



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y
ECOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**MONITORIZACIÓN DE POBLACIONES DE
TETRAÓNIDOS EN LOS PIRINEOS MEDIANTE
MÉTODOS NO INVASIVOS**

**PRESENTADA POR:
GAËL ALEIX-MATA**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. JESÚS M^a PÉREZ JIMÉNEZ
DR. D. ANTONIO SÁNCHEZ BACA**

JAÉN, 18 DE SEPTIEMBRE DE 2020

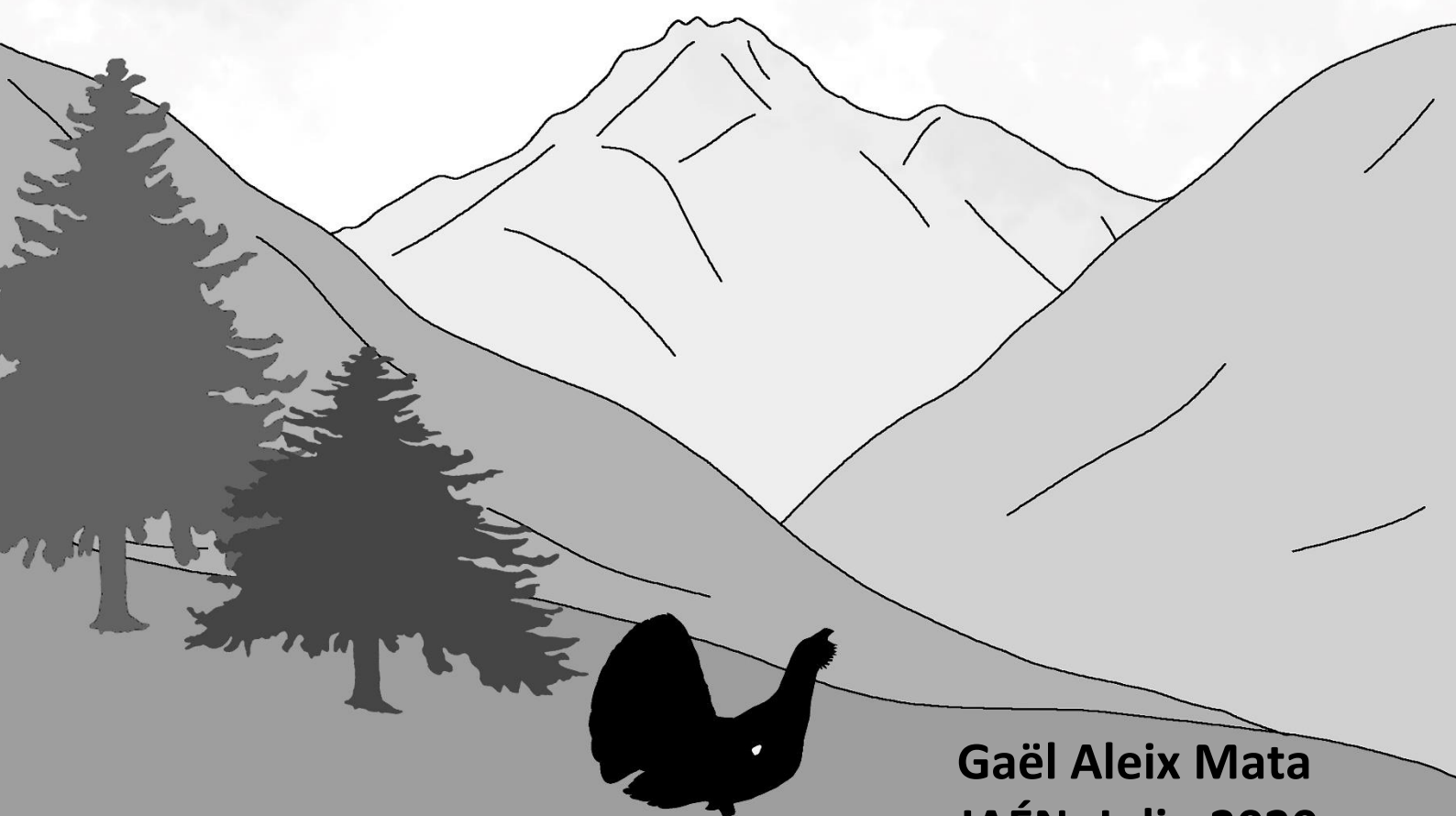
ISBN 978-84-9159-387-4



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

MONITORIZACIÓN DE POBLACIONES DE TETRAÓNIDOS EN LOS PIRINEOS MEDIANTE MÉTODOS NO INVASIVOS



**Gaël Aleix Mata
JAÉN, Julio 2020**



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL



**MONITORIZACIÓN DE POBLACIONES
DE TETRAÓNIDOS EN LOS PIRINEOS
MEDIANTE MÉTODOS NO INVASIVOS**

PRESENTADA POR:

Gaël Aleix Mata

DIRIGIDA POR:

Jesús M^a Pérez Jiménez

Antonio Sánchez Baca

JAÉN, julio de 2020



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

Área de Zoología

El Dr. Jesús M^a Pérez Jiménez y el Dr. Antonio Sánchez Baca, Catedráticos de la Universidad de Jaén certifican que la Tesis Doctoral titulada: **“Monitorización de poblaciones de tetraónidos en los Pirineos mediante métodos no invasivos”**, que presenta Gaël Aleix Mata para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo a su juicio, los requisitos exigidos para esta presentación.

Jaén, 7 de julio de 2020

PEREZ JIMENEZ
JESUS MARIA -
73991577W

Digitally signed by PEREZ
JIMENEZ JESUS MARIA -
73991577W
Date: 2020.07.09 08:38:35
+02'00'

SANCHEZ BACA
ANTONIO -
74625080Q

Firmado digitalmente
por SANCHEZ BACA
ANTONIO - 74625080Q
Fecha: 2020.07.09
08:42:56 +02'00'

Dr. Jesús M^a Pérez Jiménez

Dr. Antonio Sánchez Baca

Memoria presentada por

Gaël Aleix Mata

Este trabajo, no hubiese sido posible sin el soporte logístico y la financiación de, la Fédération Nationale des Chasseurs (France) la Fédération Départementales des Chasseurs de l'Ariège et des Hautes Pyrénées (FNC-PSN-PR16-2014), La Fundacion para la Conservacion del Quebrantahuesos (FCQ-UJ-2017), el Govern d'Andorra (GA-UJ-2017), la Fédération Départementales des Chasseurs de l'Isère (FDC38-UJ-2018).

A todos vosotros, muchas gracias,

A vous tous, merci beaucoup,

A tots vosaltres, moltes gràcies,



A la meva Padrina,

*Pourtant que la montagne est belle
Comment peut-on s'imaginer
En voyant un vol d'hirondelles
Que l'automne vient d'arriver?*

Jean Ferrat, 1964

*¡Quién no recordará durante toda su vida el fragoso encuentro
con una de estas grandes tetraónidas en pleno bosque, o el
pavoneo de los gallos en celo en el amanecer de la montaña!*

Castroviejo, 1975

Agradecimientos.

Als meus Pares per haver estat sempre aquí i per haver-me recolzat en cada moment, així com en cada decisió important de la meva vida. Sense el vostre suport incondicional no crec que ara estigués en aquesta etapa, gràcies per creure en mi sempre. A la Margot pel teu suport i ajuda. A la Padrina Herminia, sense qui no hagués fet el Doctorat. Moltes gràcies per tot, us estimo molt.

Als meus Padrins i a la meva família per haver-me recolzat i ajudat sempre malgrat la distancia, sempre és un plaer retrobar-nos tots al voltant d'una bona taula. Moltes gràcies per tot!

A mis directores de tesis, hemos encontrado algún que otro bache en el camino, pero al final lo hemos logrado, ¡ha merecido la pena! Jesús, al terminar el Máster, me propusiste hacer la Tesis, cosa que descarté en su momento.... ¡y al final aquí estoy! ¡Gracias por tu ayuda, tu apoyo, y la confianza que en todo momento has depositado en mí! Antonio, has sido un gran descubrimiento en la tesis. Recuerdo que al principio te dije que la genética solo sería una herramienta para mi tesis... y al final, por tu forma de ser, tu pasión por el trabajo y por enseñar, has conseguido que cambie la bota por la bata. ¡Gracias por toda tu implicación! A los dos, muchas gracias por todo, ¡ha sido una etapa genial de la cual he salido más fuerte!

A Víctor, qué bien conocerte, gracias por todos estos buenos momentos y por haberme acogido como uno más de tus amigos. No te diré que ahora me gusta el sabor de la Cruzcampo, ¡pero sí que me encanta por los buenos momentos que me recuerda! ¡Gracias por todo de corazón!

A Feli, por todos estos momentos que hemos compartido, las cenas de vinos, los té, los cafés, los momentos de recreo entre trabajo y trabajo. Siempre es un placer hablar de lo que sea y pasar tiempo contigo. Tu guiri.

A Vero, por los vinos y los buenos ratos que hemos pasado y tus buenos consejos, sobre todo por estos últimos meses por videollamadas en los que has sido de gran ayuda. Recuerdos a Damián, ¡nos vemos pronto en vivo!

Agradecimientos.

A los Ecólogos, por estos buenos ratos en la UJA y fuera de ella:

Perea, el último ecólogo de la sala, ¡siempre es un placer compartir momentos contigo! Y por haber tenido la idea de los jueves de Sanatorio, aunque últimamente no se te ve el pelo y hemos tenido que cambiar de cuartel general. Lucia, gracias por tu buen rollo y tu amabilidad, tus ganas de hacer planes, siempre me lo he pasado genial, aunque a veces se me ha ido de las manos... ¡a ver si nos vemos pronto que ya va siendo hora! Ana, por tu buen humor, las risas, tu dinamismo, ¡La sala sin ti no hubiese sido lo mismo! Jorge, por los buenos ratos escalando y las buenas charlas a pie de vía o por el monte. A ver si nos vemos que desde que te has ido a Sevilla....

A los demás Ecólogos Rubén, Carlos, José Luis, Paco, Luisa, Dayana, Gema y Miguel por los buenos momentos que hemos compartido, en casas rurales, por Sevilla, y espero que en más sitios en el futuro.

Al Marc, gràcies per tot el que he après des que treballem junts, gràcies per haver compartit tot el que saps, sempre és un plaer fer feines i col·laborar amb tu. Gràcies també per totes les teques, els bons vins, els bon moments i converses que hem tingut.

A Evelyn, sans toi je crois que je n'en serais pas là aujourd'hui, merci de m'avoir poussé à franchir le pas, ça a été long mais petit à petit ça porte et ça va porter ces fruits. Merci aussi pour les bonnes bouffes, les bonnes journées de comptages et les bons moments en montagne. C'est toujours un plaisir de venir en Ariège!

A Pierre, pour ta bonne humeur en toutes circonstances et pour toutes ces rigolades. Merci aussi pour avoir partagé ton expérience au coq, tu es vraiment un pro! Sans toi les comptages ne seraient pas pareils!

A toda la gente del laboratorio de la tercera planta, no hemos compartido muchos momentos, ¡pero siempre es un placer y una risa juntarse con vosotros!

A Juani, sin ti los días de laboratorio no serían tan amenos, siempre dispuesta a ayudar y a facilitarnos la vida, ¡eres un primor y sin ti el laboratorio no sería lo mismo!

Agradecimientos.

A Ricardo Oya del CICT, por tu eficacia y disponibilidad para leer las placas y siempre resolver los problemas que he podido tener con mi historia de amor-odio con el GeneMapper.

A Mrs. Les Présidents Fernandez, Baudin, Massenet, Schraen, Dufresne et Delcasso, pour avoir cru, soutenu, défendu et financé ce projet d'étude. J'espère que les résultats obtenus vous conviennent, et qu'avec les résultats à venir ils vous permettront de répondre à vos attentes. Merci de votre confiance.

Als meus amics d'Andorra. No és fàcil amb la distància i ens veiem menys del que m'agradaria, però sempre és un autèntic plaer compartir moments amb vosaltres. Gràcies per tots els bons moments i ja sabeu que podeu baixar quan vulgueu.

Al Jordi i al Edgar, per els moments i les discussions compartides, gràcies als dos i a tu Edgar per deixar-me algunes fotos per il·lustrar la Tesis.

A Greg de la FDC 65 et ses collègues pour avoir fait tout le travail de terrain, ça a été difficile de pouvoir se voir durant les saisons de comptages, mais vous avez été au top. A Estelle de la FDC 38 et ses collègues pour la réalisation de comptages au lagopède alpin, ça n'a pas toujours été facile sur Skype ou par mail mais à la fin on y est arrivés.

Als agents del Cos de Banders del Govern d'Andorra i en especial a l'Alex, per haver participat en els recomptes de perdiu blanca, sempre és un plaer col·laborar amb gent tan apassionada per la seva feina i la muntanya.

También quiero dar las gracias a Alexandra Elbakyan por el desarrollo de su maravillosa herramienta que me ha facilitado mucho el trabajo bibliográfico.

Índice.

Resumen	3
Abstract.....	5
Capítulo 1: Introducción general	7
1.1. Especies objeto de estudio	9
1.2. Estatus y estado de conservación.....	19
1.3. Metodologías de monitoreo de las poblaciones	22
1.4. Conocimiento genético de las especies.....	29
1.5. Tabla resumen	31
Capítulo 2: Objetivos	33
Capítulo 3: Material y métodos.....	39
3.1. Urogallo: área de estudio y conteos.....	41
3.2. Lagópodo alpino: área de estudio y conteos	44
3.3. Muestreos no invasivos y análisis genéticos	47
3.4. Caracterización genética	54
Capítulo 4: Resultados y discusión	57
4.1. Comparing methods for estimating the abundance of western capercaillie <i>Tetrao urogallus</i> males in Pyrenean leks: singing counts versus genetic analysis of non-invasive samples.....	59
4.2. Complete mitochondrial genome of the western capercaillie <i>Tetrao urogallus</i> (Phasianidae, Tetraoninae)	75
4.3. Distance sampling vs. Plot sampling for monitoring population abundances of the Pyrenean rock ptarmigan	101
4.4. Comparing methods for estimating the abundance of rock ptarmigan <i>Lagopus muta</i> males: Distance Sampling versus Non-Invasive Sampling and Genetic Analysis.	125

Índice.

4.5. Sex ratio of Alpine and Pyrenean rock ptarmigans <i>Lagopus muta</i> estimated by non-invasive methods and by hunting bag data.....	147
Capítulo 5: Discusión general.....	173
5.1. Aspectos metodológicos.....	175
5.2. Urogallo	180
5.3. Lagópodo alpino	185
Capítulo 6: Conclusiones.....	193
Bibliografía	197

Resumen.

La obtención de estimaciones precisas del número de individuos es crucial para un manejo adecuado de las poblaciones de animales silvestres. Sin embargo, la obtención de estimaciones fiables, y en particular en el caso de ciertas especies de aves, no es tarea fácil. El urogallo (*Tetrao urogallus*) y el lagópodo alpino (*Lagopus muta*), son dos especies de tetraónidos que se quedaron aisladas en los macizos montañosos del sur de Europa después de las últimas glaciaciones. En los últimos años pocos son los trabajos desarrollados para evaluar la eficiencia y la exactitud de las metodologías empleadas para la estimación poblacional de estas aves. En esta tesis el principal objetivo ha sido evaluar las metodologías disponibles para estimar el número de los individuos de estas especies, y proponer métodos de estimación alternativos y más precisos.

En el urogallo, se compararon el número de machos detectados a partir de recuentos de cantos desde un escondite, método tradicional de seguimiento para esta ave, con el número de individuos detectados a partir de un muestreo no invasivo (heces) y análisis genéticos. Los recuentos de cantos tienden a subestimar el número de machos de un cantadero, por lo que el método basado en el genotipado de las heces puede ser una buena alternativa para la monitorización de poblaciones de esta especie. Por otro lado, a partir de una secuenciación a baja cobertura del genoma de *T. u. aquitanicus* se ensambló y describió el genoma mitocondrial de esta subespecie de urogallo endémica de los Pirineos. El genoma mitocondrial del urogallo es similar en tamaño y en organización a los genomas mitocondriales descritos en otras especies de galliformes. Además, con los análisis filogenéticos realizados usando el genoma mitocondrial se confirmó la filogenia establecida para este Orden de aves.

En el lagópodo alpino, a partir una misma base de datos de conteos de los machos de esta especie desde puntos fijos (Point-count), se calcularon las densidades con dos metodologías diferentes: Plot Sampling (muestreo por parcelas) y Distance Sampling (muestreo por distancias). Demostrándose que Distance Sampling es una mejor metodología que Plot Sampling para estimar las densidades de esta especie a partir de Point-counts, proporcionando densidades más elevadas y más precisas. Además, en tres zonas de estudio, se compararon las densidades obtenidas mediante Point-count y Distance Sampling, y mediante un

Resumen.

muestreo no invasivo (heces) y análisis genéticos. Los muestreos no invasivos y análisis genéticos pueden ser una buena herramienta para estimar el número de individuos de las poblaciones de lagópodo alpino. Finalmente, se estimó la proporción de sexos de esta especie con dos aproximaciones diferentes: a partir de los datos de los muestreos no invasivos y análisis genéticos, y mediante las estadísticas de caza. Mediante los muestreos no invasivos se obtuvo una proporción de sexos equilibrada, además se confirmó que los parámetros estimados a partir de las estadísticas de caza pueden estar sesgados debido a factores intrínsecos o extrínsecos.

De forma general, la metodología basada en muestreos no invasivos y análisis genéticos desarrollada en esta tesis permite estimar de forma más precisa y con menos sesgos los parámetros demográficos (número de individuos y proporción de sexos) que las metodologías empleadas tradicionalmente (recuentos de cantos y análisis de estadísticas de caza). Además, esta metodología puede ser una buena alternativa a los conteos tradicionales, ya que permite obtener más información, con un coste similar, y causando menos perturbaciones a los individuos de estas especies.

Palabras clave: Estima del número de individuos, Genoma mitocondrial, Lagópodo alpino, Muestreo no invasivo y análisis genéticos, Muestreo por parcelas, Muestreo por distancias, Pirineos, Proporción de sexos, Urogallo,

Abstract.

Obtaining accurate estimates of the abundance of individuals is crucial for proper management of wildlife populations. However, obtaining reliable estimates, particularly of bird species, is not a simple task. The western capercaillie (*Tetrao urogallus*) and the rock ptarmigan (*Lagopus muta*) are two tetraonid species that were isolated in the southern European mountain ranges after the last glaciations. During the last years, few studies have been carried out to evaluate the efficiency and accuracy of the methodologies used to estimate population size of these birds. The main objective of this study was to evaluate the available methodologies to estimate the abundance of individuals of these species, and to propose alternative and more precise estimation methods.

Regarding the western capercaillie, the number of males detected from singing counts, the traditional monitoring method for this bird, was compared with the number of individuals detected from non-invasive sampling (faeces) and genetic analysis. Since singing counts tend to underestimate the number of males in a lek, the method based on non-invasive sampling and genetic analysis can become a good alternative for monitoring this species. Moreover, from a low-coverage sequencing of the genome of *T. u. aquitanicus*, the mitochondrial genome of this subspecies of capercaillie endemic to the Pyrenees was assembled and described. The mitochondrial genome of the western capercaillie was similar in size and organization to the mitochondrial genomes described for other Galliformes species. Furthermore, with the phylogenetic analyses performed using the mitogenome, the phylogeny established for this Order of birds was confirmed.

For rock ptarmigan, using the same database of Point-counts of the singing males, densities were calculated with two different methodologies: Plot Sampling and Distance Sampling. Proving that Distance Sampling is more reliable methodology than Plot Sampling for estimating the densities of this species from singing males Point-counts, providing higher and more precise densities. In addition, in three study areas, densities obtained from Point-counts and Distance Sampling, and by non-invasive sampling (faeces) and genetic analysis were compared. Non-invasive sampling and genetic analysis can become a good tool for monitoring the abundance of rock ptarmigan populations. Finally, the sex ratio of this species was estimated with two different approaches, using data from non-invasive sampling and

Abstract.

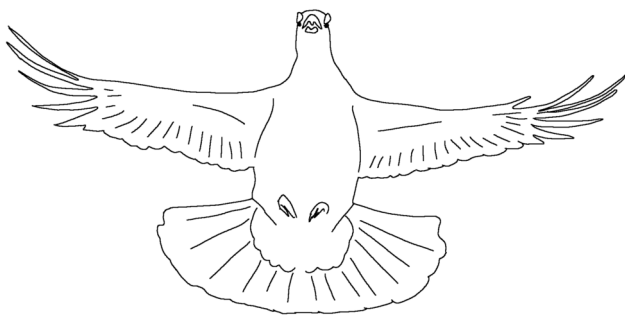
genetic analysis, and using the hunting bag data. Data obtained from non-invasive sampling allowed us to obtain a balanced sex ratio of adult rock ptarmigan; moreover, results obtained from the hunting bag data may be biased due to intrinsic or extrinsic factors.

In general, the non-invasive sampling and genetic analysis methodology developed in this study allows to estimate more precisely and with less bias the demographic parameters (number of specimens and sex ratio) than the traditionally employed methodologies (song counts, hunting bag data). In addition, this methodology can be a good alternative to traditional counts, since they allow to obtain more information, with a similar cost, and producing less disturbance to the specimens of these species.

Keywords: Abundance Estimate, Distance Sampling, Mitochondrial Genome, Non-invasive Sampling and Genetic Analysis, Pyrenees, Plot Sampling, Rock ptarmigan, Sex Ratio, Western Capercaillie.

Capítulo 1:

Introducción general



1.1. Especies objeto de estudio.

El Orden de las Galliformes contiene alrededor de 290 especies de aves, de las cuales aproximadamente el 10 % están catalogadas como en peligro (EN) o en peligro crítico de extinción (CR) (del Hoyo et al. 1994; Hosner et al. 2016; IUCN 2019). Tradicionalmente este Orden estaba dividido en siete familias: Megapodiidae, Cracidae, Odontophoridae, Numidae, Phasianidae, Meleagridae y Tetraonidae (del Hoyo et al. 1994). Recientemente se ha propuesto que incluya solo cinco familias, con Meleagridae y Tetraonidae como subfamilias de la familia Phasianidae (Wang et al. 2013). La familia Phasianidae cuenta con más de 150 especies, distribuidas por todo el mundo (Johnsgard 1986; Fuller y Garson 2000; Fuller et al. 2000). El urogallo, *Tetrao urogallus* (Linnaeus, 1758), y el lagópodo alpino, *Lagopus muta* (Montin, 1781), son dos especies de tetraónidos distribuidas exclusivamente en el hemisferio norte y ligadas a ambientes fríos: pasan el invierno en hábitats septentrionales o montañosos sin migrar (Watson y Moss 2008). Ambas especies poseen características anatómicas y fisiológicas que les permiten soportar las bajas temperaturas y las condiciones extremas de los ambientes en los que habitan. Como muchos tetraónidos tienen las plumas desdobladas con un plumón, llamado hyporachis, que les confiere un mayor aislamiento térmico, además el plumaje de invierno es más denso y con plumas más largas (Couturier 1964; Couturier y Couturier 1980; Watson y Moss 2008; Nord y Folkow 2018). Con este mismo fin, ambas especies tienen los tarsos y las fosas nasales emplumadas evitando de esta manera la pérdida de calor (Nord y Folkow 2018). Además, en invierno para tener una mayor superficie de pisada el lagópodo alpino tiene los dedos emplumados y el urogallo con escamas actuando como raquetas de nieve que les permiten poder andar por la nieve fresca sin hundirse (Drovetski 1992; Watson y Moss 2008).

A continuación, describiremos los aspectos principales de estas dos aves, prestando especial atención al área de distribución, a los aspectos morfológicos y al comportamiento reproductivo, dado que estas aves crípticas van a cantar y exhibirse durante el cortejo, y es en este momento en el que se realizan los conteos para las estimas poblacionales.

El Urogallo.

El urogallo es el ave de caza más grande de los bosques boreales y montanos del Paleártico Occidental, y es considerada como especie paraguas en los bosques boreales, dado que su presencia es un indicador de elevada biodiversidad (Suter et al. 2002; Pakkala et al. 2003). Es la especie mejor conocida y con la mayor distribución del género *Tetrao*, estando ampliamente distribuida en toda Eurasia. Está presente de forma continua en las partes orientales y septentrionales de Europa y Asia, desde Siberia hasta Fenoescandinavia y Bielorrusia (Storch 2000; Duriez et al. 2007; Storch 2007). Las poblaciones de Europa Central y Occidental están más fragmentadas y restringidas a cadenas montañosas aisladas como los Pirineos (Francia, Andorra y España) y la Cordillera Cantábrica (España) (de Juana 1994; Storch 2000). Estas poblaciones ocupan el límite meridional de su área de distribución (Hampe y Petit 2005; Segelbacher y Piertney 2007). En estas cordilleras se encuentran dos subespecies endémicas: *T. urogallus aquitanicus* (Ingram 1915) en los Pirineos y *T. urogallus cantabricus* (Castroviejo 1967) en la Cordillera Cantábrica. Ambas subespecies están bien diferenciadas, tanto morfológica como molecularmente, en comparación con el resto de las poblaciones de urogallos del este de Europa (Castroviejo 1975; Couturier y Couturier 1980; Duriez et al. 2007; Segelbacher y Piertney 2007; Homel et al. 2019).

En este trabajo nos vamos a centrar en la subespecie pirenaica *T. urogallus aquitanicus*. En los Pirineos encontramos el urogallo en los tres países de la cordillera: Francia, Andorra y España. En la vertiente francesa está presente de manera continua desde el macizo del Canigó al Este (departamento de los Pirineos Orientales), hasta el valle de Larrau al Oeste (departamento de los Pirineos Atlánticos) con un área de distribución de 5835 km² (Couturier y Couturier 1980; Ménoni 2006). En Andorra el urogallo está presente en la mayoría de los bosques de coníferas del Principado en aproximadamente 166 km² (32 % del territorio). La población andorrana se encuentra relativamente bien conectada con su vecina española mientras que permanece aislada de la francesa debido a la altitud de las cumbres de la frontera con Francia (punto más bajo, 2260 m) (Mossoll-Torres 2006; Mossoll-Torres y Ménoni 2008). En el Pirineo español, la distribución de la especie es más discontinua y forma dos núcleos poblacionales: uno oriental, el más grande, que se extiende desde el Valle de Ter

(provincia de Gerona) hasta el valle de Cinca (provincia de Huesca), y otro, más pequeño, en la zona fronteriza entre el extremo noreste de Navarra y la provincia de Huesca. Para ambos núcleos, se estima un área de distribución de 5700 km² (Canut et al. 2004a; 2004b; Ballesteros et al. 2006). En conjunto, las áreas de distribución francesa, andorrana y española referenciadas anteriormente suman un total de 11701 km², superficie ligeramente inferior a la estimada para el conjunto de los Pirineos por Ménoni et al. (2004) (Fig. 1).

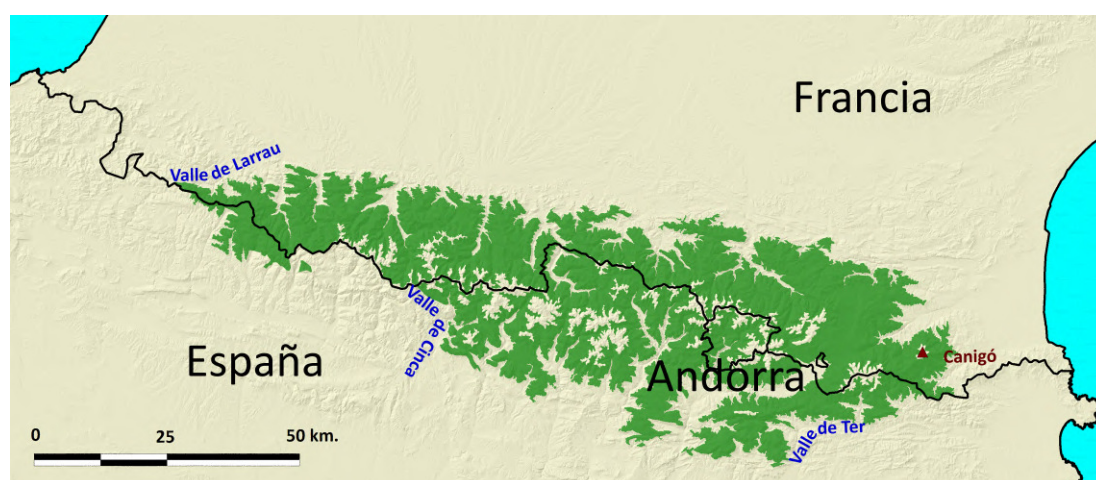


Figura 1. Área de distribución del urogallo (*Tetrao urogallus aquitanicus*) en el Pirineo (en verde), según: Canut et al. (2004a; 2004b), Ménoni et al. (2004), Ballesteros et al. (2006), Ménoni (2006), Mossoll-Torres (2006), Mossoll-Torres y Ménoni (2008); Gil et al. (2020).

El urogallo es una especie ligada a los bosques boreales que, a lo largo de su área de distribución, presenta una gran plasticidad con respecto a los tipos de bosque en los que habita (Storch 2007). La localización geográfica y la orografía del macizo pirenaico permiten que éste reciba tanto la influencia atlántica como la mediterránea y que sus bosques sean muy variables (Duriez et al. 2007). Así la vertiente francesa tiene un clima más húmedo, marcado por la influencia atlántica, mientras que la vertiente española tiene un clima relativamente seco, marcado por la influencia mediterránea (López-Moreno y Vicente-Serrano 2007). Estas características, hacen que haya una marcada diferencia entre los bosques de la vertiente norte del Pirineo y los de la vertiente sur. Podemos describir un gradiente en las especies vegetales que forman los bosques de Noroeste a Sureste: i) bosques de hayedos puros (*Fagus sylvatica*), ii) hayedos mixtos con abetos (*Abies alba*), iii) bosques de pino negro (*Pinus mugo uncinata*), y iv) bosques de pino silvestre (*Pinus silvestris*), en la

parte más mediterránea (Ménoni et al. 2004). El urogallo está presente en todos estos tipos de bosque, desde los 900 m hasta los 2400 m de altitud (Ménoni 1997; Mossoll-Torres y Ménoni 2008). La estructura abierta de los bosques y la presencia de un estrato arbustivo con arándano (*Vaccinium myrtillus*) y otros arbustos ericáceos como el rododendro (*Rodhodendron ferroginosus*) que le proporcionan cobijo y protección también son primordiales para esta especie (Ménoni 1991; Storch 2007). Las especies de coníferas, como los abetos o los pinos también son especies clave para el urogallo. En los Pirineos estas plantas constituyen su principal alimento en invierno, época durante la cual el ave limita al máximo sus movimientos para evitar gastos de energía innecesarios y consume hasta 500 g al día de estos alimentos poco calóricos (Gjerde y Wegge 1987; Sachot et al. 2002; Odden et al. 2003; Mossoll-Torres 2011).

El urogallo es el ave más grande de su género (del Hoyo et al. 1994) pudiendo alcanzar los machos más grandes de la subespecie *T. urogallus major* del centro de Francia los 8 kg (Couturier y Couturier 1980; Ménoni 1991). La subespecie pirenaica es ligeramente más pequeña que sus vecinas de la Cordillera Cantábrica, del centro de Francia o de los Alpes (Castroviejo 1975; Couturier y Couturier 1980).

