



Universitat d'Alacant

Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.

Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.

[Ir directamente al índice](#)

Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores

Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .

[Anar directament a l'índex](#)

Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Dispersión Natal y
Estructura de la Población de
Águila-Azor Perdicera *Hieraaetus*
fasciatus en la Península Ibérica.

Natal Dispersal and Population Structure of
Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* in the Iberian
Peninsula.



Luis Cadahía Lorenzo

Tesis Doctoral

Universidad de Alicante, 2007



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Fotos portada: V. Urios Moliner, V. García Matarranz, J.L. García Mudarra.
Fotos contraportada: V. Urios Moliner, J.J. Negro Balmaseda, V. García Matarranz, L. Cadahía Lorenzo.

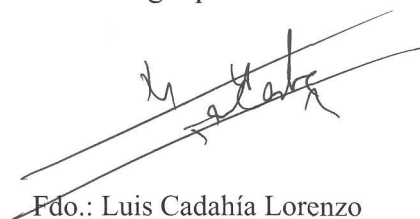


Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Dispersión Natal y Estructura de la Población de Águila-Azor Perdicera *Hieraaetus fasciatus* en la Península Ibérica.

Memoria presentada por el Licenciado Luis Cadahía Lorenzo para optar
al título de Doctor en Biología por la Universidad de Alicante.



Fdo.: Luis Cadahía Lorenzo

Directores:

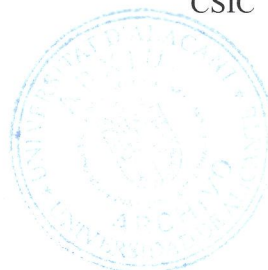


Fdo.: Dr. Vicente Urios Moliner
Estación Biológica Terra Natura
Universidad de Alicante



Fdo.: Dr. Juan J. Negro Balmaseda
Estación Biológica de Doñana
CSIC

Alicante, 2007





Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Atoda mi familia, tanto los de sangre
como los que no, desde los que llevan con nosotros
casi un siglo hasta los que acaban de llegar.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Índice.

Índice de Tablas y Figuras.	iii
Síntesis general.	1
General synthesis.	11
Introducción general.	19
Sección I – Dispersión natal.	47
Metodología general.	49
Capítulo 1.	
Estimating the onset of dispersal in endangered Bonelli's Eagle <i>Hieraaetus fasciatus</i> tracked by satellite telemetry: a comparison among methods.	57
Capítulo 2.	
Dispersal of raptors detected by location distribution and vectors.	77
Capítulo 3.	
Bonelli's Eagle <i>Hieraaetus fasciatus</i> juvenile dispersal: hourly and daily movements tracked by GPS.	103
Capítulo 4.	
Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's Eagles <i>Hieraaetus fasciatus</i> during their first winter.	117
Capítulo 5.	
Patrones de movimiento y áreas vitales en el águila-azor perdicera <i>Hieraaetus fasciatus</i> durante el período de dispersión juvenil en España.	133
Capítulo 6.	
From hatching to parenthood: recruitment to the breeding population of a Bonelli's eagle <i>Hieraaetus fasciatus</i> after four years of satellite tracking.	161
Sección II – Genética de poblaciones.	179
Capítulo 7.	
Low mitochondrial DNA diversity in the endangered Bonelli's Eagle (<i>Hieraaetus fasciatus</i>) from SW Europe (Iberia) and NW Africa.	181



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 8.	
Repeated sequence homogenization in the subfamily Aquilinae as revealed by the structure of the mitochondrial control and pseudo-control regions.	199
Conclusiones.	241
Agradecimientos.	247

Índice de Tablas y Figuras.

Introducción General.

Figura 1: Distribución mundial del águila-azor perdicera <i>Hieraetus fasciatus</i> .	28
Figura 2: Distribución de las parejas nidificantes de águila-azor perdicera en España.	33

Metodología General.

Figura 1: Cambio en la frecuencia recibida por el satélite desde un emisor a través del sistema Argos.	52
Tabla 1: Clases de Localización del sistema Argos	53

Capítulo 1.

Figura 1: Study area in eastern Spain where 14 Bonelli's Eagle nestlings were tagged with satellite transmitters to study their dispersal period.	63
Tabla 1: Methods used to estimate the age at the onset of dispersal in 14 Bonelli's Eagles tracked by satellite telemetry in Spain.	66
Tabla 2: Age at the onset of dispersal in 14 Bonelli's Eagles estimated by nine different methods based on either the natal home range size or the patterns of movement in Spain.	68

Capítulo 2.

Tabla 1: Location data sets used to compare the performance of the distribution-and-vector (DAV), the observed-location-pattern (OLP) and the inter-nest distance-threshold (INT) dispersal detection methods.	83
Figura 1: Functioning of the DAV dispersal detector.	86
Figura 2: Examples of different movement patterns of raptors during dispersal.	87
Figura 3a: Number of birds set as 'non-dispersers', 'dispersers' and 'ambiguous' by DAV and OLP within five raptor species. Figura 3b: The prevalence of non-dispersal plotted against ambiguity for the five species for DAV and OLP.	89



Figura 4: Boxplot of the OLP variable AGREE against DAV dispersal results with the most concordant combination of settings.	90
Tabla 2: Concordance values output from a binary logistic regression of the variable AGREE against the nine combinations of settings of the DAV dispersal detector.	90
Figura 5: Dissimilarity of estimated dates of dispersal for the nine analysis settings of the DAV detector with either the subjective OLP method or the INT method for five raptor species.	91
Tabla 3: Median, range, mean, standard deviation and coefficient of variation of the dispersal day estimated from the distribution-and-vector (DAV), the observed-location-pattern (OLP) and the inter-nest distance-threshold (INT) methods for five raptor species.	92
Capítulo 3.	
Figura 1: Distribution of the hourly distances travelled by two juvenile Bonelli's Eagles tracked by GPS satellite telemetry in Spain.	109
Tabla 1: Hourly distances covered by two juvenile Bonelli's Eagles tracked by GPS satellite telemetry in Spain during the initial phase of dispersal.	110
Capítulo 4.	
Tabla 1. Summary of the satellite telemetry information used in the study.	122
Tabla 2. Dispersal parameters for averaging the first winter movements in seven Bonelli's eagle juveniles.	123
Figura 1: Movements of seven Bonelli's eagles during their first winter in Spain in 2002.	124
Capítulo 5.	
Figura 1. Localización de las áreas de dispersión juvenil de 11 individuos de águila-azor perdicera en España.	139
Figura 2. Evolución de la distancia mensual al nido en 14 juveniles de águila-azor perdicera durante su primer año de vida.	144
Tabla 1: Diferencias entre sexos en las variables relacionadas con la dispersión juvenil en 14 jóvenes de águila-azor perdicera estudiados por telemetría vía satélite en España.	146



