo dos de los posibles pares serían beneficiosos y los dos incluirían al macho 02-1. Los pares con índices 5 y 6 sólo deberían cruzarse si las consideraciones demográficas anulan las consideraciones sobre la diversidad genética. En este caso

	<b>Machos</b>		
	<b>02-1</b>	<b>002-</b>	<b>003</b>
<b>Hembras</b>	<b>2</b>		

<b>04-1</b>	5	-	-
<b>019</b>	1	6	6
<b>020</b>	1	6	6
<b>004</b>	-	-	-
<b>005</b>	-	-	-
<b>006</b>	-	-	-
<b>007</b>	-	-	-
<b>008</b>	-	-	-
<b>009</b>	-	-	-
<b>011</b>	-	-	-

Tabla 1.7.- Índice de los distintos cruzamientos posibles entre los tres machos y las 10 hembras del centro de Sobrescobio

hemos propuesto tres pares (véase página 12) para maximizar el número de cruzamientos, atendiendo a criterios demográficos, evitando los cruzamientos totalmente inaceptables desde el punto de vista genético.

#### D) PROYECCIONES DE DISTINTOS ESCENARIOS DE MANEJO DE LA POBLACIÓN CAUTIVA VALORADOS CON EL SOFTWARE PM2000

El software PM2000 permite valorar distintos escenarios de manejo de la población cautiva utilizando los parámetros demográficos y genéticos determinados anteriormente. Según los valores reproductivos y atendiendo únicamente a aspectos demográficos la población podría crecer y pasar de los 100 individuos en 20 años (Figura 1.7).

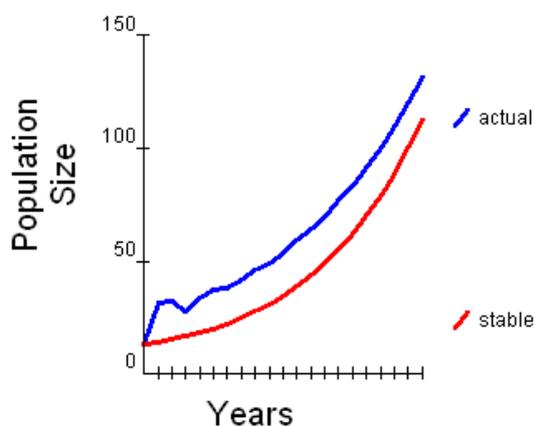


Figura 1.7.- Tamaño de población en función de los años

El número de cruzamientos anuales para alcanzar el tamaño  $N=24$  (el número de animales que presumimos se podrían mantener en el Centro de Cría de Sobrescobio) en 20 años se presenta en la Figura 1.8.

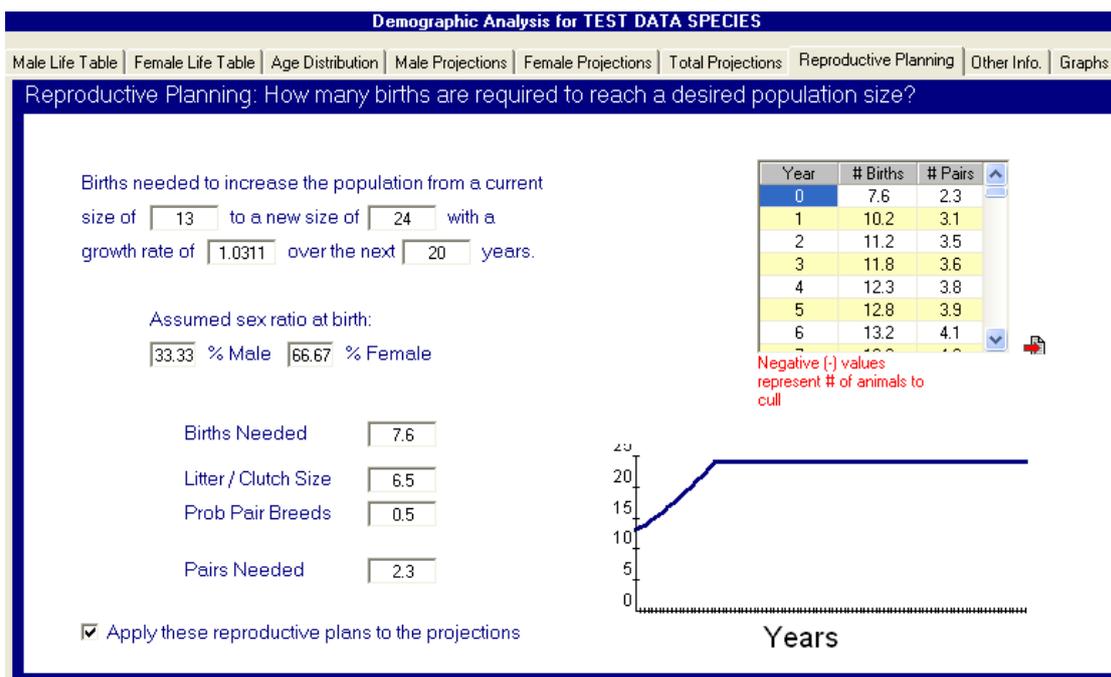


Figura 1.8.- Requerimientos para alcanzar un N=24 en veinte años

El programa PM2000 permite definir unos objetivos sobre el mantenimiento de diversidad genética durante un número de generaciones. El objetivo que se fija generalmente es el mantenimiento del 90% de la diversidad genética inicial durante un periodo de 100 años (estos son los valores que da por defecto el programa). Cómo se verá más abajo estos objetivos no resultarían alcanzables ni de lejos, por ello vamos a probar los requerimientos para un objetivo mucho más modesto: el mantenimiento de un 90% de la diversidad genética durante 20 años.

**Escenario 1: Mantenimiento de la población cautiva a partir de los trece individuos presentes actualmente en el centro**

Al ser la diversidad genética inicial igual al 80%, esta no haría más que disminuir y por tanto sería imposible alcanzar los objetivos propuestos incluso aunque se aumentase el tamaño de población

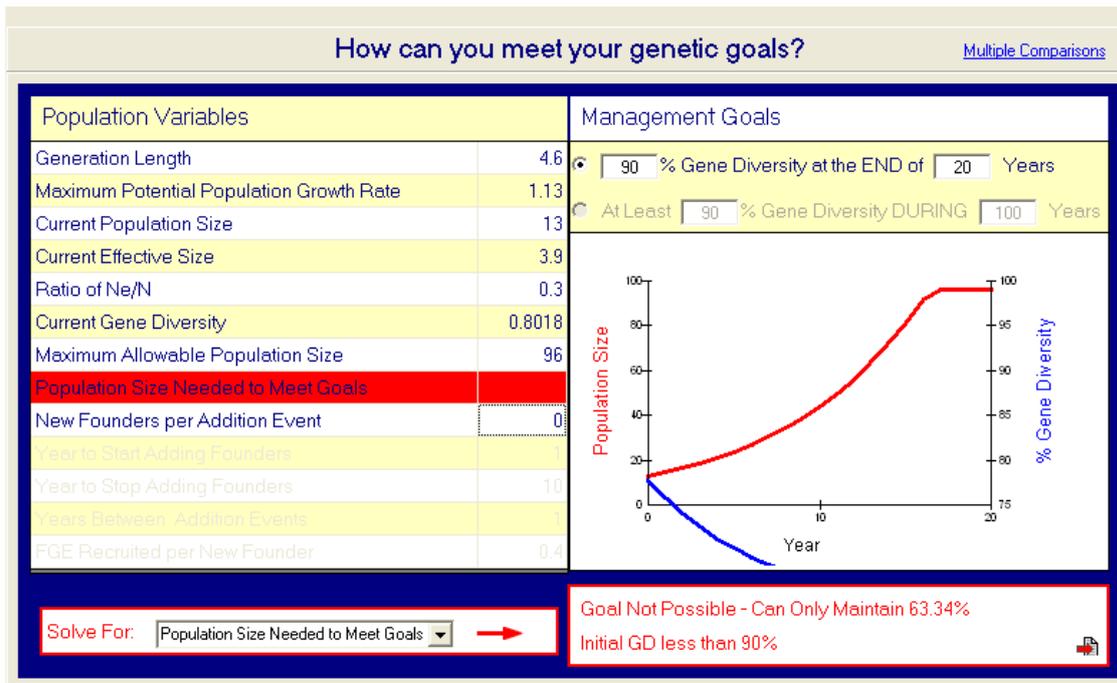


Figura 1.9.- Análisis de los objetivos deseados a partir de los 13 individuos de Sobrescobio asumiendo un  $N_{max}=24$  y sin suplementar la población con nuevos individuos capturados en la naturaleza

## Escenario 2: Mantenimiento de la población cautiva a partir de los trece individuos presentes actualmente en el centro suplementados con distinto número de nuevos fundadores por año

2a) con un tamaño máximo de población de 24 animales.

Con un tamaño máximo igual a 24 y partiendo de los 13 animales presentes actualmente en el Centro de Sobrescobio es imposible mantener el 90% de la diversidad durante 20 años.

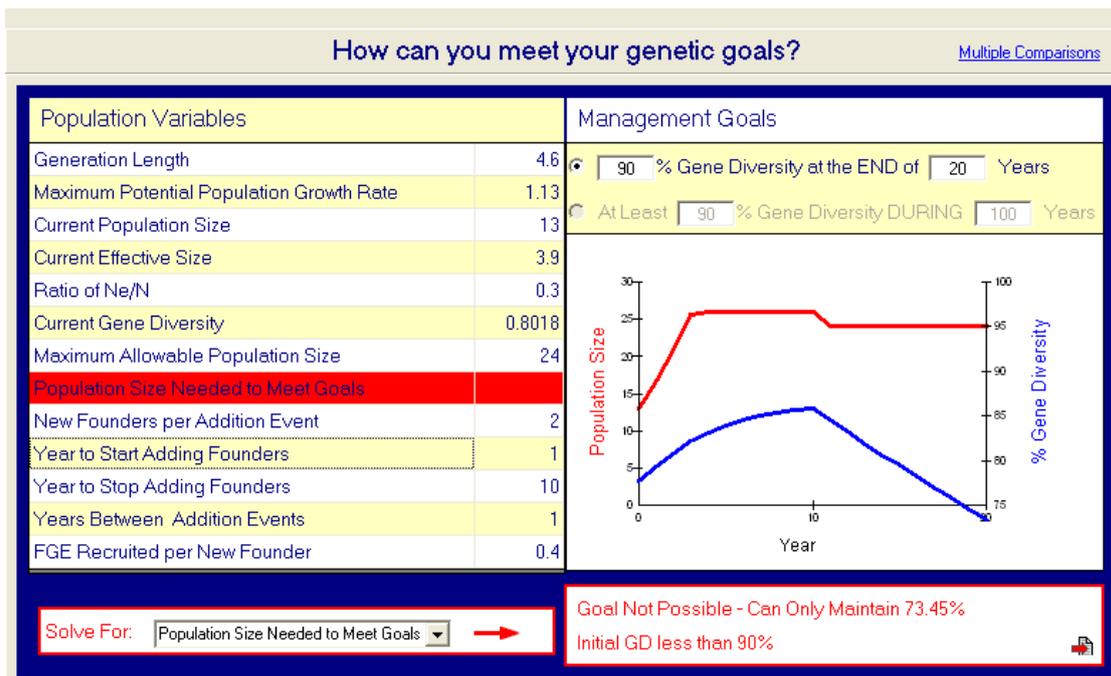


Figura 1.10.-Población inicial:13 animales cautivos. Nmax=24. Suplemento de 2 fundadores por año durante 10 años.

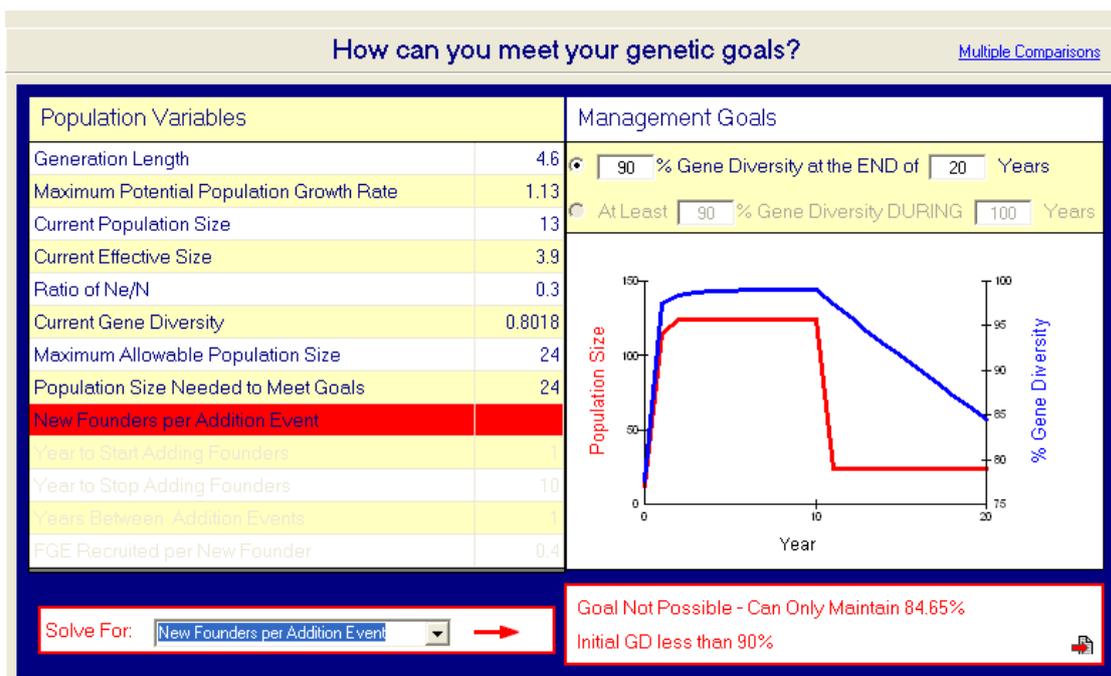


Figura 1.11. Población inicial:13 animales cautivos. Nmax=24. Suplemento de fundadores necesitado.

El tamaño N=24 es insuficiente para mantener los objetivos propuestos. Esto resulta evidente si se observa la Figura 1.11, ni siquiera con un suplemento de 100 fundadores por año, lo que obviamente es un absurdo, se podrían alcanzar los objetivos.

2b) Tamaño máximo de población superior a 24 animales

Consideramos distintos tamaños de población y distinto número anual de fundadores.

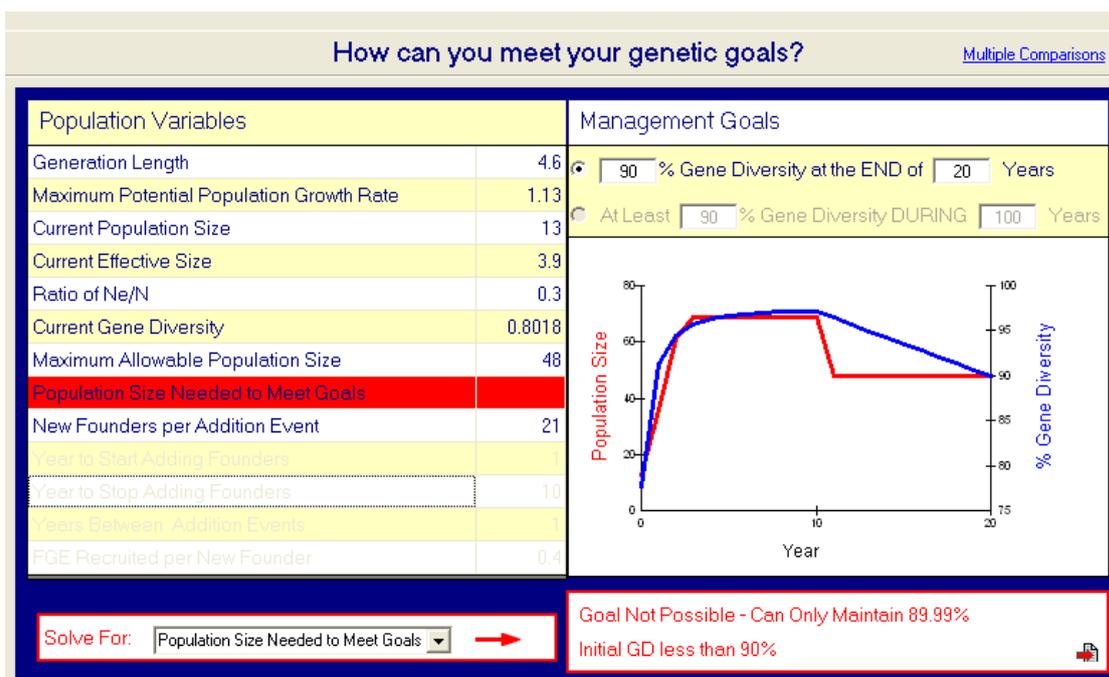


Figura 1.12.- Población inicial:13 animales cautivos. Nmax=48. Introducción de 21 nuevos fundadores por año durante 10 años.