Los machos de urogallo, también llamados gallos, tienen un peso medio en los Pirineos de alrededor de los 3,5 kg, aunque los machos más grandes pueden llegar excepcionalmente a los 5 kg, y tienen una envergadura media de alrededor de 120 cm (Castroviejo 1975; Couturier y Couturier 1980). Presentan un plumaje dominado por el negro pizarra con reflejos metálicos azulados y verdosos en el cuello y el abdomen, las alas son marrones con reflejos rojizos con una mancha blanca en la base (Fig. 2). En época de celo, durante los cortejos los machos exhiben la cola, desplegándola en forma de abanico. Ésta es negra, moteada de manchas blancas, con un patrón característico a cada individuo que puede ser usado para diferenciarlos en una misma zona (Leclercq 1988). El pico en forma de gancho es robusto de color blanco hueso, en la barbilla poseen una barba negra que erizan durante el canto. Por encima de los ojos poseen una ceja verrugosa roja llamada carúncula, que en época de celo aumenta de volumen en función de la actividad endocrina del individuo (Castroviejo 1975; Couturier y Couturier 1980) (Fig. 2). Las hembras de urogallo o gallinas,

son muy diferentes a los machos, siendo un 40 % más pequeñas, con un peso medio en los Pirineos de alrededor de los 1,5 kg, pudiendo llegar a los 2 kg, con una envergadura media de unos 90 cm (Castroviejo 1975; Couturier y Couturier 1980). Tienen un plumaje de un color pardo, barrado y moteado, que es más rojizo en la parte delantera del cuello y el pecho. Como en muchas otras especies de aves, las hembras de urogallo son menos conspicuas que los machos lo que les permite camuflarse y pasar desapercibidas (Castroviejo 1975; Couturier y Couturier 1980) (Fig. 2).



Figura 2. Fotografía de una hembra (izquierda) y de un macho de urogallo (derecha) durante la época de celo, al que se le puede apreciar bien la barbilla erizada y la carúncula roja. Imagen cedida por Edgar Madrenys.

Los tetraónidos se encuentran entre las aves que tienen una organización social y un comportamiento reproductivo más impresionantes (Couturier 1964; Wiley 1974). Muchas de ellas son polígamas y los machos se organizan en cantaderos o leks para defender sus territorios, cantar y aparearse (Castroviejo 1975; Couturier y Couturier 1980; Johnsgard 1986; Watson y Moss 2008; Cayuela et al. 2019). Los cantaderos son los sitios de apareamiento, son territorios de exhibición y de canto de los machos, donde van a interactuar entre ellos para defender sus territorios, y establecer una jerarquía, con el fin de atraer a las hembras y emparejarse (Couturier 1964; Wiley 1974; Elianssen y Wegge 2007; Watson y Moss 2008; Wegge et al. 2013; Cayuela et al. 2019). Solo los machos de más de dos años participan en la reproducción y es generalmente el macho dominante del cantadero el que cubre la mayoría de las hembras (Wegge y Larsen 1987). Los machos de menos de dos años no participan a la reproducción y establecen territorios periféricos pudiendo visitar varios cantaderos (Wegge et al. 2013; Mollet et al. 2015). Una característica importante del

urogallo pirenaico, así como del cantábrico, es que sus cantaderos son relativamente pequeños, variando entre 10-15 ha hasta 30 ha en algunos casos, en comparación con los cantaderos de Rusia, Finlandia o Noruega que pueden llegar a las 100 ha (Castroviejo 1975; Couturier y Couturier 1980; Catusse y Novoa 1993; Ménoni 1997). En los Pirineos, los cantaderos están distribuidos de forma regular a unas distancias de entre 1500 y 2000 m (Ménoni 1991; Mossoll-Torres y Ménoni 2008). La localización de los cantaderos es la misma de un año a otro (aunque puede haber pequeñas variaciones), en los Pirineos su localización está relacionada con la proximidad de los territorios de nidificación de las hembras que, en esta especie polígama, son las que se encargan de criar los pollos (Ménoni 1991; Ménoni 1997; Wegge et al. 2010).

El Lagópodo alpino.

El lagópodo alpino (*Lagopus muta*) está presente exclusivamente en el hemisferio norte donde tiene una distribución circumpolar, distribuyéndose a través de la tundra ártica y alpina de Norteamérica y del norte de Eurasia, lo que hace que sea el ave con la distribución más amplia de su género (Storch 2007; Watson y Moss 2008). Las poblaciones más septentrionales se encuentran en el norte de Groenlandia, y las más meridionales en los Pirineos, en Bulgaria, en las montañas del Pamir (Tayikistán) y en Japón (Storch 2000; 2007). La población pirenaica de lagópodo alpino es una reliquia glacial de las poblaciones que se refugiaron en este macizo tras el aumento de las temperaturas y el retroceso de los glaciares que cubrían Europa durante el Cuaternario (Taberlet et al. 1998; Caizergues et al. 2003). Por este motivo esta especie es un excelente indicador para monitorear los cambios ambientales (Martin 2001; Bech et al. 2013). En los Pirineos encontramos a la subespecie *Lagopus muta pirenaica* (Hartet 1921), endémica de este macizo, y que presenta una diferenciación genética clara con respecto a las poblaciones de los Alpes o de Noruega (Caizergues et al. 2003).

En los Pirineos el lagópodo alpino está presente en los tres países de la cordillera, Francia, Andorra y España (Marty y Mossoll-Torres 2012). Se localiza en altitudes superiores a los 1800 m, presentando una distribución relativamente continua por la línea fronteriza Francia-Andorra-España (Canut et al. 2004c; Bech 2010; Bech et al. 2013; Marin-Cudraz et al. 2019).

Sin embargo, en los extremos oriental y occidental de los Pirineos encontramos diferentes núcleos poblacionales aislados. Al Este encontramos uno aislado por el valle del Segre, que separa el Macizo del Canigó del resto del Pirineo (Novoa y Gonzalez 1988; Gonzalez y Novoa 1989; Bech 2010; Bech et al. 2013). El resto de la población se extiende al Oeste de este valle de manera casi continua hasta la parte alta del Valle de Aspe por la parte francesa y hasta el Macizo de Larra formando una serie de pequeños núcleos poblacionales aislados (Canut et al. 1987; Canut et al. 2004c) (Fig. 3). En consecuencia, la población total en ambas vertientes del Pirineo ocupa un área de 3330 km² (Canut et al. 2004c).



Figura 3. Área de distribución del lagópodo alpino (*Lagopus muta pyrenaica*) en el Pirineo (en verde), según: Canut et al. (1987), Novoa y González (1988), González y Novoa (1989), Canut et al. (2004c), Bech (2010), Bech et al. (2013).

El lagópodo alpino vive por encima del límite superior de los bosques, hasta las más altas cumbres del macizo (Boudarel 1989; Canut et al. 2004c; Marty y Mossoll-Torres 2012). La altitud y la orientación son dos factores clave para caracterizar el hábitat de esta ave, ya que, por su origen ártico, tiende a seleccionar las altitudes más elevadas y las orientaciones más frías de las laderas de las montañas, buscando las condiciones climáticas que le son más favorables (Couturier 1964; Favaron et al. 2006; Nelli et al. 2013; Bisi et al. 2017). Por otra parte, se han detectado movimientos altitudinales de los individuos de esta especie en función de la época del año (Boudarel 1989; Favaron et al. 2006; Nelli et al. 2013). Así, en invierno, las altitudes en las que se encuentran suelen ser más bajas que durante el resto del año (Favaron et al. 2006). Es decir, se aprecia cómo los lagópodos descienden en altitud, buscando las zonas menos nevadas, donde es más fácil encontrar alimento y protección,

usando para ello el límite superior del bosque (Boudarel 1988; 1989). Su hábitat es por lo tanto de tipo alpino, mayormente dominado por las zonas rocosas (Favaron et al. 2006; Nelli et al. 2013; Bisi et al. 2017), tal y como indica su nombre común inglés: rock ptarmigan. Por lo tanto, su hábitat se caracteriza por una vegetación escasa con festucas (*Festuca* spp.), algunas leguminosas como el regaliz (*Trifolium alpinum*), así como algunos arbustos ericáceos, como el arándano (*Vaccinium myrtillus* o *V. uliginosum*), los rododendros y las azaleas (*Loiseleuria procumbens*) (García-González et al. 1987; Boudarel 1989; Favaron et al. 2006; Nelli et al. 2013).

El lagópodo alpino es una especie críptica muy discreta y difícil de observar puesto que se mimetiza perfectamente con su hábitat debido a un patrón de muda característico (Salomonsen 1939; Favaron et al. 2006; Pyle 2007; Pedersen et al. 2012). Los lagópodos alpinos mudan las plumas del cuerpo tres veces al año, dos mudas parciales en primavera y en verano, y una muda completa en otoño. Sin embargo, la muda de las alas se realiza solo una vez al año durante el verano (Pyle 2007). La muda completa del cuerpo en otoño hace que estas aves sean completamente blancas y que se mimeticen con el ambiente nevado durante el invierno (Salomonsen 1939) (Fig. 4). Las mudas parciales tienen lugar en primavera y verano, de manera que los lagópodos pasan progresivamente del blanco invernal a un color pardo-grisáceo muy críptico en verano, mimetizándose perfectamente con el ambiente estival de las zonas alpinas (Pyle 2007; Watson y Moss 2008) (Fig. 4). El plumaje blanco de invierno debe considerarse como el plumaje básico del lagópodo alpino, siendo las dos mudas parciales de primavera y verano presumiblemente adaptaciones a las estrategias de selección sexual y a la presión por depredación (Salomonsen 1939; Pyle 2007).

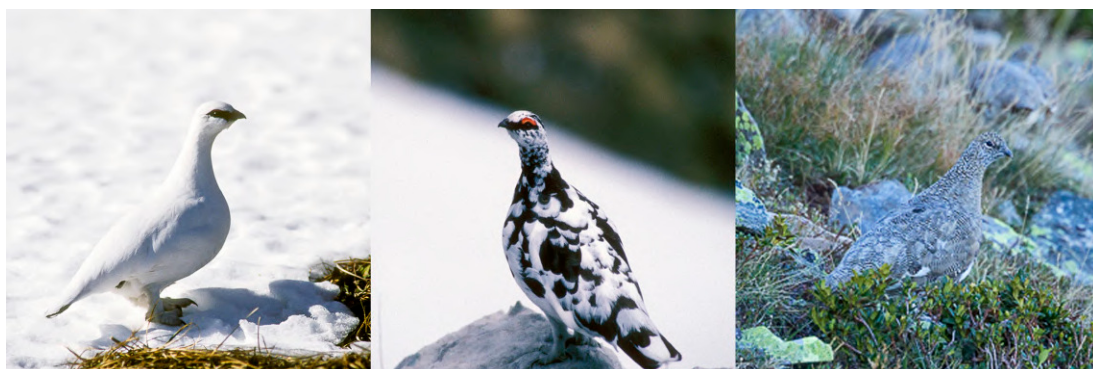


Figura 4. Fases del plumaje del lagópodo alpino (de izquierda a derecha) blanco en invierno, intermedio en primavera y otoño, y gris-marrón en verano. Imágenes cedidas por Bernard Bellon y Edgar Madrenys.

Este particular sistema de muda confiere a esta especie su mejor arma: el camuflaje. Además, los individuos también buscan las zonas que tienen un sustrato más cercano al color de su plumaje (Watson y Moss 2008) (p. ej. en primavera cuando la nieve se está derritiendo, y todavía no tiene el plumaje estival completo, tienen tendencia a agruparse en las manchas de nieve, y no en los espacios libre de nieve). Otra particularidad del lagópodo alpino es que su cola es siempre de color negro, independientemente de la época del año, habiéndose postulado que puede actuar a modo de señuelo en caso de ataque de una rapaz dirigiendo su atención hacia la zona menos vulnerable de su anatomía (Couturier 1964).

El lagópodo alpino es un ave relativamente pequeña, con un dimorfismo sexual muy poco marcado (Wiley 1974). De hecho, en los Pirineos su peso es de 400-540 g para los machos y de 350-485 g para las hembras (Brenot et al. 2005), y su envergadura es de 63-65 cm en los machos y de 59-60,5 cm en las hembras (Couturier 1964). Aparte de esta ligera diferencia biométrica entre machos y hembras, es muy difícil determinar el sexo, pues a nivel de plumaje el lagópodo no presenta prácticamente ningún dimorfismo sexual, salvo una ligera banda negra a nivel de los ojos, que es más visible en los machos en el plumaje de invierno (Salomonsen 1939; Holder y Montgomerie 1993). Es en la época de celo cuando es más fácil distinguir ambos sexos, por su comportamiento y/o por la carúncula roja (ceja verrugosa) de los machos, que aumenta su volumen en función de la actividad hormonal, al igual que ocurría en los machos de urogallo (Watson y Moss 2008).

Las tres especies de lagópodos (*Lagopus* spp.), junto con el grévol común (*Tetrastes bonasia*), son las únicas cuatro especies de tetraónidos monógamas y que establecen parejas duraderas (Wiley 1974; Martin et al. 1995). Generalmente, la proporción de sexos de las aves monógamas está sesgada a favor de los machos (Wittenberger y Tilson 1980). En el lagópodo alpino, la proporción de sexos parece estar equilibrada, sin embargo, se han observado proporciones muy dispares en función de la época del año en la que se realiza el muestreo, como en invierno cuando las aves se agregan por sexos (Schwab et al. 2005). Además, los cálculos de la proporción de sexos pueden verse fácilmente afectados por la época del año, la metodología empleada y por sesgos durante la toma de los datos (Clutton-Brock 1986; Donald 2007). Así, en Escocia, en los adultos de esta especie, la proporción de sexos estimada mediante observaciones directas sobre varios años, puede variar y ser a favor de los machos (Watson 1965) o ser más equilibrada (Watson et al. 1998). En los Pirineos y los Alpes franceses un estudio de los individuos abatidos durante las temporadas de caza 1978 a 1995, concluye que esta especie tiene una proporción de sexos equilibrada (Ellison y Léonard 1996). Sin embargo, en norma general las estimaciones de la proporción de sexos obtenidas mediante este enfoque no suelen ajustarse a la proporción real de la población, debido a que los cazadores tienden a disparar preferentemente a los machos (Donald 2007). En los Pirineos y en los Alpes, desde los trabajos de Ellison y Léonard (1996), no se han realizado otros estudios sobre la proporción de sexos del lagópodo alpino y se ha asumido una proporción equilibrada (Caizergues et al. 2003; Novoa et al. 2011).

Por lo general, el comportamiento reproductor del lagópodo alpino pirenaico es comparable al que tiene la especie en otras zonas de su área de distribución (Alpes, Escocia, Canadá, etc.). En primavera, después de haber pasado el otoño y el invierno en bandadas, los lagópodos alpinos forman parejas estables y establecen sus territorios de reproducción distribuidos de forma uniforme en las laderas de las montañas (Wiley 1974; Bossert 1977; Boudarel 1987; Scherini et al. 2003; Favaron et al. 2006; Watson y Moss 2008). En zonas de los Alpes italianos se ha descrito que todas las hembras se aparean y se reproducen en su primer año (Scherini et al. 2003). Entre principios de mayo y mediados de junio, los machos van a realizar cantos territoriales para establecer y defender sus territorios, comunicarse y atraer a las hembras (Martin et al. 1995; Marin-Cudraz et al. 2019). Mayo es el mes en el que se registra la mayor

actividad de cantos, siendo las primeras horas del día cuando los machos de lagópodo alpino son más activos, y en concreto en los Pirineos la media hora que precede el amanecer (Marty y Mossoll-Torres 2012; Mossoll-torres y Marty 2012). Los cantos que realizan los lagópodos alpinos se pueden llegar a escuchar hasta 1 km de distancia (Favaron et al. 2006; Marty y Mossoll-Torres 2012), sin embargo, es muy difícil poder oírlos a partir de los 250 m (Marty y Mossoll-Torres 2012; Franceschi et al. 2014).

1.2. Estatus y estado de conservación.

A nivel mundial, tanto el urogallo como el lagópodo alpino están catalogados como preocupación menor (LC), ambos con una tendencia poblacional a la baja (IUCN 2019). Se estima que la población adulta mundial varía entre 3 y 5,5 millones de urogallos y entre 5 y 25 millones de lagópodos alpinos (IUCN 2019). A nivel europeo, el urogallo está considerado como preocupación menor (LC) tanto en los 27 países de la Comunidad Europea como en todo el continente europeo; está citado en el los Anexos I, IIB y IIIB de la Directiva Aves y en el Apéndice III de la Convención de Berna (BirdLife International 2015). El lagópodo alpino está considerado vulnerable (VU) en los 27 países de la Comunidad Europea y casi amenazado (NT) en todo el continente europeo. La subespecie *L. m. pirenaica* esta citada en los Anexos I, IIA y IIIB de la Directiva Aves y en el Apéndice III de la Convención de Berna (BirdLife International 2015).

Al ser los Pirineos una de las zonas más meridionales del área de distribución de estas dos aves, su estatus de conservación y de protección difieren de los estatus globales expuestos anteriormente, además también varían entre los tres Países que incluyen esta cordillera. En Francia, las dos especies son cinegéticas y el comité de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza de Francia (UICN France et al. 2016) considera al urogallo como vulnerable (VU) y al lagópodo alpino como casi amenazado (NT). La caza de los machos de urogallos está autorizada en los Pirineos, así como la de ambos sexos de lagópodo alpino tanto en los Alpes como en los Pirineos (Ménoni 2006; Storch 2007; FNC y ONCFS 2008). La caza de estas especies está sometida a diferentes restricciones y cuotas: periodo hábil de

caza corto (10 días); la caza no está autorizada en los espacios protegidos; número limitado de individuos cazados por cazador y día; los individuos cazados tienen que ser debidamente identificados y declarados (Storch 2007; FNC y ONCFS 2008). Además, la apertura de la temporada de caza se hace en función de éxito anual de la preproducción (FNC y ONCFS 2008).

En Andorra ambas especies gozan de protección desde el año 2001 (Llei 13/2012) y su caza está prohibida desde 1965 (Mossoll-Torres 2006). En España están totalmente protegidas y catalogadas como en peligro (EN) el urogallo pirenaico y vulnerable (VU) el lagópodo alpino (Ley 42/2007 y Real Decreto 139/2011).

Los datos sobre la demografía de estas dos especies son escasos (Gée et al. 2018). En las Tablas 1 y 2 se pueden ver resumidos los datos recopilados sobre los efectivos de estas especies en los Pirineos durante el período 1970 - 2013 (urogallo) y 2002 - 2007 (lagópodo alpino).

Tabla 1. Variación del número de urogallos en Francia, Andorra y España entre 1970 y 2013.

	1970 ^a	1975	1983-1991 ^a	2001 ^a	2005 ^a	2007 ^b	2008 ^c	2012-2013 ^d
Francia	7000♂	5000♂♀ ^e 2500♂♀ ^f	2170♂	1900♂	1800♂ / 3500-5000♂♀ ^g	3500- 6000♂♀*	-	1603-2228♂
Andorra	-	-	-	209♂	209♂	600♂♀	500- 600♂♀	-
España	-	-	942♂	703♂ / 689♂ ^h	562-573♂	2000♂♀**	-	-

^a Ballesteros et al. 2006; ^b Storch 2007; ^c Mossoll-Torres y Ménoni 2008; ^d Ménoni et al. 2014; ^e ONC 1977; ^f Couturier y Couturier 1980; ^g Ménoni 2006; ^h Canut et al. 2004a

* Efectivos estimados en el conjunto del Macizo central y los Pirineos franceses

** Efectivos estimados en el conjunto de los Pirineos españoles y la Cordillera Cantábrica

Tabla 2. Variación del número de lagópodos alpinos en Francia, Andorra y España entre 2002 y 2007.

	2002 ^a	2004 ^b	2007 ^c
Francia	4000♂♀	2000-6000♂♀	<20.000♂♀*
Andorra	-	-	1500♂♀
España	-	884-1476♂♀	1200♂♀

^a Bernard-Laurent et al. 2002; ^b Canut et al. 2004c; ^c Storch 2007

* Efectivos estimados en el conjunto de los Alpes y los Pirineos franceses

Por lo que se refiere a las tendencias de las poblaciones de urogallo, la población francesa muestra una tendencia negativa o estable (Canut et al. 2004a; Storch 2007). Las citas más recientes describen una cierta estabilidad en la tendencia del número de urogallos en el Pirineo francés (Ménoni et al. 2014; UICN France et al. 2016). En Andorra, Mossoll-Torres y Ménoni (2008) sugieren que la población se encuentra en buen estado; de hecho, con los

datos de la Tabla 1 y asumiendo una proporción de sexos de 1:1, sería el único país donde los efectivos son relativamente estables desde el 2001 al 2008. En la vertiente española, los datos más recientes sugieren que la especie se encuentra en regresión (Canut et al. 2004a; Storch 2007; Gil et al. 2020).

Las tendencias poblacionales del lagópodo alpino en el Pirineo francés son negativas según la UICN France et al. (2016), estando en riesgo de extinción el núcleo poblacional del Macizo del Canigó en el Este de los Pirineos (Novoa et al. 2011). En Andorra, se desconoce la tendencia poblacional de la especie (Storch 2007), pero es en la zona fronteriza entre el Principado de Andorra y la alta Ariège (395 km²) donde se dan las densidades poblacionales más elevadas (entre 9,06 y 10,7 machos/km²) de los Pirineos, e incluso de otras zonas del área de distribución de la especie (Canut et al. 2004c; Favaron et al. 2006; Zohmann y Wöss 2008; Marty y Mossoll-Torres 2012; Mossoll-Torres y Marty 2012). En el Pirineo español la tendencia poblacional de la especie es globalmente estable, pero existen núcleos poblacionales que están en regresión (Canut et al. 2004c).

Es difícil tener una idea clara y objetiva de las tendencias poblacionales de las dos especies, puesto que a medida que bajamos a escala regional o local, las estimaciones se basan en criterios menos objetivos (encuestas y en algunos casos solo recabando la opinión de expertos sin contar con datos de estimas poblacionales) (Charra y Sarasa 2018). Además, salvo en el Pirineo francés, donde se ha desarrollado un modelo de estimación global de los efectivos de urogallo (Ménoni et al. 2014), debido a la complejidad logística de realizar a gran escala este tipo de estimaciones no existen otras referencias de estimas poblacionales de todo el Pirineo (Canut et al. 2004a). Los estudios recogidos en las tablas anteriores presentan resultados dispares, puesto que se han realizado mediante diferentes métodos de campo y de estimación, por lo que, es difícil comparar y analizar con rigor los datos presentados. Así, en base a lo anteriormente expuesto queda claro que es necesaria la optimización y estandarización de los métodos utilizados para poder llevar a cabo estudios fiables y comparables de la dinámica poblacional de estas dos especies.

1.3. Metodologías de monitoreo de las poblaciones.

Las primeras referencias sobre técnicas de monitoreo de las poblaciones de urogallos y de lagópodos alpino datan de los años sesenta del siglo pasado. Durante estos años en los países nórdicos se desarrollaron bastantes metodologías para estimar el número de urogallos basadas principalmente en muestreos por transectos (mediante desplazamientos andando, en moto de nieve e incluso en avioneta) (Couturier y Couturier 1980). Otra metodología desarrollada en Finlandia para estimar el número de individuos de esta especie, así como de otras especies de tetraónidos, son las batidas en línea (Rajala 1966). En este caso, los observadores se colocan a una distancia de unos 20 m entre ellos y a medida que avanzan cuentan los individuos de urogallos que levantan el vuelo (Rajala 1966; 1974).

Fue también en la misma década cuando se realizaron las primeras estimas poblaciones de lagópodo alpino en el Parque Nacional de Cairngorms en el norte de Escocia (Watson 1965) o de lagópodo común (*Lagopus lagopus*) en la isla de Newfoudland en Canadá (Bergerud y Mercer 1966). En ambos trabajos se compararon diferentes metodologías de estimación, como captura-marcaje-recaptura (índice de Lincoln-Petersen) con aves anilladas, conteos desde avionetas, transectos recorridos con o sin perros, etc. Estos estudios coincidían en que las escuchas de los cantos de los machos en primavera (época de celo) es la técnica más adaptada para estimar el número de individuos de lagópodos presentes en un área (Watson 1965; Bergerud y Mercer 1966).

Es importante señalar que las técnicas mencionadas anteriormente se llevaron a cabo en su mayor parte en zonas con poco relieve, por lo tanto, tuvieron que ser adaptadas para poder realizar los conteos de estas aves en zonas montañosas, como los Pirineos y los Alpes (Boudarel 1989). A continuación, veremos las diferentes técnicas que se emplean para estimar los efectivos de estas dos especies en los Pirineos.

Metodologías de estimación poblacional para el urogallo en los Pirineos.

Se han llevado a cabo diferentes aproximaciones y metodologías para estimar los efectivos de urogallo en los Pirineos. Para estimar a escala del Pirineo francés el número de urogallos, en el año 1975 el “Office National de la Chasse” (ONC 1977) realizó una encuesta global a cazadores, guardas y agentes forestales. Con los resultados de esta encuesta se estimó que en 1975 había en el Pirineo francés alrededor de 5000 individuos de urogallos (machos y hembras). Sin embargo, Couturier y Couturier (1980) consideraron que este valor sobreestimaba el número “real” de individuos, que estaría alrededor de unos 2500 individuos. En 1983 se publica un primer informe donde se describen los protocolos para estimar el número de urogallos (ONC 1983). En éste se diferencian los protocolos que permiten conocer la tendencia evolutiva a corto plazo (conteo de los machos en los cantaderos, etc.), y los que permiten estimar datos sobre la dinámica de las poblaciones (batidas en línea, etc.) (ONC 1983). Entre los métodos que sirven para estimar la tendencia evolutiva a corto plazo de las poblaciones de urogallo, el más empleado en Europa es el conteo de los machos en los cantaderos en primavera (ONC 1983; Catusse y Novoa 1983; Storch 2007). Así, en los Pirineos las estimaciones de las tendencias poblacionales se basan en los resultados obtenidos a partir de este tipo de conteos (Canut et al. 2006; Ménoni et al. 2014).

La metodología de conteo de los machos de urogallo en los cantaderos empleada actualmente en los Pirineos se basa en los trabajos de Catusse y Novoa (1983) y Leclercq (1987). Se lleva a cabo en primavera, momento en el que los machos adultos de urogallo van a agruparse en los cantaderos para cantar y cortejar a las hembras (Catusse y Novoa 1983; Canut et al. 2006). Para realizar estos conteos, es imprescindible conocer con exactitud el emplazamiento de los cantaderos. También se recomienda realizar una prospección de la zona del cantadero para confirmar a partir de los indicios de presencia (excrementos, trazas sobre la nieve, plumas, etc.) el emplazamiento exacto, puesto que puede variar ligeramente de un año a otro (Lentner et al. 2018, Abrahams 2019). Este método consiste en realizar de madrugada un conteo de los machos de urogallo que se escuchan cantar y/o se ven desde un escondite, en el cual se pernocta para reducir las perturbaciones causadas a los individuos

de la especie (Catusse y Novoa 1983; ONC 1983). De esta forma los resultados que se obtienen son el número de machos y, si se pueden observar, también el de hembras diferentes presentes en cada cantadero. Canut et al. (2006) describen otra modalidad de esta metodología de conteo que llaman la “visita de madrugada”. Esta variante consiste en llegar de madrugada y realizar una aproximación a la zona del cantadero andando realizando paradas de escucha para determinar el número de machos presentes. Según estos autores, esta modalidad es más adecuada para cantaderos en los que solo hay uno o pocos ejemplares, o cuando se desconoce la ubicación exacta del cantadero (Canut et al. 2006). Sin embargo, esta segunda modalidad puede causar perturbaciones a los individuos si no se realiza correctamente. Por otro lado, no se han realizado estudios comparativos del número de machos detectados en un mismo cantadero a partir de cada modalidad (pernoctando en un escondite o visitándolo de madrugada).

Este método de conteo solo permite estimar el número de machos de la población adulta, y tiende a subestimarlos (ONC 1983; Storch 2007). De hecho, los machos jóvenes de urogallo (menos dos años) no participan activamente en la reproducción (establecen territorios periféricos al cantadero y no suelen cantar) y por lo tanto no suelen ser detectados con este tipo de conteo (Storch 1997; Wegge et al. 2003; Mollet et al. 2015). Por otro lado, estos conteos tampoco permiten obtener información válida sobre el número de hembras en una zona (Canut et al. 2006). En esta época del año, las hembras tienen una estrategia que consiste en visitar los cantaderos en oleadas sucesivas lo cual hace que sea difícil tener una buena aproximación del número de hembras presentes en la población (Storch 1997; Wegge et al. 2005). Otra limitación que tiene este método de conteo es que los propios observadores, por muy experimentados y cautelosos que sean, pueden afectar involuntariamente sobre la actividad del canto, y por lo tanto en los resultados (Abrahams 2019). Sin embargo, este método es el más empleado para estimar el número de machos de urogallo en los cantaderos tanto en los Pirineos (ONC 1983; Catusse y Novoa 1983; Canut et al. 2006) como fuera de ellos (Haysom 2013; Montadert 2013; Abraham y Denny 2018; Abraham 2019). El comportamiento tan espectacular de esta ave en el momento del celo (Castroviejo 1975), que es fácilmente observable a poca distancia de los escondites durante

los conteos, puede ser la razón por la que, aunque presentando ciertas limitaciones, este método sea tan utilizado.

En la vertiente francesa del Pirineo desde 2010 se ha puesto en marcha un modelo de predicción basado en la estadística bayesiana, aplicando el método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para estimar el número de machos de urogallo a escala del Pirineo francés (Ménoni et al. 2014). Este modelo utiliza los resultados de los conteos de los machos que se realizan en primavera en los cantaderos para extrapolar bianualmente el número de machos de urogallos del Pirineo francés (Ménoni et al. 2014). Sin embargo, los datos brutos en los cuales se basa el modelo son los resultados de los conteos de los machos en primavera, y como hemos visto anteriormente estos presentan ciertas limitaciones. Por lo tanto, los resultados de las estimaciones del número de urogallo en el Pirineo francés obtenidos a partir de este modelo, pueden suscitar ciertas dudas.

En la actualidad se están empleando técnicas basadas en el genotipado de muestras no invasivas de urogallo (heces o plumas) para estimar los efectivos de la especie en diferentes zonas. En las últimas décadas el desarrollo y la caracterización de microsatélites para el urogallo (Segelbacher et al. 2000; Piertney y Höglund 2001) y su uso en diferentes estudios (Jacob et al. 2010; Pérez et al. 2011; Mollet et al. 2015; Lentner et al. 2018) han hecho que estas técnicas se conviertan en una buena alternativa para monitorizar las poblaciones de urogallos. En los Alpes Suizos y en el Bosque Bohemiano (Alemania) para mejorar las estimaciones de las poblaciones se han utilizado métodos de estimación basados en el análisis genético de muestras no invasivas (heces) (Jacob et al. 2010; Rösner et al. 2014; Mollet et al. 2015). Los resultados obtenidos indican que las estimaciones del número de individuos obtenidas a partir de muestreos no invasivos (heces o plumas) y análisis genéticos son más elevadas que las obtenidas mediante los estudios de campo (conteos de los machos en los cantaderos o por batidas). Además, se considera que las estimaciones obtenidas a partir de muestreos no invasivos y análisis genéticos están más próximas al tamaño real de las poblaciones de urogallo (Lentner et al. 2018). Sin embargo, todavía no se ha analizado la relación existente entre el número de machos en un cantadero, obtenido a partir de conteos en primavera (Catusse y Novoa 1983; Canut et al. 2006) o a partir de muestreos no invasivos

y análisis genéticos. Los estudios de esta relación, podrán proporcionar información sobre parámetros clave como la probabilidad de detección de los machos de urogallo en un cantadero, sus potenciales desplazamientos entre cantaderos, etc. Esto permitirá además obtener datos fiables que puedan ser útiles para implementar modelos de estimación poblacional como el que se ha desarrollado en el Pirineo francés, o poder poner a punto nuevas metodologías para estimar de forma contrastada los tamaños poblacionales de esta especie.

Metodologías de estimación poblacional para el lagópodo alpino.