Tabla 2: Variables relacionadas con la dispersión juvenil en 14 jóvenes de águila-azor perdicera estudiados por telemetría vía satélite en España.	147
Tabla 3: Evolución del tamaño de las áreas anuales en 14 individuos de águila-azor perdicera estudiados mediante telemetría vía satélite durante el período dispersión juvenil en España.	148
Tabla 4: Matriz de solapamientos entre las áreas de dispersión de cinco juveniles de águila-azor perdicera.	149
 Capítulo 6.	
Tabla 1: Tracking and movement parameters of 15 Bonelli's eagle juveniles whose juvenile dispersal was monitored by satellite tracking in Spain.	168
Figura 1: Annual home ranges of a juvenile Bonelli's eagle computed using the 95% Minimum Convex Polygon in Spain.	169
Tabla 2: Annual movement parameters recorded for a Bonelli's eagle juvenile female tracked by satellite telemetry since the beginning of dispersal until recruitment to the breeding population in Spain.	170
 Capítulo 7.	
Figura 1: Geographical distribution of the samples used to study the genetic diversity in Bonelli's eagle in the western Palearctic.	186
Tabla 1: Haplotypic variants in a 253-bp long fragment of the mitochondrial control region (CR) in 72 Bonelli's eagles from Morocco, Portugal and Spain.	189
Figura 2: Network of the four mitochondrial control region haplotypes present in Bonelli's eagle's western Palearctic population, showing the relationship with the geographical origin of the individuals studied.	190
Tabla 2: Mitochondrial control region diversity in Bonelli's eagle and other raptor species.	192
 Capítulo 8.	
Tabla 1: Primers utilized to amplify the mitochondrial control region (mt CR) and non-repetitive pseudo-control region (nr-ΨCR) in <i>H. fasciatus</i> .	208



Figura 1: Mt gene order in the region including the mt CR and Ψ CR in <i>H. fasciatus</i> along with primer binding sites and PCR fragments.	210
Figura 2: Structure of the CR in <i>H. fasciatus</i> .	211
Tabla 2: Nucleotide composition of the mt CR and nr- Ψ CR in <i>H. fasciatus</i> .	212
Figura 3: Partial alignments of the CR conserved sequence blocks.	215
Figura 4: Structure of the Ψ CR in <i>H. fasciatus</i> .	217
Figura 5: Evolutionary scenario proposed for the CR and Ψ CR in Aquilinae.	223
Suplemento Electrónico (ES) 1. Alignment of the CR sequences of <i>H. fasciatus</i> , <i>S. nipalensis</i> and <i>A. gentilis</i> .	231
Suplemento Electrónico (ES) 2. Alignment of the CR and nr- Ψ CR sequences of <i>H. fasciatus</i> and <i>S. nipalensis</i> as well as nr- Ψ CR sequences of <i>A. chrysaetos</i> , <i>A. heliaca</i> , <i>A. pomarina</i> and <i>A. clanga</i> .	233
Suplemento Electrónico (ES) 3. Genetic similarity among different sections of CR and Ψ CR sequences.	238



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

SÍNTESIS
GENERAL

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

SÍNTESIS DE LA TESIS DOCTORAL:

**DISPERSIÓN NATAL Y ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN DE ÁGUILA-AZOR
PERDICERA *Hieraaetus fasciatus* EN LA PENÍNSULA IBÉRICA.**

El estudio de la estructura de una población, es decir, de la distribución espacial de los individuos, de los núcleos conformados por ellos y de la relación que existe entre esos núcleos, tiene gran relevancia para entender la dinámica del flujo de individuos y de genes, las posibles causas de incremento o declive poblacional en las diferentes áreas ocupadas por una especie, los patrones de mortalidad, los procesos de colonización y extinción y, en definitiva, la persistencia y evolución de una especie. Este conocimiento es esencial, además, para llevar a cabo unas actuaciones de conservación eficientes, ya que en ocasiones éstas pueden estar basadas en información local o parcial, mientras que el origen de los problemas puede provenir de o tener un efecto en áreas alejadas donde también habita la especie. Conocer, por tanto, las relaciones existentes entre los núcleos poblacionales puede resultar de gran utilidad para emprender acciones adecuadas a cada caso concreto.

La presente tesis doctoral aborda el estudio de la estructura de la población de águila-azor perdicera *Hieraaetus fasciatus* en la Península Ibérica, una especie de ave de presa catalogada como 'en peligro' tanto en Europa como en España. La investigación se centra, fundamentalmente, en los aspectos relacionados con el flujo de individuos, para averiguar si, a la escala de la Península Ibérica, la población puede ser considerada como un todo o como diversos núcleos aislados o interconectados. Diferentes trabajos han investigado la biología de las fracciones reproductora y no reproductora de la población y algunos han tratado aspectos relacionados con la estructura poblacional. Estos estudios, sin embargo, han proporcionado una visión local de los problemas que abordan, contribuyendo al conocimiento de la estructura poblacional del águila-azor perdicera sólo de manera parcial, debido a la limitación geográfica de sus áreas de estudio. Por el contrario, la presente tesis doctoral trasciende el ámbito de las anteriores, ya que la investigación que se plantea ha pretendido comprender el conjunto de la Península Ibérica.



El águila-azor perdicera se distribuye de manera irregular por el territorio peninsular, de acuerdo a los requerimientos ecológicos de las parejas nidificantes. Los juveniles tienen una elevada capacidad de movimiento y resultan difíciles de estudiar una vez que abandonan el territorio paterno, lo cual ha hecho imposible, hasta el momento, averiguar dónde se asientan para criar una vez que alcanzan la madurez sexual. A raíz de esto se plantea la cuestión de si, a través de sus desplazamientos, los jóvenes ponen en contacto las diferentes áreas donde la especie cría. En función de la existencia de esa potencial conexión se pueden proponer tres escenarios distintos a la escala de la Península Ibérica: i) la población es panmítica, es decir, el apareamiento ocurre al azar y no hay estructura; ii) se da un grado fuerte de filopatria, existen núcleos diferenciados que no están interconectados, con lo cual existe una estructura poblacional clara; y iii) existen flujos diferenciales y restringidos de individuos, diversos grados de filopatria, grupos de poblaciones conectadas y otras aisladas, dinámicas fuente-sumidero, es decir, existe una potencial estructura de tipo metapoblacional.

Para tratar de dilucidar cuál de éstos es el escenario más probable hemos analizado el proceso de dispersión natal, es decir, el período que transcurre desde el abandono del territorio paterno hasta el asentamiento para criar, en juveniles marcados a lo largo del extremo oriental de España, cuyos movimientos se han desarrollado por buena parte del territorio peninsular. Para el estudio se ha utilizado telemetría vía satélite, a fin de averiguar el destino de los individuos dispersantes y el efecto de su dispersión en la estructura de la población. Se ha analizado también la diversidad genética contenida en secuencias de ADN mitocondrial y se ha explorado la existencia de una posible estructuración genética de las poblaciones peninsulares. La aplicación de estas dos perspectivas metodológicas de manera complementaria ha tenido como objeto posibilitar el contraste de los resultados obtenidos, fundamentando o rebatiendo las conclusiones extraídas con cada una de ellas y permitiendo una mejor comprensión del proceso estudiado. Los objetivos de la tesis se detallan a continuación.

Objetivo General.

Conocer si existe estructura en la población de águila-azor perdicera en la Península Ibérica.

Objetivos Parciales.

- Averiguar cómo el proceso de dispersión natal configura la potencial existencia de estructura en la población ibérica de águila-azor perdicera a través del flujo de individuos entre diferentes zonas.
- Profundizar en el conocimiento de las diferentes fases del proceso de dispersión natal en la especie.
- Aportar herramientas metodológicas que faciliten el estudio de la dispersión en especies como el águila-azor perdicera y otras grandes rapaces amenazadas.
- Estudiar los niveles de diversidad genética y la posible existencia de una estructura genética en la población ibérica de águila-azor perdicera.
- Aportar conocimiento para tomar decisiones de manejo y conservación de la especie.

La utilización de las dos aproximaciones metodológicas comentadas, es decir, el estudio de la dispersión natal y el trabajo de genética de poblaciones, justifica la división en dos grandes secciones de la presente tesis doctoral. La primera de ellas abarca los capítulos 1 a 6, perteneciendo los capítulos 7 y 8 a la segunda sección. A continuación se enumeran los trabajos incluidos en la tesis.