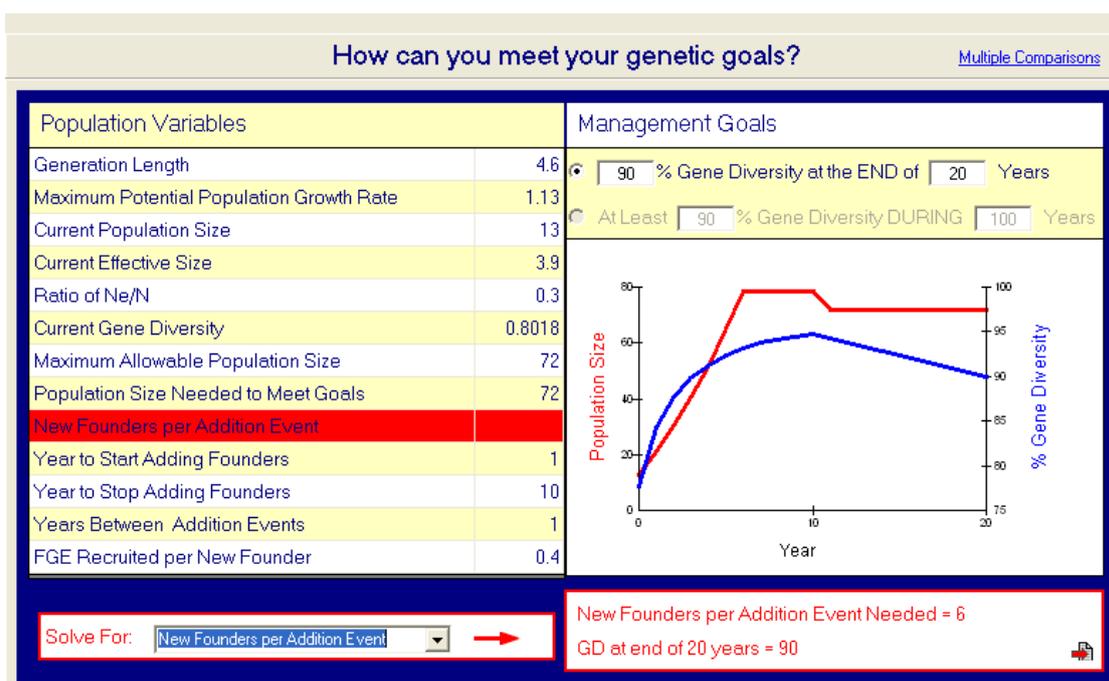


Figura 1.13.- Nmax=72. Introducción de 6 nuevos fundadores por año durante 10 años.

Para alcanzar los objetivos con un tamaño de 48 animales se requiere la introducción de 21 animales anualmente durante 10 años (Figura 1.12), lo que es impensable teniendo en cuenta el estado actual de la población silvestre. Aumentando el tamaño de la población hasta 72 podríamos conseguir el objetivo suplementando la población cautiva con 6 individuos silvestres cada año durante 10 años (Figura 1.13). Si el tamaño de la población cautiva fuera de 96 animales se podría conseguir el objetivo suplementando con 4 animales silvestres por año durante 10 años (Figura 1.14).

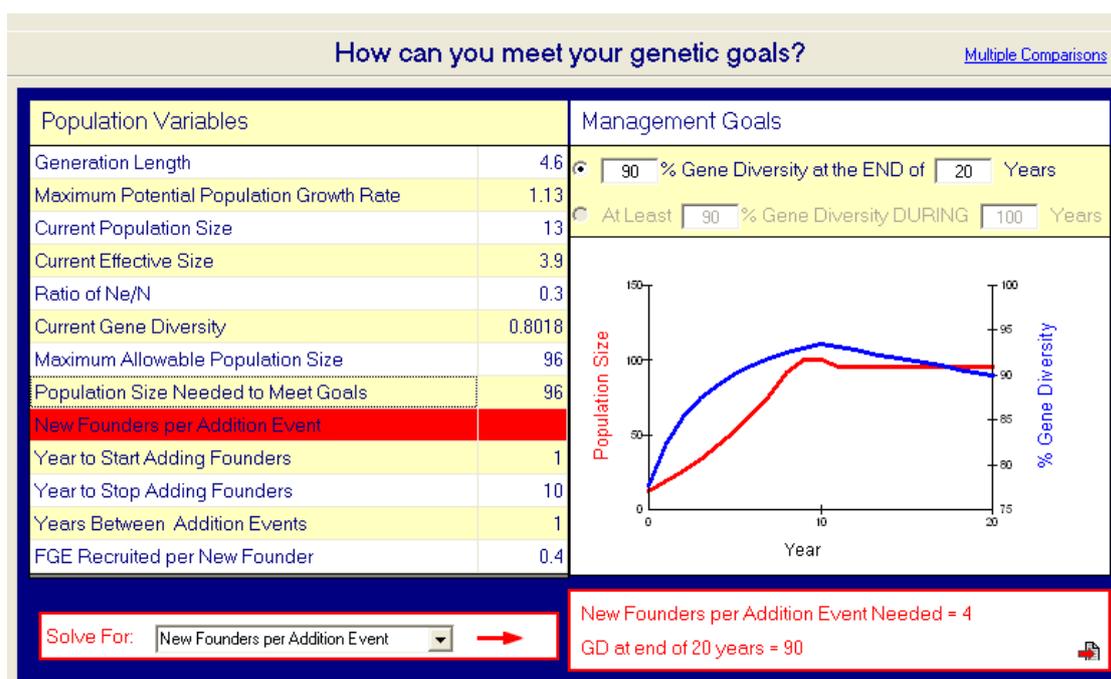


Figura 1.14.-  $N_{max}=96$ . Introducción de 4 nuevos fundadores por año durante 10 años.

Estos resultados deben ser tomados como orientativos dado que no disponemos de datos sobre los parámetros demográficos apropiados (mortalidad, fecundidad, % eclosión, etc) en el centro de cría. En cualquier caso, de todo lo visto anteriormente se deduce que el tamaño de la población cautiva debe ser mucho mayor que el actual si se piensa en poder establecer una población con unos requerimientos mínimos en cuanto a mantenimiento de la diversidad genética y, por tanto, limitar los efectos negativos de la deriva genética y la endogamia. Aún con tamaños de población de 72-96 animales, los requerimientos anuales de fundadores son muy altos. Extraer anualmente 4 o 6 fundadores de la población silvestre presumiblemente supone disturbar a muchos animales. Sería necesario hacer un análisis de los efectos que tendría el reclutamiento de estos fundadores sobre la población desde el punto de vista demográfico.

## E) APUNTES GENÉTICOS AL PLAN DE REFORZAMIENTO DE LA POBLACIÓN SILVESTRE DE UROGALLO CANTÁBRICO

Quando se pretende reintroducir los individuos criados en cautividad a la población silvestre el primer punto a tener en cuenta es si se conocen las condiciones que han llevado a la reducción del censo y si esas condiciones persisten o se han superado (IUCN, 2009). Si las condiciones silvestres son malas, entonces no merece la pena liberar a los individuos criados. Si se pretende mantener una población cautiva a la espera que se den las condiciones favorables para la suelta, se requieren los medios adecuados para mantener a los individuos sin que se habitúen a la cautividad. Además, en ese caso necesitaríamos mucho más espacio para garantizar que la población retenga los niveles suficientes de variabilidad.

Considerando las limitaciones físicas del Centro de Cría de Sobrescobio, el único existente en este momento, la posibilidad de mantener un stock cautivo con suficiente diversidad parece muy difícil.

La suelta de animales criados en cautividad, pero que proceden de la propia población silvestre, en ningún caso reforzaría la población desde el punto de vista genético. La elección de los lugares de suelta debe atender a razones demográficas y de hábitat, en este momento la prioridad sería tratar de conectar los parches de población.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1- Ha de llevarse un libro genealógico completo en donde se anoten además todas las incidencias y ese libro debe ser accesible al equipo encargado del seguimiento genético del stock cautivo.
- 2- De los 13 ejemplares que se encuentran actualmente en el Centro de Sobrescobio, 9 están emparentados en primer grado. Atendiendo a razones demográficas además de las genéticas, se proponen tres cruzamientos macho 02-1 x hembra 04-1, macho 002-2 x hembra 019 y macho 003 x hembra 020 que no serían endogámicos.
- 3- Una población cautiva con una tamaño de 24 es inviable. Para mantener una población con unos requerimientos mínimos en cuanto a diversidad genética sería necesario aumentar la capacidad de carga del centro al menos hasta unos 70-100 individuos.
- 4- Como orientación, para suplementar la población cautiva se podrían añadir entre 4-6 nuevos fundadores por año durante 10 años. Desde un punto de vista genético, si se decide una retirada parcial de puestas, estas deberían proceder de lugares repartidos por todo el hábitat de la población dada la relación existente entre distancia genética y distancia geográfica.
- 5- Antes de continuar el plan, es imperativo hacer una valoración del efecto que tendría sobre la población silvestre una retirada parcial de puestas. No es aceptable degradar la población silvestre para favorecer la población cautiva.
- 6- La suelta de individuos criados en cautividad procedentes de la propia población silvestre no reforzaría a la misma desde un punto de vista genético. Los criterios para elegir los lugares de las posibles sueltas han de ser principalmente demográficos y de calidad de hábitat.
- 7- Tal y como recomienda la IUCN (2009), la gestión de un programa de reintroducción requiere la formación de un equipo multidisciplinar.

## ANEXO I.1.- Genotipos de los 13 ejemplares del centro de cría

Individuo	TUD1	TUD2	TUD3	TUD4	TUD5	TUD6	TUD7	TUT1	TUT3	BG4	BG10	BG12	BG14	BG15	BG16	BG18	Sexo																
Ucra-04-1	165	173	154	154	120	120	93	93	109	113	153	153	159	161	155	155	103	103	181	181	183	183	139	139	178	182	114	122	133	133	157	157	H
Ucra-02-1	165	173	164	164	120	122	123	123	109	115	153	153	159	161	159	167	103	103	181	185	183	195	143	143	186	186	110	114	137	137	157	157	M
Ucra-002-2	165	165	154	164	120	120	93	123	109	113	153	153	159	161	155	167	103	103	181	181	183	183	139	143	178	186	110	122	133	137	157	157	M
Ucra-003	165	173	154	164	120	120	93	123	109	115	153	153	159	161	155	167	103	103	181	185	183	183	139	143	178	186	110	122	133	137	157	157	M
Ucra-004-2	165	165	154	164	120	120	93	123	113	115	153	153	159	161	159	159	103	103	181	181	195	195	143	143	182	186	110	114	133	137	157	157	H
Ucra-005	165	173	154	164	120	120	93	123	109	109	153	153	159	161	159	159	103	103	181	185	195	195	143	143	182	186	114	114	133	137	157	157	H
Ucra-006	173	173	154	164	120	122	93	123	109	109	153	153	159	161	167	167	103	103	181	181	183	183	143	143	178	186	114	122	133	137	157	157	H
Ucra-007	165	165	154	164	120	120	93	123	109	115	153	153	159	161	167	167	103	103	181	181	183	183	143	143	178	186	114	114	133	137	157	157	H
Ucra-008	165	165	154	164	120	122	93	123	109	109	153	153	159	161	159	159	103	103	181	181	195	195	143	143	178	186	110	122	133	137	157	157	H
Ucra-009	165	173	154	164	120	122	93	123	109	115	153	153	159	161	167	167	103	103	181	185	183	183	143	143	182	186	114	114	133	137	157	157	H
Ucra-011	165	173	154	164	120	122	93	123	109	109	153	153	159	161	159	159	103	103	181	181	195	195	143	143	182	186	110	122	133	137	157	157	H
Ucra-019	165	173	154	164	120	120	123	123	115	115	153	153	159	161	167	167	103	103	189	189	183	183	143	143	182	182	114	114	141	141	161	161	H
Ucra-020	165	169	154	160	120	122	93	93	101	105	¿?	¿?	161	161	155	155	107	107	181	193	187	187	147	147	178	186	118	118	133	137	165	165	H

## ANEXO I.2.- GLOSARIO

**Lambda,  $\lambda$**  : Tasa de crecimiento poblacional

**F, Coeficiente de Endogamia:** Probabilidad de que un individuo tenga en un locus dos alelos idénticos por descendencia

**FGE (Founder Genome Equivalents), Número de fundadores equivalente:** Número de fundadores que producirían el mismo grado de diversidad que tiene la población

**Fundador:** Individuo obtenido de la población silvestre y que no está emparentado con los individuos que componen la población cautiva

**GU (Genome Uniqueness), Singularidad Genética:** Probabilidad de que un alelo elegido al azar de un individuo no sea idéntico por descendencia al de cualquier otro individuo de la población

**GV, Valor Genético:** Diversidad de los individuos vivos ponderada por su valor reproductivo

**Kinship, Coascendencia:** Probabilidad de que un alelo de un locus muestreado al azar en un individuo sea idéntico por descendencia a un alelo muestreado al azar de ese locus en un segundo individuo. Es igual al coeficiente de endogamia que tendría un descendiente entre el par de individuos considerado

**KV (Kinship Value), Valor de Coascendencia:** Coascendencia media ponderada de un individuo con el resto de individuos de la población, siendo el factor de ponderación en valor reproductivo de los distintos individuos

**Ne, Tamaño efectivo:** Tamaño de una población con igual proporción de sexos y apareamientos al azar, de tamaño constante y con tamaño de familia siguiendo una distribución de Poisson que tendría la misma tasa de endogamia o la misma deriva que la población real

**MK (Mean Kinship), Coascendencia Media:** Coeficiente de coascendencia medio entre un individuo y todos los demás de la población

**MSI (Mate Suitability Index), Índice de Validez del Cruzamiento:** Índice generado por el programa MateRx y se basa en los coeficientes MK, la diferencia entre los MK de macho y hembra y la F de la descendencia

**Relatedness, Coeficiente de Relación:** Probabilidad de que en un locus, un alelo muestreado en un individuo sea igual a, al menos uno de los alelos en ese locus en el segundo individuo

**Vx, Valor reproductivo:** Número esperado de descendientes producidos este año y en el resto de sus años de vida por un animal de edad xGD, **Diversidad Genética:** Probabilidad de que al tomar dos alelos, de un locus, de la población al azar estos sean diferentes. Para los análisis con PM2000 se toma la diversidad como proporción de la que había inicialmente en la población, esto equivale a la probabilidad de que al tomar dos alelos de un locus al azar estos sean idénticos por descendencia

## **PARTE II**

### **CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ACTUAL DE UROGALLO CANTÁBRICO. TENDENCIA Y PERSPECTIVAS DE FUTURO**

## A) MUESTREO Y GENOTIPADO

### Recogida de muestras y extracción de ADN

Al tratarse en su mayor parte de muestras de carácter no invasivo (heces y pelos) la recogida, almacenamiento y selección adecuada del método de extracción de ADN de las mismas es de gran importancia para obtener un porcentaje de éxito elevado y unos genotipos fiables (Taberlet y Luikart 1999). Como ya ha sido comprobado en nuestro grupo de trabajo anteriormente los protocolos de recogida más efectivos para muestras no invasivas son el almacenamiento directo en sobres de las plumas y un proceso en dos pasos etanol-silica para las heces (Pérez et al. 2009, Vázquez et al. 2012). Para otro tipo de muestras como el músculo se recomienda el almacenamiento directo en etanol y para el caso de la sangre se llevó a cabo tanto en tubos heparinizados como en tarjetas Isocode obteniéndose en ambos casos buenos resultados.