El lagópodo alpino es un ave muy críptica y discreta, lo cual hace que sea difícilmente observable. El mejor momento para realizar los conteos es en primavera, época de celo en la que los machos cantan y son más visibles ya que presenta el plumaje intermedio de muda (Watson 1965; Bergerud y Mercer 1966). Las primeras metodologías de conteo de esta especie se desarrollaron en zonas con poco relieve, por lo que se tuvieron que adaptar a las zonas montañosas del límite meridional de su área de distribución, los Pirineos y los Alpes (Boudarel 1989). Bossert (1977) adaptó las metodologías de conteos por escucha de los cantos de los machos al relieve de los Alpes suizos, definiendo el emplazamiento del observador con respecto a la zona que se quiere muestrear, las horas y la duración del conteo. El primer protocolo de conteo de los machos cantores de lagópodo alpino se publicó en 1995 por Léonard (1995), permitiendo obtener un índice de densidad de machos en un sector determinado, siendo el protocolo más empleado en los macizos montañosos europeos (Mossoll-Torres y Marty 2012). Existen dos variantes principales de estos conteos, mediante transectos preestablecidos donde se hacen paradas de escucha: Line-transect (Pelletier y Krebs 1997) o mediante puntos fijos de escucha: Point-count (Mossoll-Torres y Marty 2006; Nopp-Mayr y Zohmann 2008; Zohmann y Wöss 2008; Marty y Mossoll-Torres 2012). Siendo la variante del Point-count mucho más eficaz y adaptada a esta especie críptica (Mossoll-Torres y Marty 2012). El Point-count, consiste en que los observadores se distribuyen homogéneamente en la zona a muestrear en puntos fijos preestablecidos y toman nota y localizan las manifestaciones sonoras o las visualizaciones de los lagópodos alpinos (Léonard 1995; Mossoll-Torres y Marty 2006). Marty y Mossoll-Torres (2012) aportaron nuevos

elementos para mejorar esta metodología de conteo, detallando la distancia entre los observadores, que tiene que ser de entre 400 y 500 m, la época del año y las horas del día en las que se tienen que realizar los conteos.

Marty y Mossoll-Torres (2012) proponen que para obtener las estimas de la densidad a partir de cada Point-count, los datos se analicen mediante la metodología del Plot Sampling (muestreo por parcelas -PS-). Definiendo como parcela muestreada (Plot) el área de una circunferencia de 250 m de radio alrededor de los observadores (distancia a partir de la cual ya no se pueden escuchar la mayoría de los cantos). La densidad de machos por unidad de superficie se calcula dividiendo el número de machos de lagópodo alpino detectados dentro de la parcela predefinida durante el conteo entre la superficie de la misma (Mossoll-Torres y Marty 2006; 2012; Marty y Mossoll-Torres 2012). En el Pirineo francés también se emplea esta metodología, pero con la variante de que la parcela muestreada se define mediante un radio de 350 m alrededor de los observadores (Aubri 2011). Esto hace que las densidades obtenidas con ambas variantes no sean del todo comparables. De hecho, en ambas variantes se asume que, dentro de la parcela muestreada, definida por un radio de 250 m (Marty y Mossoll-Torres 2012) o de 350 m (Aubri 2011) alrededor de los observadores, se detectan todos los machos de lagópodo alpino que cantan. Sin embargo, esto genera incertidumbre sobre las estimaciones obtenidas, puesto que a medida que aumenta la distancia, la probabilidad de detección del canto de un lagópodo alpino disminuye (Franceschi et al. 2014).

Otra metodología empleada para estimar las densidades de lagópodo alpino, a partir de los datos de los Point-count, es el muestro por distancias (Distance Sampling -DS-) (Buckland et al. 2001). Contrariamente al Plot Sampling, Distance Sampling asume la posibilidad de que no se detecten todas las aves presentes en la zona (Buckland et al. 2008). Para aplicar esta metodología, se tienen que conocer las distancias entre el observador y cada uno de los especímenes detectados durante el Point-count. Estos datos (distancias de detección) se analizan con el programa Distance, que, aplicando una función de detección, calcula una estima de la densidad de forma más precisa y con menos sesgo, así como su coeficiente de variación asociado (Buckland et al. 2001).

En los Alpes italianos con una población simulada, basada en datos de conteos parciales, se ha estimado la densidad de machos de lagópodo alpino usando la metodología de Plot Sampling y de Distance Sampling (Franceschi et al. 2014). Los resultados mostraron que las estimas mediante Plot Sampling tienen una tendencia a la subestimación, mostrando densidades un 30 % inferiores respecto a las obtenidas mediante Distance Sampling. Además, las densidades estimadas mediante Distance Sampling resultaron ser más exactas y precisas en relación con los datos de la población simulada. Sin embargo, para la correcta aplicación de Distance Sampling a una población “real” de lagópodo alpino, se ha estimado que, en la realización de los Point-counts, se requieren de entre 4 a 5 observadores por km² (Franceschi et al. 2014). Debido a este elevado coste logístico, todavía no se ha podido estudiar la variabilidad de las densidades obtenidas a partir de Plot Sampling o de Distance Sampling sobre datos reales de Point-counts de lagópodo alpino.

Recientemente se han empleado técnicas de monitoreo acústico, basados en la grabación de los cantos de machos de lagópodo alpino mediante micrófonos automatizados y el posterior análisis de los fonogramas grabados para diferenciar cuantos individuos diferentes se han registrado (Marin-Cudaz et al. 2019). Este método de estimación es muy novedoso y permite reducir el trabajo de campo con respecto a otros métodos menos automatizados. Sin embargo, parece ser complicado de llevar a cabo, puesto que el trabajo de análisis que permite diferenciar los individuos por su canto a partir de los fonogramas es muy largo y complejo. Además, según los autores esta metodología no permitiría identificar el mismo individuo de un año a otro (Marin-Cudaz et al. 2019), un problema que afecta a todas las metodologías aplicadas hasta el momento en esta especie. Las técnicas basadas en muestreos no invasivos (heces o plumas) y análisis genéticos mediante microsatélites podría solventar este problema.

Así, el uso de muestreos no invasivos y análisis genéticos es otro enfoque prometedor, que ya se ha aplicado con éxito para estimar los efectivos de urogallo (Jacob et al. 2010; Pérez et al. 2011; Mollet et al. 2015; Lentner et al. 2018), pero no en el lagópodo alpino a pesar de estar descritos varios paneles de microsatélites polimórficos para la especie (Piertney y Dallas 1997; Bech 2010; Constanzi et al. 2018). Esta metodología no requiere observaciones

directas, captura o manejo de animales (Waits 2004), y permite tener información sobre las hembras, contrariamente a las metodologías basadas sobre los conteos de los cantos de los machos. Por otra parte, esta metodología también puede servir para analizar parámetros demográficos de esta especie, como la proporción de sexos, la tasa de supervivencia o de reclutamiento, variables clave para los modelos demográficos.

Actualmente, no existe un método de referencia para poder comparar las estimaciones de las distintas metodologías y explorar plenamente la exactitud de cada una de ellas en relación con el tamaño real de las poblaciones de estas especies, aunque los métodos basados en muestreos no invasivos y análisis genéticos podrían cubrir este vacío.

1.4. Conocimiento genético de las especies.

El urogallo y el lagópodo alpino son dos especies emblemáticas y se dispone de bastante información a nivel de su biología, alimentación y comportamiento. En estos últimos 10 años se han publicado, entre otros, estudios sobre los parásitos que pueden afectar estas dos especies (Skirnisson et al. 2012; Isomursu et al. 2017; Skirnisson et al. 2019), sobre el uso del hábitat (González et al. 2012; Pedersen et al. 2014; Zohmann et al. 2014; Bisi et al. 2017), sobre técnicas de estimación poblacional (Jacob et al. 2010; Pérez et al. 2011; Marty y Mossoll-Torres 2012; Franceschi et al. 2014; Mollet et al. 2015; Marin-Cudaz et al. 2019), y sobre su fisiología y su actividad reproductora (Kowalczyk et al. 2017; Salgado-Flores et al. 2019).

La información sobre el genoma de estas dos especies es más reducida. En concreto, se han analizado y descrito diversos marcadores, como microsatélites (Piertney y Dallas 1997; Segelbacher et al. 2000; Piertney y Höglund 2001; Bech 2010; Constanzi et al. 2018). Éstos se han usado en el urogallo para diferentes estudios poblacionales basados en el genotipado de heces y plumas como los descritos anteriormente en el apartado sobre las técnicas de estimación poblacional (Jacob et al. 2010; Rösner et al. 2014; Mollet et al. 2015; entre otros). Los microsatélites también se han usado en el lagópodo alpino para estudiar la historia

demográfica de las poblaciones en el Pirineo a partir de la variación y diferenciación genética de diferentes núcleos poblacionales (Bech et al. 2013). En Escandinavia, después del descubrimiento de lagópodos alpinos y lagópodos comunes con un plumaje intermedio se ha utilizado un panel de microsatélites, así como marcadores mitocondriales (citocromo oxidasa I (Col)), para ver si era posible la hibridación entre estas dos especies (Quintela et al. 2010). Concluyeron que la hibridación entre estas dos especies hermanas era posible y que se podía ver favorecida por los cambios en el uso del hábitat como consecuencia del calentamiento global (Quintela et al. 2010).

También se han analizado y descrito secuencias del ADN mitocondrial (12s rRNA, 16s rRNA, Col, citocromo B (CytB), región control (D-loop)) que se han usado en diversos estudios filogenéticos y biogeográficos. A partir de la secuenciación de alrededor de 2700 pares de base (pb) del ADN mitocondrial (D-loop, secuencias parciales de los 12s RNA y 16s RNA, y del CytB) se ha estudiado la historia biogeográfica de 17 especies de tetraónidos, entre ellos el urogallo y el lagópodo alpino, y se ha concluido que la mayoría de los géneros de la familia Tetraonidae se separaron en el Plioceno superior (Lucchini et al. 2001). Usando una secuencia parcial del D-loop se ha estudiado la diversidad y la estructura genética de diferentes poblaciones de urogallo en Polonia y se han comparado con poblaciones de Rusia y de Suecia concluyendo que el número de haplotipos se ve reducido en áreas donde el hábitat está fragmentado como es el caso de algunas poblaciones de Polonia (Rutkowski et al. 2017). Otro estudio similar ha mostrado una buena diversidad y estabilidad genética en una población de urogallos de Bielorrusia (Homel et al. 2019). También se han descrito el genoma mitocondrial completo del lagópodo alpino y del lagópodo común, siendo prácticamente idénticos (Sveinsdóttir y Magnússon 2017). El genoma completo de *Lagopus muta japonica* se conoce y está disponible en Genbank (Accession number: BJCA000000000.1), aunque aún no ha sido publicado.

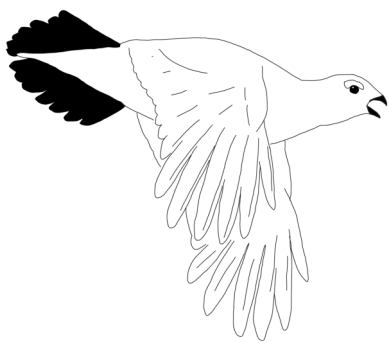
1.5. Tabla resumen.

Tabla 3. Tabla resumen: comparación de los aspectos principales del urogallo y del lagópodo alpino.

		Urogallo	Lagópodo alpino
Estatus	Mundial	Preocupación menor (LC)	Preocupación menor (LC)
	Francia	Vulnerable (VU)	Casi amenazado (NT)
	Andorra	nc	nc
	España	En peligro (EN)	Vulnerable (VU)
Caza	mundial	Autorizada	Autorizada
	Francia	Autorizada	Autorizada
	Andorra	Prohibida	Prohibida
	España	Prohibida	Prohibida
Hábitat		Bosques (hayedos, mixtos y coníferas)	Hábitat alpino (vegetación escasa y rocas)
		Altitudes de 1000 m a 2400 m	Altitudes superiores a 1800 m
Reproducción		En cantaderos	Distribución uniforme (sin cantaderos)
		Polígama	Monógama
		No establecen parejas	Establece parejas duraderas
		Sólo la hembra cría los pollos	Ambos sexos crían los pollos
Estimas poblacionales		Conteos directos en cantaderos	Conteos directos
		Muestreos no-invasivos y análisis genéticos	Plot samplig
			Distance samplig (población simulada)
			Muestreos por grabación de cantos
Conocimientos genéticos		Marcadores de ADN mitocondrial	Marcadores de ADN mitocondrial
		Microsatélites	Microsatélites
			ADN mitocondrial completo
			Genoma completo de <i>L. m. japonica</i>

Capítulo 2:

Objetivos



La obtención de estimaciones exactas y precisas del número de individuos de una población es crucial para un buen manejo de la misma (Scott y Ralph 1981; Shea 1998). Sin embargo, la obtención de estimaciones fiables, y en particular en el caso de ciertas especies de aves, no es tarea fácil (Bibby 2004; Buckland 2006; Buckland et al. 2008;). Asimismo, es importante disponer de protocolos de conteo contrastados para poder conocer el número de individuos de urogallo y de lagópodo alpino en los macizos montañosos donde habitan. Los Pirineos se extienden por Francia, Andorra y España, por lo que la gestión de la fauna silvestre la realizan organismos y entidades diferentes en cada país y/o región. En Francia, la Oficina Francesa de la Biodiversidad (OFB), junto con las Federaciones Departamentales de Cazadores son los principales organismos que realizan el monitoreo de la fauna silvestre a través de sus técnicos. En Andorra, la gestión de la fauna silvestre depende del Departamento de Medio Ambiente del Gobierno y son el cuerpo de técnicos de la unidad de fauna y los guardas (Cos de Banders) los que realizan los trabajos de seguimiento. En España, son los agentes de las consejerías de Medio Ambiente de las comunidades autónomas, o del OAPN (Organismo Autónomo de Parques Nacionales) en los Parques Nacionales, así como voluntarios y personal de algunas organizaciones no gubernamentales quienes realizan estas tareas. De forma general, en los tres países se utilizan métodos indirectos: los conteos de urogallos se realizan en los cantaderos en primavera, empleando el método de los conteos desde los escondites o de la “visita de madrugada” (Canut et al. 2006). En el caso del lagópodo alpino, se suelen hacer conteos de los cantos (Point-count), analizándolos con Plot Sampling, sin embargo, se definen las parcelas de conteo con radios de 250 m o de 350 m, dependiendo el organismo o de la zona (Aubry 2011; Marty y Mossoll-Torres 2012).

Por otro lado, tampoco hay mucha sincronización entre los organismos que realizan los trabajos, y cada uno se adapta a sus disposiciones de tiempo y de personal para realizar los muestreos. Así, puesto que no todos los organismos que realizan el monitoreo de estas especies no trabajan siempre de la misma manera los resultados que se obtienen son difícilmente comparables entre sí.

A pesar de la importancia patrimonial, cultural, ecológica e incluso económica, del urogallo y del lagópodo alpino para las regiones montañosas, pocos son los estudios que analizan y

proponen alternativas a los protocolos de estimación poblacional existentes. Salvo algunas excepciones, usando poblaciones simuladas (Franceschi et al. 2014), todavía no se han realizado trabajos comparativos entre los resultados obtenidos a partir de las diferentes metodologías de estimación poblacional disponibles. Además, la comparación de las distintas metodologías existentes, también permitiría seleccionar cuales son las más adaptadas a cada especie, hábitat, objetivo de gestión concreto, etc. (Blondel et al. 1981; Evans et al. 2007).

En la última década, en los Alpes Suizos, en la Selva de Bohemia y en la Cordillera Cantábrica, están aumentando los estudios enfocados a la estima poblacional de urogallos mediante métodos genéticos (Jacob et al. 2010; Pérez et al. 2011; Rösner et al. 2014; Mollet et al. 2015; Lentner et al. 2018; Augustine et al. 2019). Sin embargo, en los Pirineos las estimaciones poblacionales se siguen basando en los conteos de los machos en los cantaderos en primavera (Robles et al. 2006; Ménoni et al. 2014), trabajando con protocolos antiguos (Catusse y Novoa 1983; ONC 1983).

En el caso del lagópodo alpino, en los Alpes se han desarrollado nuevas metodologías para estimar las densidades de esta especie como Distance Sampling (Buckland et al. 2001; Franceschi et al. 2014) o muestreos de escucha mediante micrófonos automatizados (Marin-Cudaz et al. 2019). Sin embargo, en los Pirineos y en los Alpes franceses aún se siguen utilizando las metodologías basadas en el Plot Sampling (Aubry 2011; Marty y Mossoll-Torres 2012).

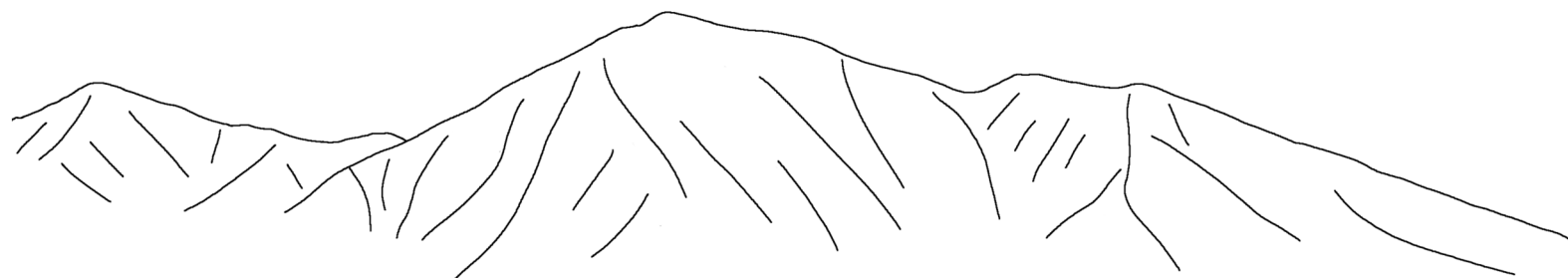
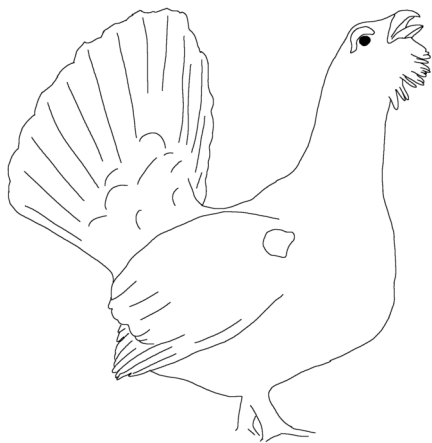
La hipótesis principal que nos planteamos es que los protocolos de muestreo “tradicionales” no permiten estimar con precisión y exactitud el número de efectivos de las poblaciones estudiadas de urogallo o de lagópodo alpino. Además, que los parámetros demográficos, densidades, tendencias poblacionales o proporción de sexos, presentados o asumidos en estudios anteriores no son representativos de los valores actuales de las poblaciones de urogallo y de lagópodo alpino.

Por lo tanto, los objetivos que nos hemos planteado en esta tesis para testar esta hipótesis son los siguientes:

1. Diseñar una metodología basada en muestreos no invasivos y análisis genéticos para estimar el número de individuos de urogallos y de lagópodos alpinos de una zona, como método alternativo e independiente del recuento de cantos.
2. Analizar si los conteos en los cantaderos de los machos en primavera, tradicionalmente usados en los Pirineos para monitorizar los efectivos de esta especie, permiten estimar correctamente el número de individuos de un cantadero.
3. Analizar con datos de conteos reales si las diferentes metodologías existentes en la bibliografía, Plot Sampling y Distance Sampling, permiten estimar correctamente el número de individuos de lagópodo alpino.
4. Determinar si los nuestros no invasivos y análisis genéticos permiten estimar los parámetros demográficos, como la proporción de sexos de estas especies.
5. Ensamblar, describir y analizar el genoma mitocondrial del urogallo.

Capítulo 3:

Material y métodos



Para responder a los objetivos planteados se han comparado las estimaciones del número de individuos de ambas especies obtenidas mediante las metodologías que se usan tradicionalmente en los Pirineos (conteos de los cantos de machos), con las obtenidas mediante muestreos no invasivos y análisis genéticos. Seguidamente se presenta el área de estudio y la metodología de conteo empleada en cada especie, la metodología empleada en los muestreos no invasivos y análisis genéticos, y finalmente los análisis genéticos realizados.

3.1. Urogallo: área de estudio y conteos.

Área de estudio

El urogallo se ha estudiado en los Pirineos franceses (departamentos de los Altos Pirineos y Ariège) y en Andorra. El área de estudio abarca 700 km², incluye una zona meridional (290 km²), una zona central (180 km²), una zona oriental (180 km²), y una zona mediterránea en Andorra (50 km²) (Fig. 1).

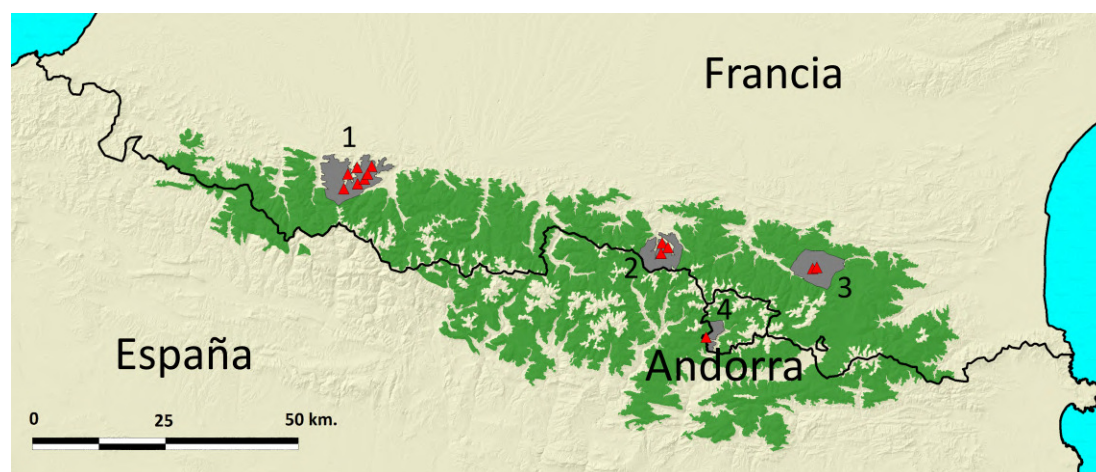


Figura 1. Área de estudio del urogallo. En verde el área de distribución del urogallo. En gris las zonas de estudio, 1: zona meridional; 2: zona central; 3: zona oriental; 4: zona mediterránea. Los triángulos rojos representan los cantaderos muestreados.

Esta área, incluye la mayoría de los hábitats del urogallo, bosques puros de hayedos (*Fagus sylvatica*), bosques mixtos de hayedos y abetos (*Abies alba*), bosques puros de abetos y bosques de pino negro (*Pinus mugo uncinata*), en altitudes comprendidas entre los 900 m y los 2300 m y en todas las orientaciones. En la parte francesa del área de estudio el clima es

relativamente húmedo con un gradiente decreciente de las precipitaciones de Oeste a Este debido a la influencia atlántica (López-Moreno y Vicente-Serrano 2007). En la parte andorrana del área de estudio, el clima es más seco ya que por su localización recibe una influencia más mediterránea (Panadera 1984).

Durante el periodo 2016 a 2019, se han muestreado un total de 13 cantaderos (7 en los Altos Pirineos; 5 en la Ariège, y 1 en Andorra). Cada cantadero se ha monitorizado ente 1 y 3 años (Tabla 1; triángulos rojos Fig. 1). Los principales criterios que se han seguido para seleccionar los cantaderos han sido su accesibilidad y la ausencia de zonas peligrosas (cortados u otros). También se ha tenido en cuenta que no presenten zonas con mucha pendiente o con mucho estrato arbustivo (sobre todo rododendros) de manera que los muestreos se puedan realizar en las mejores condiciones. Finalmente se han seleccionado cantaderos representativos de los Pirineos, ya sea por su localización, por el tipo de bosque, por su altitud y orientación.

Tabla 1. Caracterización de los cantaderos muestreados durante el estudio

Código	Nombre	Zona	Altitud media	Orientación	Tipo de bosque	Años de monitoreo
HP-1	Cap de Soc	Meridional (1)	1450m	N	Abetal	3
HP-2	Soum Berducou	Meridional (1)	1550m	NE	Hayedo mixto	3
HP-3	Cantau	Meridional (1)	1430m	NW	Hayedo	3
HP-4	Bosquet	Meridional (1)	1450m	N	Hayedo	3
HP-5	Navaiho	Meridional (1)	1600m	NW	Hayedo	3
HP-6	Estibetes	Meridional (1)	1600m	N	Hayedo	3
HP-7	Nouit	Meridional (1)	1500m	N	Hayedo mixto	1
AR-1	Peyre M1	Central (2)	1500m	N	Hayedo	1
AR-2	Fôret de Rouze	Central (2)	1650m	NW	Hayedo	1
AR-3	Peyre M2	Central (2)	1550m	N	Hayedo	1
AR-4	Fourtou	Oriental (3)	1800m	NE	Abetal	2
AR-5	Fourtou	Oriental (3)	1350m	NE	Abetal	2
AND-1	Costa de l'Arn	Mediterránea (4)	2100m	NE	Pinar	3

Conteos.

Los conteos de los machos de urogallo se han realizado en primavera en los cantaderos, zonas boscosas donde se reúnen los machos para cantar, atraer a las hembras y aparearse. Los conteos se han realizado siguiendo los protocolos tradicionalmente usados en los Pirineos, basados en escuchas de madrugada de los cantos de los machos desde escondites (Catusse y Novoa 1983; ONC 1987; Canut et al. 2006). Los muestreos se han hecho

coincidir con el pico de máxima actividad de canto del urogallo en cada cantadero. En los Pirineos el periodo de máxima actividad de canto, que suele durar unos pocos días en cada cantadero, ocurre durante los 20 primeros días del mes de mayo (Catusse y Novoa 1983; ONC 1987). Sin embargo, el pico de máxima actividad no se produce en todos los cantaderos en el mismo momento, variando de un cantadero a otro en función de su localización, altitud, meteorología, etc. Por lo tanto, los muestreos comenzaron a mediados de abril, para que coincidiesen con el pico de máxima actividad del canto en cada zona. El principal criterio que se ha considerado para determinar si se había alcanzado el pico de máxima actividad era la presencia de hembras en la zona (Canut et al. 2006). Todos los muestreos se realizaron entre el 28 de abril y el 28 de mayo. Puesto que la localización del cantadero puede variar de un año a otro (Lentner et al. 2018; Abrahams 2019), la tarde anterior al muestreo, el observador, basándose en su experiencia y en los indicios de presencia (huellas en la nieve, excrementos, plumas, etc.), determina la localización del centro del cantadero, donde coloca el escondite. Entonces se instala en su interior y permanece en él toda la noche, siendo lo más sigiloso posible, hasta la madrugada siguiente cuando empieza el conteo. El conteo empieza cuando todavía es de noche y termina alrededor de una hora y media después del amanecer (Catusse y Novoa 1983). Durante ese tiempo se cuentan y localizan los machos, y en su caso también las hembras, que se escuchan u observan desde el escondite. Una vez que el conteo ha terminado, el observador debe asegurarse que todos los urogallos se hayan ido del cantadero, antes de salir del escondite para evitar perturbar a los individuos de la especie. En cada cantadero los conteos se repitieron dos veces en un plazo de tiempo lo más corto posible (menos de 10 días), idealmente durante dos días consecutivos. Todos los conteos del estudio se han realizado en buenas condiciones meteorológicas, en días sin viento y sin fuertes lluvias. Como resultado de los conteos en cada cantadero se considera el número máximo de machos de urogallos detectados en uno de los dos conteos.

3.2. Lagópodo alpino: área de estudio y conteos.

Área de estudio.

El lagópodo alpino se ha estudiado en los Pirineos y en los Alpes franceses. En los Pirineos, el estudio se ha desarrollado en la zona fronteriza entre el departamento de Ariège (Francia) y Andorra, así como en otras tres zonas del Pirineo español: una en Aragón y dos en Cataluña (Fig. 2). En los Alpes se ha estudiado una zona, en el departamento francés de Isère (Fig. 2). El área de estudio abarca 426,5 km², de los cuales 419,5 km² se encuentran en los Pirineos y 7 km² en los Alpes.

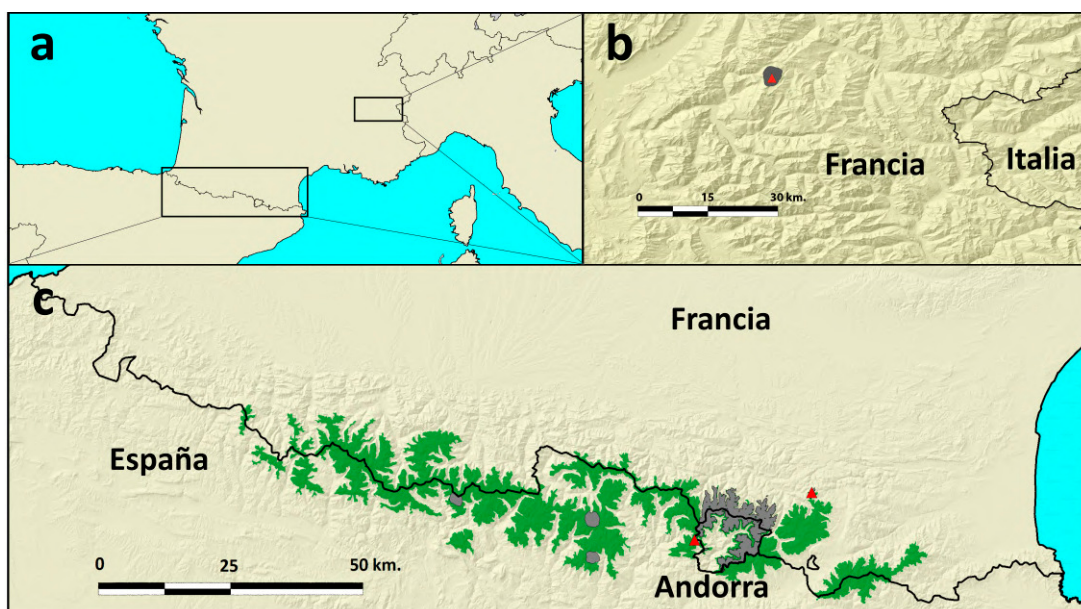


Figura 2. Área de estudio del lagópodo alpino: a) vista global; b) detalle de la zona de estudio de Isère (en gris); c) detalle de la zona de estudio de los Pirineos (en gris), en verde el área de distribución del lagópodo alpino. Los triángulos rojos en b) y c) representan las zonas muestreadas entre 2016 y 2019.

Esta área, incluye todos los hábitats del lagópodo alpino por encima del límite superior del bosque entre 1800 m y 3000 m de altitud, tales como afloramientos rocosos, pedregales con zonas de vegetación escasa, pastizales y matorrales. Debido a la altitud de la zona de estudio el clima es altamente cambiante, con precipitaciones abundantes, sobre todo en primavera (López-Moreno y Vicente-Serrano 2007; Dumont et al. 2019).

Durante el periodo de 2016 a 2019, se realizaron cinco muestreos (uno en Ariège, tres en Andorra y uno en Isère) (Tabla 2; triángulos rojos Fig. 2). Las zonas muestreadas se seleccionaron evitando las zonas peligrosas (acantilados, zonas con fuerte pendiente o con riesgo de avalanchas) para poder realizar los muestreos con total seguridad; también se tuvo en cuenta que los puntos de muestreo fuesen de fácil acceso.

Tabla 2. Caracterización de las zonas de estudio de lagópodo alpino

Nombre	Zona	Altitud media	Orientación	Años de monitoreo
Tarbésou	Ariège	2250 m	NW-N	1
Pic dels Llacs	Andorra	2500 m	N-NE	3
L'Étandard	Isère	2650 m	N-NE	1

De forma complementaria, se analizó una base de datos de 56 conteos de machos de lagópodo alpino realizados entre 2003 y 2016 en toda del área de estudio pirenaica (419,5 km²).

Conteos y estima de las densidades.