Sección I.

Capítulo 1: Cadahía, L., Urios, V., López-López, P. & Negro, J.J. Estimating the onset of dispersal in endangered Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* tracked by satellite telemetry: a comparison among methods. *Ibis*. Aceptado.

Capítulo 2: Cadahía, L., Kenward, R.E., Walls, S.S., South, A.R., Mareström, V., Nygård, T., Einvik, K., López-López, P., Soutullo, A. & Urios, V. Dispersal of raptors detected by location distribution and vectors. *Journal of Animal Ecology*. En revisión.

Síntesis general

Capítulo 3: Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* juvenile dispersal: hourly and daily movements tracked by GPS. Bird Study. En prensa.

Capítulo 4: Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. 2005. Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's Eagles *Hieraaetus fasciatus* during their first winter. Ibis 147: 415-419.

Capítulo 5: Cadahía, L. Patrones de movimiento y áreas vitales en el águila-azor perdicera *Hieraaetus fasciatus* durante el período de dispersión juvenil en España. No corresponde a ninguna publicación.

Capítulo 6: Cadahía, L., López-López, P., Urios, V. & Negro, J.J. From hatching to parenthood: recruitment to the breeding population of a Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* after four years of satellite tracking. Journal of Avian Biology. En revisión.

Sección II.

Capítulo 7: Cadahía, L., Negro, J.J. & Urios, V. 2007. Low mitochondrial DNA diversity in the endangered Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) from SW Europe (Iberia) and NW Africa. Journal of Ornithology 148: 99-104.

Capítulo 8: Cadahía, L., Pinsker, W., Negro, J.J., Pavlicev, M., Urios, V. & Haring, E. Repeated sequence homogenization in the subfamily Aquilinae as revealed by the structure of the mitochondrial control and pseudo-control regions. Molecular Biology and Evolution. En revisión.

La relación directa de la dispersión natal con la estructura de la población proviene del traslado *per se* de ejemplares de unas zonas a otras. Sin embargo, el proceso consta de tres etapas sucesivas en las que el comportamiento y los patrones de movimiento de los individuos son diferentes: el abandono del territorio paterno ('emigración'), el período intermedio ('transferencia') y el encuentro de pareja y asentamiento para criar ('inmigración'). Al abordar el estudio de la dispersión natal en el águila-azor perdicera hemos obtenido información referente a cada una de esas tres fases y es por ello que la primera sección de la presente tesis está conformada por capítulos que desarrollan aspectos correspondientes a cada una de ellas.

Los capítulos 1 y 2 se enmarcan en la etapa de 'emigración' y abordan el problema de conseguir una detección precisa del comienzo de la dispersión, es decir, del momento en el cual los juveniles de águila-azor perdicera (y otras especies)

abandonan el territorio natal cuando son estudiados mediante sistemas de seguimiento remoto, como radiotelemetría o seguimiento por satélite. Esta información resulta de importancia para entender la relación existente entre diversos factores (p.e., disponibilidad de alimento, condición física, sexo, presencia de hermanos, etc.) y el inicio de la dispersión. El resultado de estos capítulos metodológicos pone de manifiesto que los métodos más consistentes para detectar el inicio de la dispersión en el águila-azor perdicera están basados en la observación directa del comportamiento de los juveniles o bien en establecer una distancia mínima de dispersión junto con una condición que evite el efecto de los movimientos exploratorios previos al abandono definitivo del territorio natal. Sin embargo, la detección se hace más consistente y precisa, tanto en ésta como en otras especies de rapaces, utilizando un nuevo método basado en la distribución de las localizaciones y en vectores que hace posible una comparación objetiva entre estudios.

Los capítulos 3 al 5 abordan diversos aspectos de la fase de 'transferencia' y de ellos se extrae que el águila-azor perdicera es una especie con tendencia claramente dispersiva y con una elevada capacidad de movimiento, en la que todos los juveniles abandonan el territorio paterno y recorren grandes distancias. Durante el inicio de esta fase de 'transferencia' los mayores desplazamientos se dan a mediodía y en las primeras horas de la tarde, lo cual probablemente está relacionado con la disponibilidad de térmicas. Se observa, además, que los movimientos diarios no suelen exceder los 20 km, a excepción de episodios puntuales que suelen ocurrir inmediatamente después del abandono del territorio paterno y en los que se pueden alcanzar casi 250 km/día. Los juveniles no recorren el territorio al azar durante esta etapa, sino que seleccionan una serie de 'áreas de dispersión' en el marco de la Península Ibérica, agrupándose en unas cuantas zonas concretas pertenecientes a 11 Comunidades Autónomas diferentes. Estas áreas son probablemente seleccionadas en base a la mayor eficiencia en la captura de presas y a la ausencia de reproductores, a causa del tipo de hábitat que en ellas existe. Además, aunque en general no se observaron diferencias significativas entre sexos en diferentes variables relacionadas con el comportamiento dispersivo, sí fue posible apreciar

Síntesis general

algunas tendencias que están de acuerdo con trabajos anteriores, como el hecho de que las hembras se dispersen antes y a edades más tempranas, o que el tamaño de sus áreas de dispersión sea menor que el de los machos.

En el capítulo 6 se completa la descripción del proceso de dispersión natal en el águila-azor perdicera a partir del registro, por primera vez, de un reclutamiento a la población reproductora, aportándose, así, información sobre la última etapa ('inmigración') de las arriba comentadas. El registro de una distancia de dispersión natal de aproximadamente 440 km evidencia una conexión entre diferentes áreas en la Península Ibérica, la ausencia de filopatria obligatoria en la especie y la existencia, por tanto, de flujo génico.

Los movimientos entre áreas implican un flujo de genes cuando conllevan eventos reproductivos subsiguientes. De este modo, el proceso de dispersión puede favorecer una homogeneización de la población cuando pone en contacto zonas alejadas. Si, por el contrario, existe algún tipo de restricción al flujo génico o los movimientos de los individuos ocurren con una dirección y sentido preferentes, entonces las poblaciones de áreas no interconectadas evolucionarán independientemente derivando en una estructuración de la población. Al estudiar la 'estructura genética de una población', es decir, la distribución de la diversidad genética (genotipos, frecuencias alélicas o frecuencias haplotípicas) dentro y entre subpoblaciones, podemos entender los procesos demográficos que subyacen tras los patrones de polimorfismos genéticos y de frecuencias de alelos o haplotipos, y obtener, por tanto, información sobre la estructura poblacional.

Es por ello que la segunda sección de esta tesis doctoral consiste en una aproximación genética al estudio de la estructura de la población ibérica de águila-azor perdicera. En el capítulo 7 se explora la diversidad y potencial existencia de estructura genética mediante el uso de secuencias de ADN mitocondrial y se encuentran unos niveles muy bajos de diversidad nucleotídica y haplotípica, así como ausencia de una estructuración genética en la población muestreada, planteándose varias hipótesis que expliquen los resultados obtenidos. Una de ellas considera la posibilidad de que una mayor diversidad genética esté contenida en otras regiones del ADN mitocondrial y de ella surge el capítulo 8, que en origen

consiste en una descripción y caracterización de las dos regiones no codificantes del ADN mitocondrial, la 'región control' y la 'pseudo-región control', con objeto de identificar aquellas zonas polimórficas que puedan ser utilizadas como marcadores moleculares. Además de ello, durante el transcurso del estudio se detecta una homología intra-genómica entre ambas regiones, de modo que se explora su existencia en otras especies filogenéticamente emparentadas y se analizan las implicaciones evolutivas que ello conlleva a partir de los datos disponibles en la actualidad.