En cuanto a la elección del método de extracción más adecuado se optó por la elección de kits específicos para la extracción de ADN a partir de heces (“QIAmp DNA stool kit” de Qiagen) y plumas, sangre o músculo (“DNAeasy kit” de Qiagen). Todos estos métodos demostraron su eficacia en anteriores trabajos de nuestro grupo tanto para urogallo como para otras especies (Pérez et al. 2009, Vázquez et al. 2012).

### Muestras genotipadas

Se han analizado un total de 187 muestras, de las cuales 172 provenían de individuos silvestres y otras 15 eran muestras de sangre procedentes de los individuos mantenidos en cautividad en el centro de cría de Sobrescobio.

Las 172 muestras procedentes de individuos silvestres incluyen 14 muestras que fueron procesadas y genotipadas por duplicado al haberse obtenido genotipos incompletos a partir de la primera extracción. Por lo tanto el número de muestras silvestres diferentes analizadas fue en realidad de 158 de las cuales 83 fueron recolectadas en el Principado de Asturias (50 heces y 33 plumas) y 75 en León (7 heces, 67 plumas y una muestra de músculo procedente de un individuo atropellado en León en 2007). Datos recogidos en la Tabla 2.1

Los marcadores seleccionados para el análisis de estas muestras fueron 16 loci microsatélites, nueve descritos por Segelbacher et al. (2000) para *Tetrao urogallus* (TUD1, TUD2, TUD3, TUD4, TUD5, TUD6, TUD7, TUT1, TUT3), y siete descritos por Piertney y Höglund (2001) para *Tetrao tetrix* (BG4, BG10, BG12, BG14, BG15, BG16, BG18). Estos marcadores han demostrado su utilidad para el estudio poblacional del urogallo cantábrico en estudios previos a la realización de este trabajo llevados a cabo en nuestro laboratorio entre los años 2004 y 2010 (Pérez et al. 2011, Vázquez et al. 2012). Además se dispone de un marcador para la determinación del sexo obtenido mediante el diseño de oligonucleótidos específicos para urogallo a partir del gen CDH que codifica la proteína “chromodomain helicase DNA binding”. Este gen se localiza en la región homóloga de los cromosomas sexuales (cromosomas Z y W) de casi todas las aves y presenta intrones que difieren en tamaño entre las copias de los cromosomas Z y W. El empleo de estos oligonucleótidos (PU y P8 mod), diseñados en nuestro laboratorio, origina dos bandas de pequeño tamaño en las hembras (189 pb y 214 pb) y una única banda en machos (189 pb) (Pérez et al. 2011). El hecho de ser oligonucleótidos diseñados específicamente para urogallo unido al pequeño tamaño de los fragmentos originados permite su empleo, de forma efectiva, en el análisis de muestras no invasivas de urogallo.

Del total de muestras silvestres diferentes analizadas, un total de 94 muestras (37 de Asturias y 57 de León) se consideraron como útiles. Estas muestras útiles presentaban un genotipo lo suficientemente completo como para permitir la identificación del individuo con un

elevado margen de confianza (al menos 14 marcadores amplificados de entre los 17 probados: 16 loci microsatélite y el marcador del sexo). Las 94 muestras consideradas como útiles fueron sexadas mediante el marcador genético y la correspondencia con el sexado visual fue absoluta.

El origen geográfico de las muestras útiles provenientes de animales silvestres así como el tipo de muestra analizado se encuentran recogidos en la Figura 2.1 y la Tabla 2.1 respectivamente.

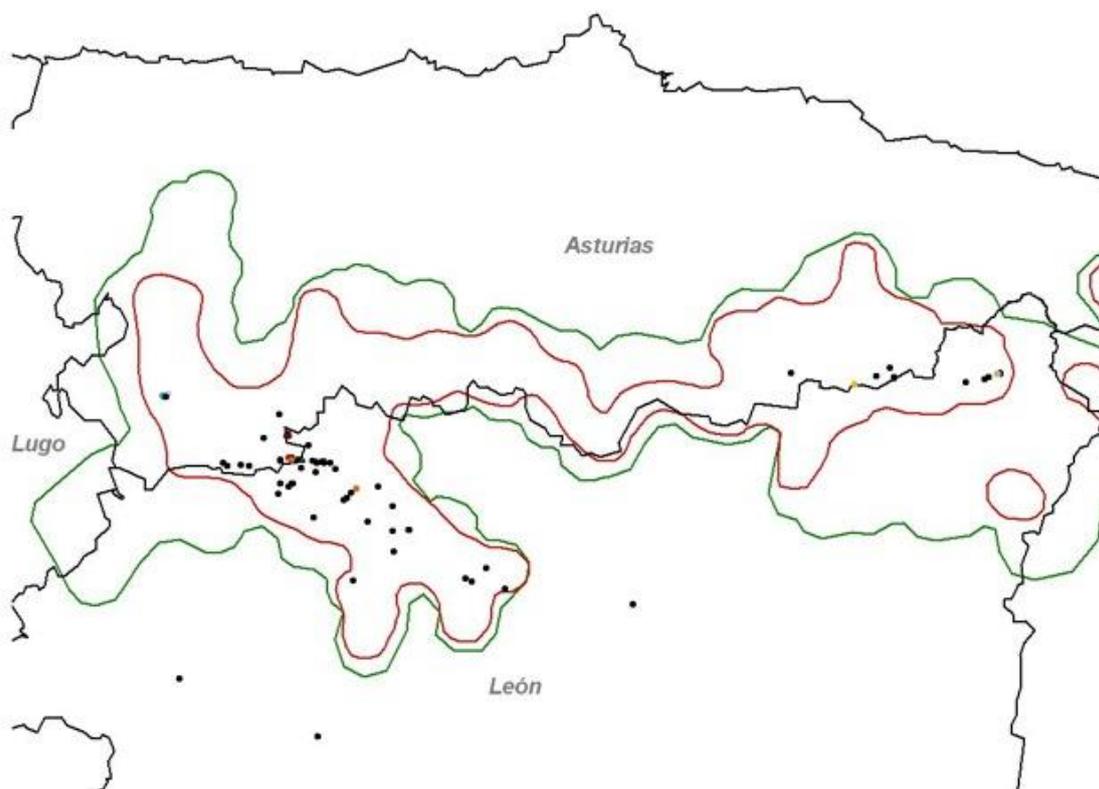


Figura 2.1.- Mapa de origen geográfico de las 94 muestras útiles de urogallo. La línea verde corresponde al límite de distribución histórica y la línea roja a los límites en 2005

	ASTURIAS		LEÓN	
	Total muestras	Muestras útiles	Total muestras	Muestras útiles
<b>Plumas</b>	33	22	67	53
<b>Heces</b>	50	15	7	3
<b>Músculo</b>	0	0	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>83</b>	<b>37</b>	<b>75</b>	<b>57</b>

Tabla 2.1.- Muestras de urogallo analizadas por comunidad autónoma y tipo de muestra.

### Éxito y errores de genotipado

La utilización de muestras no invasivas para la obtención de genotipos multilocus que permitan la identificación de individuos se encuentra limitada por la baja calidad y cantidad del ADN recuperado tras la extracción. Este hecho conlleva, por una parte, una disminución del porcentaje de éxito a la hora de obtener estos genotipos con respecto a otro tipo de muestras. Por otra parte estos genotipos multilocus basados en muestras no invasivas se caracterizan por tener asociado una elevada tasa de error lo que puede llevar a la obtención de un genotipo incorrecto.

Con la intención de limitar estos problemas se han ido desarrollando diferentes metodologías que permiten aumentar el porcentaje de éxito de la amplificación y por otra la detección y cuantificación de los errores de genotipado lo que nos permite aumentar y determinar la fiabilidad de los genotipos finalmente obtenidos.

Hemos obtenido un total de 93 muestras útiles a partir de las 157 muestras no invasivas, esto nos da un porcentaje de éxito del 59,24% (no muy lejos del 63,56% obtenido en nuestro grupo anteriormente en trabajos previos de urogallo). Este porcentaje de éxito es altamente dependiente del tipo de muestra no invasiva analizada, así para plumas el porcentaje de éxito se sitúa en el 75% (75 muestras útiles de 100 analizadas) y el de heces en el 31,58% (18 muestras útiles de 57 analizadas) con lo que una vez más se comprueba que las plumas son una mejor fuente de ADN que las heces. (Figura 2.2)

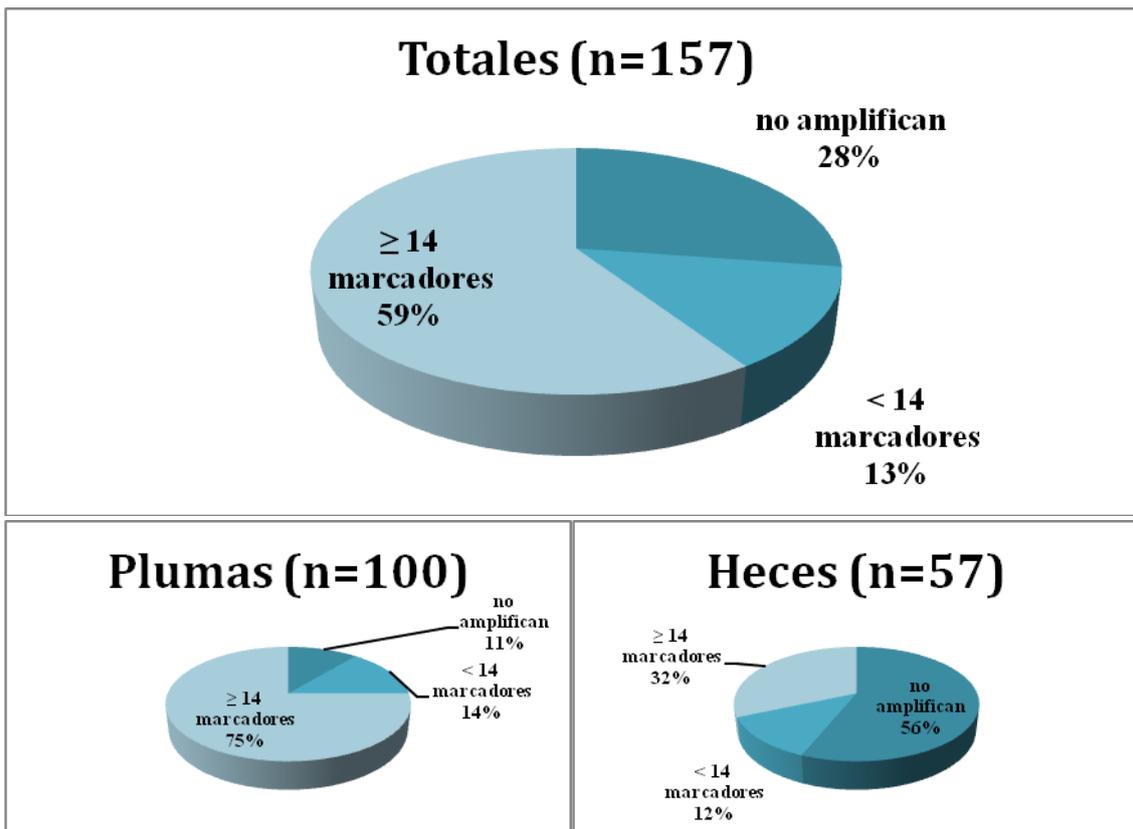


Figura 2.2.- Porcentaje de muestras del total que no amplifican, lo hacen para menos de 14 marcadores o para al menos 14 marcadores (muestras útiles)

El otro aspecto delicado a la hora de trabajar con muestras no invasivas y que nos da una idea sobre la calidad de dichas muestras son los errores en el genotipado y la fiabilidad del genotipo multilocus final obtenido. Con el fin de incrementar la obtención de genotipos fiables se estableció un protocolo de trabajo en el que se utilizaban la PCR multiplex junto con una PCR “semianidada” (Ulrich et al. 1993) unidas a un enfoque “multitubo” (Taberlet et al. 1996). El enfoque “multitubo” consiste en la realización de cuatro repeticiones por marcador y muestra en una primera fase, tras el análisis de estas cuatro repeticiones se aceptaba el genotipo para ese marcador si no se observaba ninguna incongruencia. En caso de observar alguna diferencia entre repeticiones o fallar alguna de ellas, ese marcador se repite otras cuatro veces. Posteriormente, a partir de todas las repeticiones realizadas para cada marcador se obtiene un genotipo consenso para la muestra. Este protocolo de trabajo, unido a la utilización de programas informáticos diseñados para la detección y cuantificación de errores (GIMLET Valérie, 2002; RelioType Miller et al. 2002), permite, obtener una estimación de la frecuencia de errores de genotipado, a partir de la comparación entre las distintas réplicas del genotipo

obtenido para un mismo individuo, así como calcular la fiabilidad de un genotipo multilocus concreto. Se consideraron **muestras útiles** los genotipos multilocus para al menos 13 marcadores que tienen fiabilidad mínima combinada del 95%. Así la fiabilidad media de los genotipos aceptados fue del 95,08% y la de los marcadores individuales del 99,65%. Estas tasas de error han de ser tenidas en consideración para todas las deducciones obtenidas del trabajo.

Mediante el programa GIMLET (Valère, 2002) se ha determinado la frecuencia y el tipo de errores a partir de la comparación entre las distintas réplicas del genotipo. En la Figura 2.3 se representan los porcentajes de error detectados en el global de las muestras utilizadas así como para cada tipo de muestra. Se puede observar que tanto en el caso de las heces como en el de las plumas el tipo de error más frecuente es el “dropout” (pérdida de uno de los alelos en los individuos heterocigotos) y en ambos casos el valor de “dropout” es muy elevado, superior al 10%, y ligeramente superior para las plumas que para las heces.

Los porcentajes de ocurrencia de otro tipo de errores son similares para heces y plumas. El hecho de que los errores detectados, especialmente el “dropout”, sean elevados hace necesario un alto número de repeticiones con el fin de obtener un genotipo fiable.