El lagópodo alpino, al contrario que el urogallo, realiza su cortejo y emparejamiento en territorios de reproducción que se reparten homogéneamente en las laderas de las montañas, sin establecer cantaderos (Wiley 1974; Martin et al. 1995; Caizergue et al. 2003; Storch 2007). Todos los conteos de cantos, los incluidos en la base de datos histórica (2003 - 2016) y los efectuados durante el desarrollo de esta tesis (2016 - 2019), se realizaron entre abril y finales de junio, siguiendo el protocolo de Point-count (conteo desde puntos fijos) (Marty y Mossoll-Torres 2012; Mossoll-Torres y Marty 2012). Los puntos de conteo se distribuyeron de forma aleatoria en el área de estudio, pero guardando una separación entre 400 y 500 m los unos de los otros y teniendo siempre en cuenta la seguridad de los observadores. Cada conteo por Point-count comenzó una hora antes y terminó media hora después del amanecer, coincidiendo con el período de máxima actividad de canto del lagópodo alpino (Marty y Mossoll-Torres 2012). Así, los observadores se colocaron en los puntos de conteo en la oscuridad (antes de empezar el muestreo), y permanecieron en el mismo lugar durante la hora y media de cada conteo. Tras cada detección se anotó la hora y la localización de cada acontecimiento en un mapa de 1:25000. Si un lagópodo alpino no se

pudo localizar con exactitud desde el punto de conteo, al final del conteo el observador se desplazaba hasta la zona concreta para confirmar la localización exacta ayudándose de los rastros, pisadas y excrementos en la nieve. Los posibles desplazamientos de un lagópodo alpino durante el conteo también fueron anotados. Si un lagópodo es detectado desde más de un punto fijo esto se considera como una detección múltiple. Al final de cada conteo, se realizó una puesta en común de los datos recogidos en cada punto, teniendo en cuenta las horas de cada acontecimiento (canto u observación) y los posibles desplazamientos, se eliminaron los dobles conteos (lagópodos que se han desplazado durante el conteo) y las observaciones dudosas. Finalmente se realizó un resumen, localizando en un mapa 1:25000 cada punto fijo de conteo, y cada lagópodo alpino detectado, trazando una línea uniéndolo, i) al punto fijo desde el que fue detectado o ii) a los puntos fijos desde los que fue detectado (caso de las detecciones múltiples). Todos los Point-counts se realizaron en días de buen tiempo, sin precipitaciones ni viento, para tener las mejores condiciones de escucha posibles. Para calcular las densidades de machos en cada Point-count, se han analizado los mapas resumen con dos metodologías diferentes, Plot Sampling (PS) y Distance Sampling (DS) (Buckland et al. 2001; Marty y Mossoll-Torres 2012; Franceschi et al. 2014).

Los mapas resumen de cada Point-count se digitalizaron usando un sistema de información geográfico (SIG, QGIS Development Team 2014). Con este sistema se calcularon, para la metodología Plot Sampling, las áreas de las parcelas (plots); para la metodología Distance Sampling, las distancias de detección entre los lagópodos alpinos y el o los punto(s) fijo(s) desde el cual fue o fueron detectados.

Con Plot Sampling se calcularon las densidades poblacionales utilizando las dos variantes del método usadas en los Pirineos, una que define los plots con un radio de 250 m alrededor del observador (Marty y Mossoll-Torres 2012) y otra que los define con un radio de 350 m (Aubri 2011). Para la estima de las densidades de machos de lagópodos alpinos, el número de machos detectados en el interior de los plots se dividió entre el área de los plots (definida por un radio de 250 o 350 m alrededor de los puntos de fijos de conteo). De este modo se obtuvieron las densidades de machos por unidad de superficie (machos / km²). Para estos cálculos no se consideraron los ejemplares detectados fuera de los plots.

Para Distance Sampling, se utilizó el programa Distance 7.0 Beta 3 (Thomas et al. 2010), que se implementó con las distancias de detección (simples o múltiples) para estimar la densidad poblacional de cada Point-count. Se utilizaron las siguientes funciones de detección: (i) *half-normal* con ajuste *cosine* (ii) *half-normal* con ajuste *hermite polynomial*, (iii) *uniform* con ajuste *cosine*, y (iv) *hazard-rate* con ajuste *simple polynomial* (Thomas et al. 2010). Para la modelización de estas funciones se utilizaron tres términos de ajuste de Akaike, el *encounter rate* propio de cada Point-count y se estimó la varianza de forma empírica (Buckland et al. 2001; Thomas et al. 2010; Franceschi et al. 2014; Pérez et al. 2015). Todos los análisis se realizaron sin truncar las observaciones más distantes y sin agrupar los datos en intervalos de distancia. Con esta metodología se estimaron las densidades y sus coeficientes de variación (CVs) asociados.

3.3. Muestreos no invasivos y análisis genéticos.

Muestreo no invasivo.

Para poder comparar los resultados obtenidos a partir de los conteos de estas aves con los resultados de los muestreos no invasivos y análisis genéticos, se tomó como referencia el alcance del canto de cada especie para definir el área de recogida de las muestras. Según Couturier y Couturier (1980), 200 m es la distancia máxima a la que se puede escuchar un macho de urogallo ya sea por su canto o por los saltos que realiza en el momento del cortejo. En el caso del lagópodo alpino esta distancia es mayor: algunos autores apuntan que en buenas condiciones su canto puede ser escuchado hasta un km de distancia (Favaron et al. 2006; Marty y Mossoll-Torres 2012). Sin embargo, a partir de 250 m ya no se pueden escuchar la mayoría de los cantos de machos de lagópodo alpino (Marty y Mossoll-Torres 2012; Franceschi et al. 2014). Por lo que las áreas de recogida de muestras se definieron con un radio de 200 m alrededor del observador para el urogallo y de 250 m para el lagópodo alpino. Cada recogida de muestras se realizó tras concluir los conteos, tras asegurarse que todos los urogallos habían abandonado la zona, y tras la revisión de los datos de los Point-count de lagópodo alpino mediante una puesta en común de los distintos observadores. Las recogidas de muestras se realizaron de forma intensiva y sistemática en cada área de

recogida, realizando transectos espaciados de 25 m siguiendo las curvas de nivel (Fig. 3). Por lo tanto, se buscó un compromiso entre el esfuerzo de muestreo, su representatividad y nuestra capacidad para analizar las muestras en el laboratorio.

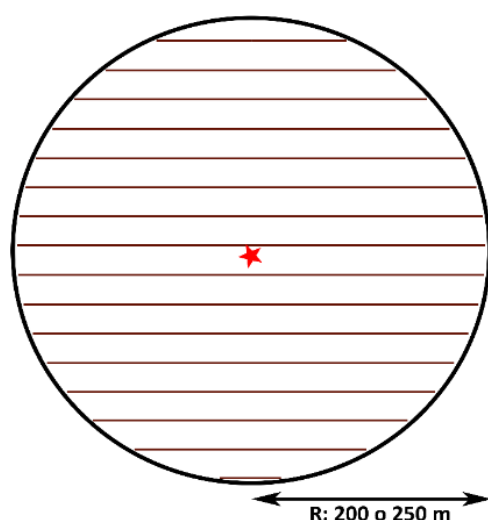


Figura 3. Esquema de un área de recogida de muestras con un radio de 200 m para el urogallo o de 250 m para el lagópodo alpino. La estrella simboliza el centro de la área, las líneas marrones representan los transectos espaciados a 25 m.

En cada recogida de muestras el observador podía conocer en todo momento su posición y visualizar el área de muestreo gracias a una Tablet con GPS vinculada a un SIG (Qgis v1.8) (QGIS Development Team 2014) (Fig. 4). Este sistema también permitía geo-referenciar todas las muestras. En los muestreos solo se recogieron las heces que se consideraban frescas, idealmente de menos de una semana. Respecto a las heces del urogallo, al estar dentro del bosque y no directamente expuestas al sol, era relativamente fácil valorar este hecho por su aspecto y gracias a la experiencia de los observadores. En el caso del lagópodo alpino, esta tarea era más compleja ya que las heces están directamente expuestas al sol. Por lo tanto, se recogieron solo las que estaban enteras, no demasiado descoloridas por el sol y con el ácido úrico (blanco en los extremos) aún visible. Cada muestra se guardó en un tubo Falcon de 50 ml conteniendo 15 ml de gel de sílice (Fig. 4), y se conservó a -20°C hasta su análisis en el laboratorio (Jacob et al. 2010).



Figura 4. Tablet y tubo Falcon con gel de sílice usados en la recolecta de las muestras de heces en un cantadero en Andorra.

Análisis genético.

a) Extracción de ADN

Para las extracciones de ADN se utilizaron hasta 500 mg de cada muestra, aproximadamente la mitad del tamaño de las heces de urogallo, y las heces completas en el caso del lagópodo alpino. El ADN se extrajo utilizando los kits comerciales QIAamp® DNA Stool Mini Kit y QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen). El primer paso del protocolo de extracción se modificó, usando un tubo de ensayo de 15 ml (en vez de uno de 2 ml) para poder aumentar la solución de lisis de un volumen de 750 μ l a 2 ml, lo cual permitió homogeneizar mejor las heces. Una vez homogeneizada la muestra, se introdujo una bola de acero inoxidable en el tubo y se centrifugó a 2000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 min. Estas modificaciones permitieron homogeneizar mejor las heces y separar mejor el sobrenadante con el ADN, de la parte sólida de la muestra que se descartaba. El resto de los pasos se realizaron tal y como especifican los protocolos proporcionados por el fabricante. El ADN se eluyó en un volumen de 150 μ l de buffer TLE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0), y se almacenó a 4°C hasta que se realizaban las PCRs. Con el fin de evitar contaminaciones, cada tanda de extracción (N= 24) se realizó en una zona aislada del laboratorio, el material de manipulación de las muestras y la poyata se lavaron con una solución de lejía al 20 % tras

el procesamiento de cada muestra. Además, con este mismo fin, se guardó un período de cuarentena de al menos 24 horas antes de realizar otra tanda de extracción de ADN o realizar las PCRs.

b) Control del ADN extraído por PCR.

El ADN extraído de las heces de urogallo o de lagópodo alpino proviene de las células de la mucosa del intestino que se descaman y quedan adheridas a su superficie al pasar por el tracto digestivo. Estas células son escasas y una vez excretadas quedan expuestas a la intemperie por lo que el ADN que se obtiene suele estar a una concentración muy baja y parcialmente degradado. Por ello, se realizó una PCR control para determinar el rendimiento de cada muestra de ADN extraído y valorar si se podría genotipar y sexar correctamente. En esta PCR control se amplificó un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases (pb) que es un tamaño más grande que los fragmentos que se amplificarán en las PCR de genotipado y de sexado. Por lo tanto, se consideró que, si esta PCR control producía amplificación, la muestra probablemente se podría genotipar y sexar con garantías. El fragmento amplificado en esta PCR correspondió en el urogallo al microsatélite TUD7 (Segelbacher et al. 2000) (aunque se diseñaron cebadores nuevos TU-Cont-F: 5'-CTGGGGTCATTAGGCAGAGC-3' y TU-Cont-R: 5'-TGCGTGTGTGCAGAGATAGG-3') y al microsatélite Mut 12 (Costanzi et al. 2018) en el lagópodo alpino (también se diseñaron cebadores nuevos LM-Cont-F: 5'-AAAGCCACAGGGGCATGAA-3' y LM-Cont-R: 5'-GTCAGGAACAGGAATCCACGA-3').

Las PCRs control se realizaron en un volumen total de 13 µl con 5 µl de la elución de ADN, 6,5 µl de Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen) y 0,2 µM de cada cebador. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 5 min de desnaturalización inicial a 95 °C, seguidos de 35 o 40 ciclos, para el urogallo o el lagópodo alpino respectivamente, con 30 s a 95 °C, 90 s a 60 °C y 30 s a 72 °C; y una extensión final de 30 min a 60 °C. Los productos de estas PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1 %, teñido con el agente intercalante, bromuro de etidio. Las muestras en las que no se observó el amplificado de 300 pb se descartaron, las otras se genotiparon y se sexaron.

c) Genotipado y sexado.

El genotipado de las muestras se realizó con un panel de 14 microsatélites en el caso del urogallo (Tabla 3) y de 16 microsatélites para el lagópodo alpino (Tabla 4). Las muestras de ambas especies se sexaron amplificando un fragmento del gen de la proteína chromodomain-helicase-DNA-binding (CHD), ligado a los cromosomas sexuales, utilizando los cebadores específicos PU y P8mod (Pérez et al. 2011). Con estos cebadores las muestras de machos amplificaron un único fragmento de 189 pb de ambos cromosomas Z, y las de hembras amplificaron dos fragmentos uno de 189 pb del cromosoma Z y otro de 214 pb del cromosoma W. Las PCRs se realizaron como multiplex conteniendo cada una ellas una combinación (Mix) de cebadores de diferentes microsatélites y del gen de sexado (Tablas 3 y 4). Se realizaron en un volumen total de 13 µl con 5 µl de la elución de ADN, 6,5 µl de Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen) y de 0,1 a 0,2 µM de cada cebador. Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes: 5min de desnaturalización inicial a 95°C, seguidos de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 90 s a 53 °C, 55 °C o 60 °C de temperatura de “annealing” que se ajustó en función del Mix (Tablas 3 y 4) y 30 s a 72 °C; y una extensión final de 30 min a 60 °C. Los productos las PCRs, se analizaron en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén (CICT) con un secuenciador Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystem, California, USA). El tamaño de los distintos alelos de cada microsatélite, y el sexo de cada una de las muestras se determinaron con el programa GeneMapper v. 4.1 (Applied Biosystems, California, USA).

Tabla 3. Cebadores utilizados para genotipar y sexar las muestras de urogallo

Nombre	Secuencia 5'-3'	Mix	Ta°C ^a	Variación de los alelos en pb ^b	Referencia ^c
TUD 3	F: TCCAAGGGGAAAATATGTGTG R: TGGCTCTATTAAGGCTGCTG	1	60°C	113 - 129 (6)	1
TUD 4	F: TCCAAGGAGAGACAAAAGG R: GGGAGGACTGTGTAGGAGAGC	1	60°C	92 - 104 (3)	1
TUT 1	F: GTATATCTGTCTGTCTGCC R: ATATGGCATCCCAGCTATGG	1	60°C	142 - 166 (7)	1
TUT3	F: CAGGAGGCCCTCAACTAATCACC R: TGAGGGATTATGCATGCTGC	1	60°C	99 - 107 (3)	1
TUD 1	F: ATTTGCCAGGAACTTGCTC R: TGAACATAACCTTTGCCTCC	2	60°C	164 - 172 (5)	1
TUD 2	F: GGTCTTCTAACGCTGCTGCAC R: AATAAGGGTGCGCATACACC	2	60°C	151 - 177 (11)	1
TUD 5	F: CTGTACACAGCACTGAGCC R: GGTGCTGAGCATGTACTAGGG	2	60°C	103 - 128 (8)	1
TUD 7	F: TGACACTGGGCTCATTAGGC R: AACATGGGCAGGAGGAGAC	2	60°C	150 - 156 (2)	1
BG 10	F: ATGTTTCATGTCTTCTGGAATAG R: GCATACTATACTGTCTATGCAG	3	55°C	180 - 210 (8)	2
BG 12	F: TCTCCTTCTAAACCACTCATT R: CAATGTCGTGGCCCACTGAG	3	55°C	139 - 155 (5)	2
BG 15	F: AAATATGTTTGCTAGGGCTTAC R: GCTCCCTGTAAAGGTAAATAGA	3	55°C	110 - 124 (5)	2
BG 16	F: GTCATTAGTGTCTGTCTATCT R: CGGATGAATGGATGGAGGGG	3	55°C	127 - 151 (6)	2
BG 18	F: CAGAATTAATGTTTGTCTAAC R: CTGATACAAAGATGCCTACAA	3	55°C	152 - 164 (4)	2
TUD 6	F: GCCTTTTACTGCACTACTTGC R: GAGGACTGCAGAACCCACTG	3	55°C	130 - 132 (2)	1
SEXADO	PU: AAAGCTGATCTGGAATTTTACG P8mod: TCCAAGGATGAGRAAYTGTG	3	55°C	♂ 189 - 189 ♀ 189 - 214	3

^a Temperatura de "annealing"; ^b Entre paréntesis el número de alelos; ^c 1: Segelbacher et al. (2000); 2: Piertney y Höglund (2001); 3: Pérez et al. (2011)

Tabla 4. Cebadores utilizados para genotipar y sexar las muestras de lagópodo alpino

Nombre	Secuencia 5'-3'	Mix	Ta°C ^a	Variación de los alelos en pb ^b	Referencia ^c
Mut 01	F: GGTCACCTTGGCTATTAGAACC R: CTGAGAAAGACAATGGTGGATGG	1	60°C	87 - 99 (4)	1
Mut 02	F: GATGGATGAACAGACAGTGGATG R: CACTCACTTGGCTTATATGATTCCC	1	60°C	111 - 131 (5)	1
Mut 04	F: AACATGGTCCTACACTTCAGAGG R: ATGTACACAAGGAAGCATTCAGG	1	60°C	113 - 129 (5)	1
Mut 17	F: CCAAGAACACAGAAATCCCAGAG R: TGTTAATTGACTGCCACAACTAC	1	60°C	187 - 207 (5)	1
Mut 24	F: AACTGACAATCAAGCATCTCATG R: CTGCTATGTACTACTCAAGGTGC	1	60°C	197 - 201 (2)	1
Mut 06	F: TTGAACACTAATCTCGCCATTGC R: GTGGGATATGAGGAAAGATTGC	2	53°C	109 - 125 (5)	1
Mut 09	F: CACTCTAGTTCAACCTGTTTCAGC R: CTCTTAGAGAATTGCTGCTGTG	2	53°C	131 - 11 (6)	1
Mut 16	F: TGCTGTAATTGGCTAGTGGTTTC R: CGGTCAGGTGTTTCTCAGTAAAG	2	53°C	149 - 173 (7)	1
SEXADO	PU: AAAGCTGATCTGGAATTTTACG P8mod: TCCAAGGATGAGRAAYTGTG	2	53°C	♂ 189 - 189 ♀ 189 - 214	2
Mut 03	F: TCACTAAATCATGGAAGCAATGG R: GGTGAGGTGGATTATCATATGCAG	3	60°C	104 - 132 (6)	1
Mut 14	F: TCTGCCAATCTTTATGCTGTC R: TTCTTTCAATTTCATTAGCCCACTG	3	60°C	152 - 168 (6)	1
Mut 18	F: TTCCTCATAACTAAGCAAAGCAG R: TGCATTGGAATTACTGTTGATGC	3	60°C	172 - 184 (4)	1
Mut 22	F: GTGGTATCTCTGTAACCTGGGAG R: AAGGCAAAGCAAGAAATGTCTGTG	3	60°C	177 - 193 (3)	1
Mut 08	F: TACTACTTTCTGAACCTCTGCTGC R: GAGAGAAGAAGGAACAACAAGC	4	60°C	128 - 156 (8)	1
Mut 12	F: GGAAGGAGCTTACACATAGGAAC R: GGAGGATCTTGTACTTGCACTTG	4	60°C	-	1
Mut 20	F: CTTTCCACCTTTCTTACTGCCTG R: CTCATCCTGTATTCTGAGCTGC	4	60°C	181 - 209 (8)	1
Mut 23	F: CTGGAGTCTAGAATTGCCCAAC R: AGGGTCAAGAACTTACAATGGAC	4	60°C	177 - 201 (7)	1

^a Temperatura de "annealing"; ^b Entre paréntesis el número de alelos; ^c 1: Costanzi et al. (2018); 2: Pérez et al. (2011); No se ha calculado en tamaño del microsatélite Mut 12, puesto que no se han podido interpretar correctamente las lecturas.

Para evitar errores de genotipado o de sexado se empleó la técnica de "multitubo" (Navidi et al. 1992; Taberlet et al. 1996; Taberlet y Luikart 1999; Goossens et al. 2000), que consiste en repetir la PCR multiplex de cada muestra varias veces. En nuestro caso se realizaron 3 réplicas de cada PCR multiplex por muestra.

Finalmente, a partir de los resultados de las 3 réplicas se asignó un consenso para cada microsatélite y muestra (Fig. 5). Los microsatélites de una muestra se consideraron homocigotos si sólo se observaba un alelo en al menos dos réplicas independientes, sin observarse ningún otro alelo adicional en la tercera réplica. Los microsatélites heterocigotos eran los que tenían dos alelos diferentes en al menos dos réplicas. A cada muestra se le asignó un índice de calidad (QI) similar al descrito por Miquel et al. (2006). Para calcular este índice, primero se asignó a cada réplica de cada microsatélite una nota de 1 o 0, dependiendo de si era o no igual a la lectura consenso asignada a cada microsatélite y muestra. Luego se calculó la media de las notas de las 3 réplicas obteniendo el valor QI de cada microsatélite (lógicamente el promedio puede tener los siguientes valores: 0, si ninguna repetición es idéntica a la lectura de consenso o que las 3 PCR han fallado; 0,33 si sólo una repetición es idéntica a la lectura de consenso; 0,66 si dos repeticiones son idénticas a la lectura de consenso y 1 si todas las repeticiones son idénticas a la lectura de consenso). Por último, el QI global de la muestra se calculó haciendo el promedio de los valores obtenidos para todos los microsatélites de una misma muestra, que varió entre 0 y 1 (Fig. 5).

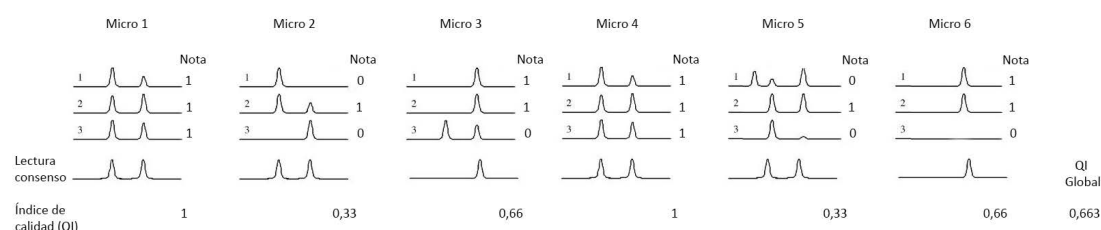


Figura 5. Ejemplo de asignación de la lectura consenso y del cálculo del valor QI por microsatélite y global en una muestra modelo con 6 microsatélites.

Para considerar una muestra fiable se fijó como criterio que debía tener un QI global igual o superior a 0,6. Por lo tanto, las muestras con un QI global inferior a 0,6 o con más de 4 microsatélites sin genotipar, se descartaron del análisis posterior. Las muestras que pasaron

los criterios de calidad, se analizaron con el programa Gimlet v.1.3.3 (Valiére 2002), para estimar el número final de individuos en cada área muestreada. Para evaluar la fiabilidad de los resultados obtenidos se calcularon las probabilidades de identidad sin sesgo $P_{(ID)}$ y para individuos emparentados $P_{(ID)sib}$ (Waits et al. 2001) a partir de programa Cervus v3.0.7 (Field Genetics; Marshall et al. 1998).

3.4. Caracterización genética.

Se secuenciaron los genomas del urogallo y del lagópodo alpino a baja cobertura. El ADN genómico se extrajo a partir de tejidos de una hembra de cada especie usando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). La cantidad de ADNs obtenidos se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (ThermoScientific). También se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% que no estaban degradados y que tenían una concentración adecuada para poder ser secuenciados correctamente. La secuenciación de los genomas fue realizada por la empresa Novogene, utilizando 3 µg de cada ADN para la construcción de dos bibliotecas con fragmentos de 750 pb. Estas bibliotecas se utilizaron en la secuenciación de Illumina® HiSeq™ 2000 paired-end con lecturas de 2 × 100 nucleótidos. Se obtuvieron 2 Gpb de secuencias para cada especie, lo que corresponde a una cobertura aproximada de 1,5 X.

Ensamblado del genoma mitocondrial del urogallo.

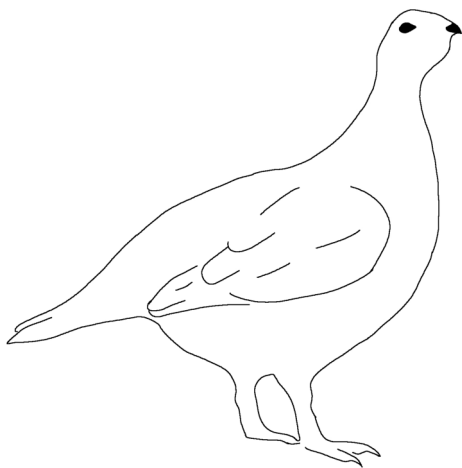
A partir de esta secuenciación, el genoma del ADN mitocondrial completo del urogallo se ensambló usando el programa MITObim v1.8 (Hahn et al. 2013) con la opción "--quick" y con un desajuste por defecto del 15 %. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente un millón de pares de lectura con seqTK (<https://github.com/lh3/seqtk>) utilizando como referencia el genoma mitocondrial del gallo lira *Lyrurus tetrix*, disponible en GenBank (número de acceso KF955638.1) (Li et al. 2016). Una parte de la región control y del gen Nd6 del genoma mitocondrial no se pudieron ensamblar correctamente y tuvieron que ser confirmadas mediante amplificaciones por PCR. Así, se amplificó mediante PCR a partir del mismo ADN que se utilizó para la secuenciación masiva, utilizando los cebadores Pro+ (5'-

ACCATCAGCACCCAAAGCTG-3') y Phe- (5'-AAGCATTTTCAGTGCTTTGCTT-3') (Haring et al. 2000) que anclan en los tRNAs que flanquean la región control y el gen Nd6. La PCR se realizó en un volumen total de 50 µl con 150 ng de ADN, 5 µl de 10x NH₄ reaction buffer, 2,5 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl de 100 mM dNTPs, 0,5 µM de cada cebador y 1 µl de BIOTAQ polimerasa (Bioline). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 5 min de desnaturalización inicial a 95 °C, seguidos de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 45 °C y 90 s a 72 °C; y una extensión final de 5 min a 72 °C. Se realizó una electroforesis con 40 µl del producto de esta PCR, en un gel a 1 % teñido con bromuro de etidio. La banda de 1600 pb (correspondiente a la región control más el gen Nd6) se cortó y se purificó con el kit de QIAquick® Gel Extraction de Qiagen. El fragmento purificado se ligó con el vector pGEM®-T Easy (Promega) en una reacción de ligado en 10 µl de volumen total con 3,6 µl de la banda purificada, 5 µl de buffer 2X, 0,7 µl de vector T y 0,7 µl de ligasa y se incubó una noche a + 4° C. El día siguiente se transformó en bacterias competentes (*E. coli*) (Mix & Go Competent Cells, Zymo research) cultivadas en placas de Petri con medio de cultivo LB + IPTG + Xgal Ampicilina a 37° C. Finalmente se extrajo el plásmido de tres colonias positivas con el kit FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction (Favorgen), que se secuenciaron en ambas direcciones mediante secuenciación Sanger (Macrogen).

Una vez las secuencias de la región control y del gen Nd6 secuenciadas, se analizaron con Bioedit (versión 7.0.9.0) (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), y finalmente se ensamblaron al genoma mitocondrial. La anotación del genoma mitocondrial del urogallo se realizó utilizando los servicios de la web MITOS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/help.py>) (Bernt et al. 2013) y tRNA scan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) (Lowe y Eddy 1997). Las anotaciones de los genes codificadores de proteínas (PCG), los ARN de transferencia (ARNt) y los genes de ARNr se refinaron comparándolos manualmente con el genoma mitocondrial de *L. tetric* (Li et al. 2016). El dibujo circular del genoma mitocondrial se realizó con las herramientas OrganellarGenomeDRAW (<http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de/>) (Lohse et al. 2013).

Capítulo 4:

Resultados y discusión



4.1. Comparing methods for estimating the abundance of Western Capercaillie *Tetrao urogallus* males in Pyrenean leks: singing counts versus genetic analysis of non-invasive samples.

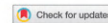
Bird Study (10.1080/00063657.2020.1720594)

Authors: Gaël Aleix-Mata, Begoña Adrados, Mathieu Boos, Evelyn Marty, Pierre Mourieres, Gregory Tucat, Nicolas Thion, Marc Mossoll-Torres, Jesús M. Pérez, Antonio Sánchez.

BIRD STUDY
<https://doi.org/10.1080/00063657.2020.1720594>



SHORT REPORT



Comparing methods for estimating the abundance of Western Capercaillie *Tetrao urogallus* males in Pyrenean leks: singing counts versus genetic analysis of non-invasive samples

Gaël Aleix-Mata^{a,b}, Begoña Adrados^c, Mathieu Boos^{d,e}, Evelyn Marty^f, Pierre Mourieres^f, Gregory Tucat^g, Nicolas Thion^g, Marc Mossoll-Torres^h, Jesús M. Pérez^{a,i} and Antonio Sánchez^h

^aDepartment of Animal and Plant Biology and Ecology, Jaén University, Jaén, Spain; ^bDepartment of Experimental Biology, Jaén University, Jaén, Spain; ^cDepartment of Conservation Biology, Doñana Biological Station, CSIC, Seville, Spain; ^dResearch Agency in Applied Ecology, Naturaconst@, Wilshausen, France; ^ePôle Scientifique, Fédération Nationale des Chasseurs, Issy-Les-Moulineaux, France; ^fAriège Departmental Federation of Hunters, Foix, France; ^gHautes-Pyrénées Departmental Federation of Hunters, Tarbes, France; ^hPirenalia, Encamp, Andorra; ⁱWildlife Ecology & Health group (WE&H), Bellaterra, Spain

Resumen.

Estimas poblacionales de los machos de urogallos *Tetrao urogallus* se llevaron a cabo durante la época de apareamiento utilizando dos métodos: conteos de machos al canto y muestreo no invasivo y análisis genéticos. Las estimaciones del número de machos fueron en promedio un 50% más bajas utilizando los conteos de machos al canto en comparación con las estimaciones obtenidas mediante el muestreo no invasivo y análisis genéticos, siendo las subestimaciones mayores cuando el número de urogallos en el cantadero era bajo.

Abstract.

Population estimates of male western capercaillies *Tetrao urogallus* were carried out during the mating season using two methods: counts of singing males and non-invasive genetic analysis. Estimates of male numbers were 50% lower using the singing counts compared to the estimates obtained through genetic analysis, and underestimates were greatest when the number of capercaillies was lowest.

4.2. Complete mitochondrial genome of the Western capercaillie *Tetrao urogallus* (Phasianidae, Tetraoninae).

Zootaxa (10.11646/zootaxa.4550.4.9)

Authors: Gaël Aleix-Mata, Francisco J. Ruiz-Ruano, Jesús M. Pérez, Mathieu Sarasa, Antonio Sánchez.

 Zootaxa 4550 (4): 585–593
<https://www.mapress.com/j/zt/>
Copyright © 2019 Magnolia Press

Article

ISSN 1175-5326 (print edition)
ZOOTAXA
ISSN 1175-5334 (online edition)

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4550.4.9>
<http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:12E18262-0DCA-403A-B047-82CFE5E20373>

Complete mitochondrial genome of the Western Capercaillie *Tetrao urogallus* (Phasianidae, Tetraoninae)

GAËL ALEIX-MATA^{1,5}, FRANCISCO J. RUIZ-RUANO², JESÚS M. PÉREZ¹,
MATHIEU SARASA³ & ANTONIO SÁNCHEZ⁴

¹Department of Animal and Plant Biology and Ecology, Jaén University, Campus Las Lagunillas, E-23071, Jaén, Spain.
E-mail: galeix@ujaen.es

²Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva, 18071 Granada, Spain.

³BEOPS, 1 Esplanade Compans Caffarelli, 31000 Toulouse, France

⁴Department of Experimental Biology, Jaén University, Campus Las Lagunillas, E-23071, Jaén, Spain

⁵Corresponding author

Gaël Aleix-Mata: galeix@ujaen.es ORCID: 0000-0002-7429-4051

Francisco J. Ruiz-Ruano: fjruizruano@ugr.es ORCID: 0000-0002-5391-301X

Jesús M. Pérez: jperez@ujaen.es ORCID: 0000-0001-9159-0365

Mathieu Sarasa: msarasa@beops.fr ORCID: 0000-0001-9067-7522

Antonio Sánchez: abaca@ujaen.es ORCID: 0000-0002-6715-8158

Resumen.