Como resultado general de la consideración conjunta de los datos genéticos y de dispersión natal se puede concluir que la población de águila-azor perdicera de la Península Ibérica no presenta una estructura clara, es decir, que las diferentes áreas habitadas por la especie se encuentran conectadas a través del flujo de individuos entre ellas. Sin embargo, el caso único de reclutamiento a la población reproductora y la naturaleza preliminar de los resultados genéticos hacen necesarias posteriores investigaciones para aclarar el patrón existente.

Con respecto a la conservación de la especie, dos son los aspectos principales, de entre los conocimientos obtenidos en esta tesis, que es preciso resaltar. En primer lugar, la conexión entre zonas a través del flujo de individuos implica que los procesos demográficos observados a escala local pueden tener origen o consecuencias en lugares alejados donde también habita la especie. Por otro lado, las áreas de dispersión identificadas corresponden a lugares concretos, en los cuales se puede proteger un elevado porcentaje de la población no reproductora protegiendo un bajo porcentaje del territorio. Esa conexión entre zonas y el hecho de que las áreas de dispersión se encuentren en 11 Comunidades Autónomas diferentes pone de manifiesto la necesidad de organización entre administraciones a la hora de establecer una estrategia coordinada de conservación a niveles tanto interregional (Comunidades Autónomas) como internacional (España y Portugal).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant

Universidad de Alicante

SYNTHESIS OF THE PHD THESIS:
NATAL DISPERSAL AND POPULATION STRUCTURE OF BONELLI'S EAGLE
***Hieraaetus fasciatus* IN THE IBERIAN PENINSULA.**

The study of population structure, i.e., the spatial distribution of individuals, of the nuclei they constitute and the relationship existing between those nuclei, has great importance in understanding several biological traits, like dynamics of individuals' movements and gene flow, possible causes of population increasing or declining in different areas, mortality patterns, colonization and extinction processes and, ultimately, persistence and evolution of a species. Moreover, this knowledge is essential to undertake efficient conservation measures, since these may be usually based on local or partial information, whereas the causes of the problems may come from or have an effect on distant areas also inhabited by the species. Therefore, identifying the actual relationships between populations can be of great help to undertake appropriate conservation measures.

This PhD thesis studies the population structure of Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* in the Iberian Peninsula, a bird of prey catalogued as 'endangered' both in Europe and in Spain. The research is mainly focused on the movements and flow of individuals, and is aimed at finding out whether, at the scale of the Iberian Peninsula, the population may be considered as a whole or as a number of nuclei, either isolated or interconnected. Several studies have dealt with a number of aspects of both breeding and non-breeding fractions of the population, and some of them have tackled features connected with population structure. However, these surveys have provided a local point of view of the problems they study, contributing to the knowledge of Bonelli's eagle population structure only partially, because of the geographical limitation of their study areas. In contrast, this thesis goes beyond them, given that the research has attempted to cover the whole Iberian Peninsula.

Bonelli's eagle is irregularly distributed in the Iberian Peninsula, depending on the ecological requirements of the breeding pairs. Juveniles cover great distances and are difficult to study after departing from the parental territory. This has yielded it impossible hitherto to find out where they settle to breed once they reach sexual

General synthesis _____

maturity. This poses the question whether or not they connect the different areas where the species breeds. Depending on the existence of this hypothetical connection, three different scenarios can be suggested at the scale of the Iberian Peninsula: i) the population is panmictic, i.e., breeding happens randomly and there is no structure; ii) there exists strong philopatry, several non-connected population nuclei are apparent, and, hence, there exists a clear population structure; and iii) there is differential and restricted flow of individuals, several degrees of philopatry, groups of interconnected and isolated populations, source-sink dynamics, in a few words, a potential metapopulation structure.

In order to elucidate which of these scenarios is most probable, we have analysed the natal dispersal process, i.e., the period elapsed between the departure from the natal territory and the breeding settlement, in juveniles tagged along the east side of Spain, whose movements have covered nearly the whole peninsular territory. We have used satellite telemetry to find out the fate of the dispersing individuals and the effect of their dispersal in the population structure. We have also surveyed the genetic diversity existing in mitochondrial DNA sequences and we have explored the existence of a putative genetic structure in the peninsular populations. The usage of both methodological approaches in a complementary way has aimed at enabling the comparison of results, strengthening or rejecting the conclusions achieved with each of them, making it possible to better understand the process studied. The thesis objectives are stated below.

General Objective.

To investigate whether a population structure exists in the Bonelli's eagle in the Iberian Peninsula.

Partial Objectives.

- To find out how natal dispersal shapes the potential existence of structure in the Iberian population of Bonelli's eagle by means of the movement of individuals between different areas.

- To deepen in the knowledge of the different phases of natal dispersal in the species.
- To provide methodological tools that aid in the study of dispersal in species like Bonelli's eagle and other endangered raptors.
- To survey the genetic diversity and the putative existence of a genetic structure in the Iberian population of Bonelli's eagle.
- To provide knowledge that may be of help in decisions-making about management and conservation of the species.

The usage of the two methodological approaches, that is, the natal dispersal investigation and the population genetic survey, accounts for the division in two sections of this thesis. The first one comprises chapters 1 to 6 and chapters 7 and 8 belong to the second section. The papers and chapters included in the thesis are listed below.

Section I.

- Chapter 1:** Cadahía, L., Urios, V., López-López, P. & Negro, J.J. Estimating the onset of dispersal in endangered Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* tracked by satellite telemetry: a comparison among methods. *Ibis*. Accepted.
- Chapter 2:** Cadahía, L., Kenward, R.E., Walls, S.S., South, A.R., Marström, V., Nygård, T., Einvik, K., López-López, P., Soutullo, A. & Urios, V. Dispersal of raptors detected by location distribution and vectors. *Journal of Animal Ecology*. Under review.
- Chapter 3:** Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* juvenile dispersal: hourly and daily movements tracked by GPS. *Bird Study*. In press.
- Chapter 4:** Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. 2005. Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's Eagles *Hieraaetus fasciatus* during their first winter. *Ibis* 147: 415-419.
- Chapter 5:** Cadahía, L. Patrones de movimiento y áreas vitales en el águila-azor perdicera *Hieraaetus fasciatus* durante el período de dispersión juvenil en España (Movement patterns and home ranges in Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* during juvenile dispersal in Spain). It does not correspond to any scientific publication.
- Chapter 6:** Cadahía, L., López-López, P., Urios, V. & Negro, J.J. From hatching to parenthood: recruitment to the breeding population of a Bonelli's eagle

General synthesis _____

Hieraaetus fasciatus after four years of satellite tracking. Journal of Avian Biology. Under review.

Section II.

Chapter 7: Cadahía, L., Negro, J.J. & Urios, V. 2007. Low mitochondrial DNA diversity in the endangered Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) from SW Europe (Iberia) and NW Africa. Journal of Ornithology 148: 99-104.

Chapter 8: Cadahía, L., Pinsker, W., Negro, J.J., Pavlicev, M., Urios, V. & Haring, E. Repeated sequence homogenization in the subfamily Aquilinae as revealed by the structure of the mitochondrial control and pseudo-control regions. Molecular Biology and Evolution. Under review.

The relationship between natal dispersal and population structure comes from the translocation of individuals from some areas to some others. However, the process comprises three consecutive stages in which behavioural and movement patterns are distinct: the departure from the parental territory ('emigration'), the intermediate period ('transfer') and the settlement for breeding ('immigration'). When undertaking the study of natal dispersal in Bonelli's eagle we have gathered information related to each of those three phases, and that is the reason why the first section of this thesis is made up by chapters developing aspects corresponding to every one of them.