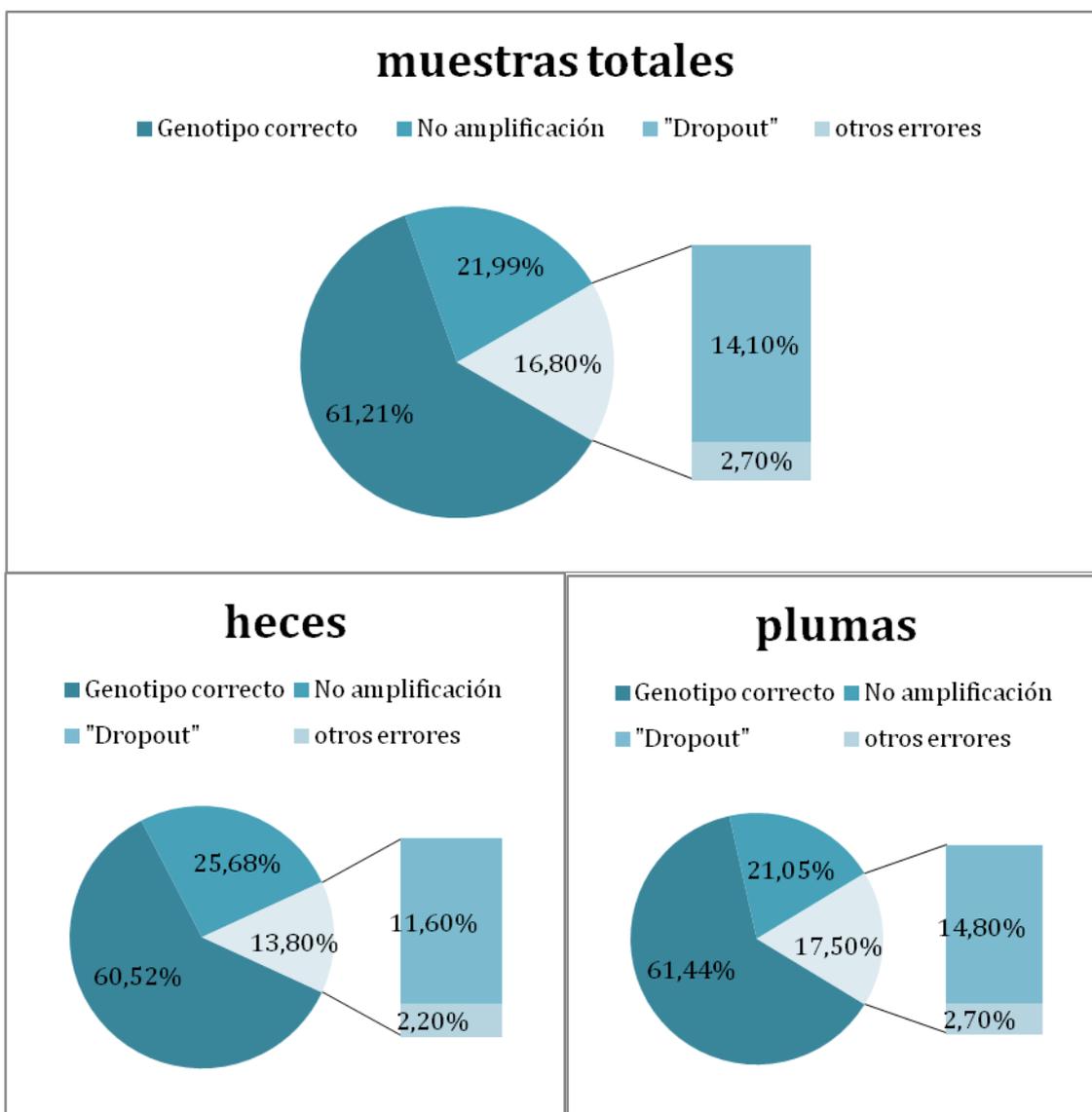


Figura 2.3.- Porcentaje de errores detectados para el total de las muestras utilizadas así como para cada tipo de muestra no invasiva en particular (heces y plumas por separado).

### Individualización de ejemplares

La individualización se realizó a partir de las muestras útiles, tal como se han definido en la página 36. El punto de corte para el mínimo de marcadores necesarios para considerar un genotipo multilocus como útil se determinó en previos trabajos utilizando el método gráfico de distribución del número de loci distintos entre pares de genotipos, siguiendo las recomendaciones de McKelvey y Schwartz (2004) y Waits y Paetkau (2005). Los genotipos de las muestras se compararon entre sí utilizando los programas GIMLET y GenAlex para detectar aquellas muestras que eran iguales, y por lo tanto se asignaban a un único individuo, y las que difieren en uno, dos o tres marcadores. Dado que la tasa de error por “dropout” es muy elevada y que la fiabilidad de los genotipos en ningún caso fue del 100%, en aquellos casos en que dos muestras resultaron iguales para todos los marcadores excepto para uno o dos y estas diferencias se podían explicar por “dropout” las muestras se consideraron como pertenecientes al mismo individuo.

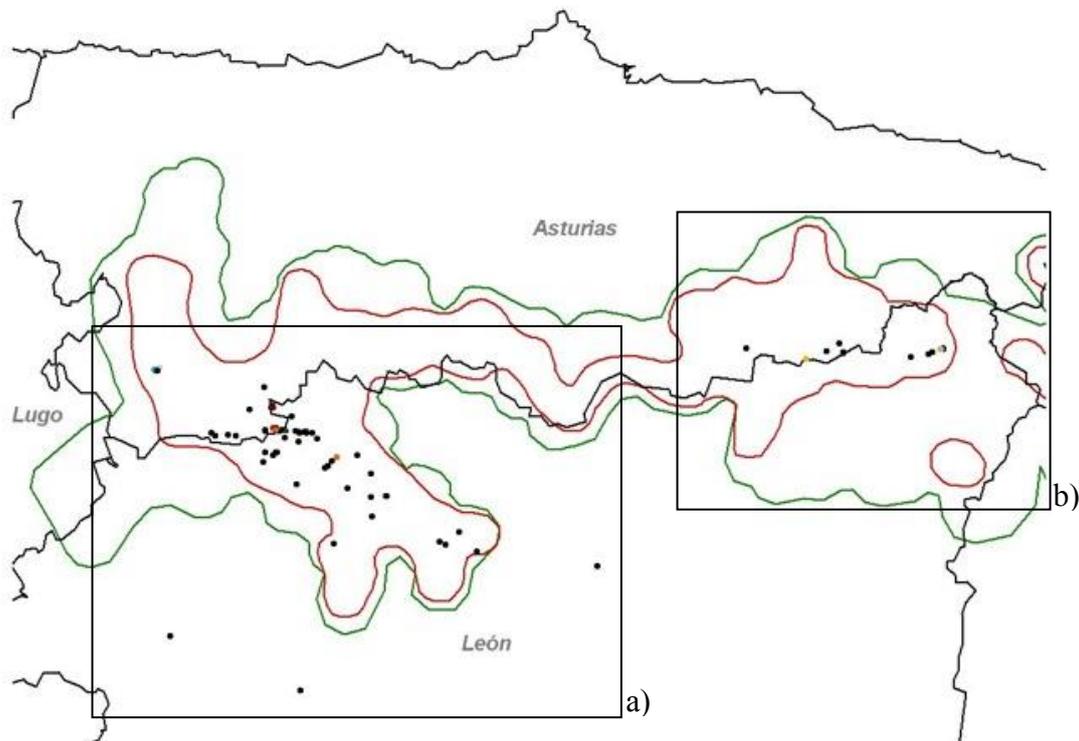
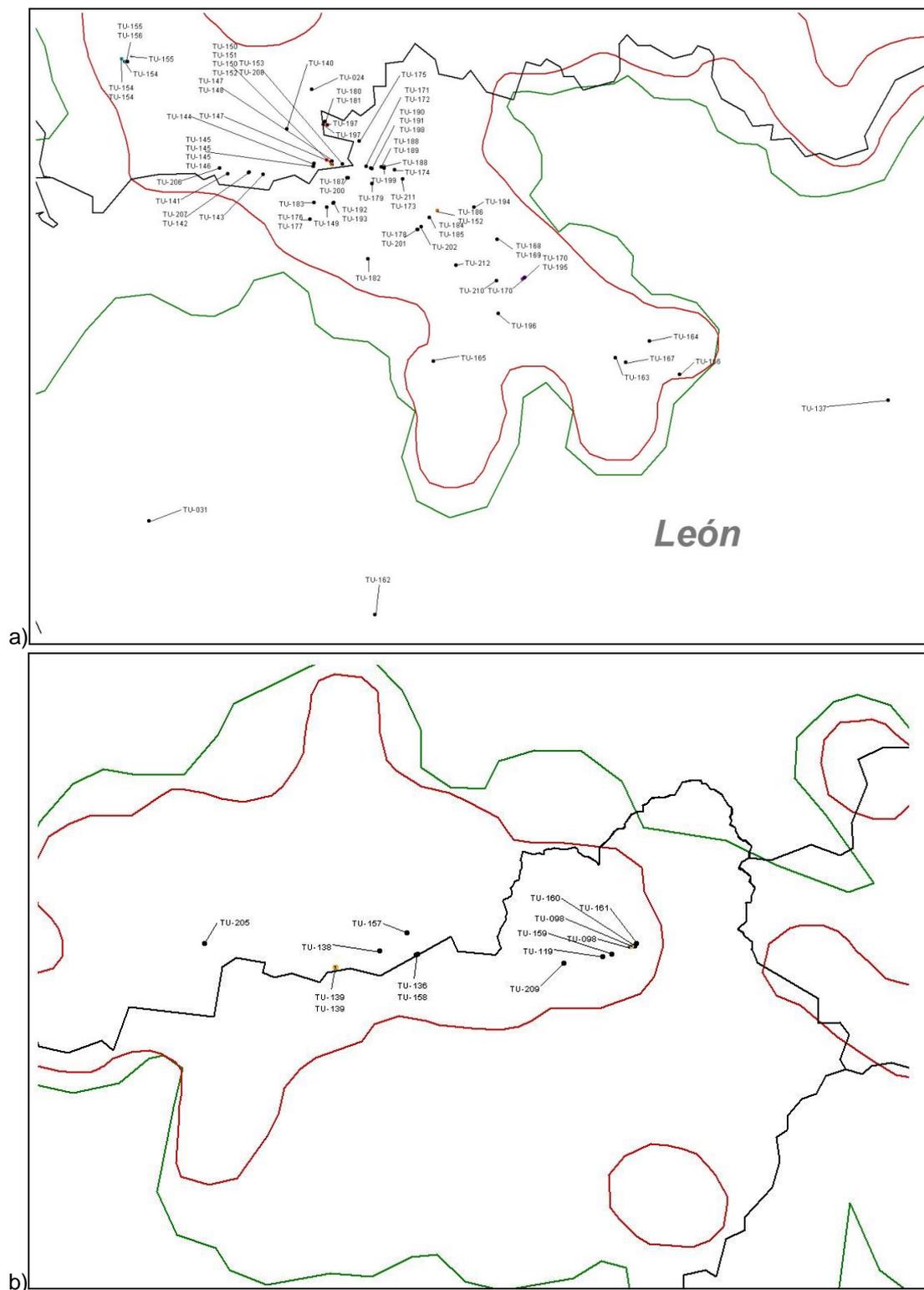


Figura 2.4.- Mapa de origen geográfico de las 94 muestras útiles de urogallo. En las figuras 2.4a y 2.4b se presentan ampliadas las áreas en los recuadros.

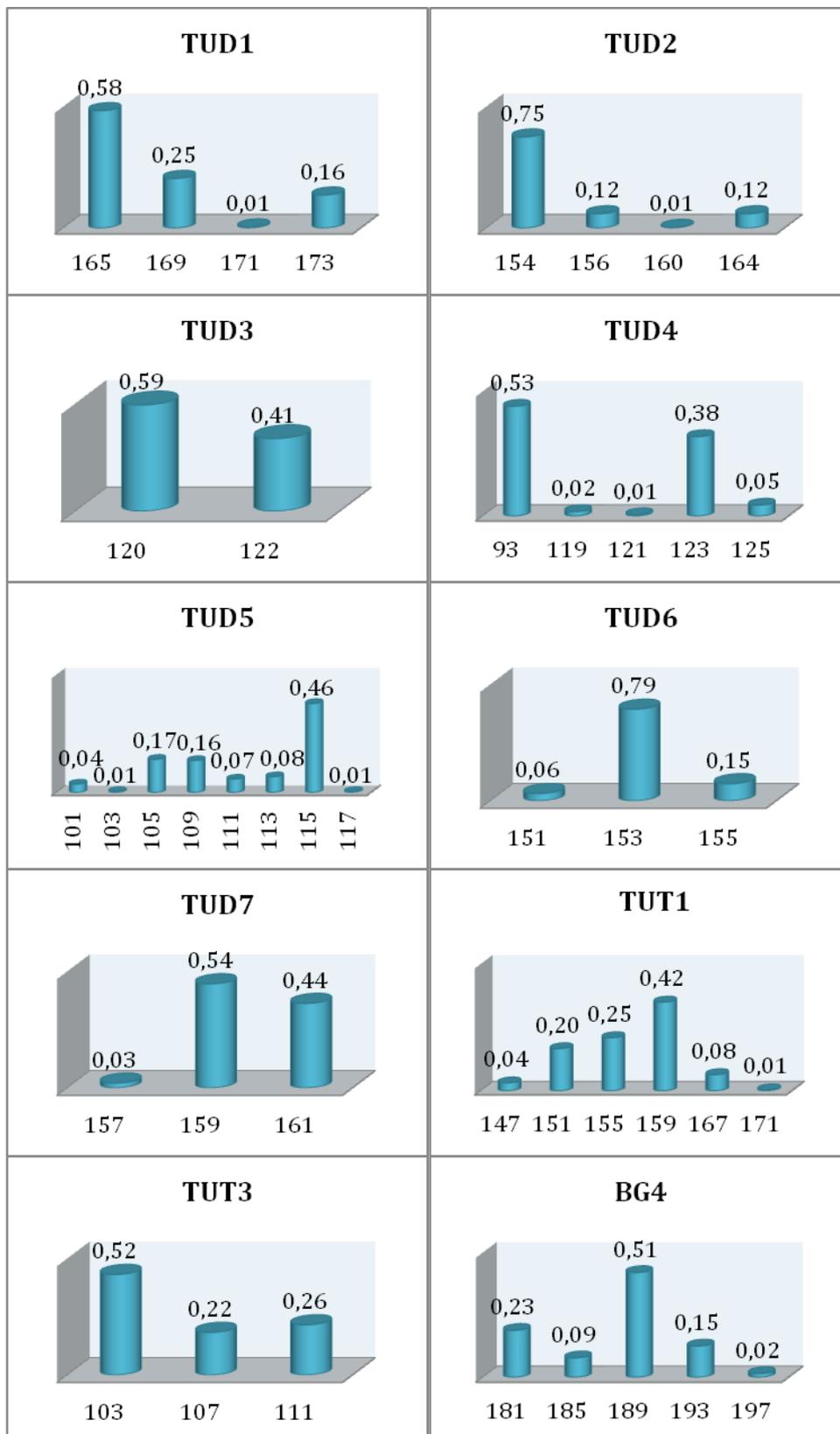


Del total de 93 muestras silvestres (74 de plumas, 18 de heces y 1 de músculo) se individualizaron 80 ejemplares (41 hembras y 39 machos). De estas, 14 fueron recogidas en la zona oriental de la distribución y 75 en la occidental, además se identificaron tres ejemplares que se encontraron fuera de los límites de distribución de la población (ver Figura 2.4) uno de ellos era a una hembra localizada muerta en Cacabelos en el año 2007 y las otras dos muestras procedían de animales vivos, un macho cuya muestra de pluma fue recolectada en el Valle de las Tejedas en Ponferrada en 2009 y una hembra recogida en Camposagrado en 2011 y que actualmente se encuentra en el centro de cría de Sobrescobio.

**B) DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN**

**Número de alelos, frecuencia y diversidad**

Las frecuencias alélicas estimadas para cada uno de los 16 loci microsatélite estudiados en esta población se muestran en la Figura 2.5.