El urogallo (*Tetrao urogallus*) es un ave Galliforme que se encuentra en los bosques maduros boreales desde Escandinavia hasta Siberia oriental, con una población fragmentada en el suroeste de Europa. Hemos extraído ADN de una muestra de un ejemplar de *T. urogallus aquitanicus* usando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) y ensamblado el genoma mitocondrial completo combinando los datos de secuenciación Illumina y Sanger. El genoma mitocondrial de *T. urogallus* tiene 16683 pares de bases (pb) y es muy similar al de *Lyrurus tetrrix* (16677 pb). El genoma mitocondrial de *T. urogallus* contiene los 13 genes codificantes para proteínas (PCGs), 22 ARNs de transferencia, 2 ARNs ribosómicos (rRNAs) y una región de control. El número, orden y orientación de los genes mitocondriales son los mismos que en *L. tetrrix* y en otras especies de esta familia y de otras familias de aves. Los tres dominios de la región control contenían secuencias conservadas (ETAS; CSBs), “cajas” (Box-F, E, D, C, B, BS-Box-), el origen de replicación de la cadena H (O_H) y promotores bidireccionales de la traducción (LSP/HSP). Las filogenias obtenidas para las especies de Phasianidae utilizando para el análisis tanto los PCGs como los genomas mitocondriales completos concuerdan con la clasificación actual para esta familia.

Abstract.

The western capercaillie (*Tetrao urogallus*) is a Galliforme bird, found typically in boreal climax forests from Scandinavia to eastern Siberia but also in a fragmented population in southwestern Europe. We extracted the DNA using a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) from liver tissue of *T. urogallus aquitanicus*. The complete mitochondrial genome (mitogenome) sequence was obtained by combining Illumina and Sanger sequencing sequence data. The mitochondrial genome of *T. urogallus* is 16,683 bp long and is very similar to that of *Lyrurus tetrix* (16,677 bp). The *T. urogallus* mitogenome contains the normal 13 protein-coding genes (PCGs), 22 transfer RNAs, 2 ribosomal RNAs, and the control region. The number, order, and orientation of the mitochondrial genes are the same as in *L. tetrix* and in other species of the same and other bird families. The three domains of the control region contained conserved sequences (ETAS; CSBs), boxes (F, E, D, C, B, BS box), the putative origin of replication of the H-strand (OH) and bidirectional promoters of translation (LSP/HSP). The phylogenies obtained for the Phasianidae species using both the PCGs and complete mitogenomes for the analysis agree with the current classification for this family

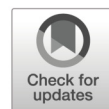
4.3. Distance sampling vs. Plot sampling for monitoring population abundances of the Pyrenean rock ptarmigan.

European Journal of Wildlife Research
(10.1007/s10344-020-01407-9)

Authors: Gaël Aleix-Mata, Marc Mossoll-Torres; Evelyn Marty; Mathieu Boos, Antonio Sánchez, Jesús M. Pérez.

European Journal of Wildlife Research (2020) 66:68
<https://doi.org/10.1007/s10344-020-01407-9>

ORIGINAL ARTICLE



Distance sampling vs. plot sampling for monitoring population abundances of the Pyrenean rock ptarmigan

Gaël Aleix-Mata^{1,2}  • Marc Mossoll-Torres³ • Evelyn Marty⁴ • Mathieu Boos^{5,6}  • Antonio Sánchez²  • Jesús M. Pérez^{1,7} 

Received: 23 March 2020 / Revised: 11 June 2020 / Accepted: 8 July 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Resumen.

El lagópodo alpino (*Lagopus muta*) tiene una distribución geográfica Holártica dentro de la cual su estatus cambia localmente de amenazado a abundante. Para una correcta gestión en diferentes escenarios de las poblaciones se requieren estimaciones precisas y exactas de la abundancia y/o densidades de las aves. Hemos utilizado un conjunto de datos geolocalizados de 56 muestreos de machos al canto realizados entre 2003 y 2017 para estimar la densidad del lagópodo alpino pirenaico (*L. m. pyrenaica*). Hemos analizado este conjunto de datos utilizando dos metodologías i) el método de los muestreos por parcelas (PS) con dos rangos de detección efectivos (EDR) de 250 m y 350 m y ii) el método de muestreos por distancia (DS). Nuestros resultados han mostrado que las estimaciones de densidad obtenidas por DS son más precisas y entre un 30 y un 87 % más altas que las obtenidas por PS utilizando un EDR de 250 m y 350 m. Los conteos realizados con PS subestiman las poblaciones y son menos precisos que los realizados por DS; este sesgo se magnifica cuando se usan EDR elevados. El monitoreo del lagópodo alpino en el Pirineo podría mejorarse significativamente con un mayor uso del método de estima por DS.

Abstract.

The rock ptarmigan (*Lagopus muta*) has a wide Holarctic geographical range, within which its status changes locally from threatened to abundant. For the correct management of populations under differing scenarios, accurate and precise estimates of bird abundances and/or densities are required. We used geolocated datasets from 56 counts of singing males carried out in 2003-2017 to estimate the density of Pyrenean rock ptarmigan (*L. m. pyrenaica*). We analysed these dataset using two methodologies i) a plot-sampling approach (PS) with two effective detection ranges (EDR) of 250 m and 350 m and ii) a conventional distance-sampling approach (DS). Our results showed that the estimates density obtained by DS were more precise and 30–87 % higher than those obtained by PS using 250 m and 350 m EDR. Monitoring with PS underestimates populations and is less precise than DS; this bias is magnified when high EDR values are used. The monitoring of the Pyrenean rock ptarmigan could be significantly improved with greater use of DS method.

4.4. Comparing methods for estimating the abundance of Rock ptarmigan *Lagopus muta* males: Distance Sampling versus Non-Invasive Sampling and Genetic Analysis.

Authors: Gaël Aleix-Mata, Antonio Sánchez, Jesús M. Pérez.

Resumen.

El lagópodo alpino (*Lagopus muta*) es un galliforme críptico que tiene la mayor distribución de su género. Obtener una estimación precisa del número de individuos es crucial para un manejo adecuado de las poblaciones silvestres. Los programas de monitoreo suelen basarse en conteos directos o indirectos, tras los cuales los datos se convierten en índices de abundancia y densidad. Se han monitoreado tres áreas para evaluar la precisión de dos métodos para estimar la densidad de esta especie, Distance Sampling (PC-DS) y muestreo no invasivo y análisis genéticos (NIS-GA). Para ello, se realizaron un conteo desde puntos fijos de los machos al canto en cada área, seguido de una recolección de heces. Los datos del conteo desde puntos fijos se analizaron con Distance Sampling convencional para obtener la densidad de cada área (estimación PC-DS). Las heces fueron genotipadas y sexadas para determinar cuántos especímenes están presentes en las áreas muestreadas (estimación NIS-GA). Las estimaciones PC-DS son un 14% superiores a las NIS-GA, además los resultados obtenidos serán útiles para diseñar futuros estudios comparativos.

Abstract

The rock ptarmigan (*Lagopus muta*) is a cryptic galliform with the largest distribution of this genus. Obtain an accurate estimates of the abundance of individuals is crucial for a proper management of wildlife populations. Surveillance programmes are usually based on direct or indirect surveys, after which the data are converted into indices of abundance and density. A monitoring was performed in three areas for to assess the accuracy of two methods to estimate the density of this species, Distance Sampling (PC-DS) and non-invasive sampling and genetic analysis (NIS-GA). One Point-count of the singing males was performed in each area fallow-it by a faeces collection, the data of the Point-count were analysed under the conventional Distance Sampling approach to obtain the density of each area (PC-DS estimation). The faeces were genotyped and sexed to determine how many specimens are presents in the sampled areas (NIS-GA estimation). The PC-DS estimations are 14% higher than the NIS-GA, and these results could be very useful for designing future comparative studies.

Introduction.

For a proper management of wildlife populations, obtain an accurate estimates of the abundance of individuals is crucial (Shea 1998; Williams et al. 2002). Methods giving precise and accurate estimates of density are needed for address population's status and trend in order to implement and/or evaluate management measures (Greenwood and Robinson 2006). In the case of game species, reliable density estimates are pivotal to know and quantify the impact of hunting on the population viability (Francheschi et al. 2014). However, obtaining reliable estimates of the abundance of wild species, particularly birds, is not a simple task (Bibby 2004; Buckland et al. 2008).

Surveillance programmes focussed on population trends are usually based on direct or indirect surveys, after which the data are converted into indices of abundance and density (Gregory et al. 2004; Bart 2005). Some approaches, such as Distance Sampling (Buckland et al. 2001), permit go further and apply detection functions for obtaining precision of estimated densities (Buckland et al. 2008; Francheschi et al. 2014). However, it is important to re-evaluate and compare the estimations methods used to assess their accuracy and to optimize sampling effort for a better use of available resources (Cagnacci et al. 2013; Aleix-Mata et al. 2020b). Moreover, comparison of different methods helps us for selecting the best method for a particular species and habitat (Blondel et al. 1981; Evans et al. 2007).

The rock ptarmigan *Lagopus muta*, is a cryptic galliform with an Arctic–Alpine distribution (the largest one within this genus) (Storch 2007). Globally, it is categorized as Least Concern, but is Near Threatened in France and Vulnerable in Spain and other European countries (Canut et al. 2004; BirdLife International 2015; BirdLife International 2016; UICN France et al. 2016). The rock ptarmigan has become isolated in the mountainous massifs of southern Europe after the last glaciations (Taberlet et al. 1998; Caizergues et al. 2003) where it selects rocky and stony areas in the highest altitudes (≥ 1800 m) and the coldest mountain slopes, where the climatic conditions are the more favourable for this species (Favaron et al. 2006; Nelli et al. 2013; Bisi et al. 2017). In the Pyrenees and in the Alps we found two different subspecies, *L. m. pyrenaica* and *L. m. helvetica* respectively (Caizergues et al. 2003). Monitoring populations of this subspecies is challenging due to the rugged terrain and harsh

climate conditions of its habitats (Marty and Mossoll-Torres 2012; Pedersen et al. 2012) and also to its cryptic nature and elusive behaviour (Favaron et al. 2006; Pedersen et al. 2012; Jakob and Ponce-Boutin 2013; Furrer et al. 2016).

The best timing for carrying out such activities is during the mating season (spring), when the males sing and are most conspicuous since they have the intermediate moulting plumage (Watson 1965; Bergerud and Mercer 1966). Until now, some field protocols have been developed to obtain population data, being the count of the singing males from sampling points: Point-counts the most widely used (Marty and Mossoll-Torres 2012). To estimate densities of rock ptarmigan, data obtained from these Point-counts can be analysed in two different ways: under a Plot Sampling scheme (Marty and Mossoll-Torres 2012; Aleix-Mata et al. 2020b) or using Distance Sampling (Franchesi et al. 2014; Aleix-Mata et al. 2020b). Comparative studies of both approaches evidenced that Distance Sampling gives higher and more precise estimates of density than Plot Sampling (Franchesi et al. 2014; Aleix-Mata et al. 2020b).

Another method employed to estimate the number of specimens of the western capercaillie, *Tetrao urogallus*, is based on the non-invasive sampling (feathers, faeces) and genetic analysis (NIS-GA) (Jacob et al. 2010, Mollet et al. 2015, Rösner et al. 2013; Aleix-Mata et al. 2020a). This method, allows to obtain densities 48 % higher than those given by direct counts on the field (Aleix-Mata et al. 2020a). Unlike other monitoring methods (e.g., acoustic recordings) (Marin-Cudaz et al. 2019), this methodology provides information for each individual through several years. If the protocol for collecting samples is adapted to the nature of the studied species, estimated densities as well as other demographic parameters, such as sex-ratio, obtained by non-invasive sampling and genetic analysis could be less biased and match better with the real population parameters (Donald, 2007; Lentner et al. 2018; Aleix-Mata et al. 2020a; 2020c). However, until now NIS-GA has not yet been applied to estimate population size of the rock ptarmigan.

To date, there is no a gold-standard method for comparing estimates and obtaining their accuracy (e.g., in relation to the real population size) for this species. A possible alternative to overcome this obstacle is to use populations with known size or artificial populations (e.g.,

those simulated by audio devices) (Alldredge et al. 2008). However, from technical and logistical viewpoints, this is a very difficult task, but the combination of such strategy with NIS-GA could be a good alternative.

The aim of this study is to estimate the size of the rock ptarmigan population in the study areas using NIS-GA, and compare the results obtained with those given by Point-count and Distance Sampling (PC-DS) protocols.

Material and methods.

Study area.

The study was conducted in three small areas: Isère (French Alps; 45°11'N, 6°9'E), Ariège (French Pyrenees ; 42°42'N, 1°58'E) and Andorra (42°32'N, 1°25'E) (Fig. 1). The whole study area covered about 550 ha (280 ha in Isère, 140 ha in Ariège and 130 in Andorra), in which all rock ptarmigan habitats above the treeline (≥ 1800 m) were included. In these areas, due to the altitude, the climate is highly changeable with abundant rainfall, especially in spring (López-Moreno and Vicente-Serrano 2007; Dumont et al. 2019). The study was carried out during the mating season (spring 2017) and all surveys were performed from April 31th to June 8th.



Figure 1. Location of the study areas (represented by dots).

Field methods.

To compare the two estimation methods, PC-DS and NIS-GA, one survey in each area was carried out. Each survey consisted in counting rock ptarmigan singing males from tree points (Point-count), followed by a collection of faeces.

The Point-counts were performed from three sampling points per area with an observer per point. In order to increase sample size (e.g., number of observations) the sampling points were placed between 250 to 450 m from each other (Fig. 2). Accessibility and observer's safety were always taken into account. Observations from each Point-count started one hour before and finished half an hour after sunrise, coinciding with maximum rock ptarmigan singing activity (Marty and Mossoll-Torres 2012). Observers took up position at the sampling points in the dark before the beginning of counting, and during 1.5 hours observers recorded the time and location (on a 1: 25000 map) of each detected rock ptarmigan call. When calls were not accurately located, after finishing Point-counts, the observer(s) went to the specific point to confirm the exact position taking in account the feathers, traces in the snow, or droppings. When the Point-count was finished, the observers pooled their observations, in order to eliminate doubtful observations, potential double counts, and group all the observations on a 1: 25000 summary map (Aleix-Mata et al. 2020b) (Fig. 2).

For comparing densities estimates obtained by PC-DS and NIS-GA, faeces were collected in a radius of 250 m around the sampling points. This distance corresponds to the effective detection radius for this species (Marty and Mossoll-Torres 2012; Franceschi et al. 2014; Aleix-Mata et al. 2020b). At the end of each Point-count, and after the pooling of the observations, all fresh faeces were collected in the area defined by the sampling points, performing transects separated 25 m each other, following the contour lines. Only faeces considered as recent and well preserved were collected (e.g., not too discoloured by the sun with evident uric acid, white end, and whole). Every stool was individually placed in a Falcon tube with silica gel and its location was georeferenced using a GPS. Once in the lab, they were stored at -20° C until analysis (Aleix-Mata et al. 2020a). To avoid any accident the dangerous zones were not sampled, hence the prospected area correspond to the sampling area without the dangerous zones (Fig. 2).

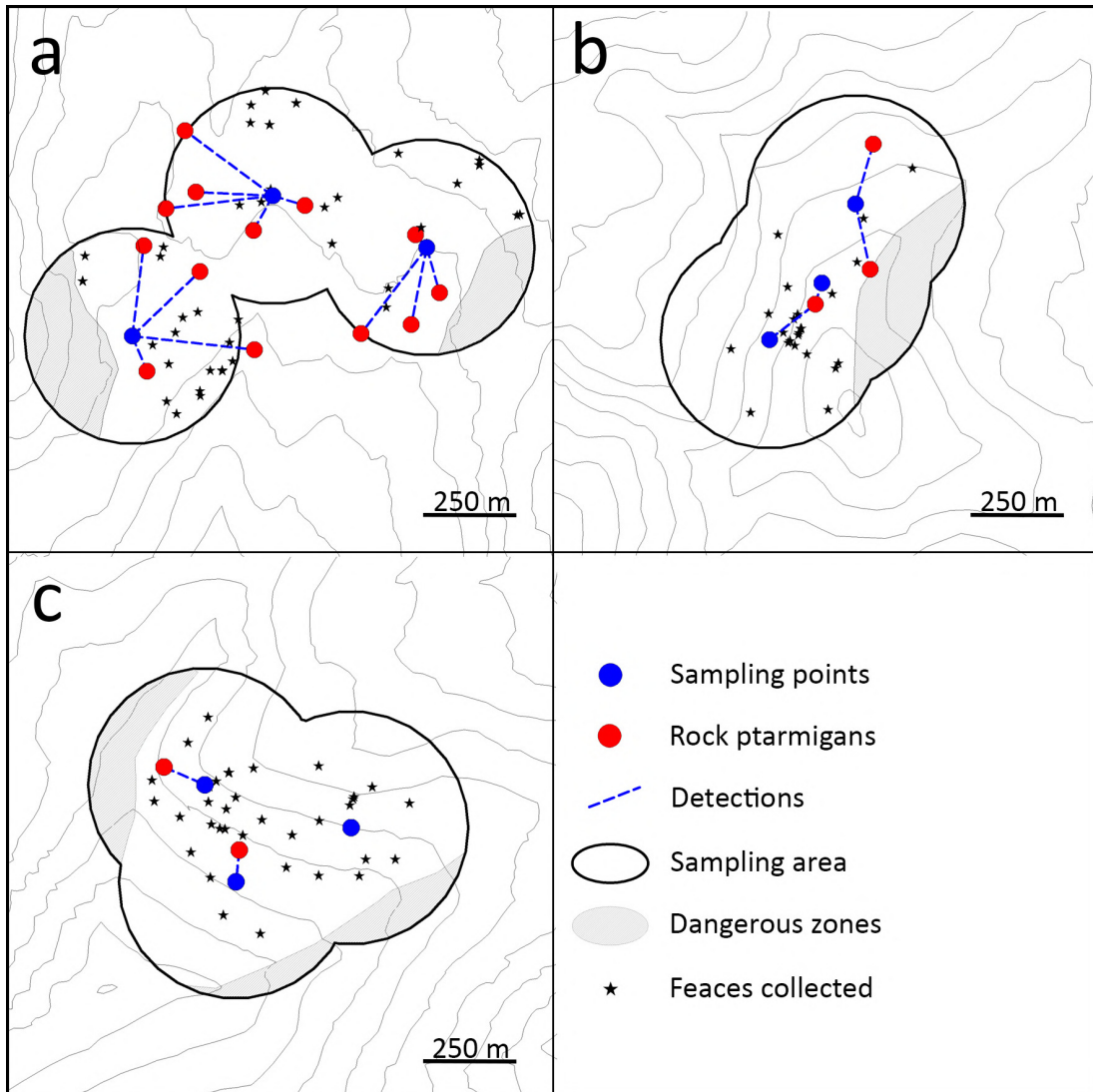


Figure 2. Detail of the sampled areas; a) Isère; b) Ariège; c) Andorra. The position of the sampling points, areas delimitation, the rock ptarmigans detected, collected faeces location, and the dangerous zones (not sampled) are represented.

Data analysis (PC-DS).

To estimate the density of rock ptarmigan with PC-DS, the summary maps of each Point-count were digitized to calculate the detections distances (those between the sampling points and detected ptarmigans: radial distances) using Quantum GIS (QGIS Development Team 2014). As stated by Aleix-Mata et al. (2020b), the method used to perform the Point-counts avoids violating Distance Sampling assumptions: a) arriving at night at the sampling

point; b) recording each bird at their first location; c) geolocation of each sampling point and each rock ptarmigan detected; d) use of a GIS program to calculate the detections distances. Data obtained from each Point-count were analysed under the conventional Distance Sampling approach (Buckland et al. 2001). As recommended by Thomas et al. (2010), we used the following detection functions: i) half-normal key with cosine adjustment, ii) half-normal key with hermite polynomial adjustment, iii) uniform key with cosine adjustment and iv) hazard-rate key with simple polynomial adjustment. The number and order of adjustment terms required for the analysis were automatically selected by Distance using the databased criteria with three maximum terms, of the AIC selection criterion (Franceschi et al. 2014). The encounter rate was obtained for each Point-count and its variance was empirically estimated (Buckland et al. 2001; Franceschi et al. 2014; Pérez et al. 2015; Aleix-Mata et al. 2020b). All the analyses were performed with Distance 7.0 Beta 3 (Thomas et al. 2010) without truncating observations, and without grouping data into distance intervals. Both densities and theirs associated CVs were calculated for each count.

Genotyping and sexing samples (NIS-GA).

DNA of each sample was extracted using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit and the QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and the DNA was eluted in 150 µl of TLE buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) and stored at 4 °C until analysis. Each batch of extractions (n = 24) were performed in an isolated area of the laboratory, and the working area and the equipment used to handling samples were washed with 20 % bleach solution between manipulation of each sample (Aleix-Mata et al. 2020a). A quarantine period of a minimum of 24 hours was respected before performing any PCR or other round of DNA extraction. To evaluate the yield of extracted DNA a PCR control was performed using LM-Cont-F and LM-Cont-R primers, following the protocol described by Aleix-Mata et al. (2020c). DNA samples without amplification of this control PCR were discarded, and those giving successful PCR amplification were genotyped and sexed. For genotyping and sexing the samples, the primers, the four PCR multiplex, the multi-tube approach with three replicates per locus and sample as described by Aleix-Mata et al. (2020a). For genotyping samples, the primers set described by Constanzi et al. (2018) was used, but excluding locus Mut 12, as

recommended by Aleix-Mata et al. (2020c). Sexing was performed using PU and P8mod primers (Pérez et al. 2011) amplifying a fragment of the sex-linked chromodomain-helicase-DNA-binding protein (CHD) gene. The PCR product was run on a Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystem), provided by the technical services of the University of Jaén. Alleles were sized using the GeneMapper Software version 4.1 (Applied Biosystems). With the three replicates per locus and sample, a consensus genotype was established, and quality index (QI) similar to the one described by Miquel et al. (2006) was calculated (Aleix-Mata et al. 2020c). Samples with a QI less than 0.6 or with more than four non-genotyped loci were discarded from further analyses. The final number of specimens genotyped was obtained using Gimlet v1.3.3 (Valière 2002) and the probability of identity, unbiased ($P_{(ID)}$) and between siblings ($P_{(ID)sib}$) (Waits et al. 2001) were obtained using Cervus v3.0.7 (Field Genetics; Marshall et al. 1998). Density of males present in each prospected area ($\hat{D}$), was calculated by dividing the number of males genotyped in each area by the surface of each prospected area (whole sampled area excluding dangerous zones), and multiplying it by 100 to get a density per km²:

$$\hat{D} = \frac{N \text{ genotyped males}}{\text{Prospected area}} 100$$

A Wilcoxon paired signed-ranks test was used, to compare the densities estimated by PC-DS and those obtained by NIS-GA.

Results.

During the study, three Point-counts were carried out and 18 male rock ptarmigan were detected from the 9 sampling points (Table 1). In all cases, the uniform function with cosine expansion was selected by Distance modelling. The distance of detection ranged from 39 to 284 m (mean = 139.3 m $\pm$ 78.6 m). PC-DS estimates of male density varied from 17.1 to 23.2 σ /km², with associated coefficient of variation ranging from 7.7 to 61.9 %, being higher for those counts with few observations (Ariège and Andorra) (Table 1).

Table 1. Global data of the studies areas for each method.

Area	Date	SP	<i>L. muta</i>	Obs	$\hat{D}_{PC-DS}$	CV_{PC-DS}	Prospected area (ha)	Genotyped males (*)	$\hat{D}_{NIS-GA}$
Isère	31/05/17	3	13	13	17.1	7.7	47	10 (9)	21.3
Ariège	08/06/17	3	3	4	15.9	61.9	32	3 (2)	9.3
Andorra	07/06/17	3	2	2	23.2	50.0	33.6	6 (6)	17.8

SP: sampling points; *L. muta*: rock ptarmigans detected during the survey; Obs: observations used to implement Distance; $\hat{D}_{PC-DS}$: estimated density by Distance Sampling of displaying males (σ/km^2); CV_{PC-DS} : coefficient of Variation (%); $\hat{D}_{NIS-GA}$: estimated density by non-invasive genetic analysis (σ/km^2) (Number of genotyped males / Prospected area x 100); * Number of genotyped females in brackets.

During the NIS-GA sampling, a total of 106 samples were collected (44 in Isère, 26 in Ariège, and 36 in Andorra). The PCR control allowed us to discard 28 samples (26 %) and the remaining 78 samples (74 %) were genotyped and sexed. Finally, 72 samples (68 % out of the 106 collected) were successfully genotyped and sexed. The estimated probability of identity ($P_{(ID)sib} = 8.9 \times 10^{-7}$) indicated that the 15 loci used permit discriminating specimens with a high degree of confidence. The microsatellite analysis demonstrated that the 72 genotyped samples belonged to 39 rock ptarmigan specimens: 19 males and 17 females. Since females cannot be detected by song (Bergerud and Mercer 1966; Pelletier and Krebs 1997), they were not taken into account in this analysis. Densities of males obtained with NIS-GA varied from 9.3 to 21.3 σ/km^2 (Table 1).

Densities estimated by PC-DS were 14% higher than those obtained by NIS-GA, however this difference was not significant (Wilcoxon paired signed-ranks test: $z = -1.069$; $N = 3$; $Df = 2$; $P = 0.28$).

Discussion.

The spring rock ptarmigan densities were estimated with two methods, PC-DS and NIS-GA. The field data used to estimate the densities by PC-DS were obtained by Point-counts (Marty and Mossoll-Torres 2012) and as stated by Aleix-Mata et al. (2020b) these protocols meet the basic assumptions required by the conventional Distance Sampling approach. The

faeces used for the NIS-GA were collected the same day and in a radius of 250 m around the sampling points. Therefore, the estimated densities obtained with both methods can be compared, as happen in similar studies focussed on the western capercaillie (Aleix-Mata et al. 2020a).

The density estimates obtained by PC-DS varied from 17.1 to 23.2 σ/km^2 depending on the area, and their associated CVs varied greatly from 7.7 to 61.9%, being estimates of the Pyrenean areas those with the highest CVs. In fact, when working with small number of observations/detections, these CV values are expected to become high, therefore increasing the number of sampling points (sampling effort) could allow us to increase precision of estimated density (Buckland et al. 2001; Aleix-Mata et al. 2020b). This was the case of Ariège and Andorra, where only four and two detections, respectively, of rock ptarmigan were achieved, giving CV values $\geq 50\%$. In fact, the density obtained for the Isère population was more precise (CV = 7.7 %, Table 1). The number of daily-detected singing males can become very variable. In the Pyrenees, the peak of singing activity occurs between 10th to 25th May (Marty and Mossoll-Torres, 2012). Because of logistical limitations, counts included in our study were carried out late in the mating season (7th - 8th June), and this fact could explain, at least in part, the low number of animals detected in Ariège and Andorra. In Isère, the counts were carried out one week early, and the observed singing activity was higher with the subsequent increase of detections (13 males). This fact suggest the need to standardize and synchronize sampling efforts for later comparison of rock ptarmigan densities.

The estimates obtained by NIS-GA varied from 9.3 to 21.3 σ/km^2 . As the sampling protocol was designed taking into account the biological characteristics of the target species and adapted to environmental and topographic characteristics of the surveyed areas, we can expect that the parameters estimated by this procedure were less biased and best related to the actual population parameters (Donald 2007; Lentner et al. 2018; Aleix-Mata et al. 2020c). In this study the protocols for faeces collection were designed to minimize the bias due to the observer: faeces were collected systematically, with an equivalent sampling effort for the whole prospected area. Moreover, it is interesting to note that during the Point-counts any rock ptarmigan was detected in the dangerous zones (Fig. 2). In addition, the protocols

followed for genotyping and sexing the samples, repeating each PCR three times, allow to have an accurate determination of the genotype and sex (Aleix-Mata et al. 2020c), which permit avoid possible errors that could generate over- or underestimation of the specimens in populations (Navidi et al. 1992; Creel et al. 2003).

In average, densities obtained by PC-DS were 14 % higher than those given by NIS-GA, however such differences were not significant. Compared to other methods such as Plot Sampling, Distance Sampling seems to be adaptable for estimating rock ptarmigan densities since it usually gains precision (Buckland et al. 2001; Franchesi et al. 2014; Aleix-Mata et al. 2020b). The estimates obtained by the NIS-GA were usually considered closer to the actual population sizes (Lenter et al. 2018; Aleix-Mata et al. 2020a) and it can be expect that they would be similar to those given by PC-DS. However, the high associated CV values obtained (50 % in Andorra and 61.9 % in Aïège) suggest that these results must interpret with precaution: one thing is the precision of a sampling method and other one is a high variation between local densities. In Ariège, the number of genotyped specimens was very small, and was not in line with results obtained in previous Point-counts surveys. In fact, in Ariège, most of samples were collected in a small area (Fig. 1b), because of difficulty in finding samples in an important surface as a consequence of the abundant vegetation. Therefore, this fact probably contributed to obtain underestimated densities in this location.

In summary, in Isère the densities estimated by the different methods were close each other, being more precise (lower CV) those obtained with PC-DS. In Andorra, the estimates were also quite similar, however the CV associated to the PC-DS density estimates was very high. On the contrary, in Ariège, the estimated densities given by both methods were more divergent and also had a very high CV values. At this point, we have detected some elements (date of the Pyrenean surveys, vegetation of Ariège area) that make us doubt that the results obtained in this work can be used to compare confidently the two estimation methods, PC-DS and NIS-GA. However, this exploratory analysis shows a certain relationship between the estimates obtained with the both methods. Therefore, these results could be very useful for designing future studies, which will allow us to compare both methods. Moreover, it will be possible to estimate the actual size of the populations with the NIS-GA, increasing the

number of sample collections, in order to apply the Capture-Recapture models for non-invasive samples (Mondol et al. 2009).

References.

- Aleix-Mata, G., Adrados, B., Boos, M., Marty, E., Mourieres, P., Tucat, G., Thion, N., Mossoll-Torres, M., Pérez, J.M., Sánchez, A. (2020a) Comparing methods for estimating the abundance of Western Capercaillie *Tetrao urogallus* males in Pyrenean leks: singing counts versus genetic analysis of non-invasive samples. *Bird Study*, 66: 565-569.
- Aleix-Mata, G., Mossoll-Torres, M., Marty, E., Boos, M., Sánchez, A., Pérez, J.M. (2020b) Distance sampling vs. Plot sampling for monitoring population abundances of the Pyrenean Rock ptarmigan. *European Journal of Wildlife Research* (in press)
- Aleix-Mata, G., Pérez, J.M., Adrados, B., Boos, M., Marty, E., Mourieres, P., Lauer, E., Zimmermann, S., Mossoll-Torres, M., Sánchez, A. (2020c) Sex ratio of Alpine and Pyrenean Rock Ptarmigans *Lagopus muta* estimated by non-invasive methods and by hunting bag data. *Ardeola* (in press).
- Aldredge, M.W., Pacifici, K., Simons, T.R., Pollock, K.H. (2008) A novel field evaluation of the effectiveness of distance and independent observer sampling to estimate aural avian detection probabilities. *Journal of Applied Ecology*, 45: 1349-1356.
- Bart, J. (2005) Monitoring the abundance of bird populations. *The Auk*, 122: 15-25.
- Bergerud, A.T., Mercer, W.E. (1966) Census of the Willow Ptarmigan in Newfoundland. *The Journal of Wildlife Management*, 30: 101-113.
- Bibby, J.C. (2004) Bird density survey methods. In: Sutherland, W.J., Newton, I., Green, R.E. (Eds.) *Bird ecology and conservation: a handbook of techniques*, pp. 1–11. Oxford University Press, Oxford.

BirdLife International (2015). *European Red List of Birds*. Office for Official Publications of the European Communities. Luxembourg.

BirdLife International (2016). *Lagopus muta* (errata version published in 2017). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T22679464A113623562. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016>.