Chapters 1 and 2 deal with the stage of 'emigration' and tackle the problem of getting an accurate detection of the onset of dispersal, i.e., the moment in which Bonelli's eagle (and other species) juveniles leave the natal territory when they are studied by means of remote tracking systems, like radiotracking or satellite telemetry. This information is important to understand the relationship between several factors (e.g. food availability, physical condition, sex, presence of siblings, etc.) and the onset of dispersal. The outcome of these methodological chapters highlights that the most consistent methods to detect the onset of dispersal in Bonelli's eagle are those based on either direct observation of birds' behaviour or on setting a minimum dispersal distance along with a condition aimed at avoiding the effect of early exploratory movements previous to the definitive departure from the natal territory. Nevertheless, detection becomes more consistent and accurate, both

in this and in other raptor species, using a new method based on the locations distribution and vectors, which enables an objective comparison between studies.

Chapters 3 to 5 deal with different aspects of the 'transfer' stage, and from them it is observed that Bonelli's eagle is a clear disperser species in which all juveniles depart from the natal territory. During the beginning of the 'transfer' stage the longest movements are registered at noon and in the afternoon, and this is probably related to the availability of thermals. Daily movements do not normally exceed 20 km, except for particular episodes which normally happen right after dispersal and in which birds can fly nearly 250 km/day. Juveniles do not cover the land randomly, but choose a number of 'dispersal areas' in the frame of the Iberian Peninsula, assembling in several regions belonging to 11 Autonomous Communities (Spanish administrative units). These areas are probably selected based on the higher efficiency in prey capture and on the absence of breeding pairs, because of the habitat existing within them. Furthermore, although significant sex differences were not noticeable in several variables related to dispersal behaviour, it was possible to observe several trends that matched previous studies, like the fact that females dispersed earlier and when they were younger than males, or the fact that dispersal areas were smaller in males.

In chapter 6 the description of the whole natal dispersal process in Bonelli's eagle is completed, by means of recording, for the first time, one recruitment to the breeding population. Thus, information regarding the last stage ('immigration') of the above mentioned is provided. A natal dispersal distance of 440 km was registered, and this provides evidence of connection between areas within the Iberian Peninsula, the absence of obligatory phylopatry in the species and, therefore, the existence of gene flow.

Movements between areas entail gene flow when they involve subsequent breeding events. Thus, dispersal can facilitate homogenization of the population when it connects distant areas. On the contrary, if there exists some kind of restriction to gene flow or individuals' movements occur in a preferential direction, then populations from non-interconnected areas will evolve independently and structure will be recognisable within the population. Studying the 'genetic structure

General synthesis

of a population', i.e., the distribution of the genetic diversity (genotypes, allelic frequencies or haplotypic frequencies) within and among subpopulations, enables us to understand the demographical processes laying behind the genetic polymorphisms and alleles or haplotypes frequencies, and obtain, thus, information regarding population structure.

That is the reason why the second section of this thesis is a genetic approach to the study of the structure of the Iberian population of Bonelli's eagle. In chapter 7, genetic diversity and potential genetic structure are explored by using mitochondrial DNA sequences. Very low levels of nucleotide and haplotype diversity are found, as well as absence of genetic structure in the sampled population, and several hypotheses to explain these results are put forward. One of them considers the possibility for a higher genetic diversity to be contained in other regions of the mitochondrial DNA and is the start point for chapter 8. This chapter is, originally, a description and characterization of the two non-coding regions of the mitochondrial DNA, the 'control region' and the 'pseudo-control region', aiming at identifying the most polymorphic sections which can be used as molecular markers. During the development of the study, an intra-genomic homology between both regions is detected. Its occurrence in other species phylogenetically related is explored and the evolutionary implications of this finding using the currently available data are analysed.

As a general result of concurrently considering the natal dispersal and the genetic data, it is possible to conclude that Bonelli's eagle population in the Iberian Peninsula does not present clear structure, i.e., the different areas inhabited by the species are connected by flow of individuals between them. However, the single recruitment case to the breeding population and the preliminary nature of the genetic results make further research necessary, which should aim at disentangling and clarifying the existing pattern.

Regarding conservation of the species, there are two main issues, from the various outcomes of this thesis, which need to be highlighted. Firstly, connection between areas by means of movements of individuals entails that demographic processes observed at a local scale can be originated or have consequences in distant

places also inhabited by the species. In addition, the identified dispersal areas correspond to particular places, in which it is possible to protect a high percentage of the non-breeding population through protecting a low percentage of territory. Both the connection between areas where the species breeds and the fact that dispersal areas occur in 11 Autonomous Communities emphasize the need for organization between administrations to establish a coordinated conservation strategy both at interregional (Autonomous Communities) and international (Spain and Portugal) scales.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

I N T R O D U C C I Ó N G E N E R A L



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

En el medio natural las especies se encuentran distribuidas geográficamente en poblaciones, a causa de la variación espacial en los rasgos del medio físico, en la disponibilidad de recursos o en las interacciones con otras especies (Andrewartha y Birch 1954, Futuyma 1986). A pesar de que el concepto ecológico de población ha variado a lo largo de la historia y que en la actualidad existe todavía controversia en cuanto a su definición (Camus y Lima 2002), una población podría definirse, de manera general, como un grupo de organismos conespecíficos que ocupan un área determinada durante un tiempo determinado interaccionando entre ellos (ver Camus y Lima 2002 y referencias allí citadas). Cuando se realizan estudios ecológicos, establecer en qué consiste una población de manera práctica puede resultar complicado debido a una serie de factores. En primer lugar, el patrón de distribución de los organismos en el espacio es variable, lo cual puede facilitar o dificultar, dependiendo de los casos, la delimitación de la población. De manera general, existen tres tipos básicos de distribución espacial: al azar, regular (con reparto espacial uniforme) o contagiosa (en agregados o grupos) (Pianka 1988). Además, en el caso de animales no sésiles, la diferente capacidad de movimiento de los individuos puede determinar la existencia bien de aislamiento o bien de conexión entre los diversos lugares habitados por la especie. Por último, la escala es un factor de elevada importancia (Levin 1992, Bevers y Flather 1999), pues en función de ella las poblaciones estudiadas pueden ser consideradas como un continuo, estar aisladas o presentar un mayor o menor grado de conexión entre sí (Frankham et al. 2002, Beebee y Rowe 2004). En este último caso pueden darse diferentes situaciones, como la existencia de estructuras metapoblacionales (una metapoblación es un conjunto de poblaciones locales o subpoblaciones que interaccionan a través de movimientos de individuos entre ellas, por lo cual existe cierto grado de restricción al flujo génico, y que sufren extinciones locales intermitentes seguidas de recolonizaciones desde otras subpoblaciones, de manera que los procesos ecológicos ocurren a dos escalas, la local y la metapoblacional) (Hanski y Gilpin 1991, Hanski 1999, Beebee y Rowe 2004) o de dinámicas ‘fuente – sumidero’ (las ‘poblaciones fuente’ suministran excedentes al resto del territorio mientras que las ‘poblaciones



Introducción general _____

sumidero' se mantienen gracias al flujo inmigratorio de esos excedentes) (Pulliam 1988, Hanksi 1999).