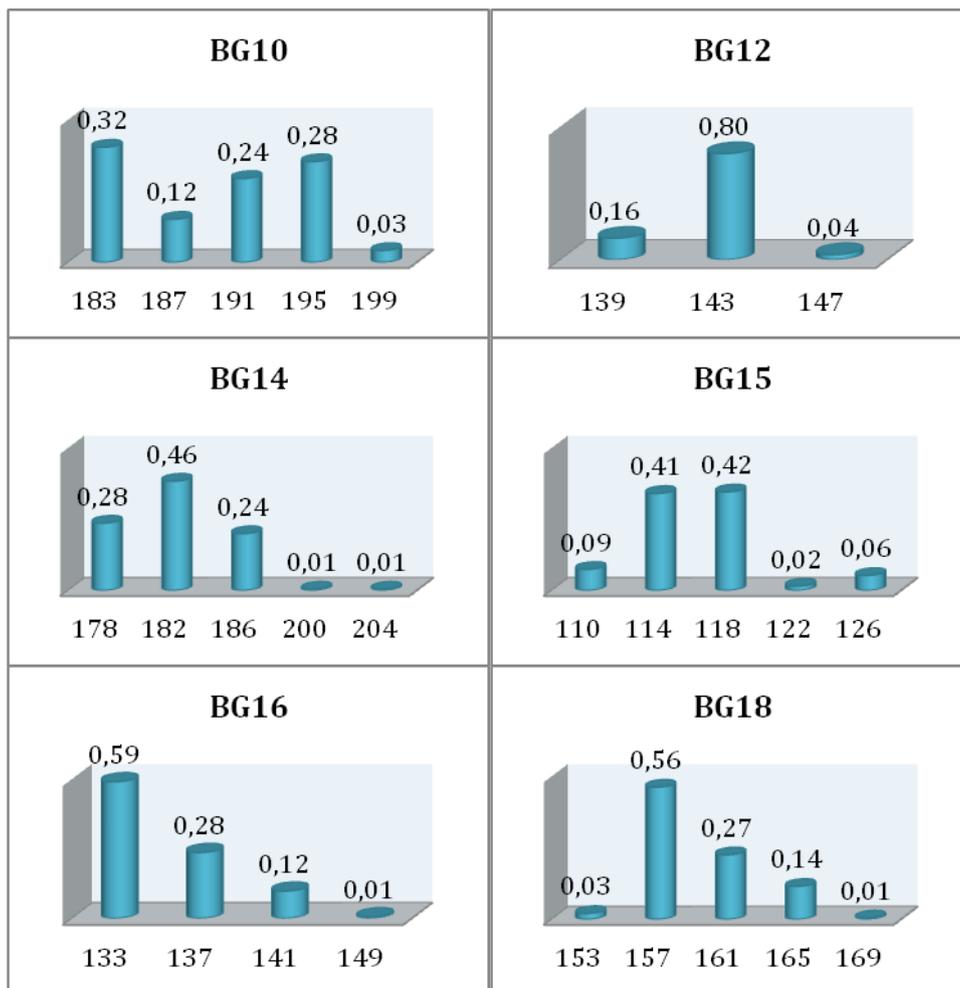


Figura 2.5.- Histogramas de frecuencias alélicas para los distintos loci analizados.

El análisis de la diversidad de la población se realizó mediante el uso de los programas informáticos “Genepop on the Web” (Raimond y Rousset 1995, Rousset 2008) y GenAlex 6 (Peakal y Smouse 2006). El número medio de alelos es de 4,38 con el rango entre 2 y 8 alelos, un valor algo inferior al número medio de 4,75 alelos detectados en un estudio previo basado en muestras recogidas principalmente en 2006. Si comparamos el número efectivo de alelos, que corrige diferencias en el tamaño de la muestra, nos encontramos con un valor de 2,51 frente a los 2,67 calculados en el anterior trabajo.

Por lo que se refiere a la aparición de nuevos alelos o pérdida de alguno de los detectados anteriormente, se observa que en el estudio actual se detectaron un total de 70 alelos frente a los 76 detectados en el anterior trabajo. Se perdieron 11 alelos en las muestras actuales y aparecieron 5 alelos nuevos, todos ellos con una frecuencia muy baja.

Tamaño muestra	Locus	n <sub>a</sub>	n <sub>e</sub>	He	Ho		Rango
79	TUD1	4	2,34	0,57	0,54		165-173
71	TUD2	4	1,68	0,40	0,35		154-164
80	TUD3	2	1,93	0,48	0,41		120-122
65	TUD4	5	2,31	0,57	0,37	**	93-125
79	TUD5	8	3,60	0,72	0,58	***	101-117
71	TUD6	3	1,54	0,35	0,23	**	151-155

79	<b>TUD7</b>	3	2,08	0,52	0,85	***	157-161
77	<b>TUT1</b>	6	3,44	0,71	0,40	***	147-171
77	<b>TUT3</b>	3	2,59	0,61	0,70		103-111
79	<b>BG4</b>	5	2,94	0,66	0,77		181-197
74	<b>BG10</b>	5	3,88	0,74	0,34	***	183-199
77	<b>BG12</b>	3	1,50	0,33	0,22	***	139-147
79	<b>BG14</b>	5	2,84	0,65	0,63		178-204
78	<b>BG15</b>	5	2,82	0,65	0,67		110-126
72	<b>BG16</b>	4	2,26	0,56	0,61		133-149
79	<b>BG18</b>	5	2,47	0,60	0,58		153-169
<b>Media</b>		<b>4,38</b>	<b>2,51</b>	<b>0,57</b>	<b>0,52</b>		

Tabla 2.2.- Parámetros descriptivos por locus. He: Heterocigosidad esperada. Ho: Heterocigosidad observada en la población. \* $P < 0,5$ , \*\* $p < 0,1$ , \*\*\* $p < 0,001$ .  $n_a$ : Número de alelos.  $n_e$ : Número de alelos efectivo.

La diversidad calculada en este trabajo es de 0,57, ligeramente inferior al valor de 0,60 obtenido previamente en la población. La heterocigosidad media observada (Ho) para el conjunto de la población fue 0,52 (Tabla 2.2). Siete de los 16 loci analizados no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, una vez corregidos los valores obtenidos mediante el método de Bonferroni (TUD4, TUD5, TUD6, TUD7, TUT1, BG10 Y BG12). Todos ellos a excepción del TUD7 presentan defecto de heterocigotos. Este locus ya presentaba este comportamiento anómalo en estudios anteriores de esta población años (Pérez et al. 2011, Vázquez et al. 2012), lo que en su momento se interpretó como el posible resultado de una selección en contra de genes ligados en desequilibrio de ligamiento y con efecto negativo en homocigosis. El test global para el conjunto de la población y los loci analizados muestra que la población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, siendo el resultado altamente significativo ( $P < 0,0001$ ).

Se empleó el programa Microchecker (Van Oosterhout et al. 2004 para comprobar la posible existencia de alelos nulos, es decir, alelos que no amplifican por presentar mutaciones en las zonas de unión a los oligonucleótidos empleados en la PCR. La presencia de alelos nulos puede dar lugar a un resultado significativo al analizar si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se detectó la posible existencia de alelos nulos en aquellos marcadores que eran significativos para un defecto de heterocigotos (TUD4, TUD5, TUD6, TUT1, BG10 Y BG12). Los datos de la familia del Centro de Cría de Sobrescobio también apuntaban a la presencia de alelos nulos en la hembra 04-1 en los microsatélites TUT1, BG10 y BG12. La presencia de alelos nulos en la población complica todos los análisis, dado que los individuos heterocigotos para un alelo nulo se confunden con los homocigotos.

El test global del equilibrio de Hardy-Weinberg para el conjunto de la población descartando los microsatélites con alelos nulos y eliminando también el TUD7, que presenta exceso de heterocigotos, da una desviación significativa ( $P < 0,006$ ).

Se analizó el desequilibrio de ligamiento entre los 120 pares de loci posibles. Se detecta desequilibrio significativo en 41 de estos pares con una  $P < 0,05$ , 20 pares dan significativo con una  $P < 0,01$  y 8 con un valor de  $P < 0,001$ . Si se aplica la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones siete de los pares analizados (BG10 con TUD5, TUT1, BG12 y BG15; TUT1 con BG18 y TUD5; TUD6 con BG4) presentan un desequilibrio de ligamiento significativo.

### Estructura genética de la población

De los 80 ejemplares identificados, uno era una hembra que presentaba un claro genotipo oriental pero se desconocía su zona de procedencia, otros eran tres individuos detectados a partir de las muestras recogidas fuera de los límites de distribución de la población (un macho y dos hembras), 64 procedían de muestras recogidas en la zona

occidental de la distribución (29 hembras y 35 machos) y 12 de muestras recogidas en la zona oriental (9 hembras y 3 machos).

El análisis de componentes principales de la variación entre genotipos (Figura 2.6) nos indica que los dos primeros ejes explican un 46,49% de la variación total (28,79% el primer eje y 17,71% el segundo). La distribución de los ejemplares, conforme a estos dos ejes, no presenta una discontinuidad clara entre aquellos individualizados a partir de muestras recogidas en la zona occidental de los de la zona oriental, si bien las muestras de esta última zona tienden a agrupar juntas en el zona inferior derecha de la gráfica. Sólo TU-205 se aleja de esta agrupación, correspondiendo este ejemplar al identificado a partir de la muestra más occidental dentro del área oriental muestreada. Así mismo el individuo TU-203 del que se desconoce su origen geográfico se agrupa claramente con los individuos detectados a partir de muestras recogidas en la zona oriental de la distribución. En cuanto a las muestras de la zona occidental de la distribución no se observa ningún agrupamiento claro de los individuos del occidente según la zona en que se hayan recogido las muestras sino que se encuentran todos entremezclados a lo largo de los tres cuadrantes restantes de la gráfica sin observarse ningún patrón geográfico claro. Los tres ejemplares identificados fuera del área de distribución de la especie (incluida la hembra localizada en la zona más oriental y que ahora se encuentra en el centro de cría de Sobrescobio) se encuentran distribuidos entre el resto de los individuos de la zona occidental de la distribución.

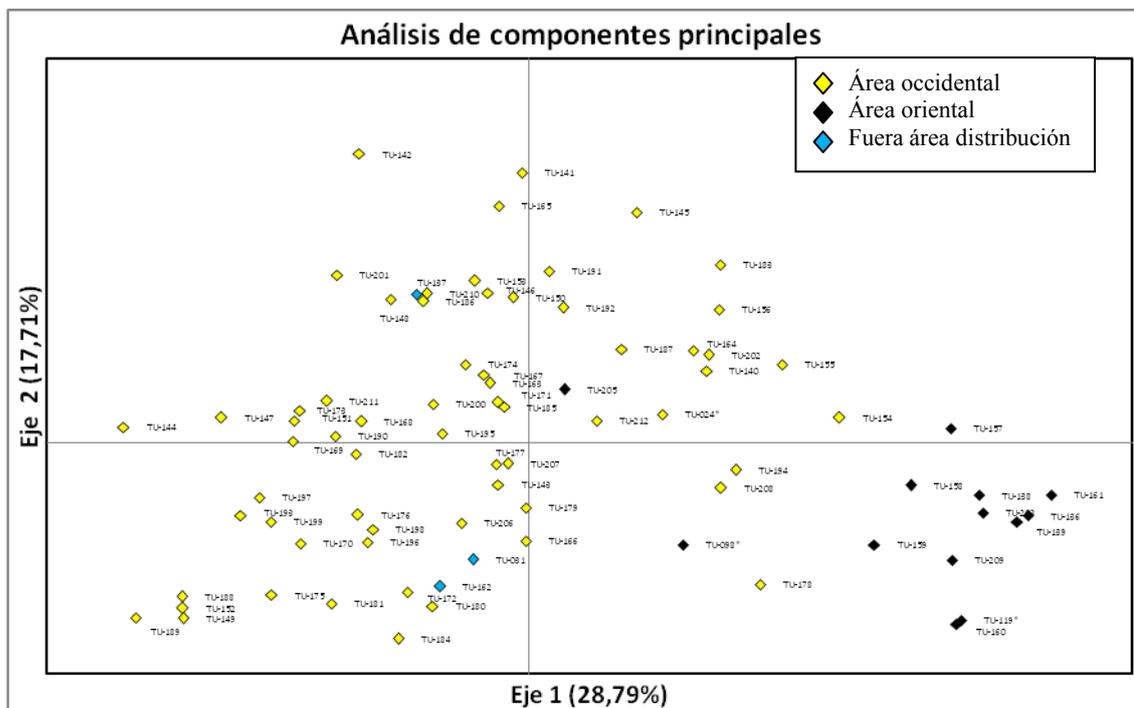


Figura 2.6.- Análisis de componentes principales de la variación entre genotipos.

Se analizaron los datos con el programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Este programa investiga la estructura poblacional a partir de los genotipos multilocus de los distintos individuos utilizando un enfoque bayesiano. Esto nos permite inferir la presencia de distintas subpoblaciones en el conjunto de animales muestreados. Cuando se analizaron los datos el programa presentó como el resultado más probable que los distintos individuos se agruparan en tres grupos poblacionales. El número de grupos más probable se calculó con el programa Structure Harvester (Evanno et al. 2005). Uno de estos tres grupos poblacionales agrupaba mayoritariamente a los individuos del área oriental, mientras que los dos grupos restantes incluían individuos identificados a partir de muestras del área occidental (Figura 2.7).

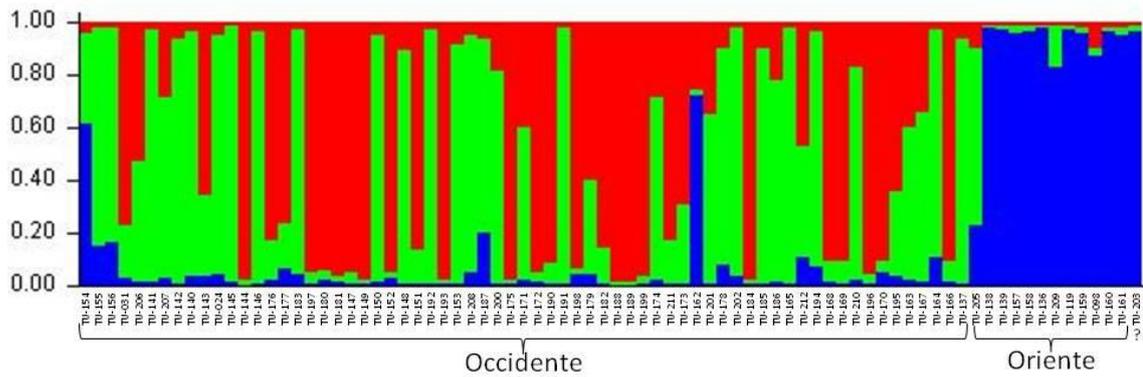


Figura 2.7.- Representación gráfica del resultado obtenido con el programa STRUCTURE a partir de 80 genotipos individuales. Cada barra vertical representa un individuo y su probabilidad de asignación a uno de los tres grupos detectados por el programa

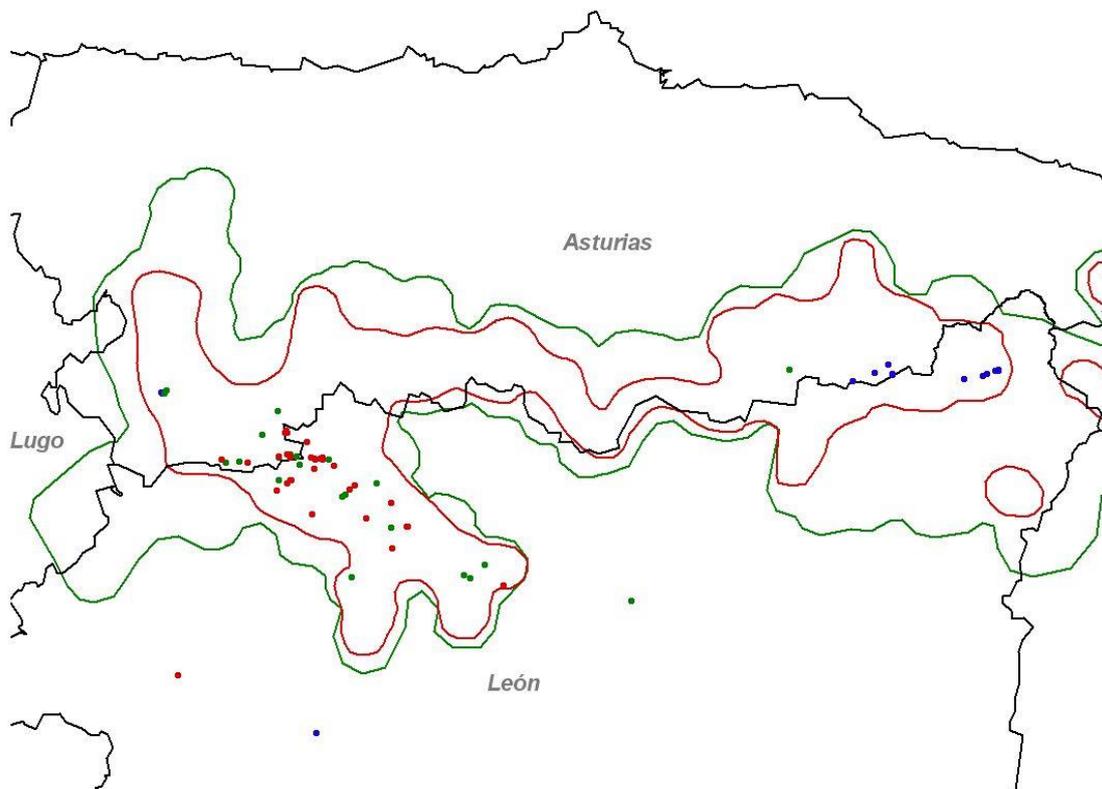


Figura 2.8.- Representación espacial de los individuos identificados y su pertenencia a cada uno de los grupos detectados por el programa STRUCTURE.