Bisi, F., Martinoli, A., D'Acunto, D., Gagliardi, A., Masseroni, E., De Franceschi, C., Preatoni, D., Wanters, L.A., Martinoli, A. (2017) Habitat Selection by Alpine Rock Ptarmigan *Lagopus muta helvetica* in the Italian Alps. *Ornithological Science*, 16: 93-100.

Blondel, J., Ferry, C., Frochot, B. (1981) Point counts with unlimited distance. In: Ralph C.J., Scott, J.M. (Eds.) *Estimating numbers of terrestrial birds*, pp. 414-420. Studies in Avian Biologie No. 6, Cooper Ornithological Society, Kansas.

Buckland, S.T., Anderson, D.R., Burnham, K.P., Laake, J.L., Borchers, D.L., Thomas, L. (2001) *Introduction to Distance Sampling*. Oxford University Press, Oxford.

Buckland, S.T., Marsden, S.J., Green, R.R. (2008) Estimating bird abundance: making methods work. *Bird Conservation International*, 18: S91-S108.

Cagnacci, F., Cardini, A., Ciucci, P., Ferrari, N., Mortelliti, A., Preatoni, D.G., Russo, D., Scandura, M., Wauters, L.A., Amori, G. (2013) Less is more: researcher survival guide in times of economic crisis. *The Italian Journal of Mammalogy*, 23: 1-7.

Caizergues, A., Bernard-Laurent, A., Brenot, J.F., Ellison, L., Rasplus, J.Y. (2003) Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and Western Europe. *Molecular Ecology*, 12: 2267-2274.

Canut, J., García, D., Parellada, X., Lorente, L. (2004). Lagópodo alpino, *Lagopus mutus*. In: Madroño, A., González, C., Atienza, J.C. (Eds.): *Libro rojo de las aves de España*, pp. 173-175. Dirección General para la Biodiversidad-SEO/BirdLife. Madrid.

- Costanzi, J.M., Bergan, F., Sæbø, M., Jenkins, A., Steifetten, Ø. (2018) Development and evaluation of 16 new microsatellite loci for the rock ptarmigan (*Lagopus muta*) and cross-species amplification for the willow grouse (*L. lagopus*). BMC Research Notes, 11: 1-5.
- Creel, S., Spong, G., Sands, J.L., Rotella, J., Zeigle, J., Joe, L., Murphy, K.M., Smiths, D. (2003) Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. Molecular Ecology, 12: 2003-2009.
- Donald, P.F. (2007) Adult sex ratios on wild bird population. Ibis, 149: 671-692.
- Dumont, L., Lauer, E., Zimmermann, S., Roche, P., Auliac, P., Sarasa, M. (2019) Monitoring black grouse *Tetrao tetrix* in Isère, northern French Alps: cofactors, population trends and potential biases. Animal Biodiversity and Conservation, 42:227–244.
- Evans, S., Mougeot, F., Redpath, S., Leckie, F. (2007) Alternative methods for estimating density in an upland game bird: the red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. Wildlife Biology, 13: 130–139.
- Favaron, M., Scherini, G.C., Preatoni, D., Tosi, G., Wauters, L.A. (2006) Spacing behaviour and habitat use of rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) at low density in the Italian Alps. Journal of Ornithology, 147: 618-628.
- Franceschi, S., Nelli, L., Pisani, C., Franzoi, A., Fattorini, L., Meriggi, A. (2014) A Monte Carlo appraisal of plot and distance sampling for surveys of black grouse and Rock ptarmigan populations in alpine protected areas. Journal of Wildlife Management, 78: 359–368.
- Furrer, R., Schaub, M., Bossert, A., Isler, R., Jenny, H., Jonas, T., Marti, C., Jenni, L. (2016) Variable decline of Alpine Rock Ptarmigan (*Lagopus muta helvetica*) in Switzerland between regions and sites. Journal of Ornithology, 157: 787-796.
- Greenwood, J.J.D., Robinson, R.A. (2006) Principles of sampling. In: Sutherland, W.J. (Ed) *Ecological census techniques*, pp. 11-86. Cambridge University Press, Cambridge.

- Gregory, R.D., Gibbons, D.W., Donald, P.F. (2004) Bird census and survey techniques. In: Sutherland, W.J., Newton, I., Green, R.E (Eds.) *Bird ecology and conservation: a handbook of techniques*, pp. 17-56. Oxford University Press, Oxford.
- Jacob, G., Debrunner, R., Gugerli, F., Schmid, B., Bollmann, K. (2010) Field surveys of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Swiss Alps underestimated local abundance of the species as revealed by genetic analyses of non-invasive samples. *Conservation Genetics*, 11: 33-44.
- Jakob, C., Ponce-Boutin, F. (2013) Recent tools for population abundance estimation adjustment and their use in long-term French red-legged partridge survey. *Avocetta*, 37: 77-82.
- Lentner, R., Masoner, A., Lehne, F. (2018) Are counts on leks of Capercaillie and Black Grouse still state-of-the-art? Results from grouse monitoring in Tirol, Austria. *Der Ornithologische Beobachter*, 115: 215-238.
- López-Moreno, I., Vicente-Serrano, S.M. (2007) Atmospheric circulation influence on the inter annual variability of snow pack in the Spanish Pyrenees during the second half of the 20th century. *Nordic Hydrology*, 38:33-44.
- Marin-Cudraz, T., Muffat-Joly, B., Novoa, C., Aubry, P., Desmet, J.F., Mahamoud-Issa, M., Nicolè, F., Van Niekerk, M.H., Mathevon, N., Sèbe, F. (2019) Acoustic monitoring of rock ptarmigan: A multi-year comparison with point-count protocol. *Ecological Indicators*, 101: 710–719.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk., L.E.B., Pemberton, J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639-655.
- Marty, E., Mossoll-Torres, M. (2012) Point-count method for estimating Rock ptarmigan spring density in the Pyrenean chain. *European Journal of Wildlife Research*, 58: 357-363.

- Miquel, C., Bellemain, E., Poillot, C., Bessière, J., Durand, A., Taberlet, P. (2006) Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach. *Molecular Ecology Notes*, 6: 985-988.
- Mollet, P., Kéry, M., Gardner, B., Pasinelli, G., Royle, J. A. (2015) Estimating Population Size for Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) with Spatial Capture-Recapture Models Based on Genotypes from One Field Sample. *Plos One*, 10: e0129020.
- Mondol, S., Ullas Karanth, K., Samba Kumar, N., Gopalaswamy, A.M., Andheria, A., Ramakrishnan, U. (2009) Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. *Biological Conservation*, 142: 2350–2360.
- Navidi, W., Arnheim, N., Waterman, M.S. (1992) A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. *American Journal of Human Genetics*, 50: 347-359.
- Nelli, L., Meriggi, A., Franzoi, A. (2013) Habitat selection by breeding rock ptarmigan *Lagopus muta helvetica* males in the western Italian Alps. *Wildlife Biology*, 19: 382-389.
- Pedersen, A.O., Bårdsen, B.J., Yoccoz, N.G., Lecomte, N., Fuglei, E. (2012) Monitoring Svalbard rock ptarmigan: Distance sampling and occupancy modeling. *Journal of Wildlife Management*, 76: 308–316.
- Pelletier, L., Krebs, C.J. (1997) Line-transect sampling for estimating ptarmigan (*Lagopus spp.*) density. *Canadian Journal of Zoology*, 75: 1185–1192.
- Pérez, J.M., Sarasa, M., Moço, G., Granados, J.E., Crampe, J.P., Serrano, E., Maurino, L., Meneguz, P.G., Afonso, A., Alpizar-Jara, R. (2015) The effect of data analysis strategies in density estimation of mountain ungulates using distance sampling. *Italian Journal of Zoology*, 82:262–270.
- Pérez, T., Vazquez, J.F., Quirós, F., Domínguez, A. (2011) Improving non-invasive genotyping in capercaillie (*Tetrao urogallus*): redesigning sexing and microsatellite primers to increase efficiency on faeces samples. *Conservation Genetics Resources*, 3: 483-487.

QGIS Development Team (2014) QGIS geographic information system. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.

Rösner, S., Brandl, R., Segelbacher, G., Lorenc, T., Müller, J. (2014) Noninvasive genetic sampling allows estimation of capercaillie numbers and population structure in the Bohemian Forest. *European Journal of Wildlife Research*, 5: 789-801.

Shea, K. (1998) Management of populations in conservation, harvesting and control. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 371-375.

Storch, I. (2007) Grouse: Status Survey and Conservation Action Plan 2006–2010. IUCN and World Pheasant Association. Gland, Switzerland, and Fordingbridge.

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

Thomas, L., Buckland, S.T., Redstad, E.A., Laake, J.L., Strindberg, S., Hedley, S.L., Bishop, J.R.B., Marques, T.A., Burnham, K.P. (2010) Distance software: design and analysis of distance sampling surveys for estimating population size. *Journal of Applied Ecology*, 47:5-14.

UICN France, MNHN, LPO, SEOF, ONCFS (2016) *La Liste rouge des espèces menacées en France*. Paris.

Valière, N. (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 2: 377-379.

Waits, L.P., Luikart, G., Taberlet, P. (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10: 249-256.

Watson, A. (1965) A population study of ptarmigan (*Lagopus mutus*) in Scotland. *Journal of Animal Ecology*, 34: 135–172.

Williams, B.K., Nichols, J.D., Conroy, M.J. (2002) *Analysis and management of animal populations*. Academic Press, San Diego, California.

4.5. Sex ratio of Alpine and Pyrenean rock ptarmigans
Lagopus muta estimated by non-invasive methods and
by hunting bag data

Ardeola (10.13157/arla.68.1.2021.sc1)

Authors: Gaël Aleix-Mata, Jesús M^a. Pérez, Begoña Adrados, Mathieu Boos, Evelyn Marty, Pierre Mourieres, Estelle Lauer, Sébastien Zimmermann, Marc Mossoll-Torres, Antonio Sánchez.

Resumen.

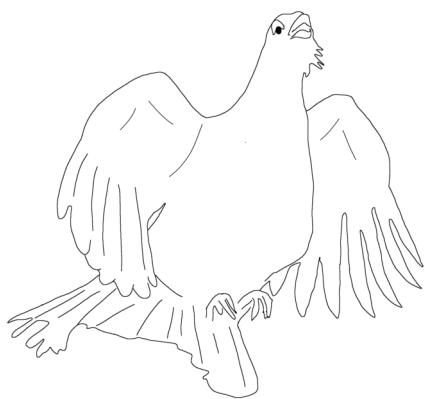
En la mayoría de las especies unisexuales, el número de machos y de hembras es aproximadamente igual. La proporción de sexos de los adultos (ASR) es un parámetro demográfico clave para la conservación y la gestión de las especies silvestres. Sin embargo, en el caso de las aves monomórficas como el lagópodo alpino *Lagopus muta* la estimación de la proporción de sexos es difícil. Para comprobar si la proporción de los sexos es equilibrada, hemos analizado la proporción de los sexos de los adultos de este tetraónido con dos métodos diferentes, utilizando la individualización por microsatélites de muestras no invasivas (heces) y los datos de ejemplares cazados en los Alpes y los Pirineos franceses. Los resultados de nuestro estudio no invasivo revelaron una ASR equilibrada en primavera, mientras que los especímenes cazados tenían una proporción fuertemente sesgada a favor de los machos en los adultos, pero una proporción de sexos aproximadamente equilibrada en los jóvenes (< 1 año). La proporción de los sexos estimada a partir de los datos de caza puede estar sesgada en la población adulta y, como ocurre en otras especies, no es representativa de la proporción de los sexos real. Nuestros resultados sugieren que, suponiendo que la estrategia de muestreo fuese adecuada, el muestreo no invasivo y análisis genético es un buen método para estimar la ASR.

Abstract.

In most unisexual species, the numbers of male and female specimens are approximately equal. The adult sex ratio (ASR) is a key demographic parameter for the conservation and management of wild species. However, in the case of monomorphic birds such as the rock ptarmigan *Lagopus muta* the estimation of the sex ratio is difficult. To test if the sex ratio is balanced, we analysed the adult sex ratio of this tetraonid with two different methods, using the microsatellite individualisation of non-invasive samples (faeces) and the hunting bag data of specimens hunted in the French Alps and Pyrenees. The results of our non-invasive study revealed a balanced ASR in spring, whereas hunted specimens had a strongly male-biased ratio for adults but an approximately balanced sex ratio for juveniles (< 1 year). The sex ratio estimated from hunting data may be biased in adult population and, as occurs in other species, is not representative of the overall sex ratio. Our results suggest that, assuming our sampling strategy was adequate, the non-invasive sampling is a good method to estimated ASR.

Capítulo 5:

Discusión general



5.1. Aspectos metodológicos.

Una parte importante en el desarrollo de esta tesis fue la puesta a punto de los protocolos para los análisis genéticos de las muestras de heces recogidas en el campo. En esta puesta a punto, se buscó optimizar el porcentaje de muestras que eran analizadas con éxito, aumentar la fiabilidad de los resultados y disminuir los costes por muestra asociados a esta metodología.

En cuanto al porcentaje de muestras analizadas con éxito, en el caso del urogallo, se pudieron analizar (genotipar y sexar) con éxito el 93 % de las muestras que se recogieron en el campo, siendo este porcentaje uno de los más elevados de los descritos en este tipo de estudios para esta especie (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). De hecho, este porcentaje es muy variable en diferentes estudios, encontrándose entre el 26 y 75 % (Regnaut et al. 2006; Jacob et al. 2010), el 75 y 80 % (Bañuelos et al. 2019; Cayuela et al. 2019), e incluso en algunos casos superior al 90 % (Rösner et al. 2014; Vallant et al. 2018; Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). En el caso del lagópodo alpino el porcentaje de heces que se analizó con éxito fue más bajo y se situó alrededor del 68 % (Aleix-Mata et al. 2020c; Capítulos 4.4 y 4.5), sin embargo, no se encontraron estudios similares en lagópodo alpino para poder comparar. Comparando los datos de esta especie con los que se obtuvimos en el urogallo, usando los mismos protocolos de conservación y de análisis de las muestras, el porcentaje de muestras analizadas con éxito de lagópodo alpino fue un 25 % inferior al obtenido en el urogallo. Varios parámetros pueden explicar esta diferencia, como el estado de conservación y el tamaño de las muestras. Además, otro aspecto importante fue el tiempo en que las muestras estuvieron expuestas al medio desde que fueron expulsadas. Según Jacob et al. (2010) es recomendable muestrear heces lo más frescas posible, menos de dos días. En el caso del urogallo, al estar los individuos agregados en cantaderos la recolección de heces frescas fue sencilla, ya que se concentran en un área muy concreta. Además, al estar en el bosque sus heces no estaban expuestas directamente al sol, lo que las conserva en mejores condiciones y nos permitió estimar que la mayoría de las heces de urogallo recogidas no tenían más de dos días. Sin embargo, en el caso del lagópodo alpino, fue más complicado muestrear heces frescas ya que estaban distribuidas de forma uniforme en las laderas de las montañas y durante los

muestreos es muy difícil encontrar heces que no tengan más de dos días. Además, al estar expuestas directamente al sol, se secan y degradan más rápidamente (Regnaut 2004), lo cual hizo complicado estimar el tiempo transcurrido desde su deposición, dificultando su identificación y recolección para los análisis genéticos. Por lo tanto, para evitar recoger heces demasiado antiguas, que no se podrían analizar con éxito, se establecieron los siguientes criterios de recolección: debían estar enteras, no demasiado descoloridas por el sol y con el ácido úrico (blanco en los extremos) aún visible (Aleix-Mata et al. 2020c; Capítulos 3; 4.4; 4.5). Otro parámetro que influyó en la eficiencia de muestras analizadas fue el tamaño de las heces. Mientras las heces de urogallo miden entre 4 y 6 cm de largo con un diámetro de entre 7 y 13 mm (Couturier y Couturier 1980), las de lagópodo alpino miden entre 1,5 y 2 cm de largo con un diámetro de entre 5 y 7 mm (Couturier 1964). Así, aun procesando las heces de lagópodo alpino enteras, la cantidad de muestra es mucho menor que la procesada en el caso del urogallo. Lo que implica que la cantidad de ADN extraído de las muestras de lagópodo alpino fuese mucho menor, y explica en parte las diferencias en el rendimiento entre las dos especies.

Otro aspecto que seguro que influyó en la obtención de estos porcentajes de muestras analizadas con éxito fueron las modificaciones realizadas en los protocolos de los kits comerciales de extracción de ADN. Estas modificaciones permitieron adaptarlos a las muestras totalmente deshidratadas, ya que fueron conservadas usando gel de sílice. El grado de deshidratación hacía que las muestras absorbiesen la mayor parte de la solución de lisis lo que dificultaba la homogenización, el centrifugado y finalmente la recuperación de la cantidad suficiente de la misma para poder trabajar. Por lo tanto, tal y como se recomienda en estudios anteriores que usaron los mismos kits de extracción de ADN, se aumentó el volumen de esta solución lo que permitió homogeneizar mejor la muestra (Jacob et al. 2010; Rösner et al. 2014). Esto, condicionó que los primeros pasos de la extracción de ADN se llevasen a cabo en un tubo de 15 ml. Sin embargo, al estar las heces deshidratadas, absorben mucha cantidad de la solución de lisis, y los pasos de centrifugación recomendados por el fabricante, no eran suficientes para separar la parte sólida de las muestras del sobrenadante. La solución a este problema, y posiblemente la variación más relevante del protocolo, fue la adición de una bola de acero durante el centrifugado. El peso de esta bola, ayudado por la

centrifugación, permitió comprimir las partes sólidas de las muestras en el fondo del tubo y recuperar el volumen de sobrenadante requerido añadiendo solo 2 ml de solución de lisis. Estas modificaciones permitieron i) una mejor separación de las partes sólidas y recuperar un volumen suficiente de sobrenadante; ii) un mejor lisado de las células presentes en las muestras; y iii) un sobrenadante con más concentración de ADN. Todos estos cambios mejoraron y facilitaron el proceso de extracción del ADN de las muestras, y por tanto permitieron obtener los porcentajes de éxito tan altos.

En otros estudios se obtuvieron porcentajes de éxito similares (91 %) recuperando las células de la superficie de las heces con hisopos secos (Segelbacher y Steinbrück 2001; Vallant et al. 2018). Pero en esta tesis se optó por procesar las muestras enteras o simplemente cortándolas por la mitad si eran muy grandes (heces de urogallo) reduciendo la manipulación de las muestras y las posibles contaminaciones cruzadas al máximo.

También es interesante destacar que el cambio del Kit de extracción de ADN por el fabricante, sustituyendo el QIAamp® DNA Stool Mini Kit, usado al principio del estudio, por el QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit, mejoró el porcentaje de muestras analizadas con éxito. En el caso del lagópodo alpino, analizando cronológicamente los resultados obtenidos por Aleix-Mata et al. (2020c) (Capítulo 4.5) vemos que el porcentaje de muestras analizadas con éxito pasa de 59 % en 2017 en la zona de Isère, a 73 % en 2018 y 89% en 2019 en la zona de Andorra con el uso del nuevo Kit de extracción. Por lo tanto, las modificaciones aportadas por el fabricante al nuevo kit de extracción de ADN combinadas con las modificaciones mencionadas anteriormente, permitieron incrementar el porcentaje de muestras analizadas con éxito. Sin embargo, todavía no se ha utilizado el nuevo kit de extracción de ADN en muestras de urogallo, y es posible que también se incremente el porcentaje de muestras analizadas con éxito en esta especie.

Otro aspecto metodológico que se quiso optimizar fue la fiabilidad de los resultados obtenidos. Al analizar muestras no invasivas (heces, pelos, plumas, etc.) el ADN que se obtiene suele estar en concentraciones bajas y parcialmente degradado (Taberlet et al. 1996; Regnaut 2004; Regnaut et al. 2006). Esto, puede generar “allele drop-out” y / o falsos alelos, que pueden inducir errores y generar una sobreestimación o subestimación del número de

individuos (Navidi et al. 1992; Creel et al. 2003). Para evitar estos posibles errores, todas las PCRs de genotipado y de sexado se realizaron usando la técnica del "multitubo" (Navidi et al. 1992; Taberlet et al. 1996; Taberlet y Luikart 1999; Goossens et al. 2000) con tres réplicas por cada PCR multiplex y por muestra. A partir de los resultados de estas tres replicas se estableció una lectura consenso, y se aplicó un índice de calidad (QI) a cada lectura (Miquel et al. 2006; Palomares et al. 2017). En otro estudio similar basado en el genotipado y sexado de muestras de heces recogidas de forma no invasiva se utilizó la misma metodología, pero realizando cuatro réplicas de cada PCR y muestra y descartado las muestras con un $QI \leq 0,5$ (Palomares et al. 2017). En esta tesis se ha buscado un compromiso entre fiabilidad y coste, por lo que se realizaron tres réplicas por PCR multiplex y muestra, pero se descartaron las muestras con un $IQ \leq 0,6$, que se considera es un valor adecuado para este tipo de estudios (Miquel et al. 2006). Además, el uso de este índice es muy útil ya que, además de su interés para descartar muestras dudosas que pueden generar errores, permitió también detectar los loci problemáticos, con patrones difíciles de interpretar o que suelen generar muchos alelos falsos (Miquel et al. 2006).

Otro parámetro que permite evaluar la fiabilidad de los resultados que se obtienen son las probabilidades de identidad (Waits et al. 2001). Este valor es la probabilidad para que, con un mismo panel de microsatélites, dos individuos muestreados al azar tengan el mismo haplotipo, esta probabilidad se calcula sin sesgo $P_{(ID)}$ y para individuos emparentados $P_{(ID)sib}$ (Waits et al. 2001). Para que los resultados que se obtienen en estudios basados en el genotipado mediante microsatélites de muestras no invasivas sean fiables, se requiere que la $P_{(ID)sib}$ sea $\leq 10^{-4}$ (Latorre-Cardenas et al. 2020). Los resultados obtenidos en este estudio cumplen con este criterio, obteniendo en el urogallo una $P_{(ID)sib} = 3,1 \times 10^{-4}$ (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1) y una $P_{(ID)sib}$ de 9×10^{-7} para el lagópodo alpino (Aleix-Mata et al. 2020c; Capítulos 4.4; 4.5). Por lo tanto, los paneles de microsatélites usados en esta tesis fueron suficientes y adecuados para poder discriminar individuos emparentados con un elevado grado de fiabilidad.

Un último aspecto que se ha intentado optimizar fue reducir los costes del uso de esta metodología de muestreo no invasivo y análisis genéticos. La puesta a punto de un control

del ADN extraído por PCR permitió descartar las muestras con un ADN que no era válido para genotipar y sexar. Esta PCR fue un paso importante que permitió ahorrar recursos y tiempo en el laboratorio. La parte más costosa de los análisis genéticos fue el genotipado y el sexado a partir del análisis de los fragmentos en el equipo de secuenciación, que representa entre el 80 y el 85 % del coste total del análisis de una muestra. El otro 15 - 20 % se repartió entre los costes de los kits de extracción de ADN, el material fungible, etc. Por lo tanto, fue importante poder descartar en la fase inicial del proceso de análisis las muestras que no podrían ser geneotipas y sexadas correctamente lo que permitió ahorrar el coste asociado al genotipado y el sexado (80 - 85 % del coste total). En el caso del urogallo, esta PCR permitió descartar el 7 % de las muestras (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1), en el caso del lagópodo alpino este porcentaje aumentó hasta el 23 - 26 % (Aleix-Mata et al. 2020c; Capítulos 4.4; 4.5) con lo que el ahorro en ambas especies fue considerable.

Por otro lado, con el fin de reducir los costes, también se trabajó en reducir el número de análisis de los fragmentos amplificados en el equipo de secuenciación necesarios para genotipar y sexar cada muestra. Para ello se redujo del número de réplicas por PCR multiplex y muestra de cuatro a tres. También se optimizaron los Mix de cebadores para poder combinar un número más grande de cebadores y reducir el número de PCRs. Así, los cebadores de los 14 microsatélites utilizados en el urogallo se agruparon en tres Mix y los de los 16 microsatélites usados en el lagópodo alpino en cuatro Mix, lo cual redujo los costes en reactivos y en número de lecturas en el equipo de secuenciación. De hecho, la reducción de cuatro a tres réplicas o del número de Mix de cuatro a tres, representó un ahorro de aproximadamente el 20 % del coste total para cada muestra.

Estas optimizaciones permitieron reducir los costes de los análisis genéticos, y que por ejemplo la monitorización de un cantadero de urogallo a partir de un muestreo no invasivo y análisis genéticos tenga un coste similar al que tiene un monitoreo mediante conteos al canto (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Además, esta metodología basada en análisis genéticos de muestras no invasivas permitió poder identificar un mismo individuo durante varios años de seguimiento, lo que es imposible con las metodologías tradicionales basadas

en los conteos al canto o con las técnicas de monitoreo acústico (Marin-Cudaz et al. 2019; Aleix-Mata et al. 2020a; 2020c; Capítulos 4.1; 4.4; 4.5).

Sin embargo, todavía queda pendiente la optimización del protocolo de recogida de muestras en el campo, este se realizó en las parcelas predefinidas de 200 o 250 m de radio para el urogallo y el lagópodo alpino respectivamente, realizando transectos paralelos separados 25 m los unos de los otros, y recogiendo todas las heces frescas que se localizan. Siendo un proceso largo y laborioso, y se podría reducir el tiempo de muestreo y el volumen de muestras recogidas diseñando un protocolo más selectivo. Mollet et al. (2015), a partir de los datos de una simulación redujo su número de muestras hasta el 25 %, sin sesgar el tamaño total estimado de la población. Sin embargo, la precisión de sus estimaciones disminuyó drásticamente cuando solo usaron entre el 25 y el 50 % de los datos reales. A vista de estos resultados, se podría considerar por ejemplo realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos analizando todas las muestras recogidas en un muestreo y los obtenidos descartando al azar una de cada tres muestras recogidas. Si no se observasen diferencias significativas, se podría facilitar y abaratar más el proceso de estima poblacional mediante recogida de heces y análisis genéticos realizando los muestreos descartando en el campo una de cada tres muestras localizadas.

Optimizar las técnicas de laboratorio, para los análisis genéticos de las muestras no invasivas, permitió obtener, i) un buen porcentaje de muestras analizadas con éxito, ii) resultados muy fiables, y iii) reducir los costes de esta metodología. Estos pasos fueron fundamentales para que las técnicas de estimación poblacional basada en muestreos no invasivos y análisis genéticos puedan ser una alternativa viable y accesible para el monitoreo de los tetraónidos.

5.2. Urogallo.

Conteos al canto - Muestreos no invasivos y análisis genéticos

Durante el periodo comprendido entre 2016 y 2019 se realizaron estudios comparativos en los cantaderos de urogallo, en los que se analizó la diferencia entre el

número de machos de urogallo obtenidos mediante los conteos al canto con el obtenido mediante un muestreo no invasivo y análisis genético. Estos estudios se realizaron en un área circular definida por un radio de 200 m alrededor del escondite desde el cual el observador realizaba el conteo al canto.

En todos los cantaderos estudiados los resultados mostraron que el muestreo no invasivo y análisis genéticos permitió detectar por lo menos el mismo número de machos que con los conteos al canto. De hecho, en el 27 % de los casos, con ambos métodos se detectaron el mismo número de machos, pero en el 73 % de los casos los muestreos no invasivos y análisis genéticos permitieron detectar más machos (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Así, en algunos cantaderos con este último método se detectaron de dos a tres veces más machos que mediante los conteos al canto. De manera general con los muestreos no invasivos y análisis genéticos, se pudieron detectar un 50 % más de machos de urogallo en los cantaderos que con los conteos al canto (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Estos resultados concuerdan con los de Rösner et al. (2014) y Jacob et al. (2010) que detectaron respectivamente 1,3 y 2,5 veces más machos de urogallo con los análisis genéticos de muestras no invasivas. Igualmente, Lentner et al. (2018) detectaron entre un 25 y un 50% más de machos de urogallo con este método con respecto a los conteos al canto.

Estas diferencias entre los resultados de ambos métodos se pueden deber a varios factores, uno de ellos, es el comportamiento de los machos jóvenes de urogallo (< dos años), que no se suelen detectar durante los conteos al canto ya que no muestran un comportamiento territorial, no cantan, y suelen establecerse en territorios periféricos a los cantaderos (Storch 1997; Wegge et al. 2003; Mollet et al. 2015). Sin embargo, están presentes en la zona del cantadero y por lo tanto se pudieron detectar mediante el genotipado de las heces de los mismos. Las perturbaciones que pueden causar los observadores durante el conteo son otro factor que también se tiene que considerar en este análisis comparativo. A partir de un estudio donde se monitorizó la actividad del canto del urogallo mediante micrófonos automatizados en diferentes cantaderos, Abrahams (2019) describió que, durante los días de conteos al canto, la actividad del canto disminuyó un 65 % con respecto a los días sin conteos. Esta disminución de la actividad del canto de los urogallos, debido a la posible perturbación

de los observadores que realizaron el conteo, dificultó la obtención de resultados fiables con este método, pudiendo subestimar el número de machos presentes en los cantaderos (Abrahams 2019). Por otro lado, este mismo autor mostró cómo, independientemente de la realización o no de los conteos, la actividad del canto también puede ser muy variable de un día a otro. Así, en nuestro estudio en el 53 % de los casos no se detectaron el mismo número de machos en las dos replicas e incluso en el 47 % de los cantaderos no se detectó ningún urogallo en una de las dos replicas (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Por lo tanto, es importante realizar tal y como lo recomiendan Catusse y Novoa (1983) dos conteos por cantadero, para evitar subestimar aún más el número de machos de los cantaderos.

Por otro lado, la diferencia en los resultados obtenidos con ambos métodos podría deberse al hecho de que el muestreo no invasivo se realizó en un área de 200 m de radio alrededor del observador. Esta área se definió en base a estudios previos que estiman que 200 m es la distancia máxima a la que se puede escuchar un macho de urogallo (Couturier y Couturier, 1980). A vista de los resultados y de la experiencia adquirida durante este trabajo, se podría plantear la hipótesis de que en realidad la distancia máxima a la que se puede detectar un urogallo sería inferior a 200 m, sería interesante poder testar esta hipótesis en futuros estudios.

La ratio entre el número de machos detectados con los conteos al canto con respecto a los machos detectados a partir de los muestreos no invasivos y análisis genéticos, fue muy variable, y oscilo entre 0 - 1, con un valor global de 0,48 (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Se observó como en los cantaderos “pequeños”, de uno o dos machos, esta diferencia se incrementó y la tendencia a la subestimación de los conteos al canto es mayor en este tipo de cantaderos (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). De hecho, en los cantaderos en los que solo se contaron uno o dos machos (N= 12) se llegaron a genotipar hasta cinco machos, en cambio en los cantaderos en los que se contaron tres machos (N= 2) se genotiparon el mismo número de individuos (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Este hecho es problemático, ya que la mayoría de los cantaderos de los Pirineos son “pequeños” (Robles et al. 2006). En próximos estudios será interesante determinar qué ocurre en los cantaderos más grandes en los que se suelen contar más de cuatro o cinco machos.

El muestreo no invasivo y análisis genéticos, solo permitió aproximarse al número real de machos de un cantadero. Para estimar el número real de machos presentes en un cantadero, se tendrá que aplicar a los datos obtenidos a partir de los muestreos no invasivos y análisis genéticos modelos de Captura-Recaptura (Mondol et al. 2009). En esta especie se usaron modelos específicos basados en estadística bayesiana para poder calcular el tamaño real de la población a partir de los datos de muestreos no invasivos y análisis genéticos (Augustine et al. 2019). Estos modelos permitieron obtener estimaciones más fiables del tamaño de las poblaciones, así como poder hacer predicciones de tasas de supervivencia (Augustine et al. 2019). Sin embargo, estos modelos nunca se han usado a escala de cantadero, y su aplicación a los datos obtenidos en este estudio permitiría poder medir con más exactitud los sesgos asociados a los conteos al canto. Estos resultados serían útiles para afinar el modelo de estimación del número de machos de urogallo que se desarrolló para estimar el tamaño de la población de urogallos del Pirineo francés (Ménoni et al. 2014). Este modelo se basa en los resultados de los conteos de los machos al canto en los cantaderos para, aplicando el método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), extrapolar bianualmente el número de machos de urogallos del Pirineo francés (Ménoni et al. 2014).