Todos estos factores deben ser tenidos en cuenta cuando se aborda el estudio de la estructura de una población, es decir, de la distribución espacial de los individuos y de los núcleos conformados por ellos, así como de la relación que existe entre esos núcleos. Esta información tiene relevancia para entender la dinámica del flujo de individuos, de propágulos y de genes, las posibles causas de incremento o declive poblacional en las diferentes áreas ocupadas por la especie, los patrones de mortalidad, los procesos de colonización y extinción y, en definitiva, la persistencia y evolución de la especie (Johnson y Gaines 1990, Clobert et al. 2001, Bullock et al. 2002). Este conocimiento es, además, esencial para llevar a cabo unas actuaciones de conservación eficientes, ya que en muchas ocasiones las medidas de conservación se aplican en regiones concretas para tratar de paliar o solucionar una serie de problemas determinados. Sin embargo, estas actuaciones pueden estar basadas en información local o parcial, mientras que el origen de los problemas puede provenir de o tener un efecto en áreas alejadas donde también habita la especie. Conocer, por tanto, las relaciones existentes entre los núcleos poblacionales puede resultar de gran utilidad para emprender acciones que deberían ser diferentes dependiendo de si la población funciona como un todo o, por el contrario, como una serie de núcleos relacionados entre sí (Dizon et al. 1992, Frankham et al. 2002).

Aproximaciones al estudio de la estructura poblacional.

En esta tesis nos referiremos al concepto de 'estructura de una población' como la distribución de los núcleos poblacionales en el espacio y la relación que existe entre ellos a través del flujo de individuos, y estudiaremos fundamentalmente los aspectos relacionados con ese flujo de ejemplares en un caso concreto, para averiguar si, a una escala determinada, una población puede ser considerada como un todo o como diversos núcleos, bien aislados o bien conectados entre sí. Dependiendo de la especie estudiada, llegar a conocer si existe una estructura en la población puede presentarse como una tarea complicada. La presente tesis doctoral aborda el estudio de la estructura de la población del águila-azor perdicera

Hieraaetus fasciatus a la escala de la Península Ibérica, una especie de ave de presa en la cual resulta difícil investigar la relación entre núcleos poblacionales. Esto es debido a que la fracción no reproductora de la población tiene una elevada capacidad de movimiento (Arroyo et al. 1992, Cheylan et al. 1996, Real y Mañosa 2001, Balbontín et al. 2000, Balbontín 2003), lo que dificulta el estudio de los individuos juveniles y de los movimientos que realizan, a fin de averiguar la relación existente entre el área de la cual provienen y aquella en la que se asientan para criar. El presente trabajo ha investigado este proceso.

La manera ideal de estudiar la estructura de una población consistiría en la observación directa de los movimientos de los individuos durante toda su vida, de modo que se pudiesen registrar los lugares de los que provienen, los desplazamientos que realizan, y los lugares donde se reproducen, tanto en la primera como en sucesivas ocasiones. De esta forma se observaría de manera directa el flujo de ejemplares, y por tanto de genes, entre regiones habitadas por la especie y se obtendría información sobre una posible estructuración de la población (Brodeur et al. 2002). En vertebrados, la elevada capacidad de movimiento, el comportamiento esquivo o los largos ciclos vitales determinan, en la mayoría de los casos, la imposibilidad de monitorizar a los individuos durante toda su vida, lo cual conlleva la necesidad de utilizar sistemas de marcado y posterior reconocimiento de los ejemplares, como anillas o collares, o bien el uso de dispositivos de seguimiento remoto (Walls y Kenward 1995, Kenward 2001). A raíz de estudios sobre los movimientos en diferentes especies animales se han ido estableciendo una serie de definiciones para caracterizar los tipos de desplazamientos. Howard (1960) definió el término 'dispersión' como aquel movimiento realizado por un individuo vertebrado entre el lugar en el que ha nacido y aquél en el que se reproduce o se hubiera reproducido en caso de haber sobrevivido y encontrado una pareja. Con posterioridad Greenwood y Harvey (1982) realizaron la distinción entre los movimientos que ocurren entre el lugar de nacimiento y el de primera reproducción, denominándolos 'dispersión natal', y los desplazamientos entre sucesivos asentamientos reproductivos, a los que se refirieron como 'dispersión reproductiva'. Posteriores clasificaciones fueron propuestas por Kenward et al. (2002).

Introducción general

Dado que en aves rapaces los adultos suelen ser fieles a sus territorios (Newton 1979), el proceso de dispersión natal tendrá una mayor influencia en los procesos de intercambio genético que la dispersión reproductiva (Newton 1979, Greenwood y Harvey 1982). Los movimientos de dispersión natal son protagonizados por los juveniles antes de alcanzar la madurez sexual y de ellos depende el flujo de individuos y, por tanto, la conexión entre las diferentes áreas geográficas ocupadas por la especie. Sin embargo, ya se ha comentado que este período es difícil de estudiar en el águila-azor perdicera a causa de la gran extensión de los desplazamientos que realizan los jóvenes (Arroyo et al. 1992, Cheylan et al. 1996, Real y Mañosa 2001, Balbontín et al. 2000, Balbontín 2003). A fin de conocer el origen y el destino de los juveniles dispersantes, este período se ha estudiado en la especie con ayuda de diferentes metodologías, como la colocación de anillas y marcas alares (Cheylan et al. 1996, Real y Mañosa 2001) o la radiotelemetría VHF (Arroyo et al. 1992, Balbontín et al. 2000, Balbontín 2003). Sin embargo, el avistamiento y la recuperación de individuos marcados pueden introducir importantes sesgos en las estimas de supervivencia o retorno de las aves (Kenward 2001, Ferrer 1993, Walls y Kenward 1995), y, por otra parte, la radiotelemetría VHF permite abarcar áreas de estudio que en general son limitadas y que normalmente los jóvenes exceden durante sus movimientos (Soutullo et al. 2006). En esta tesis se ha utilizado la telemetría vía satélite como alternativa adecuada al uso de las técnicas anteriores, ya que permite un seguimiento continuado de los movimientos de las aves independientemente del tamaño de las áreas que recorren. La telemetría vía satélite funciona a nivel mundial a través de Argos, un sistema de localización de emisores y recolección de datos que opera a través de satélites y cuyo funcionamiento se detalla en el apartado de 'Metodología General' (ver página 49).

Los movimientos entre áreas implican un flujo de genes cuando conllevan eventos reproductivos subsiguientes (Bohonak 1999, Johnson y Gaines 1999, Beebe y Rowe 2004). De este modo, la dispersión, los procesos de emigración-inmigración, la colonización de nuevos lugares, etc., favorecerán una homogeneización de la población (Bohonak 1999, Beebe y Rowe 2004). Si, por el contrario, existe algún tipo de restricción al flujo génico, o los movimientos de los

individuos ocurren con una dirección y sentido preferentes, entonces las poblaciones de áreas no interconectadas evolucionarán independientemente, derivando en una estructuración de la población (Avice 2000, Bohonak 1999, Frankham et al. 2002, Beebe y Rowe 2004). Con el concepto 'estructura genética de una población' nos referiremos a la distribución de la diversidad genética, es decir, de los genotipos, las frecuencias alélicas o las frecuencias haplotípicas, dentro y entre subpoblaciones. De acuerdo con esto, el estudio de una especie desde el punto de vista de la genética de poblaciones puede ayudar a entender los procesos demográficos que subyacen tras los patrones de polimorfismos genéticos y de frecuencias de alelos o haplotipos y proporcionar, por tanto, información sobre la estructura poblacional (Frankham et al. 2002, Beebe y Rowe 2004).