NOTA: Cada individuo se representa del color del grupo para el que ese individuo tiene un mayor valor de pertenencia, aunque en algunos casos ese valor sea sólo ligeramente superior al de otro grupo, con el fin de simplificar la representación. Los valores reales de pertenencia de cada individuo a cada grupo pueden ser deducidos más claramente a partir de la Figura 2.7.

Al observar más en detalle estos dos grupos se observa la existencia de un solapamiento completo en la distribución espacial de los individuos pertenecientes a cada uno de ellos (Figura 2.8).

Este hecho se ha observado con anterioridad en otras especies al utilizar el programa STRUCTURE como el muflón de Kerguelen (Kaeuffer et al. 2007) donde la aparición de estos resultados espurios se puede achacar al efecto de la existencia de un fuerte desequilibrio de ligamiento entre marcadores o a una gran desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg que lleva a una sobreestimación del número de grupos detectados (Falush et al. 2003). Esta

impresión de la sobreestimación del número de grupos se ve apoyada cuando se observa el gráfico resumen obtenido al representar cada individuo sobre la superficie de un triángulo en función de los valores estimados de pertenencia de ese individuo a cada uno de los grupos definidos, (Figura 2.9). Se observa que los individuos de la población occidental se distribuyen de forma más o menos continua a lo largo del vector que une los dos grupos detectados en el occidente sugiriendo la existencia de un resultado espurio. Esto coincidiría con el hecho de que en los análisis de PCA y FCA no se haya encontrado subestructura dentro del área occidental como hemos visto anteriormente.

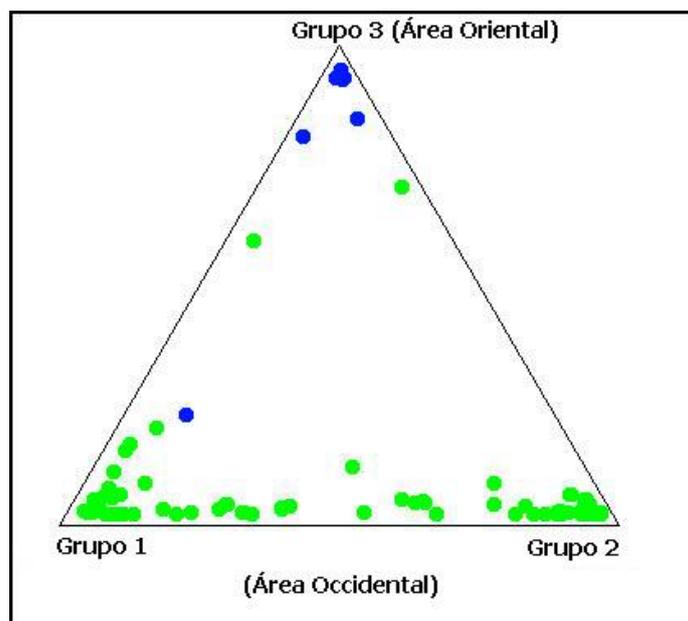


Figura 2.9.- Resumen de los resultados obtenidos con el programa STRUCTURE asumiendo las tres poblaciones detectadas por él. En rojo los individuos detectados en el área oriental de la distribución y en verde los del área occidental. Cada uno de los vértices del triángulo se corresponde con uno de los grupos detectados por el programa. El vértice se correspondería con una pertenencia del individuo a ese grupo en concreto del 100%

En conclusión, el análisis de la estructura genética poblacional muestra una diferenciación entre los individuos a ambos lados de las principales vías de comunicación de Asturias con la meseta.

### Relación entre distancia genética y distancia geográfica

El coeficiente de correlación entre distancia geográfica y distancia genética fue de 0,386, un valor significativo utilizando la prueba de Mantel ( $r=0,386$ ,  $P=0,0001$ , Figura 2.10). Cuando este análisis se repite dentro de los grupos oriental y occidental se encuentra una correlación muy significativa entre distancia geográfica y genética en la subpoblación occidental ( $r= 0,262$ ,  $P = 0,0006$ ) pero no en la oriental ( $r = 0,250$ ,  $P = 0,074$ ) aunque en este último caso hay que tener en cuenta que el bajo número de muestras incluidas en el análisis (14) que hace que el análisis pierda potencia. Se observa entonces un patrón de aislamiento por distancia como había sido detectado previamente en esta población (Alda et al. 2011; Vázquez et al. 2012) y en otras poblaciones de la especie como la de los Alpes (Storch y Segelbacher 2000).

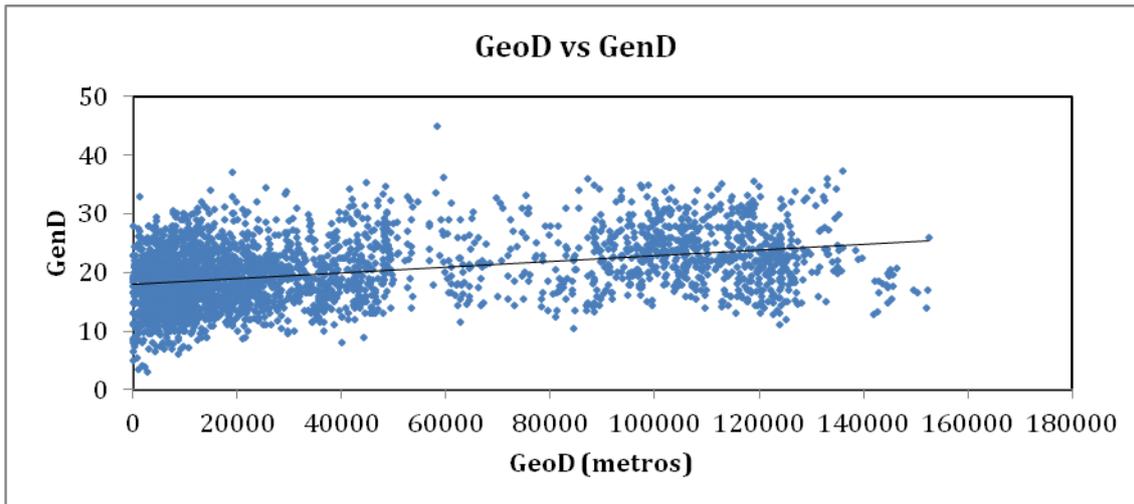


Figura 2.10.- Representación de la distancia genética frente a la distancia geográfica entre pares de muestras.  
 $r=0.393$ ,  $P=0.0003$ .

### Tamaño efectivo de población, $N_e$

Tener una estima de  $N_e$  es de gran importancia para evaluar el riesgo de extinción de las poblaciones silvestres pues determina la tasa de endogamia y la fuerza de la deriva genética (Crow y Kimura, 1970). Se calculó el tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) utilizando dos estimadores distintos: el ONeSAMP que utiliza un método Bayesiano basado en 8 estadísticos (Tallmon et al. 2008) y el estimador LD- $N_e$  (Waples y Do, 2008) basado en el principio de que, a medida que disminuye  $N_e$ , se generan asociaciones no al azar entre alelos de diferentes loci, es decir, desequilibrio de ligamiento. El tamaño efectivo estimado con ONeSAMP fue de  $N_e=80$  (CI95%=60-148) frente a una estima de  $N_e=21$  (CI95%=18—26) obtenida con el software LD- $N_e$ . Esta última estima está afectada por procesos como la fragmentación de la población y la endogamia a nivel local que generan desequilibrio de ligamiento. De hecho, la fragmentación del hábitat ha sido documentada por diversos autores (Obeso y Bañuelos 2003; Pollo et al. 2003; García et al. 2005; Robles et al. 2005) y el proceso de fragmentación de la población y de reducción del número de cantaderos ocupados va en aumento según los últimos datos obtenidos por la empresa ESGERNA (véase la Figura 2.11). La fragmentación reciente de la población se ha inferido también en un trabajo previo a partir de la comparación de la heterocigosidad con el número de alelos (Vázquez et al. 2012).

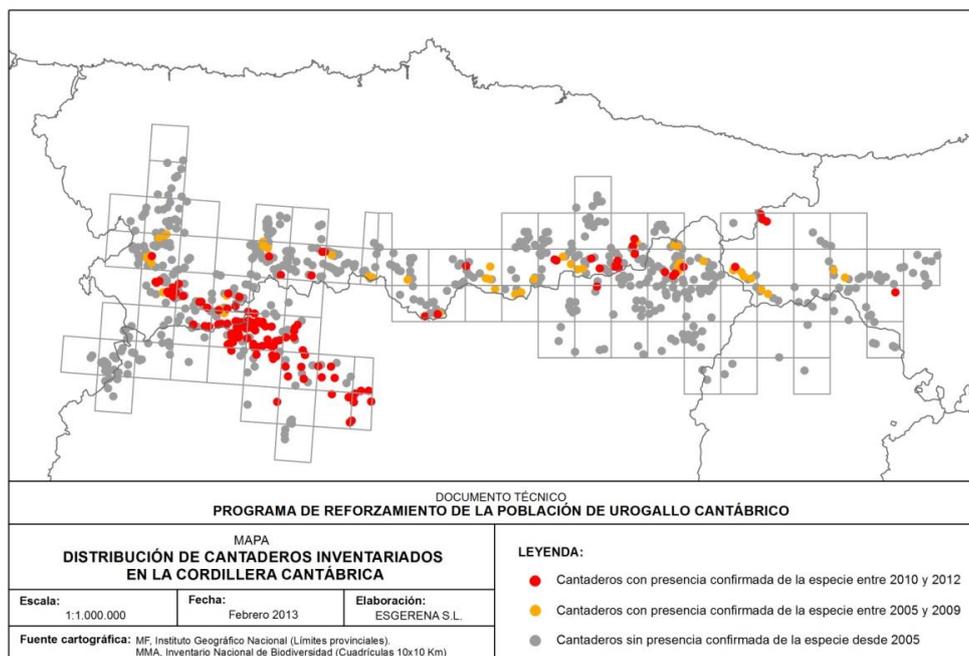


Figura 2.11-. Evolución de la distribución de los cantaderos con presencia confirmada desde 2005 hasta 2012 (datos elaborados por ESGERNA S. L.)

La estima del tamaño efectivo obtenida a partir de LE-Ne se aproxima al Ne local dentro de subgrupos de la población y su valor ( $Ne=21$ ) es muy bajo, teniendo en cuenta que el Ne mínimo que se ha sugerido debe de tener una población para que los efectos de la endogamia y la deriva no sean muy drásticos y que sea viable a corto plazo es de 50. Si los grupos de población no están conectados entre sí los efectos de la deriva y la endogamia a nivel local serán muy importantes llevando a la progresiva pérdida de variación, endogamia y fijación de alelos deletéreos, todo ello aumentará la probabilidad de extinción de grupos locales y a mayor aislamiento entre los grupos de población restantes.

La reducción del tamaño de población unido al proceso de fragmentación y rápida reducción del tamaño efectivo son factores determinantes del proceso conocido como vórtice de extinción o torbellino de extinción ("extinction vortex", Brook et al. 2002). En este proceso los factores de estocasticidad demográfica llevan a reducciones del tamaño de población que tienen las consecuencias genéticas de la endogamia y la fijación de deletéreos, estas a su vez afectan negativamente al tamaño de población con lo que se entra en un sistema de retroalimentación que conduce a la espiral o vórtice de extinción (Frankham et al. 2010)

### C) CAPTURAS Y RECAPTURAS DE LOS INDIVIDUOS Y DESPLAZAMIENTOS DE LOS EJEMPLARES.

El total de muestras disponibles así como los números de individuos identificados en cada año se representan en la Tabla 2.3. La única muestra recogida en el año 2007 pertenece a la hembra localizada muerta en Cacabelos ese año. Solamente dos individuos, ambos machos (TU-147 y TU-170) fueron identificados a partir de muestras recogidas para este trabajo en distintos años. El individuo TU-147 fue identificado a partir de una muestra de 2009 y otra de 2011 recogidas ambas en el mismo cantadero de Degaña. El individuo TU-170 por su parte se identificó a partir de una muestra de 2009 y otra de 2012 en el mismo cantadero de Omaña (Tabla 2.4).

Año	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>Machos</b>	0	3	2	2	28	5
<b>Hembras</b>	1	2	0	0	31	8
<b>Nº Ejemplares</b>	1	5	2	2	59	13
<b>Nº Muestras</b>	1	5	2	2	68	15

Tabla 2.3.- Número de ejemplares identificados por año en que se recogió la muestra y sexo.

La no correspondencia entre el número de muestras y el número de individuos en los años 2011 y 2012 que se observa en la Tabla 2.3 es resultado de que algunos individuos fueron capturados repetidamente dentro del mismo año (ver tabla 2.4). Así en 2011 se recapturaron un total de 7 individuos, 5 de ellos en dos ocasiones (dos machos y tres hembras) y los otros dos hasta en tres ocasiones (un macho y una hembra). Del mismo modo en 2012 se recapturaron dos individuos (un macho y una hembra). Todos ellos, salvo tres individuos (TU-152, TU-154 y TU-188) fueron recapturados siempre en el mismo cantadero en que se localizaron la primera vez. Los individuos TU-154 y TU-188 corresponden a dos machos que fueron localizados en dos cantaderos distintos, aunque la distancia entre estos es menor de 400 metros. El tercer individuo, la hembra TU-152 que fue localizada en dos cantaderos distintos uno en Degaña y otro en Villablino separados entre sí unos 12 km. Dando en general una idea de que los desplazamientos son mínimos, aún en aquellos casos en que las muestras han sido recogidas en diferentes años.