Los conteos al canto, es la metodología que se usa tradicionalmente en los Pirineos y en muchas otras zonas del área de distribución del urogallo, para realizar el monitoreo de sus poblaciones (ONC 1983; Catusse y Novoa 1983; Canut et al. 2006; Haysom 2013; Montadert 2013; Abraham y Denny 2018; Abraham 2019). Sin embargo, a vista de los resultados obtenidos, queda claro que presenta limitaciones, solo permite detectar el 50 % de los individuos presentes en un cantadero, el número de individuos detectados puede variar de un día a otro y puede verse afectado por las perturbaciones de los observadores (Abraham 2019; Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Además, estas limitaciones se incrementan en los cantaderos “pequeños”, que son los más representativos en los Pirineos (Robles et al. 2006). La metodología de muestreos no invasivos y análisis genéticos permite solventar estas limitaciones. Además, ésta causa menos perturbaciones a la especie y el resultado no está influido por las mismas, ya que el muestreo de heces se puede realizar fuera de las horas de canto. También, permite identificar un mismo individuo de un año a otro y obtener información relativa a aspectos demográficos (proporción de los sexos o la tasa de

supervivencia) (Mondol et al. 2009; Augustine et al. 2019; Abraham 2019; Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Adicionalmente, ya que en este estudio se trabajó para reducir los costes, este método presenta unos costes similares al método tradicional (Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Por lo tanto, los muestreos no invasivos y análisis genéticos son una buena alternativa a los conteos al canto para el monitoreo las poblaciones de urogallo en los Pirineos y en zonas de montaña en general.

El genoma mitocondrial del urogallo

Los aspectos ecológicos y biológicos del urogallo se han estudiado en muchas ocasiones (Jacob et al. 2010; Pérez et al. 2011; González et al. 2012; Pedersen et al. 2014; Kowalczyk et al. 2017; Salgado-Flores et al. 2019). Sin embargo, no son muchos los trabajos que permiten incrementar la información sobre el genoma de esta especie. En esta tesis se ensambló, describió y comparó, con el de otras especies próximas, el genoma mitocondrial del urogallo. Este está disponible en la base de datos de secuencias GeneBank, con el número de acceso: MG583885.

El genoma mitocondrial del urogallo está compuesto por 13 genes codificantes a proteínas (PCGs), dos genes de ARN ribosomal (rRNAs), 22 genes de ARN transferente (tRNA) y una región control (D-loop) no codificante, y tiene una longitud de 16683 pb. Tanto su organización como su tamaño son comparables con las del genoma mitocondrial del gallo lira (*Lyrurus tetrix*) 16677 pb (Li et al. 2016). Así mismo ambos tienen un porcentaje de identidad del 94,70%, siendo los genes Atp8 y Nd6 los que presentan más diferencias entre estas dos especies, con un porcentaje de identidad del 92,12 y 92,66 %, respectivamente, y los genes Nd1 y COII los que presentan más similitudes con un 96,10 y un 96,05 % respectivamente (Aleix-Mata et al. 2019; Capítulo 4.2).

La región control o D-loop es la parte más variable de los genomas mitocondriales, en este caso, el porcentaje de identidad es del 93,60 % y el tamaño es de 1141 pb y 1147 pb para el urogallo y el gallo lira respectivamente. En esta región se realizó un análisis muy exhaustivo en el que se identificaron y localizaron muchas secuencias conservadas, algunas de ellas por primera vez en aves (Aleix-Mata et al. 2019; Capítulo 4.2). Se identificaron las dos “extended

termination-associated sequences” (ETAS1 y ETAS2) y los bloques conservados (CSBs: conserved sequences blocks) 1 y 3, una secuencia parecía al CSB-1 (CSB1-LIKE), cinco “cajas” (Box-F, E, D, C y B) de secuencias muy conservadas. Además, también se identificó la “bird similarity box” (BS Box) una región muy bien conservada, que presenta secuencias idénticas en varios grupos de aves (Li et al. 2014, Buehler y Baker 2003; Ruokonen y Kvist 2002; Aleix-Mata et al. 2019; Capítulo 4.2). Todas estas son secuencias muy conservadas que sufren pocas variaciones de una especie a otra, y por lo tanto, son dianas potenciales para poder diseñar cebadores para amplificar zonas concretas de la región control de estas especies o de muchas otras especies de aves.

Los resultados de los árboles filogenéticos realizados con el genoma mitocondrial concuerdan con los de estudios realizados anteriormente sobre esta familia empleando diferentes aproximaciones (Shen et al. 2010; 2014; Wang et al. 2013; 2017; Hosner et al. 2016; Persons et al. 2016; Ren et al. 2018). De hecho, el representante de la subfamilia Meleagridinae (*Meleagris gallopavo*) está agrupado con los géneros de la subfamilia Tetraoninae (*Tetrates*, *Tetrao*, *Lyrurus* y *Lagopus*). Esto apoya el trabajo de Wan et al. (2013) que concluyen que el orden de los Galliformes estaría formado por cinco familias en vez de siete siendo Meleagridae y Tetraonidae subfamilias de la familia Phasianidae.

Este genoma mitocondrial es de las pocas secuencias disponibles en GeneBank de la subespecie endémica de los Pirineos, *T. u. aquitanicus*. De hecho, hasta la fecha, solo estaba disponible una secuencia de 1142 pb correspondientes a la región control del genoma mitocondrial de esta especie endémica de los Pirineos.

5.3. Lagópodo alpino.

Plot Sampling - Distance Sampling

En el lagópodo alpino, se analizaron las dos metodologías más empleadas en los Pirineos y en los Alpes para estimar las densidades de población de esta especie, el muestreo por parcelas o Plot Sampling (PS) y el muestreo por distancias o Distance Sampling (DS). Se trabajó a partir de una misma base de datos de 56 conteos al canto realizados entre el 2003

- 2017 con el método del Point-count (Marty y Mossoll-Torres 2012). Se calcularon las densidades de población con los datos de estos conteos con la metodología del PS usando dos aproximaciones, definiendo las parcelas circulares muestreadas alrededor del observador con un radio de 250 m, PS250 (Marty y Mossoll-Torres 2012) o de 350 m, PS350 (Aubri 2011). Se compararon las estimas de densidades obtenidas con esta metodología con las obtenidas empleando el método de DS (Buckland et al. 2001; Franceschi et al. 2014).

Los resultados muestran que las estimas de las densidades obtenidas con el método de DS son entre un 30% y un 87% más elevadas que las obtenidas con PS250 y PS350 respectivamente, siendo estas diferencias significativas. Además, los coeficientes de variación (CVs) asociados a las estimas de las densidades obtenidas por DS eran entre un 3,22 y un 3,25 veces inferiores a los asociados a las estimas obtenidas por PS250 y PS350 respectivamente.

Estos resultados concuerdan con los descritos por Franceschi et al. (2014), quienes compararon ambas metodologías con datos de conteos simulados y obtuvieron con DS estimas poblacionales un 30 % superiores a las obtenidas con PS. Por otro lado, Aubry (2011) sugería que la metodología de PS350 con un radio de parcela de 350 m, puede subestimar las densidades de lagópodo alpino. De hecho, las estimas de densidades obtenidas con esta aproximación fueron un 43 % inferiores a las obtenidas con PS250. Esta diferencia es lógica ya que con PS se asume que dentro de la parcela se tiene un 100% de probabilidad de detectar un lagópodo alpino que canta, para calcular la densidad se divide el número de individuos detectados en la parcela por su superficie, y con PS350 la superficie muestreada es un 35 % superior a la muestreada con PS250. Sin embargo, la asunción de la metodología PS, de que la probabilidad de detectar un lagópodo alpino que canta dentro de las parcelas es del 100%, es errónea ya que esta probabilidad disminuye a medida que la distancia al observador aumenta (Franceschi et al. 2014; Aleix-Mata et al. 2020b; Capítulo 4.3). DS tiene en cuenta este hecho lo que explica en parte las diferencias entre las densidades obtenidas con ambos métodos.

Los CV asociados a las densidades obtenidas con DS fueron más bajos que los asociados a las densidades obtenidas con PS. Esto coincide con los resultados obtenidos por Franceschi et

al. (2014), quienes obtuvieron unas estimaciones muchos más precisas, con DS que con PS. Además, la precisión de las densidades obtenidas con DS se incrementa a medida que el tamaño muestral aumenta (Buckland et al. 2001). De hecho, se ha comprobado que con DS a partir de unos 25 puntos de muestreo los CV son inferiores al 20 % (Aleix-Mata et al. 2020b; Capítulo 4.3). Estos resultados hacen que DS sea una metodología más fiable y replicable para estimar las densidades de población de una especie que PS.

Sin embargo, para poder aplicar DS correctamente, hacen faltan un número elevado de observadores, 4 – 5 por cada km² a muestrear (Franceschi et al. 2014) lo que equivale aproximadamente a uno cada 500 m (Marty y Mossoll-Torres 2012). Esto es comparable a los 235,70 m al radio efectivo de detección (EDR) que se obtuvo en nuestro trabajo (Aleix-Mata et al. 2020b; Capítulo 4.3). El EDR es aquel para el que se estima que el número de individuos que no se detectan en el área delimitada por él es el mismo que el número de individuos que se detectarían fuera de esta área (Buckland et al. 2001). Este parámetro, junto con la distribución aleatoria de los observadores, son dos parámetros a tener en cuenta a la hora de diseñar los conteos, buscando un equilibrio entre la superficie a muestrear, y el número de observadores. El 20 % de los lagópodos alpinos detectados durante los Point-counts se detectaron desde más de un punto de observación, detección múltiple. Estas detecciones múltiples son muy interesantes ya que permiten localizar con más exactitud a las aves e incrementan el número de datos (tamaño muestral) de un mismo conteo, y en consecuencia aumenta la precisión de la densidad poblacional estimada (Buckland et al. 2001; Buckland 2006). Sin embargo, si en un muestreo se tienen muchas observaciones múltiples puede ser una señal de que los observadores están demasiado cerca los unos de los otros y no se está muestreando de forma eficiente.

Otra ventaja de DS es que, contrariamente a PS, se consideran todas las observaciones. Así, con PS250 y PS350 se descartaron entre un 12 y un 6 % de las observaciones respectivamente ya que estaban fuera de rango (más allá de los radios de 250 o de 350 m) (Aleix-Mata et al. 2020b; Capítulo 4.3). Los conteos de lagópodo alpino son muy difíciles tanto a nivel logístico como a nivel humano, se tiene que acampar en alta montaña, con nieve, con temperaturas bajas, en una época del año en la que la meteorología es muy cambiante (Marty y Mossoll-

Torres 2012; Pedersen et al. 2012). Por lo tanto, es importante rentabilizar al máximo los conteos, y conservar todas las observaciones realizadas, sobre todo si estas contribuyen a mejorar la presión de la estimación, como ocurre con DS. Además, si los conteos se han realizado correctamente y se han localizado los lagópodos alpinos detectados en un mapa se puede, tal y como se ha hecho para esta tesis, analizar conteos antiguos. Por lo tanto, DS es una metodología mucho más eficiente, adaptada a las zonas de montaña, y procura estimaciones más precisas que PS (Pérez et al. 2002; Corlati 2017; Franceschi et al. 2014; Aleix-Mata et al. 2020b; Capítulo 4.3).

Distance Sampling - Muestreos no invasivos y análisis genéticos

A día de hoy, no existe un método estándar para comparar los resultados de las estimaciones y explorar plenamente su exactitud en relación con los tamaños reales de las poblaciones de lagópodo alpino. Hemos realizado un estudio exploratorio para comparar en tres zonas las densidades estimadas con Distance Sampling a partir de conteos al canto desde puntos fijos (Point-count) (PC-DS) y mediante un muestreo no invasivo y análisis genéticos (NIS-GA) de heces (Capítulo 4.4). Estas zonas estaban localizadas, en Ariège y Andorra, dos zonas de los Pirineos, y en Isère, una zona de los Alpes franceses. En ellas, se realizaron conteos al canto desde puntos fijos (Point-count) y se recogieron en un radio de 250 m alrededor de los observadores las heces frescas de este tetraonido. Posteriormente se analizaron los resultados de los Point-counts con DS y se genotiparon y sexaron las heces mediante análisis genéticos.

Los resultados que se obtuvieron fueron muy diferentes entre las zonas de los Pirineos y la de los Alpes. En los Pirineos (Ariège y Andorra) las densidades obtenidas mediante PC-DS eran más grandes que las obtenidas mediante NIS-GA, con unos coeficientes de variación (CVs) asociados muy elevados (> 50 %). Por el contrario, en los Alpes la densidad fue inferior con PC-DS que con NIS-GA y el CV asociado fue de 7,7 % (Capítulo 4.4).

Los resultados obtenidos con PC-DS en los Pirineos deben interpretarse con precaución debido a los CVs tan elevados. De hecho, en estas zonas, a causa de limitaciones logísticas, los conteos se realizaron a principios de junio, después del pico de actividad de canto, que

ocurre entre el 10 y el 25 de mayo (Marty-Mossoll-Torres 2012), y es posible que esta sea la explicación al escaso número de individuos detectados. Los CVs asociados a las densidades obtenidas con PC-DS eran muy grandes > 50 % debido posiblemente a este pequeño tamaño muestral (Buckland et al. 2001; Capítulo 4.4). Por otro lado, en el área de Ariège las densidades obtenidas mediante NIS-GA eran bajas en comparación con las de las otras zonas de estudio. Esto es probablemente debido a que por la abundante vegetación no se pudieron localizar las heces en gran parte del área muestreada (Capítulo 4.4), y posiblemente en esta zona se subestimo el número de los efectivos con este método.

En estudios donde se comparan los resultados obtenidos mediante muestreos no invasivos y análisis genéticos con los de conteos tradicionales (al canto, por batidas, etc.) se destaca que estos últimos tienden a subestimar los efectivos (Jacob et al. 2010; Lenter et al. 2018; Aleix-Mata et al. 2020a; Capítulo 4.1). Además, según Lenter et al. (2018) los resultados de los muestreos basados en la individualización de muestras no invasivas están mejor relacionados con las densidades poblacionales reales. En estudios a partir de poblaciones simuladas, las estimaciones realizadas con DS están mejor relacionadas con el tamaño real de las poblaciones (Franschesi et al. 2014). Corlatti et al. (2017) compararon diferentes métodos para estimar el tamaño real de una población de marmotas, entre ellos DS y modelos de captura marcaje recaptura (CMR) a partir de capturas directas de los individuos. En su estudio, durante las campañas de capturas, capturaron 39 marmotas diferentes, y con DS estimaron que había 24 individuos, resultando un 40 % inferior al número de individuos capturados. El presente estudio, es el primer trabajo en el que se comparan los resultados obtenidos con DS con los obtenidos a partir de un NIS-GA, pero los resultados de Corlatti et al. (2017) podrán ayudar a explicar que en la Isère las densidades que se obtienen con PC-DS son un 20 % inferiores a las obtenidas con NIS-GA.

Sin embargo, este estudio exploratorio ha permitido poner de manifiesto algunos aspectos importantes que se pueden mejorar. Así, se tendría que desarrollar un trabajo más contundente para poder comparar estos dos métodos de estimación (PC-DS y NIS-GA) de forma más precisa. Se debería incrementar el trabajo de campo, para obtener datos y resultados de más áreas, y pulir algunos elementos que afectan a la fiabilidad de los

resultados obtenidos. Para ello, de acuerdo con las sugerencias de Mondol et al. (2009) y Corlatti et al. (2017) y a la experiencia adquirida en esta tesis nos proponemos:

a) para mejorar las estimaciones realizadas mediante PC-DS, y reducir los CVs asociados a las densidades poblacionales estimadas,

- repetir los muestreos durante el pico de actividad del canto del lagópodo alpino,
- seleccionar zonas con densidades más altas de lagópodos alpinos para tener un tamaño muestral más grande (observaciones)

b) para mejorar las estimaciones realizadas con NIS-GA, y obtener resultados más fiables,

- seleccionar zonas de muestreo en las que la vegetación no dificulte la recogida de heces
- repetir los muestreos no invasivos tres veces en cada zona para poder aplicar a los datos modelos de Captura-Recaptura

Estos cambios en la metodología permitirán poder obtener resultados más fiables con ambas metodologías y poder comparar las estimas de las densidades poblacionales que se obtiene con cada una de ellas de forma más contrastada.

Proporción de los sexos

El lagópodo alpino, a diferencia del urogallo, no establece cantaderos y en primavera los individuos se reparten en territorios de reproducción distribuidos de forma uniforme en las laderas de las montañas (Wiley 1974; Martin et al. 1995; Caizergue et al. 2003; Storch 2007). Con los resultados obtenidos de los muestreos no invasivos y análisis genéticos se estimó la proporción de los sexos de esta especie de manera no invasiva. Y los resultados se compararon con la proporción de los sexos que se calculó a partir de los datos de los individuos cazados en Isère y en Ariège (Alpes y Pirineos franceses).

Los resultados que se obtuvieron en el estudio no invasivo indicaron que la proporción de los sexos de los adultos, o “adult sex ratio” (ASR), de lagópodo alpino es equilibrada (1:1) en primavera (Aleix-Mata et al. 2020c; Capítulo 4.5). A partir de los datos de los individuos

cazados la proporción de los sexos de los adultos estaba fuertemente sesgada a favor de los machos, mientras que en los juveniles (< un año) la proporción era más equilibrada (Aleix-Mata et al. 2020c; Capítulo 4.5).

Diversos autores apuntan que, en esta especie, una desproporción de los sexos a favor de los machos está relacionada con un cambio, generalmente negativo, en la tendencia poblacional (Watson et al. 1998; Watson y Moss 2008; Fedy y Martin 2011). De forma más general, se ha descrito una correlación entre el grado de amenaza de las especies y el sesgo hacia el número de machos en la proporción de los sexos, siendo las especies más amenazadas las que presentan mayores desproporciones de los sexos (Morales et al. 2005; Donald 2007). En zonas cercanas a las zonas de estudio, se ha pronosticado un fuerte declive de las poblaciones de lagópodo alpino (Novoa et al. 2011). Sin embargo, es de destacar que en el estudio no invasivo realizado, la proporción de los sexos es equilibrada y además en Andorra es estable durante los tres años del mismo. Por lo tanto, dado que el ASR obtenido es equilibrado, no se pone en evidencia ningún indicio de declive poblacional en las zonas estudiadas con este parámetro.

La proporción de los sexos basada en el análisis de los individuos cazados mostró valores muy diferentes en adultos y en juveniles. De hecho, este parámetro estaba seguramente sesgado en los adultos debido al comportamiento de los machos, que tienen una función de vigilancia y distraen a los depredadores para alejarlos de sus nidadas (Favaron et al. 2006), lo que hace que estén más expuestos durante la caza. En los juveniles se observó que este parámetro era más equilibrado, coincidiendo con lo descrito previamente en otras zonas (Suzuki et al. 2013). Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto que el análisis de las estadísticas de caza no es un método adecuado para estimar la proporción de los sexos de una especie, ya que puede estar sesgado por diversos factores intrínsecos o extrínsecos (Lambin et al. 1999; Donald 2007; Aleix-Mata et al. 2020c; Capítulo 4.5).

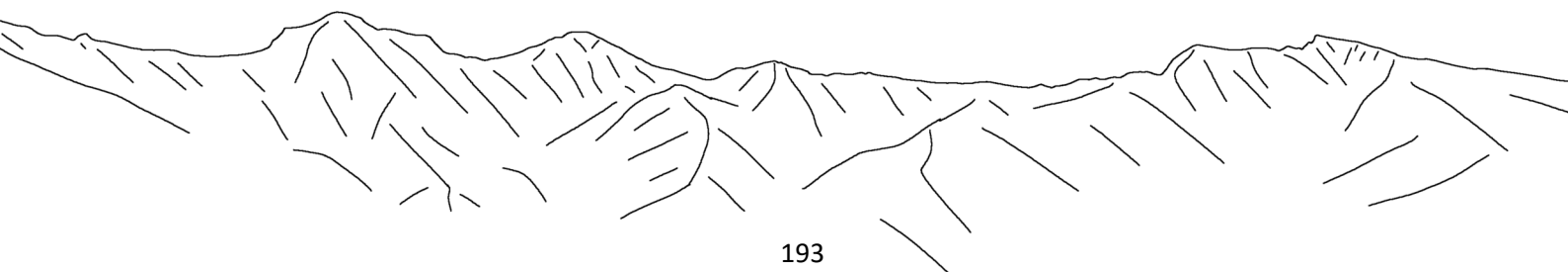
Sin embargo, si la estrategia de muestreo es adecuada a las características biológicas de la especie estudiada, los parámetros estimados por muestreo no invasivo y análisis genéticos suelen estar menos sesgados y ajustarse mejor a los parámetros reales, como se ha indicado anteriormente para el ASR y la densidad poblacional (Donald 2007; Lentner et al. 2018). En

nuestro trabajo, el muestreo no invasivo se ha diseñado para eliminar los sesgos debidos al observador, y en los protocolos de laboratorio (sexado y genotipado) se han establecido controles para detectar y eliminar los falsos alelos y “allele drop-out” que pueden generar errores y sobreestimar el número de individuos de un área (Navidi et al. 1992; Creel et al. 2003). También, para evitar sesgos, hemos preferido trabajar con heces y no con plumas, a diferencia de lo que se ha hecho en otros estudios basados en el genotipado de muestras no invasivas (Costanzi y Steifetten 2019). De hecho, trabajar con plumas podría haber generado sesgo en la estimación de la ASR dado que en primavera los machos y las hembras de lagópodo alpino tienen un patrón de muda diferente (Pyle 2007).

Como conclusión podemos afirmar que, para el monitoreo de ambas especies, los NIS-GA tienen muchas ventajas, no causan (o causan menos) perturbaciones, permiten identificar un mismo individuo de un año a otro, obtener información relativa a aspectos demográficos (ASR, tasas de supervivencia, etc.), los datos obtenidos son más fiables y ajustados y tienen un coste asequible (Mondol et al. 2009; Augustine et al. 2019; Aleix-Mata et al. 2020a; 2020c; Capítulos 4.1; 4.4; 4.5).

Capítulo 6:

Conclusiones



1. Los protocolos desarrollados para la extracción de ADN de las muestras de heces y el sexado y el genotipado a partir de microsatélites permiten obtener resultados muy fiables, con unos costes asequibles, para la realización de estudios de estimación del tamaño poblacional y del ASR.
2. En el urogallo, los muestreos no invasivos y análisis genéticos (NIS-GA), permiten detectar más machos en los cantaderos que los recuentos de cantos tradicionales. Además, los NIS-GA causan menos perturbaciones a la especie y permiten obtener información del mismo individuo durante varios años.
3. El genoma mitocondrial del urogallo es similar, tanto en organización como en tamaño, a los genomas mitocondriales descritos en otras especies de galliformes. Los análisis filogenéticos realizados confirman la filogenia establecida para este orden de aves.
4. Distance Sampling es un método adecuado para estimar las densidades de lagópodo alpino a partir de conteos desde puntos fijos, ya que proporciona estimas más precisas que el método de Plot Sampling.
5. La proporción de los sexos de los adultos (ASR) del lagópodo alpino es equilibrado en primavera. Los muestreos no-invasivos y análisis genéticos es una metodología adecuada para estimar este parámetro, ya que el análisis de los datos de caza proporciona datos muy sesgados y poco fiables.

Bibliografía.

- Abrahams, C. (2019) Comparison between lek counts and bioacoustic recording for monitoring Western Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.). *Journal of Ornithology*, 160: 685-697.
- Abrahams, C., Denny, M.J.H. (2018) A first test of unattended, acoustic recorders for monitoring Capercaillie *Tetrao urogallus* lekking activity. *Bird Study*, 65: 197–207.
- Aleix-Mata, G., Adrados, B., Boos, M., Marty, E., Mourieres, P., Tucatz, G., Thion, N., Mossoll-Torres, M., Pérez, J., Sánchez, A. (2020a) Comparing methods for estimating the abundance of Western Capercaillie *Tetrao urogallus* males in Pyrenean leks: singing counts versus genetic analysis of non-invasive samples. *Bird Study*, 66: 565-569.
- Aleix-Mata, G., Mossoll-Torres, M., Marty, E., Boos, M., Sánchez, A., Pérez, J.M. (2020b) Distance sampling vs. Plot sampling for monitoring population abundances of the Pyrenean Rock ptarmigan. *European Journal of Wildlife Research* (in press).
- Aleix-Mata, G., Pérez, J.M., Adrados, B., Boos, M., Marty, E., Mourieres, P., Lauer, E., Zimmermann, S., Mossoll-Torres, M., Sánchez, A. (2020c) Sex ratio of Alpine and Pyrenean Rock Ptarmigans *Lagopus muta* estimated by non-invasive methods and by hunting bag data. *Ardeola* (in press).
- Aleix-Mata, G., Ruiz-Ruano, F.J., Pérez, J.M., Sarasa, M., Sánchez, A. (2019) Complete mitochondrial genome of the Western Capercaillie *Tetrao urogallus* (Phasianidae, Tetraoninae). *Zootaxa*, 4550: 585-593.
- Aubry, P. (2011) Échantillonnage à deux occasions et variance totale pour l'estimation de l'abondance du Lagopède alpin. DER, ONCFS, Informe tecnico.
- Augustine, B.C., Kéry, M., Marin, J.O., Mollet, P., Pasinelli, G., Sutherland, C. (2019) Sex-specific population dynamics and demography of capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) in a patchy environment. *Population Ecology*, 62: 80-90.

Bibliografía.

- Ballesteros, F., Canut, J., Robles, L., Areces, J.L. (2006) El urogallo en la península Ibérica. In: Robles, L., Ballesteros, F., Canut, J. (Eds.) *El urogallo en España, Andorra y Pirineos franceses. Situación actual (2005)*, pp. 26-38. SEO/BirdLife. Madrid.
- Bañuelos, M.J., Blanco-Fontao, B., Fameli, A., Fernández-Gil, A., Mirol, P., Morán-Luis, M., Rodríguez-Muños, R., Quevedo, M. (2019) Population dynamics of an endangered forest bird using mark–recapture models based on DNA-tagging. *Conservation Genetics*, 20 : 1251–1263.
- Bech, N. (2010) *Génétique de la Conservation et du Paysage: Etude des Populations de lagopède alpin et de Perdrix grise en France*. Thesis Doctoral, Université Perpignan Via Domitia, Perpignan.
- Bech, N., Barbu, C.M., Quéméré, E., Novoa, C., Allienne, J.F., Boissier, J. (2013) Pyrenean ptarmigans decline under climatic and human influences through the Holocene. *Heredity*, 111: 402–409.
- Bergerud, A.T., Mercer, W.E. (1966) Census of the Willow Ptarmigan in Newfoundland. *The Journal of Wildlife Management*, 30: 101-113.
- Bibby, J.C. (2004) Bird density survey methods. In: Sutherland, W.J., Newton, I., Green, R.E. (Eds.) *Bird ecology and conservation: a handbook of techniques*, pp. 1–11. Oxford University Press, Oxford.
- BirdLife International (2015) *European Red List of Birds*. Office for Official Publications of the European Communities. Luxembourg.
- Bisi, F., Martinoli, A., D'Acunto, D., Gagliardi, A., Masseroni, E., De Franceschi, C., Preatoni, D., Wanters, L.A., Martinoli, A. (2017). Habitat Selection by Alpine Rock Ptarmigan *Lagopus muta helvetica* in the Italian Alps. *Ornithological Science*, 16: 93-100.
- Blondel, J., Ferry, C., Frochot, B. (1981) Point counts with unlimited distance. In: Ralph C.J., Scott, J.M. (Eds.) *Estimating numbers of terrestrial birds*, pp. 414-420. Studies in Avian Biologie No. 6, Cooper Ornithological Society, Kansas.

Bibliografía.

- Bossert, A. (1977) Bestandesaufnahmen am Alpenschneehuhn (*Lagopus mutus*) im Aletchgebiet. Der Ornithologische Beobachter, 74: 95-98.
- Boudarel, P. (1987) Données sur l'écologie du Lagopède *Lagopus mutus* dans le massif d'Ossau (Pyrénées-Atlantiques). Acta Biologica Montana, 7: 11-34.
- Boudarel, P. (1988) Recherches sur l'habitat et le comportement spatial du lagopède alpin (*Lagopus mutus*) dans les Pyrénées-Occidentales Françaises. Gibier et Faune Sauvage, 5: 227-254.
- Boudarel, P. (1989) Essai sur l'insertion du Lagopède alpin (*Lagopus mutus pyrenaica*) dans les écosystèmes d'altitude Pyrénéens. Thesis Doctoral, Université de Pau et Pays de l'Adour, Pau.
- Brenot, J.F., Ellison, L., Rotelli, L., Novoa, C., Calenge, C., Léonard, P., Ménoni, E. (2005) Geographic variation in body mass of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in the Alps and the Pyrenees. Wildlife Biology, 11: 281–285.
- Buckland, S.T. (2006) Point Transect survey for songbirds: robust methodologies. The Auk, 123: 345–357.
- Buckland, S.T., Anderson, D.R., Burnham, K.P., Laake, J.L., Borchers, D.L., Thomas, L. (2001) Introduction to Distance Sampling. Oxford University Press, Oxford.
- Buckland, S.T., Marsden, S.J., Green, R.R. (2008) Estimating bird abundance: making methods work. Bird Conservation International, 18: S91-S108.
- Buehler, D.M., Baker, A.J. (2003) Characterization of the red knot (*Calidris canutus*) mitochondrial control region. Genome, 46: 565-572.
- Caizergues, A., Bernard-Laurent, A., Brenot, J.F., Ellison, L., Rasplus, J.Y. (2003) Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and Western Europe. Molecular Ecology, 12: 2267-2274.

Bibliografía.

- Canut, J., García, D., Marco, X. (1987) Distribución y residencia de la perdiz nival *Lagopus mutus* en el pirineo ibérico. *Acta Biologica Montana*, 7: 51-57.
- Canut, J., García, D., Parellada, X. (2004a) Urogallo Pirenaico: *Tetrao urogallus aquitanicus*. In: Madroño, A., González, C., Atienza, J.C. (Eds.) *Libro rojo de las aves de España*, pp. 179-181. Dirección General para la Biodiversidad-SEO/BirdLife. Madrid.
- Canut, J., García, D., Parellada, X., Lorente, L. (2004c) Lagópodo alpino, *Lagopus mutus*. In: Madroño, A., González, C., Atienza, J.C. (Eds.) *Libro rojo de las aves de España*, pp. 173-175. Dirección General para la Biodiversidad-SEO/BirdLife. Madrid.
- Canut, J., Martínez, R., Parellada, X. García, D. Piqué, J. (2004b) Gall fer, *Tetrao urogallus*. IN: Estrada, J., Pedrocchi, V., Brotons, L., Herrando, S. (Eds.) *Atlas dels ocells nidificants de Catalunya 1999-2002*, pp. 106-107. Institut Català d'Ornitologia (ICO) – Lynx Edicions. Barcelona.
- Canut, J., Robles, L., Afonso, I., Ballesteros, F., Benito, J.L. (2006) Metodología de censo. In: L. Robles, L., Ballesteros, F., Canut, J. (Eds.) *El urogallo en España, Andorra y Pirineos franceses. Situación actual (2005)*, pp. 10-25. SEO/BirdLife. Madrid.
- Castroviejo, J.B. (1975) *El urogallo en España*. Monografías de la Estación Biológica de Doñana, Sevilla.
- Catusse, M., Novoa, C. (1983) Contribution à la mise au point des méthodes de recensement de mâles de Grand Tétras (*Tetrao urogallus*) en période de chant dans les Pyrénées françaises. *Bulletin Mensuel de l'O.N.C.*, 74: 16-22.
- Cayuela, H., Boualit, L., Laporte, M., Prunier, J.G., Preiss, F., Laurent, A., Foletti, F., Clobert, J., Jacob, G. (2019) Kin-dependent dispersal influences relatedness and genetic structuring in a lek system. *Oecologia*, 191: 97–112.