Este tipo de estudios permite también conocer los niveles de diversidad genética existentes en las poblaciones, lo cual tiene una relación importante con el estado de conservación de una especie (Frankham et al. 2002, Hedrick 2004). Si bien es cierto que puede existir una controversia en cuanto a la relación entre factores genéticos y la conservación de las especies (Amos y Badford 2001), generalmente se acepta que la pérdida de diversidad genética debería ser evitada, pues está frecuentemente asociada con la endogamia y con una reducción general en la supervivencia (p.e., menor resistencia a patógenos o parásitos) y en la reproducción (Frankham et al. 2002, Spielman et al. 2004). Esto es especialmente importante en taxones amenazados, con poblaciones fragmentadas y reducciones demográficas importantes, donde el riesgo de pérdida de algunos alelos y fijación de otros por deriva genética es alto, reduciéndose el potencial evolutivo de las especies y su capacidad para enfrentarse a cambios ambientales (Frankham et al. 2002).

Durante las últimas décadas, la utilización de herramientas como la 'reacción en cadena de la polimerasa' (PCR) (Mullis y Faloona 1987) ha permitido un rápido desarrollo de gran número de trabajos abordando estudios de diversidad genética y estructura poblacional, así como otras aplicaciones, en una gran variedad de organismos (p.e. Taberlet et al. 1997, Sloane et al. 2000, Palomares et al. 2002, Rudnick et al. 2005). Los tipos de marcadores moleculares disponibles son de naturaleza diversa, como los microsátélites, el ADN mitocondrial, las alozimas, los

Universitat d'Alacant
Universidad de AlicanteIntroducción general

RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA), los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) o los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), entre otros. El marcador molecular ideal debería ser barato, fácil de desarrollar y de usar, altamente polimórfico, es decir, con una buena resolución a la hora de discriminar entre individuos procedentes de diferentes áreas o poblaciones, y neutro, esto es, independiente de la selección (Beebe y Rowe 2004). Sin embargo, ninguno de los marcadores existentes cumple simultáneamente todas esas características y es necesario decidir cuál aplicar en cada caso concreto. En el águila-azor perdicera se han realizado algunos estudios sobre diversidad y estructura genética utilizando alozimas (Cardia et al. 2002), ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats) (Cardia et al. 2000), secuenciando el gen del *citocromo b* (Cardia et al. 2000) y, de manera más reciente, desarrollando marcadores de microsatélites para la especie (Mira et al. 2005, Mira 2006). Sin embargo, hasta el presente no se han empleado secuencias hipervariables no codificantes, como las contenidas en el ADN mitocondrial, molécula que, por otra parte, ha sido ampliamente utilizada para estudiar la diversidad y la estructura genética de poblaciones, los patrones filogeográficos y la filogenia en gran número de taxones de aves (ver Mindell 1997, Avise 2000, Wink 2000). Dentro del ADN mitocondrial, la 'región control' es normalmente considerada como la sección más variable y, por tanto, la más adecuada para los propósitos aquí enunciados, ya que se trata de una región no codificante, con lo que su evolución no está restringida por limitaciones derivadas de la expresión de los genes (Beebe y Rowe 2004) y, además, su tasa de evolución es entre tres y cinco veces más rápida que en el resto del genoma mitocondrial (Baker y Marshall 1997). Esta región se ha utilizado en numerosos estudios con especies de aves (p.e., Baker y Marshall 1997, Godoy et al. 2004, Roques y Negro 2005). En determinados casos se ha observado, además, que el genoma mitocondrial contiene otra sección, denominada 'pseudo-región control' (Haring et al. 1999), que también es no codificante y que puede tener una tasa de evolución incluso superior a la de la 'región control' en algunas rapaces (Kruckenhauser et al. 2004, Nittinger et al. 2005), de manera que también se ha utilizado en varios trabajos sobre especies del

grupo (p.c., Haring et al. 1999, Väli 2002, Riesing et al. 2003, Kruckenhauser et al. 2004). En esta tesis doctoral se presentan estudios realizados con ambas regiones.

La especie.

El águila-azor perdicera es una especie del orden Falconiformes, familia Accipitridae, subfamilia Aquilinae, que se distribuye irregularmente por Europa meridional, Norte de África, países del Próximo y Medio Oriente hasta alcanzar el subcontinente indio y el sudeste asiático (Fig. 1) (Del Hoyo et al. 1994, Ferguson-Lees y Christie 2004). Su distribución en el Paleártico Occidental es fundamentalmente circummediterránea, y comprende la Península Ibérica, el sureste de Francia, la zona noroccidental de África y núcleos poblacionales menores en otros países del Mediterráneo (Fig. 1) (Del Hoyo et al. 1994). En su área de distribución europea ocupa desde zonas áridas a semihúmedas dentro de la región mediterránea, criando desde prácticamente el nivel del mar hasta unos 1500 m.s.n.m. (Gil-Sánchez et al. 1996). Los adultos son territoriales y las parejas construyen sus nidos en cortados rocosos durante la época reproductora, aunque lo hacen también, de forma muy poco frecuente, sobre árboles como alcornoques (*Quercus suber*), pinos (*Pinus* sp.) y eucaliptos (*Eucalyptus* sp.) (Cabot et al. 1978, Billet 1991, López-López et al. 2004, 2006). De manera testimonial se han registrado casos de nidificación en postes eléctricos (Siméon et al. 1982). La puesta suele ser de uno o dos huevos, siendo ocasionales las puestas con tres huevos (Gil-Sánchez et al. 2004). Tras el período de dependencia (aquél que va desde el abandono del nido hasta la independencia de los progenitores en términos de alimentación) (Real et al. 1998, Mínguez et al. 2001) los juveniles desaparecen del territorio natal protagonizando movimientos dispersivos de gran envergadura y agrupándose en áreas de dispersión (Arroyo et al. 1992, Cheylan et al. 1996, Real y Mañosa 2001). En España la especie se alimenta de aves y mamíferos de mediano tamaño, fundamentalmente conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y perdices (*Alectoris rufa*), aunque también palomas (*Columba livia*; importantes en el Levante peninsular), córvidos, roedores e incluso reptiles (Del Hoyo et al. 1994, Gil-Sánchez et al. 1994, 2000, Leiva et al. 1994, Carrete et al. 2002).

Introducción general

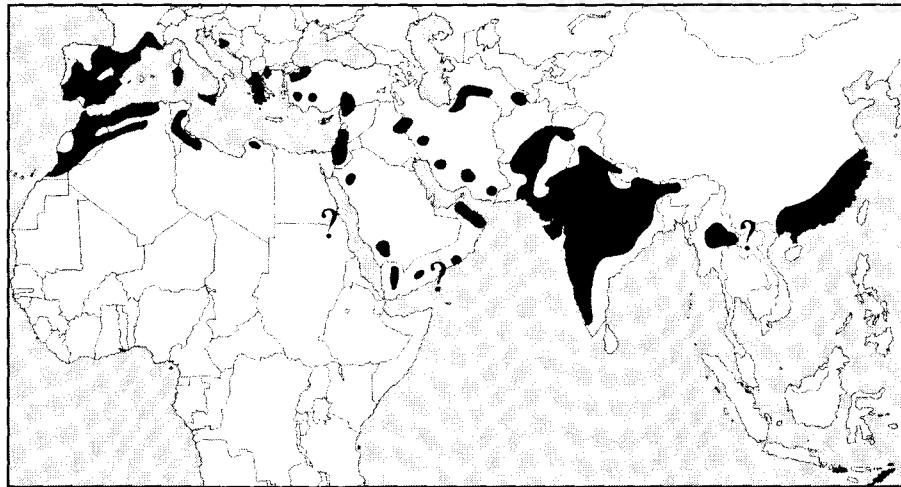


Figura 1: Distribución mundial del águila-azor perdicera *Hieraaetus fasciatus* (modificado de Ferguson-Lees y Christie 2004).