ID	Sexo	FECHA	CAPTURAS	LUGAR	Km ruta	
<b>TU-024</b>	M	<b>11/08/2006</b>	20/05/2011	Cangas	2,52	
<b>TU-098</b>	H	<b>Primavera 2006</b>	10/05/2012	22/08/2012	Valdeón	0,18-2,56
<b>TU-119</b>	M	<b>24/08/2006</b>	16/08/2008	Valdeón	2,00	
<b>TU-136</b>	H	<b>21/05/2010</b>	<b>21/05/2010</b>	10/08/2011	Ponga	1,11
<b>TU-139</b>	H	18/08/2011	18/08/2011	Caso	0,07	
<b>TU-145</b>	H	16/09/2011	16/09/2011	16/09/2011	Degaña	0,04-0,08
<b>TU-147</b>	M	26/03/2009	18/04/2011	Degaña	0,45	
<b>TU-150</b>	H	28/09/2011	28/09/2011	Degaña	0,03	
<b>TU-152</b>	H	25/08/2011	28/09/2011	Villablino/ Degaña	12,35	
<b>TU-154</b>	M	03/04/2011	08/04/2011	25/04/2011	Ibias	0,40
<b>TU-155</b>	M	25/08/2011	2011	Ibias	0,62	
<b>TU-170</b>	M	11/08/2011	11/05/2012	Omaña	0,27	
<b>TU-188</b>	M	29/07/2011	14/09/2011	Villablino	0,30	
<b>TU-197</b>	M	13/08/2012	13/08/2012	Villablino	0,42	

Tabla 2.4.- Relación de individuos que han sido recapturados. En negrilla las capturas realizadas en anteriores trabajos.

Siguiendo con el tema de las recapturas y los desplazamientos de los urogallos, se compararon los genotipos obtenidos durante la realización de este trabajo con la base de datos de los genotipos obtenidos en otros trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio. Se encontró que 4 individuos genotipados a partir de muestras recogidas para este proyecto que ya se encontraban anotados en nuestra base de datos (Tabla 2.4). Estos cuatro individuos TU-024, TU-098, TU-119 y TU-136 (dos machos y dos hembras) se localizaron en la misma zona en que se habían identificado la primera vez aunque en algún caso habían pasado casi seis años desde que se identificó al individuo la primera vez. Tres de estos individuos, TU-098, TU-119 y TU-136, se localizaron en la zona oriental del área de distribución de la especie y el cuarto en la zona occidental.

Las recapturas proporcionan datos interesantes sobre la dispersión de ejemplares en la Cordillera Cantábrica. Es conocido que el urogallo es una especie sedentaria, aunque apenas existen datos sobre el movimiento de individuos. Datos, obtenidos a partir del seguimiento de tres machos durante un periodo de 2 a 5 meses (Martínez 1993; tomado de Rodríguez-Muñoz 2011) estimaron que los desplazamientos no eran mayores de 1,8 Km respecto a la zona de cortejo. Por otro lado datos obtenidos a partir del seguimiento de hembras radiomarcadas en la Cordillera Cantábrica muestran que estas tienen una importante tendencia dispersiva aunque guardando cierta fidelidad a los cantaderos que visitan. Se ha observado una hembra que llegó a desplazarse 18 Km entre zonas de invierno y las áreas ocupadas el resto del año (Fundación Biodiversidad, 2012). Según los datos presentados en la Tabla 2.4 los desplazamientos observados mediante análisis genético no invasivo no superan los dos kilómetros y medio aun cuando entre las muestras recogidas pueda existir un periodo de hasta seis años de tiempo. Sólo en un caso (la hembra TU-152) el desplazamiento fue mayor (12,35 Km). Es de destacar la utilidad que presenta este tipo de análisis de individualización genética a partir de muestreo no invasivo para el estudio de la dispersión de los ejemplares de urogallo. En toda la bibliografía sobre el tema los datos sobre dispersión de ejemplares de urogallo son muy escasos y suelen presentar un número muy limitado de individuos, sin embargo nuestros datos, sólo con relación a individuos identificados en este trabajo, nos dan información sobre el desplazamiento de 14 individuos tanto hembras como machos y en un periodo de tiempo que va desde días hasta 6 años, mostrando el tremendo potencial de este tipo de análisis para estos estudios.

Es de reseñar que en la población oriental con sólo 13 individuos identificados se han recapturado un total de 5 individuos, uno de ellos en este mismo trabajo (TU-139) y otros tres que ya habían sido genotipados en trabajos anteriores (TU-098, TU-119 y TU-136). La alta proporción de recapturas en el área oriental indica que su censo debe ser reducido. Esta apreciación se ve reforzada por el hecho de que tres de los individuos identificados ya habían sido capturados anteriormente en el periodo comprendido entre 2006 y 2010, lo que indica que debe de haber una baja tasa de renovación. Estos resultados concuerdan con las estimas del censo realizadas a partir de avistamientos que apuntan a una situación crítica de la población.

#### **D) PERSPECTIVAS FUTURAS Y RECOMENDACIONES**

Este estudio muestra los efectos genéticos de la pérdida y fragmentación del hábitat en la población cantábrica del urogallo. La importante caída del tamaño de la población en las últimas dos décadas se refleja claramente en las asociaciones no al azar entre alelos de distintos loci y en el bajo  $N_e$  local calculado. La fragmentación de la población que se ha originando tendrá como consecuencias la deriva local y la endogamia, que junto con la estocasticidad demográfica, son los factores que conducen al vórtice de extinción (Brook *et al.* 2002).

Existe un aislamiento por distancia con una zona de fractura en la región central de la distribución. Las acciones orientadas a la conservación deberían estar dirigidas a mejorar la conectividad entre los núcleos de población para detener, si es posible, el proceso de aislamiento en curso. La limitada dispersión de los individuos que hemos demostrado indica que es necesario aumentar la cantidad de hábitat boscoso continuo para permitir el flujo entre núcleos vecinos. Para la conservación de la especie en la Cordillera Cantábrica sería necesario mantener de una red densa de núcleos de población para hacer posible el flujo genético entre ellos.

La alta proporción de recapturas en el área oriental indica una tasa de renovación reducida, si a esto unimos la separación entre núcleos de población y la baja dispersión de la especie, podemos pensar que las posibilidades de mantenimiento del urogallo en el área oriental son muy reducidas.

Se han apuntado diferentes factores que pueden afectar a la especie y entre ellos la pérdida y alteración del hábitat se ha señalado como el principal problema para la recuperación (Rodríguez-Muñoz 2011). Es imperativo determinar las causas del declive y fragmentación de la población para poder atajarlas.

## ANEXO II.2. Genotipos de los ejemplares silvestres

Individuo	TUD1	TUD2	TUD3	TUD4	TUD5	TUD6	TUD7	TUT1	TUT3	BG4	BG10	BG12	BG14	BG15	BG16	BG18	Sexo																
TU-024*	165	169	154	156	120	122	93	123	113	115	153	153	159	161	151	171	103	107	181	185	183	191	143	143	182	182	114	126	133	141	157	161	M
TU-031	169	169	154	154	120	122	93	123	109	111	153	153	159	161	159	159	103	111	181	189	191	191	143	143	178	182	114	114	133	133	157	157	H
TU-098*	165	169	154	154	120	122	93	125	105	115	151	153	159	161	147	147	103	107	185	193	191	195	143	143	178	182	110	114	133	137	157	165	H
TU-119*	165	169	154	154	122	122	93	93	101	111	151	153	159	161	147	155	103	107	181	193	187	191	139	143	182	182	110	114	133	137	161	165	M
TU-136*	165	169	154	164	120	122	93	93	101	105	153	153	159	161	155	155	103	103	185	197	187	187	143	143	178	182	110	114	133	137	165	165	H
TU-137	165	173	154	164	120	120	123	123	115	115	153	153	159	161	167	167	103	103	189	189	183	183	143	143	182	182	114	114	141	141	161	161	H
TU-138	165	169	154	160	120	122	93	93	101	105	0	0	161	161	155	155	107	107	181	193	187	187	147	147	178	186	118	118	133	137	165	165	H
TU-139	169	169	154	154	120	122	93	93	105	115	153	153	159	161	155	155	103	107	189	193	187	187	143	143	178	182	110	118	137	137	165	165	H
TU-140	165	165	0	0	122	122	93	93	113	115	153	153	159	161	151	155	107	111	181	189	183	191	143	143	178	178	114	126	133	133	157	157	M
TU-141	165	165	0	0	120	120	93	125	115	115	153	153	159	161	151	155	103	107	181	189	183	183	0	0	178	178	118	118	133	133	157	157	H
TU-142	165	165	154	154	120	120	123	125	115	115	153	153	159	161	151	151	103	107	181	189	183	183	139	139	178	178	118	118	133	133	157	157	H
TU-143	165	173	154	156	122	122	93	123	113	115	153	155	159	161	155	159	111	111	185	185	183	195	143	143	178	186	114	118	133	137	157	157	M
TU-144	165	173	154	154	120	120	123	123	105	115	155	155	159	161	159	159	103	111	181	189	195	195	143	143	178	182	118	118	133	133	157	161	M
TU-145	165	165	156	164	120	122	123	123	109	115	153	153	159	161	155	167	103	107	189	193	183	183	139	143	182	182	118	118	133	137	153	161	H
TU-146	165	165	156	164	120	120	0	0	109	115	0	0	159	161	159	167	0	0	189	193	183	183	139	143	182	182	118	118	133	137	153	161	H
TU-147	165	165	154	154	120	120	123	123	109	115	155	155	159	161	151	159	103	111	181	189	191	195	143	143	178	182	114	118	133	133	157	161	M
TU-148	165	165	154	154	120	120	0	0	109	115	0	0	159	161	151	159	103	107	181	189	183	183	143	143	178	182	0	0	133	133	157	161	M
TU-149	165	173	154	154	120	120	93	123	109	115	0	0	159	161	159	159	107	111	189	189	195	195	143	143	182	186	114	114	133	137	157	161	H
TU-150	169	173	154	154	120	120	123	123	105	109	153	153	159	161	155	167	103	103	189	193	183	183	143	143	178	186	114	118	137	141	157	161	H

Individuo	TUD1	TUD2	TUD3	TUD4	TUD5	TUD6	TUD7	TUT1	TUT3	BG4	BG10	BG12	BG14	BG15	BG16	BG18	Sexo																
TU-151	165	165	154	154	120	120	0	0	115	115	153	153	159	161	159	107	111	181	189	0	0	143	143	178	182	114	118	133	133	157	161	H	
TU-152	165	173	154	154	120	120	125	125	109	115	151	153	159	161	159	103	107	189	189	195	195	139	139	182	186	114	114	133	137	157	161	H	
TU-153	165	169	0	0	120	120	0	0	105	115	153	153	159	161	151	103	103	181	189	183	183	143	143	178	178	114	126	133	133	157	161	H	
TU-154	165	173	154	164	120	122	93	93	113	113	153	153	159	161	155	155	103	107	181	189	183	187	139	143	178	182	114	122	133	133	157	165	M
TU-155	165	173	154	156	122	122	93	123	111	113	0	0	159	161	155	155	103	107	181	189	183	183	139	143	182	182	114	118	133	133	157	165	M
TU-156	165	173	154	154	120	122	0	0	113	113	153	153	157	159	155	155	103	107	181	189	183	183	139	143	178	182	114	118	133	133	157	165	M
TU-157	169	169	0	0	120	122	93	121	101	115	153	153	159	159	155	155	103	103	189	193	187	187	143	143	178	178	110	118	133	137	157	165	H
TU-158	165	165	0	0	120	122	93	93	0	0	151	153	159	159	151	155	103	103	185	197	187	187	143	143	178	182	110	114	0	0	165	169	H
TU-159	165	169	154	154	122	122	0	0	101	111	153	153	161	161	147	155	103	107	181	189	187	191	143	143	182	182	110	114	133	137	161	165	M
TU-160	165	169	154	154	122	122	93	93	101	111	151	153	159	159	147	155	103	111	181	193	187	191	143	143	182	182	110	114	133	137	161	165	M
TU-161	169	169	164	164	120	122	93	93	113	115	153	153	159	159	155	155	103	107	181	181	187	187	143	143	182	186	110	118	133	141	161	165	H
TU-162	171	173	0	0	120	120	0	0	103	109	151	151	159	161	147	159	103	107	193	197	195	195	147	147	200	204	110	114	133	149	157	157	M
TU-163	165	165	154	154	120	122	0	0	109	115	153	153	159	161	155	159	103	103	181	189	183	195	143	143	178	186	114	118	137	137	157	157	M
TU-164	165	165	154	154	122	122	93	93	109	109	151	153	157	159	151	167	103	103	189	189	183	183	143	143	178	186	114	118	0	0	157	165	M
TU-165	165	169	154	154	120	120	93	123	105	115	0	0	159	161	167	167	103	103	181	193	183	183	143	143	178	182	118	118	133	133	157	157	H
TU-166	173	173	154	154	120	122	93	93	109	115	153	153	159	159	151	159	103	103	181	189	191	195	139	143	182	186	118	118	137	141	161	161	M
TU-167	165	165	154	154	120	122	93	123	109	115	153	153	157	159	155	159	103	103	181	189	183	195	143	143	178	186	114	118	137	141	157	157	M
TU-168	165	165	154	164	120	122	93	123	105	105	153	153	159	161	159	159	103	111	181	189	195	195	143	143	178	186	118	118	0	0	157	161	M
TU-169	165	165	154	164	122	122	123	123	105	105	153	153	159	161	159	159	111	111	189	189	195	195	143	143	178	182	114	118	133	141	157	157	H
TU-170	169	169	154	154	120	120	123	123	105	105	155	155	159	161	159	159	103	111	181	185	191	195	143	143	178	182	110	114	133	141	157	157	M
TU-171	165	169	154	154	120	122	93	123	105	115	153	155	159	161	155	159	103	111	189	193	183	183	143	143	182	186	114	118	133	133	157	161	H
TU-172	165	173	154	154	120	122	93	93	111	115	153	153	157	159	159	159	103	111	181	189	195	199	139	143	182	186	114	118	133	141	161	161	M

Individuo	TUD1	TUD2	TUD3	TUD4	TUD5	TUD6	TUD7	TUT1	TUT3	BG4	BG10	BG12	BG14	BG15	BG16	BG18	Sexo																
TU-173	165	165	154	156	120	122	123	123	115	115	153	153	159	161	159	159	0	0	189	193	191	195	139	143	178	186	114	118	133	137	157	157	M
TU-174	165	165	154	156	120	122	0	0	105	105	153	153	161	161	155	159	0	0	189	193	191	195	139	143	178	186	118	118	133	133	157	157	M
TU-175	165	173	154	154	120	120	93	93	109	115	153	155	159	161	151	159	111	111	185	189	191	195	139	143	186	186	114	118	133	133	157	161	M
TU-176	165	169	154	154	120	120	93	123	115	115	153	153	159	161	159	159	103	111	189	193	0	0	139	143	182	182	114	122	0	0	157	161	M
TU-177	165	165	0	0	120	122	93	123	113	113	153	155	159	161	159	159	103	111	185	189	0	0	143	143	182	186	118	118	133	137	0	0	H
TU-178	169	169	154	156	122	122	93	123	109	109	153	153	159	161	155	155	107	111	189	189	191	191	143	143	182	186	114	114	133	137	157	161	H
TU-179	169	173	154	164	120	120	93	93	115	115	153	155	159	161	151	155	111	111	185	193	183	183	139	143	182	186	114	114	133	141	157	161	M
TU-180	165	173	154	164	120	122	93	93	115	115	153	153	159	161	159	159	103	111	181	193	195	195	143	143	182	186	114	126	137	141	157	161	H
TU-181	165	169	154	154	120	120	93	93	115	115	153	153	159	161	159	159	103	111	189	193	195	195	143	143	182	186	114	126	133	137	157	161	H
TU-182	169	173	154	154	120	122	93	123	109	115	153	153	159	161	159	159	103	111	189	189	183	195	143	143	178	178	114	118	0	0	157	161	M
TU-183	165	169	164	164	122	122	123	123	115	115	153	153	159	161	155	155	103	111	189	193	183	183	143	143	182	186	118	118	133	137	157	161	M
TU-184	169	173	154	154	120	122	93	93	109	111	153	155	159	161	159	159	111	111	185	189	199	199	143	143	178	182	114	114	133	133	157	157	M
TU-185	165	165	154	156	120	120	93	93	105	109	153	153	159	161	151	151	103	111	189	189	191	191	143	143	182	182	114	118	133	133	157	157	H
TU-186	165	173	154	154	120	122	123	123	105	111	153	153	159	159	159	167	103	111	181	189	183	191	143	143	178	178	118	122	133	133	157	161	M
TU-187	165	165	154	164	120	120	93	123	105	111	153	153	159	159	151	151	103	103	189	193	191	191	143	143	182	186	118	118	133	137	157	165	H
TU-188	165	173	154	154	120	120	93	125	115	115	153	153	159	161	159	159	103	111	189	189	195	195	139	139	186	186	114	118	133	137	161	161	M
TU-189	165	165	154	154	120	120	0	0	115	115	153	155	159	161	159	159	103	111	185	189	195	195	139	139	186	186	114	114	133	137	157	161	H
TU-190	165	173	154	154	120	120	0	0	115	115	153	155	159	161	0	0	103	107	185	189	183	195	139	143	182	186	114	118	133	133	157	161	M
TU-191	165	165	154	154	122	122	119	119	105	115	153	153	159	161	167	167	103	111	189	193	183	183	143	143	182	182	114	118	133	133	157	157	H
TU-192	165	165	154	156	120	120	0	0	115	115	153	153	159	161	151	155	103	107	181	189	183	183	143	143	182	182	114	126	137	141	157	161	M
TU-193	165	165	154	154	120	122	0	0	115	115	153	155	159	161	159	159	103	111	189	189	195	195	143	143	182	182	114	118	133	137	157	157	H
TU-194	165	165	156	156	122	122	93	93	109	115	153	153	159	161	151	159	103	107	181	189	191	191	143	143	178	182	110	114	133	137	153	157	M