Bibliografía.

- Charra, M., Sarasa, M. (2018). Applying IUCN Red List criteria to birds at different geographical scales: similarities and differences. *Animal Biodiversity and conservation*, 41: 75–96.
- Clutton-Brock, T.H. (1986) Sex ratio variation in birds. *Ibis*, 128: 317-329.
- Corlatti, L., Nelli, L., Bertolini, M., Zibordi, F., Pedrotti, L. (2017) A comparison of four methods to estimate population size of Alpine marmot (*Marmota marmota*). *Hystrix*, 28: 61-67.
- Costanzi, J.M., Bergan, F., Sæbø, M., Jenkins, A., Steifetten, Ø. (2018) Development and evaluation of 16 new microsatellite loci for the rock ptarmigan (*Lagopus muta*) and cross-species amplification for the willow grouse (*L. lagopus*). *BMC Research Notes*, 11: 1-5.
- Costanzi, J.M., Steifetten, Ø. (2019) Island biogeography theory explains the genetic diversity of a fragmented rock ptarmigan (*Lagopus muta*) population. *Ecology and Evolution*, 9: 3837-3849.
- Couturier, M. (1964) *Le gibier des montagnes françaises*, Arthaud, Grenoble.
- Couturier, M., Couturier, A. (1980) *Les coqs de bruyère*. F. Dubusc, Boulogne.
- Creel, S., Spong, G., Sands, J.L., Rotella, J., Zeigle, J., Joe, L., Murphy, K.M., Smiths, D. (2003) Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, 12: 2003-2009.
- de Juana, E. (1994) Tetraonidae. In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (Eds.) *Handbook of the Birds of the World. Vol 2*, pp. 376–411. Lynx Edicions, Barcelona.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (1994) *Handbook of the Birds of the World, Vol 2*. Lynx Ediciones, Barcelona.
- Donald, P.F. (2007) Adult sex ratios on wild bird population. *Ibis*, 149: 671-692.

Bibliografía.

- Drovetski, S (1992) New data on the functional significance of pictinations in grouse, Tetraonidae. Zoologicheskyy Zhurnal, 71: 100-109.
- Dumont, L., Lauer, E., Zimmermann, S., Roche, P., Auliac, P., Sarasa, M. (2019) Monitoring black grouse *Tetrao tetrix* in Isère, northern French Alps: cofactors, population trends and potential biases. Animal Biodiversity and Conservation, 42: 227-244.
- Duriez, O., Sachet, J.M., Ménoni, E., Pidancier, N., Miquel, C., Taberlet, P. (2007) Phylogeography of the capercaillie in Eurasia: what is the conservation status in the Pyrenees and Cantabrian Mounts. Conservation Genetics, 8: 513-526.
- Eliassen, S., Wegge, P. (2007) Ranging behaviour of male capercaillie *Tetrao urogallus* outside the lekking ground in spring. Journal of Avian Biology, 38: 37–43.
- Ellison, L., Léonard, P. (1996) Validation d'un critère d'âge chez le lagopède alpin (*Lagopus mutus*) et sexe et âge ratios dans des tableaux de chasse des Alpes et des Pyrénées. Gibier Faune Sauvage 13: 1495-1510.
- Evans, S., Mougeot, F., Redpath, S., Leckie, F. (2007) Alternative methods for estimating density in an upland game bird: the red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. Wildlife Biology, 13: 130–139.
- Favaron, M., Scherini, G.C., Preatoni, D., Tosi, G., Wauters, L.A. (2006) Spacing behaviour and habitat use of Rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) at low density in the Italian Alps. Journal of Ornithology, 147: 618-628.
- Fedy, B., Martin, K. (2011) The Influence of Fine-Scale Habitat Features on Regional Variation in Population Performance of Alpine White-Tailed Ptarmigan. The Condor, 113: 306-315.
- FNC (Fédération Nationale des Chasseurs), ONCFS (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage) (2008) *Tout le gibier de France*. Hachette pratique, Paris.

Bibliografía.

- Franceschi, S., Nelli, L., Pisani, C., Franzoi, A., Fattorini, L., Meriggi, A. (2014) A Monte Carlo appraisal of plot and distance sampling for surveys of black grouse and Rock ptarmigan populations in alpine protected areas. *Journal of Wildlife Management*, 78: 359–368.
- Fuller, R.A., Carroll, J.P., McGowan, P.J.K. (2000) *Partridges, Quails, Francolins, Snowcocks, Guineafowl, and Turkeys. Status Survey and Conservation Action Plan 2000–2004*. WPA/BirdLife/SSC Partridge, Quail, and Francolin Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge.
- Fuller, R.A., Garson, P.J. (2000) *Pheasants. Status Survey and Conservation Action Plan 2000–2004*. WPA/BirdLife/SSC Pheasants Specialist Group. IUCN, Gland. Switzerland and Cambridge.
- García-Gonzales, R., Boudarel, P., Dendaletche, C. (1987) Premières données sur l'alimentation hivernale du lagopède dans le massif d'Ossau Pyrénées-Atlantiques. *Acta Biologica Montana* 7 : 35–50.
- Gée, A., Sarasa, M., Pays, O. (2018) Long-term variation of demographic parameters in four small game species in Europe: opportunities and limits to test for a global pattern. *Animal Biodiversity and Conservation*, 41: 33–60.
- Gil, J.A., Gómez-Serrano, M.A., López-López, P. (2020) Population decline of the capercaillie *Tetrao urogallus aquitanicus* in the central Pyrenees. *Ardeola*, 67: 285-306.
- Gjerde, I., Wegge, P. (1987) Activity patterns of capercaillie, *Tetrao urogallus*, during winter. *Holarctic Ecology*, 10: 286-293.
- Gonzalez, G, Novoa, C. (1989) Partage de l'espace entre le lagopède *Lagopus mutus pyrenicus* et le perdrix grise *Perdix perdix hispaniensis* dans les massifs du Carlit (Pyrénées Orientales) en fonction de l'altitude et de l'exposition. *Revue d'Écologie (Terre et Vie)* 44: 347- 360.

Bibliografía.

- González, M.A., Olea, P.P., Mateo-Tomás, P., García-Tejero, S., De Frutos, Á., Robles, L., Purroy, F.J., Ena, V. (2012) Habitat selection and diet of Western Capercaillie *Tetrao urogallus* in an atypical biogeographical region. *Ibis*, 154: 260–272.
- Goossens, B., Chikhi, L., Utami, S.S., De Ruiter, D., Briford, M.W. (2000) A multi-samples, multi-extracts approach for microsatellite analysis of faecal samples in an arboreal ape. *Conservation Genetics*, 1:1157-1162.
- Hampe, A., Petit, R.J. (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, 8: 461-467.
- Haysom, S. (2013) Capercaillie Survey Methods. Scottish Natural Heritage. Informe técnico.
- Holder, K., Montgomerie, R. (1993) Red colour bands do not improve the mating success of male Rock Ptarmigan. *Ornis Scandinavica*, 24: 53-58.
- Homel, K., Nikiforov, M., Kheidorova, E. (2019) Genetic Diversity and Place in the General Phylogeographic Structure of Capercaillie, *Tetrao urogallus* (Galliformes , Phasianidae), from Belarus. *Vestnik Zoologii*, 53: 385-398.
- Hosner, P.A., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Braun, E.L., Kimball, R.T. (2016) Avoiding missing data biases in phylogenomic inference: An empirical study in the landfowl (Aves: Galliformes). *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1110–1125.
- Hosner, P.A., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Braun, E.L., Kimball, R.T. (2016) Avoiding missing data biases in phylogenomic inference: An empirical study in the landfowl (Aves: Galliformes). *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1110–1125.
- Isomursu, M., Rätti, O., Helle, P., Hollmén, T. (2008) Parasitized Grouse are More Vulnerable to Predation as Revealed by a Dog-Assisted Hunting Study. *Annales Zoologici Fennici*, 45: 496-502.
- IUCN (2019) *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2017-2. <www.iucnredlist.org>. (accessed 01 November 2019).

Bibliografía.

- Jacob, G., Debrunner, R., Gugerli, F., Schmid, B., Bollmann, K. (2010) Field surveys of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Swiss Alps underestimated local abundance of the species as revealed by genetic analyses of non-invasive samples. *Conservation Genetics*, 11: 33-44.
- Johnsgard, P.A. (1986) *The Pheasants of the World*. Oxford University Press, Oxford.
- Kowalczyk, A.M., Klećkowska-Nawrot, J., Łukaszewicz, E.T. (2017) Effect of selenium and vitamin E addition to the extender on liquid stored capercaillie (*Tetrao urogallus*) semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 52: 603–609.
- Lambin, X., Krebs, C.J., Moss, R., Stenseth, N.C., Yoccoz, N. G. (1999) Population cycles and parasitism. *Science*, 286: 2425-2425.
- Latorre-Cardenas, M.C., Gutiérrez-Rodríguez, C., Lance, S.L. (2020) Isolation and characterization of 13 microsatellite loci for the Neotropical otter, *Lontra longicaudis*, by next generation sequencing. *Molecular Biology Reports*, 47: 731-736.
- Leclercq, B. (1987) Ecologie et dynamique des populations du grand tétras (*Tetrao urogallus major*) dans le Jura Français. Thesis Doctoral, Universidad de Bourgogne, Dijon.
- Leclercq, B. (1988) *Le grand coq de bruyère ou Grand Tétras*. Sang de la terre, Paris.
- Lentner, R., Masoner, A., Lehne, F. (2018) Are counts on leks of Capercaillie and Black Grouse still state-of-the-art? Results from grouse monitoring in Tirol, Austria. *Der Ornithologische Beobachter*, 115: 215–238.
- Léonar, P. (1995) Méthode de dénombrement des lagopèdes alpins mâles au chant et présentation des résultats. *Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse*, 199, Note Technique - Fiche n°85.
- Li, B., Zhu, C., Ding, P., Bai, S., Cui, J. (2016) Complete mitochondrial genome of black grouse (*Lyrurus tetrix*). *Mitochondrial DNA*, 27: 134-135.

Bibliografía.

- Li, X., Huang, Y., Lei, F. (2014) Complete mitochondrial genome sequence of *Bonasa sewerzowi* (Galliformes: Phasianidae) and phylogenetic analysis. *Zoological Systematics*, 39: 359-371.
- Lohse, M., Drechsel, O., Kahlau, S., Bock, R. (2013) OrganellarGenomeDRAW--a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. *Nucleic Acids Research*, W575-81.
- López-Moreno, I., Vicente-Serrano, S.M. (2007) Atmospheric circulation influence on the inter annual variability of snow pack in the Spanish Pyrenees during the second half of the 20th century. *Nordic Hydrology*, 38:33-44.
- Lucchini, V., Höglund, J., Klaus, S., Swenson, J., Randi, E. (2001) Historical biogeography and a mitochondrial DNA phylogeny of grouse and ptarmigan. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20: 149–162.
- Marin-Cudraz, T., Muffat-Joly, B., Novoa, C., Aubry, P., Desmet, J.F., Mahamoud-Issa, M., Nicolè, F., Van Niekerk, M.H., Mathevon, N., Sèbe, F. (2019) Acoustic monitoring of rock ptarmigan: A multi-year comparison with point-count protocol. *Ecological Indicators*, 101: 710–719.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk., L.E.B., Pemberton, J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639-655.
- Martin, K. (2001) Wildlife communities in alpine and sub-alpine habitats. In: Johnson, D.H., O'Neil, T.A. (Eds.) *Wildlife-Habitat Relationships in Oregon and Washington*. pp.285-310. Oregon State University Press, Oregon.
- Martin, K., Horn, A.G., Hannon, S.J. (1995) The calls and associated behavior of breeding willow ptarmigan in Canada. *The Wilson Bulletin*, 107: 496-509.

Bibliografía.

- Marty, E., Mossoll-Torres, M. (2012) Point-count method for estimating Rock ptarmigan spring density in the Pyrenean chain. *European Journal of Wildlife Research*, 58: 357-363.
- Ménoni, E. (1991) *Ecologie et dynamique des populations du Grand Tétrás dans les Pyrénées, avec des références spéciales à la biologie de la reproduction chez les poules - quelques applications à sa conservation*. Thesis Doctoral, Universidad Paul Sabatier, Toulouse.
- Ménoni, E. (1997) Location and size of capercaillie *Tetrao urogallus* leks in relation to territories of hens. *Wildlife Biology*, 3: 137-147.
- Ménoni, E. (2006) El urogallo en los Pirineos franceses: situación actual de la especie, evolución de los efectivos, factores limitantes y gestión de las poblaciones. In: L. Robles, L., Ballesteros, F., Canut, J. (Eds.) *El urogallo en España, Andorra y Pirineos franceses. Situación actual (2005)*, pp. 79-84. SEO/BirdLife. Madrid.
- Ménoni, E., Calenge, C., Dumont-Dayot, E., Milhau, B. (2014) Estimation des effectifs de grand tétras dans les Pyrénées françaises. *Faune sauvage*, 304: 32-36.
- Ménoni, E., Novoa, C., Berducou, C., Canut, J., Pique, J., Mossoll-Torres, M., Gallus, G. (2004) Evaluation transfrontalière de la population de Grand tétras des Pyrénées. *Faune Sauvage* 263: 20–25.
- Miquel, C., Bellemain, E., Poillot, C., Bessière, J., Durand, A., Taberlet, P. (2006) Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach. *Molecular Ecology Notes*, 6: 985-988.
- Mollet, P., Kéry, M., Gardner, B., Pasinelli, G., Royle, J.A. (2015) Estimating Population Size for Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) with Spatial Capture-Recapture Models Based on Genotypes from One Field Sample. *PLoS One* 10: e0129020.
- Mondol, S., Ullas Karanth, K., Samba Kumar, N., Gopalaswamy, A.M., Andheria, A., Ramakrishnan, U. (2009) Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. *Biological Conservation*, 142: 2350–2360.

Bibliografía.

- Montadert, M. (2013) Statut actuel et variation d'abondances du grand tétras *Tetrao urogallus* dans le Massif Jurassien français. *Alauda*, 81: 1-18.
- Morales, M.B., Bretagnolle, V., Arroyo, B. (2005) Viability of the endangered little bustard *Tetrax tetrax* population of western France. *Biodiversity and Conservation*, 14: 3135-3150.
- Mossoll-Torres, M. (2006) Situación del urogallo (*Tetrao urogallus aquitanicus*) en Andorra. In: L. Robles, L., Ballesteros, F., Canut, J. (Eds.) *El urogallo en España, Andorra y Pirineos franceses. Situación actual (2005)*, pp. 79-84. SEO/BirdLife. Madrid.
- Mossoll-Torres, M. (2011) Estudio de detalle. El Urogallo en las estaciones de esquí andorranas. In: Canut, J.; García-Ferré, D., Afonso, I. (Eds.) *Manual de conservación y manejo del hábitat del urogallo pirenaico*, pp. 185-200. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentacion i Medio Natural. Serie manuales de gestión de especies amenazadas. Madrid.
- Mossoll-Torres, M., Marty, E. (2006) Protocolo de recuento del lagópodo alpino (*Lagopus muta pyrenaica*) en época de celo en los Pirineos. In: Afonso, I.; Aniz, M.; Arribas, O.; Canut, J.; Marty, E.; Mossoll, M.; Piqué, J., Racionere, C. (Eds.) *El lagópodo alpino (Lagopus muta pyrenaica) en el Parque Nacional de Aigüestortes i Estanys de Sant Maurici*, pp. 17-25. Organismo Autónomo Parques Nacionales Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- Mossoll-Torres, M., Marty, E. (2012) Précisions apportées au protocole de dénombrement des mâles chanteurs de lagopède alpin. *Faune sauvage*, 294: 19-23.
- Mossoll-Torres, M., Menoni, E. (2008) The capercaillie in Andorra: a population in good health! *Grouse News*, 32: 18-23.

Bibliografía.

- Navidi, W., Arnheim, N., Waterman, M.S. (1992) A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. *American Journal of Human Genetics*, 50: 347-359.
- Nelli, L., Meriggi, A., Franzoi, A. (2013) Habitat selection by breeding rock ptarmigan *Lagopus muta helvetica* males in the western Italian Alps. *Wildlife Biology*, 19: 382-389.
- Nopp-Mayr, U., Zohmann, M. (2008) Spring densities and calling activities of rock ptarmigan (*Lagopus muta helvetica*) in the Austrian Alps. *Journal of Ornithology*, 149: 135-139.
- Nord, A., Folkow, L.P. (2018) Seasonal variation in the thermal responses to changing environmental temperature in the world's northernmost land bird. *Journal of Experimental Biology*, 221: jeb171124.
- Novoa, C., Desmet, J.F., Brenot, J.F., Muffat-Joly, B., Arvin-Bérod, M., Resseguier, J., Tran. B. (2011) Demographic traits of two alpine populations of Rock Ptarmigan. In: Sandercock, B.K., Martin, K., Segelbacher, G. (Eds.) *Ecology, conservation, and management of grouse. Studies in Avian Biology (no. 39)*, pp. 267-280. University of California Press. Berkeley.
- Novoa, C., Gonzalez, G. (1988) Comparaison des biotopes sélectionnés par le lagopède alpin (*Lagopus mutus*) et la perdrix grise des Pyrénées (*Perdix perdix hispaniensis*) sur le massif du Carlit (Pyrénées Orientales). *Gibier Faune Sauvage*, 5: 187-202.
- Odden, M., Wegge, P., Eliassen, S., Finne, M.H. (2003) The influence of sexual size dimorphism on the dietary shifts of capercaillie *Tetrao urogallus* during spring. *Ornis Fennica*, 80: 130-136.
- ONC. (1977) Enquête nationale sur la situation du Grand Tétras. *Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse*, suppl. n°4.

Bibliografía.

- ONC. (1983) Methodes de denombrement de Grand Tétras. Notes techniques, Supplement au Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse nº74, fiche Nº15.
- Pakkala T, Pellikka J, Linden H (2003) Capercaillie *Tetrao urogallus*—a good candidate for an umbrella species in taiga forests. *Wildlife Biology*, 9: 309–316.
- Palomares, F., Adrados, B., Zanin, M., Silveira, L., Keller, C. (2017) A non-invasive faecal survey for the study of spatial ecology and kinship of solitary felids in the Viruá National Park, Amazon Basin. *Mammal Research*, 62: 241–249.
- Panareda, M. (1984) Les conditions climatiques. In: Folch i Guillen, R. (Ed.) *El Patrimoni natural d'Andorra: Els sistemes naturals andorrans i llur utilitzacio*, pp. 55–62. Ketres, Barcelona,
- Pedersen, A.O., Bårdsen, B.J., Yoccoz, N.G., Lecomte, N., Fuglei, E. (2012) Monitoring Svalbard rock ptarmigan: Distance sampling and occupancy modeling. *Journal of Wildlife Management*, 76: 308–316.
- Pedersen, Å.Ø., Blanchet, M.A., Hornell-Willebrand, M., Jepsen, J.U., Biuw, M., Fuglei, E. (2014) Rock Ptarmigan (*Lagopus muta*) breeding habitat use in northern Sweden. *Journal of Ornithology*, 155: 195–209.
- Pelletier, L., Krebs, C. (1997) Line-transect sampling for estimating ptarmigan (*Lagopus* spp.) density. *Canadian Journal of Zoology*, 75: 1185–1192.
- Pérez, J.M., Sarasa, M., Moço, G., Granados, J.E., Crampe, J.P., Serrano, E., Maurino, L., Meneguz, P.G., Afonso, A., Alpizar-Jara, R. (2015) The effect of data analysis strategies in density estimation of mountain ungulates using distance sampling. *Italian Journal of Zoology*, 82: 262–270.
- Pérez, J.M., Serrano, E., Alpizar-Jara, R., Granados, J.E., Soriguer, R.C. (2002) The potential of Distance Sampling methods to estimate abundance of mountain ungulates: review of usefulness and limitations. *Pirineos*, 157: 15–23.

Bibliografía.

- Pérez, T., Vazquez, J.F., Quirós, F., Domínguez, A. (2011) Improving non-invasive genotyping in capercaillie (*Tetrao urogallus*): redesigning sexing and microsatellite primers to increase efficiency on faeces samples. *Conservation and Genetic Research*, 3: 483-487.
- Persons, N.W., Hosner, P.A., Meiklejohn, K.A., Braun, E.L., Kimball, R.T. (2016) Sorting out relationships among the grouse and ptarmigan using intron, mitochondrial, and ultra-conserved element sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 98: 123-132.
- Piertney, S., Dallas, J. (1997) Isolation and characterization of hypervariable microsatellites in the red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Molecular Ecology* 6: 93–95.
- Piertney, S.B., Höglund, J. (2001) Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes*, 1: 303-304.
- Pyle, P. (2007) Revision of Molt and Plumage Terminology in Ptarmigan (Phasianidae: *Lagopus SPP.*) Based on Evolutionary Considerations. *The Auk*, 124: 508–514.
- QGIS Development Team. (2014) QGIS geographic information system. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.
- Quintela, M., Thulin, C.G., Höglund, J. (2010) Detecting hybridization between willow grouse (*Lagopus lagopus*) and rock ptarmigan (*L. muta*) in Central Sweden through Bayesian admixture analyses and mtDNA screening. *Conservation Genetics*, 11: 557–569.
- Rajala, P. (1966) The number of tetraonids birds and their occurrence in various habitats types in the Oulu district according to route-census. *Suomen Riista*, 19: 130-144.
- Rajala, P. (1974) The structure and reproduction of Finnish populations of capercaillie, *Tetrao urogallus*, and black grouse, *Lyrurus tetrix*, on the basis of late summer census data from 1963-66. *Finnish Game Research*, 35: 1-51.

Bibliografía.

- Regnaut, S. (2004) Population genetics of Capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Jura and the Pyrenees: a non-invasive approach to avian conservation genetics. Thesis Doctoral, Universidad de Lausana, Lausana.
- Regnaut, S., Christe, P., Chapuisat, M., Fumagalli, L. (2006) Genotyping faeces reveals facultative kin association on capercaillie's leks. *Conservation Genetics*, 7: 665-674.
- Rem, Z., Ling, Y., Su, X., Wen, J. (2018) Complete mitochondrial genome of *Chrysolophus pictus* (Galliformes: Phasianidae), a protected and endangered pheasant species of China. *Conservation Genetics Resources*, 11: 121-124.
- Robles, L., Ballesteros, F., Canut, J. (2006) *El urogallo en España, Andorra y Pirineos franceses. Situación actual (2005)*. SEO/BirdLife. Madrid.
- Rösner, S., Brandl, R., Segelbacher, G., Lorenc, T., Müller, J. (2014) Noninvasive genetic sampling allows estimation of capercaillie numbers and population structure in the Bohemian Forest. *European Journal of Wildlife Research*, 60: 789-801.
- Ruokonen, M., Kvist, L. (2002) Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23: 422-432.
- Rutkowski, R., Zawadzka, D., Merta, D., Stanković, A., Jagołkowska, P., Suchecka, E., Kobielski, J. (2017). Conservation Genetics of the Capercaillie *Tetrao urogallus* in Poland - Diversity of Mitochondrial DNA in Remnant and Extinct Populations. *Acta Ornithologica*, 52: 179–196
- Sachot, S., Perrin, N., Neet, C. (2002) Winter habitat selection by two sympatric forest grouse in western Switzerland: implications for conservation. *Biological Conservation*, 112: 373–382.
- Salgado-Flores, A., Tveit, A.T., Wright, A.D., Pope, P.B., Sundset, M.A. (2019) Characterization of the cecum microbiome from wild and captive rock ptarmigans indigenous to Arctic Norway. *PLoS ONE*, 14: 1–21.

Bibliografía.

- Salomonsen, E. (1939) Moults and sequence of plumages in the rock ptarmigan (*Lagopus mutus* (Montin)). P. Haase and Son, Copenhagen.
- Scherini, G.C., Tosi, G., Wauters, L.A. (2003) Social behaviour, reproductive biology and breeding success of alpine Rock Ptarmigan *Lagopus mutus helveticus* in Northern Italy. *Ardea*, 91: 11–23.
- Schwab, F.E., Simon, N.P.P., Nash, S. (2005) Age and Sex Segregation of Wintering Willow Ptarmigan in Labrador. *Northeastern Naturalist*, 12: 113–118.
- Scott, J.M., Ralph, C.J. (1981) Introduccion. In: Ralph, C.J., Scott, J.M (Eds.) Estimating numbers of terrestrial birds, pp. 1-2. *Studies in Avian Biologie* No. 6, Cooper Ornithological Society, Kansas.
- Segelbacher, G., Paxton, R.J., Steinbrück, G., Trontelj, P., Storch, I. (2000) Characterization of microsatellites in capercaillie *Tetrao urogallus* (AVES). *Molecular Ecology*, 9: 1934-1935.
- Segelbacher, G., Piernney, S. (2007) Phylogeography of the European capercaillie (*Tetrao urogallus*) and its implications for conservation. *Journal of Ornithology*, 148: 269–274.
- Segelbacher, G., Steinbrück, G. (2001) Bird faeces for sex identification and microsatellite analysis. *Dei Vogelwarte*, 41: 139-142.
- Shea, K. (1998) Management of populations in conservation, harvesting and control. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 371-375.
- Shen, Y.Y., Dai, K., Cao, X., Murphy, R.W., Shen, X.J., Zhang, Y.P. (2014) The updated phylogenies of the phasianidae based on combined data of nuclear and mitochondrial DNA. *PLoS One*, 9: e95786.
- Shen, Y.Y., Liang, L., Sun, Y.B., Yue, B.S., Yang, X.J., Murphy, R.W., Zhang, Y.P. (2010) A mitogenomic perspective on the ancient, rapid radiation in the Galliformes with an emphasis on the Phasianidae. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 132.

Bibliografía.

- Skírnisson, K., Nielsen, Ó.K. (2019) Quill mite infestation of rock ptarmigan *Lagopus muta* (Aves: Phasianidae) in relation to year and host age, sex, body condition, and density. *Parasitology Research*, 118: 2643-2650.
- Skirnisson, K., Thorarinsdottir, S.T., Nielsen, O.K. (2012) The Parasite Fauna of Rock Ptarmigan (*Lagopus muta*) in Iceland: Prevalence, Intensity, and Distribution Within the Host Population. *Comparative Parasitology*, 79: 44–55.
- Storch, I. (1997) Male territoriality, female range use, and spatial organisation of capercaillie *Tetrao urogallus* leks. *Wildlife Biology*, 3: 149-16.
- Storch, I. (2000) *Grouse; status survey and conservation action Plan 2000-2004*. IUCN and World Pheasant Association. Gland, Switzerland, and Fordingbridge.
- Storch, I. (2007) *Grouse: Status Survey and Conservation Action Plan 2006–2010*. IUCN and World Pheasant Association. Gland, Switzerland, and Fordingbridge.
- Suter, W., Graf, R.F., Hess, R. (2002) Capercaillie (*Tetrao urogallus*) and avian biodiversity: testing the umbrella-species concept. *Conservation Biology*, 16: 778–788.
- Suzuki, A., Kobayashi, A., Nakamura, H., Takasu, F. (2013) Population viability analysis of the Japanese rock ptarmigan *Lagopus muta japonica* in Japan. *Wildlife Biology*, 19: 339-346.
- Sveinsdóttir, M., Magnússon, K.P. (2017) Complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of willow ptarmigan (*Lagopus lagopus*) and rock ptarmigan (*Lagopus muta*) (Galliformes: Phasianidae: Tetraoninae). *Mitochondrial DNA Part B*, 2: 400–402.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G., Cosson, J.F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453–464.
- Taberlet, P., Griffen, S., Goosens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P. Bouvet, J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24:3189–3194.

Bibliografía.

- Taberlet, P., Luikart, G. (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68:41–55.
- Thomas, L., Buckland, S.T., Redstad, E.A., Laake, J.L., Strindberg, S., Hedley, S.L., Bishop, J.R.B., Marques, T.A., Burnham, K.P. (2010) Distance software: design and analysis of distance sampling surveys for estimating population size. *Journal of Applied Ecology*, 47: 5-14.
- UICN France, MNHN, LPO, SEOF, ONCFS (2016) *La Liste rouge des espèces menacées en France – Chapitre Oiseaux de France métropolitaine*. Paris, France.
- Valière, N. (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 2: 377-379.
- Vallant, S., Niederstätter, H., Berger, B., Lentner, R., Parson, W. (2018) Increased DNA typing success for feces and feathers of capercaillie (*Tetrao urogallus*) and black grouse (*Tetrao tetrix*). *Ecology and Evolution*, 8: 3941–3951.
- Waits, L.P. (2004) Using noninvasive genetic sampling to detect and estimate abundance of rare wildlife species. In: Thompson, W.L. (Ed.) *Sampling rare or elusive species: concepts, designs, and techniques for estimating population parameters*, pp. 211-228. Island Press, Washington DC.
- Waits, L.P., Luikart, G., Taberlet, P. (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10: 249-256.
- Wang, N., Hosner, P.A., Liang, B., Braun, E.L., Kimball, R.T. (2017) Historical relationships of three enigmatic phasianid genera (Aves: Galliformes) inferred using phylogenomic and mitogenomic data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109: 217-225.
- Wang, N., Kimball, R.T., Braun, E.L., Liang, B., Zhang, Z. (2013) Assessing phylogenetic relationships among Galliformes: a multigene phylogeny with expanded taxon sampling in Phasianidae. *PLoS One*, 8: e64312.

Bibliografía.

- Wang, N., Kimball, R.T., Braun, E.L., Liang, B., Zhang, Z. (2013) Assessing phylogenetic relationships among Galliformes: a multigene phylogeny with expanded taxon sampling in Phasianidae. PLoS ONE, 8:e64312.
- Watson, A. (1965) A population study of Ptarmigan (*Lagopus mutus*) in Scotland. Journal of Animal Ecology, 34: 135-172.
- Watson, A., Moss, R. (2008) *Grouse. The natural history of British and Irish species*. Collins, London.
- Watson, A., Moss, R., Rae, S. (1998) Population dynamics of Scottish Rock Ptarmigan cycles. Ecology, 79: 1174-1192.
- Wegge, P., Eliassen, S., Finne, M.H., Odden, M. (2005) Social interactions among Capercaillie *Tetrao urogallus* males outside the lek during spring. Ornis Fennica, 82: 147-154.
- Wegge, P., Kvalsgard, T., Hjeljord, O., Sivkov, A.V. (2003) Spring spacing behaviour of capercaillie *Tetrao urogallus* males does not limit numbers at leks. Wildlife Biology, 9: 283-289.
- Wegge, P., Larsen, B.B. (1987) Spacing of adult and subadult common Capercaillie during the breeding season. The Auk 104: 481-408.
- Wegge, P., Rolstad, J., Storaunet, K.O. (2013) On the spatial relationship of males on “exploded” leks: The case of Capercaillie grouse *Tetrao urogallus* examined by GPS satellite telemetry. Ornis Fennica, 90: 222–235.
- Wegge, P., Vesterås, T., Rolstad, J. (2010). Does Timing of Breeding and Subsequent Hatching in Boreal Forest Grouse Match the Phenology of Insect Food for the Chicks? Annales Zoologici Fennici, 47: 251-260
- Wiley, R.H. (1974) Evolution of social organization and life-history patterns among grouse. The Quarterly Review of Biology, 49: 201-227.

Bibliografía.

- Wittenberger, J.F., Tilson, R.L. (1980) The evolution of monogamy: hypotheses and evidence. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 11: 197-232.
- Zohmann, M., Immitzer, M., Wöss, M., Gossow, H., Nopp-Mayr, U. (2014) Modelling habitat use of *Tetrao urogallus* L. in Austria for conservation issues. *Journal of Nature Conservation*, 22: 223–234.
- Zohmann, M., Wöss, M. (2008) Spring density and summer habitat use of alpine rock ptarmigan *Lagopus muta helvetica*. *Journal of Wildlife Research*, 54: 379–383.