Individuo	TUD1	TUD2	TUD3	TUD4	TUD5	TUD6	TUD7	TUT1	TUT3	BG4	BG10	BG12	BG14	BG15	BG16	BG18	Sexo																
TU-195	165	165	154	154	122	122	123	123	109	109	153	153	159	161	159	159	103	111	181	189	183	195	143	143	182	186	118	126	137	141	157	165	H
TU-196	0	0	154	154	120	122	93	123	115	115	155	155	159	161	151	159	103	103	189	189	191	195	139	143	182	182	114	126	133	137	157	157	M
TU-197	165	173	154	154	120	120	123	125	109	115	153	153	159	161	151	159	107	111	189	189	191	195	139	143	182	186	114	118	133	137	157	161	M
TU-198	165	173	154	154	120	122	123	123	101	111	153	153	159	161	159	159	103	111	181	189	199	199	143	143	182	186	114	126	137	141	157	161	H
TU-199	169	173	154	164	120	120	93	123	105	115	155	155	159	161	159	159	103	107	181	189	195	195	143	143	182	186	118	126	133	133	157	157	H
TU-200	165	165	154	156	120	122	123	123	109	115	153	153	159	161	151	159	103	107	189	189	191	191	143	143	182	186	114	118	133	137	157	161	H
TU-201	165	173	154	154	120	120	123	123	105	111	153	153	159	161	159	167	103	103	181	189	183	195	143	143	178	182	118	118	133	141	157	161	M
TU-202	165	165	154	156	120	122	93	93	115	115	0	0	159	161	155	155	103	107	189	193	183	183	143	143	182	182	114	118	133	137	157	161	H
TU-203	165	169	164	164	120	122	93	93	115	115	0	0	159	161	155	155	103	107	189	193	187	187	147	147	186	186	118	118	137	137	165	165	H
TU-204	165	165	154	164	120	122	93	123	113	115	153	153	159	161	155	167	103	103	181	181	183	183	139	143	178	186	110	122	133	137	157	157	M
TU-205	165	169	154	154	120	120	93	123	105	117	153	153	159	161	0	0	103	107	0	0	0	0	143	143	178	182	110	118	133	137	157	157	H
TU-206	165	169	154	154	122	122	119	123	109	115	155	155	159	161	151	151	107	111	189	189	191	191	0	0	0	0	114	114	133	133	157	157	H
TU-207	165	169	154	156	120	122	0	0	105	115	0	0	159	161	151	159	107	107	185	189	0	0	139	143	182	182	0	0	133	141	157	157	M
TU-208	165	169	154	156	122	122	0	0	105	105	153	153	0	0	151	151	103	103	181	189	191	191	143	143	182	186	114	114	133	137	157	161	H
TU-209	169	169	0	0	122	122	93	93	113	113	151	153	159	159	151	151	103	103	189	193	191	191	0	0	182	182	114	118	0	0	153	165	H
TU-210	169	173	154	156	120	122	123	123	115	115	153	153	159	161	151	151	103	111	189	189	183	195	143	143	178	178	110	118	0	0	157	157	M
TU-211	165	165	154	154	120	120	93	93	115	115	153	153	159	161	159	159	103	111	189	189	191	191	143	143	178	182	118	118	133	133	157	157	H
TU-212	165	169	0	0	120	120	93	93	115	115	153	153	159	159	0	0	103	107	181	185	0	0	143	143	178	186	114	118	0	0	157	157	H

Los individuos con asterisco al lado del nombre ya figuraban en nuestra base de datos con anterioridad.

El individuo TU-204 podría pertenecer al centro de cría.

### ANEXO II.3. Protocolos de recogida de los distintos tipos de muestra

#### MUESTRAS NO INVASIVAS

##### RECOGIDA DE MUESTRAS DE HECES

- 1.- Usar unos guantes distintos para cada muestra
- 2.- Abrir el tubo inmediatamente antes de recoger las heces
- 3.- Introducir las heces en el tubo y añadir un volumen de alcohol 96° que cubra sobradamente la muestra
- 4.- Cerrar bien el tubo para que no se vierta el alcohol
- 5.- No colocar más de una muestra en cada tubo
- 6.- Rellenar la ficha con todos los datos incluyendo en “observaciones” datos relevantes sobre el estado de la muestra si los hubiera
- 7.- Guardar los tubos con las muestras en la nevera en cuanto sea posible
- 8.- Entregar la muestra al biólogo encargado del muestreo lo antes posible

##### RECOGIDA DE MUESTRAS DE PLUMAS

- 1.- Usar unos guantes distintos para cada muestra
- 2.- Introducir las plumas en el sobre y cerrarlo
- 3.- No colocar más de una muestra en cada sobre
- 4.- Apuntar en el sobre todos los datos sobre la muestra incluyendo en “observaciones” datos relevantes sobre el estado de la muestra si los hubiera
- 5.- Guardar los tubos con las muestras a temperatura ambiente y remitir al laboratorio lo antes posible

#### MUESTRAS INVASIVAS

##### RECOGIDA DE MUESTRAS DE SANGRE TUBO HEPARINIZADO

- 1.- Anotar la información sobre la muestra (individuo, sexo, etc.) en cada tubo
- 2.- Recoger unos 0,5 ml de sangre por muestra
- 3.- La sangre debe mezclarse inmediatamente con la heparina una vez que ha entrado en el tubo. Invertir suavemente varias veces, nunca agitar enérgicamente
- 4.- almacenar en nevera y remitir al laboratorio a la mayor brevedad

##### RECOGIDA DE MUESTRAS DE SANGRE EN TARJETA ISOCODE

Llevar guantes en todo momento y evitar tocar la zona de la tarjeta en la que se llevará a cabo la recolección de la muestra.

- 1.- Anotar la información sobre la muestra (individuo, sexo, fecha, etc.) en la tarjeta de recolección ISOCODE (Isocode, Schleicher & Scheull, Keene, NH).

- 2.- Dispensar cuatro gotas de sangre en la tarjeta de recolección de muestra ISOCODE (una gota en cada círculo).
- 3.- Dejar secar a temperatura ambiente
- 4.- Introducir la tarjeta ya seca en la bolsa de plástico con silica suministrada
- 5.- almacenar a temperatura ambiente y remitir al laboratorio a la mayor brevedad

Se debe procurar en todo momento que las tarjetas con la sangre de distintas muestras no entren en contacto para evitar contaminaciones cruzadas.

#### RECOGIDA DE MUESTRAS DE TEJIDO

- 1.- Usar unos guantes distintos para cada muestra
- 2.- Abrir el tubo inmediatamente antes de recoger la muestra de tejido
- 3.- Cortar un dado de tejido de aproximadamente 1cm
- 3.- Introducir la muestra de tejido en el tubo y añadir un volumen de alcohol 96° que cubra sobradamente la muestra
- 4.- Cerrar bien el tubo para que no se vierta el alcohol
- 5.- No colocar más de una muestra en cada tubo
- 6.- Rellenar la ficha con todos los datos incluyendo en “observaciones” datos relevantes sobre el estado de la muestra si los hubiera
- 7.- Guardar los tubos con las muestras en la nevera en cuanto sea posible y remitir al laboratorio a la mayor brevedad.

Se debe limpiar el material usado para cortar el tejido entre muestra y muestra para evitar contaminaciones cruzadas.

## REFERENCIAS

- Alda F, Sastre P, De la Cruz-Cardiel PJ, Doadrio I (2011) Population genetics of the endangered capercaillie in northern Spain. *Animal Conservation* **14**:249-260.
- Ballou J, Thompson S, Earnhardt J MateRx Computer program for prescribing mates in a pedigreed populations. Downloaded from: <http://www.vortex9.org/materx.exe>
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bellemain E, Taberlet P (2004) Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Molecular Ecology Notes* **4**: 519–522.
- Brook BW, Tonkyn DW, O'Grady JJ, Frankham R (2002) Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. *Conservation Ecology* **6**: 16.
- Castroviejo, J. (1975). El urogallo en España. Monografías de la Estación Biológica de Doñana, 3. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. 546 pp.
- Cercueil A, Bellemain E, Manel S (2002) PARENTE: Computer Program for Parentage Analysis. *Journal of Heredity* **93**: 458-460.
- Cramp, S., Simmons, K. E. L. (1980). Handbook of the Birds of Europe the Middle East and North Africa. The Birds of the Western Palearctic. Volume II. Hawks to Bustards. Oxford University Press, Oxford.
- Crow JF, Kimura M (1970) An introduction to population genetics theory. Harper and Row, New York.
- Duriez O, Sachet JM, Menoni E, Miquel C, Taberlet P (2006) Phylogeography of the Capercaillie in Eurasia: what is the status of the Pyrenean-Cantabrian population?. *Journal of Ornithology* **147**: 160-161.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.
- Fundación Biodiversidad (2012) Documento técnico para la conservación y mejora del hábitat del urogallo (*Tetrao urogallus cantabricus*) en la cordillera Cantábrica. Fundación Biodiversidad, Madrid, España. 144 páginas.
- Frankham, R, Briscoe DA, Ballou DJ (2010) Introduction to conservation genetics. Second edition. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- García D, Quevedo M, Obeso JR, Abajo A (2005) Fragmentation patterns and protection of montane forest in the Cantabrian range (NW Spain). *Forest Ecology and Management* **208**:29-43.
- IUCN (2002) Technical Guidelines on the Management of Ex Situ Populations for Conservation, approved at the 14th Meeting of the Programme Committee of Council, Gland Switzerland.
- IUCN (2009) Guidelines for the Re-introduction of Galliformes for Conservation Purposes. World Pheasant Association and IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group (eds.)
- Kaeuffer R, Réale D, Coltman DW, Pontier D (2007) Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium. *Heredity* **99**:374-380.
- McKelvey KS, Schwartz MK (2004) Genetic Errors Associated with Population Estimation Using Non-Invasive Molecular Tagging: Problems and New Solutions. *Journal of Wildlife Management* **68**:439-448.

- Marshall K, Edwards-Jones G (1998) Reintroducing capercaillie (*Tetrao urogallus*) into southern Scotland: identification of minimum viable populations at potential release sites. - *Biodiversity and Conservation* **7**: 275-296.
- Miller CR, Joyce P, Waits LP (2002) Assessing Allelic Dropout and Genotype Reliability Using Maximum Likelihood. *Genetics* **160**:357-366.
- Moss R, Picozzi N (1994) Management of forests for Caperacillie in Scotland. HMSO, Londres.
- Obeso JR, Bañuelos MJ (2003) El urogallo (*Tetrao urogallus cantabricus*) en la Cordillera Cantábrica. Parques Nacionales. Ministerio del Medio Ambiente, Madrid.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**:288-295.
- Pérez T, Vázquez JF, Naves J, Fernández A, Corao A, Albornoz J, Dominguez A (2009) Non-invasive genetic study of the endangered Cantabrian brown bear (*Ursus arctos*). *Conservation genetics* **10**:291-301.
- Pérez T, Vázquez JF, Quirós F, Domínguez A (2011) Improving non-invasive genotyping in capercaillie (*Tetrao urogallus*): redesigning sexing and micorsatellite primers to increase efficiency on faeces samples. *Conservation Genetic Resources* **3**:483-487.
- Piertney SB, Höglund J (2001) Polymorphic microsatellite ADN markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes* **1**:303-304.
- Pollak JP, Ballou J, Lacy R (2007) PM2000 Windows-based software for genetic and demographic analysis and management of pedigrees (v1.213). Downloaded from <http://www.vortex9.org/pm2000install.zip>
- Pollo CJ, 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 CJ, Robles L, Seijas JM, García-Miranda A, 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**:397-409.
- Pritchard JK, Stephens P, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-959.
- Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**:258-275.
- Quevedo M, Bañuelos MJ, Sáez O, Obeso JR (2006) Habitat selection by Cantabrian capercaillie at the edge of the species distribution. *Wildlife Biology* **12**:269-278.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**:248-249.
- Robles, L., Ballesteros, F. y Canut, J. (Eds.) (2006) El urogallo en España, Andorra y Pirineos franceses. Situación actual (2005). SEO/BirdLife. Madrid.
- Rodríguez-Muñoz R, Mirol PM, Segelbacher G, Fernandez A, Tregenza T (2007) Genetic differentiation of an endangered capercaillie (*Tetrao urogallus*) population at the Southern edge of species range. *Conservation Genetics* **8**:659-670.
- Rodríguez-Muñoz, R. (2011). Urogallo común – *Tetrao urogallus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Morales, M. B. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Rousset F, (2008) Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**: 103-106.

- Segelbacher G, Paxton RJ, Steinbruck G, Trontelj P, Storch I (2000) Characterization of microsatellites in capercaillie *Tetrao urogallus* (AVES). *Molecular Ecology* **9**: 1919–1952.
- Storch I, Segelbacher G (2000) Genetic correlates of spatial population structure in central European capercaillie *Tetrao urogallus* and black grouse *Tetrao tetrix*: a project in progress. *Wildlife Biology* **6**:305-310.
- Storch I, Bañuelos MJ, Fernandez-Gil A, Obeso JR, Quevedo M, Rodriguez-Munoz R (2006) Subspecies Cantabrian capercaillie *Tetrao urogallus cantabricus* endangered according to IUCN criteria. *Journal of Ornithology* **147**:653-655.
- Taberlet P, Luikart G (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**:41-55.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**:3189-3194.
- Tallmon DA, Koyuk A, Luikart G, Beaumont MA (2008) COMPUTER PROGRAMS: onesamp: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology Resources* **8**:299-301.
- Ulrich PP, Romeo JM, Daniel LJ, Vyas GN (1993) An improved method for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma utilizing heminested primers and internal control RNA. *PCR Methods and Applications* **2**: 241-249.
- Valière N (2002) Gimlet: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* **2**:377-379.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**:535-538.
- Vázquez JF, Pérez T, Quirós F, Obeso JR, Albornoz J, Domínguez A (2012) Population genetic structure and diversity of the endangered Cantabrian capercaillie. *Journal of Wildlife Management* **76**:957-965.
- Waits LP, Paetkau D (2005) Noninvasive Genetic Sampling Tools for Wildlife Biologists: A Review of Applications and Recommendations for Accurate Data Collection. *Journal of Wildlife Management* **69**:1419-1433.
- Waples RS, Do C (2008) Idne: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* **8**:753-756.