Actualmente se encuentra catalogada como ‘en peligro’ tanto en Europa (Birdlife 2004) como en España (Real 2004). En la Península Ibérica la población está compuesta por 733-768 parejas reproductoras (Del Moral 2006), de las cuales unas 658-721 vivirían en nuestro país (Real 2004), constituyendo aproximadamente el 75% de la población europea (Real 2004). Con respecto a su estado de conservación, la tendencia global en España durante las últimas décadas presenta diferencias geográficas importantes, ya que las poblaciones del norte y centro, junto con algunas del este, parecen estar en declive mientras que las del sur se encuentran en situación estable o incluso en expansión (Real 2004). Esta diferencia podría estar motivada por el hecho de que las poblaciones del norte de la Península Ibérica se encuentran en el extremo del área de distribución mundial de la especie (las poblaciones más septentrionales corresponden precisamente a las provincias españolas próximas a los Pirineos y a la existente en el sur de Francia). Puesto que no existen barreras geográficas a la expansión de la especie (los Pirineos no lo son, dado que hay una población en Francia), la actual distribución estaría explicada por la existencia de un límite fisiológico, es decir, algún rasgo de la fisiología del animal que condicione su presencia en determinadas áreas. El taxón más emparentado con

el águila-azor perdicera es el águila-azor africana *Hieraaetus spilogaster*, cuya distribución abarca la zona intertropical del continente africano (Del Hoyo et al. 1994). Un ancestro común de ambas especies pudo haberse refugiado en África y expandido hacia el norte tras un periodo glacial, quedando los linajes aislados posteriormente y evolucionando, finalmente, hacia los dos taxones actuales. Este pasado evolutivo podría hacer razonable el hecho de que el águila-azor perdicera esté adaptada a climatologías con temperaturas altas y necesite de la existencia de térmicas que favorezcan y faciliten su vuelo (Pennycuick 1998), al igual que ha sido descrito para otras especies de rapaces (Haller 1996, Ferrer 2001, Sarasola y Negro 2005). El clima en Europa es adverso a estas condiciones, con la excepción de las áreas meridionales del continente, que es, precisamente, donde aparece la especie. Esta limitación la convierte en potencial peor competidora con respecto a otras grandes rapaces, como el águila real *Aquila chrysaetos*, lo cual podría afectar también a la conformación de su área de distribución actual.

Estudios moleculares recientes han revelado que el género *Hieraaetus*, junto con otros géneros pertenecientes a la subfamilia Aquilinae como *Aquila* o *Spizaetus*, es parafilético conforme está definido actualmente (Helbig et al. 2005, Lerner y Mindell 2005). Las águilas incluidas en la subfamilia Aquilinae se distinguen por tener los tarsos completamente emplumados (denominadas en inglés “booted eagles”, Amadon 1982) y se han reconocido como un grupo monofilético tanto de manera tradicional como por los recientes datos moleculares (Helbig et al. 2005, Lerner y Mindell 2005). Sin embargo, esta monofilia no se da en los géneros incluidos dentro de ella. Brown y Amadon (1968) separaron el género *Hieraaetus* del género *Aquila* basándose en rasgos morfológicos como un menor tamaño en general, un pico más pequeño o patas más largas y esbeltas. No obstante, estas diferencias son en realidad graduales y no se dan en todas las especies existentes en los dos géneros (Amadon 1982, Helbig et al. 2005). Los resultados moleculares indican que el águila-azor perdicera es filogenéticamente más próxima al género *Aquila* que a otras especies del género *Hieraaetus* (Helbig et al. 2005, Lerner y Mindell 2005). Por ello, Helbig et al. (2005) sugieren que debería ser incluida dentro de *Aquila*, junto con *H. spilogaster*, especie muy similar que en ocasiones ha sido

Introducción general

considerada como subespecie de *H. fasciatus*. Los patrones de coloración del plumaje en la parte ventral del cuerpo apoyan esta teoría, ya que *H. fasciatus* (como *H. spilogaster*) presenta un patrón no barrado y monomórfico, al igual que las especies del género *Aquila*, si bien en las primeras éste es de color claro y en las últimas de color oscuro (Helbig et al. 2005). Esto las distingue de otras especies del género *Hieraaetus*, más pequeñas, con patrones de coloración dimórficos y que genéticamente están más alejadas de *H. fasciatus* (Helbig et al. 2005, Lerner y Mindell 2005).

Estos recientes hallazgos traerían como consecuencia el hecho de que España albergue tres especies del género *Aquila*: el águila real *A. chrysaetos*, el águila imperial ibérica *A. adalberti* y el águila-azor perdicera *H. fasciatus*, que pasaría a ser *A. fasciata* una vez que se realice una revisión taxonómica completa y se adopten los cambios pertinentes. La presencia de estas tres especies en nuestro territorio conlleva un alto grado de responsabilidad en lo que se refiere a la conservación del género *Aquila* en Europa, dado que la práctica totalidad de la población de águila imperial (el ave de presa con mayor nivel de amenaza a nivel europeo; Ferrer 2001) y al menos el 75% de la población europea de águila-azor perdicera (Real 2004) habitan en España. La coexistencia de las tres especies en simpatria ofrece, además, una oportunidad excelente para estudiar fenómenos ecológicos y evolutivos dentro del género: relaciones interespecíficas, competencia por los recursos tróficos o los lugares de nidificación, comportamiento en las zonas de dispersión, en las que a veces coinciden juveniles de las tres especies, así como la potencial existencia de fenómenos de hibridación.

Esta tesis: Estudio de la estructura de la población de águila-azor perdicera en la Península Ibérica.

El presente trabajo de tesis doctoral aborda el estudio de la estructura de la población de águila-azor perdicera en la Península Ibérica. Dentro de este marco geográfico, la especie ha sido estudiada monográficamente con anterioridad en al menos tres tesis doctorales. La primera de ellas (“L’àliga perdiguera *Hieraaetus fasciatus* a Catalunya: status, ecologia tròfica, biologia reproductora i demografia”,

Real 1991) consistió en un trabajo centrado en la población catalana de águila-azor perdicera, en el cual se estudió fundamentalmente la evolución de la población en las comarcas barcelonesas. La tesis también investigó la ecología trófica de la especie, detallando y valorando los diferentes métodos de recolección y análisis. Mediante la descripción de las variaciones en la dieta a nivel geográfico, dentro del área estudiada y a nivel del Mediterráneo occidental, se encontró que el conejo *Oryctolagus cuniculus* era la presa más importante tanto cuantitativa como cualitativamente. También se estudiaron las variaciones temporales de la dieta, a niveles estacional e interanual. En la tesis se describieron, además, los principales parámetros reproductivos de la población estudiada y el modo en el que diferentes factores ambientales y genotípicos incidieron en las variaciones interanuales e intraespecíficas de esos parámetros. De esa descripción se extrajo que los factores que más afectación tienen en la reproducción son los parámetros climatológicos previos a la puesta, especialmente la insolación. Finalmente, la tesis hacía una serie de consideraciones demográficas en base a los parámetros reproductivos observados.

La siguiente tesis en abordar un estudio sobre el águila-azor perdicera ("El águila perdicera en Andalucía: ecología y dispersión juvenil", Balbontín 2003) se centró en la población andaluza de la especie, de la cual se investigaron dos cuestiones. En primer lugar, se llevó a cabo un estudio sobre diferentes aspectos relacionados con la población reproductora y la biología reproductiva de la especie. Se estableció la situación demográfica del águila-azor perdicera en la comunidad andaluza y los principales problemas a los que se enfrentaba. Se estudiaron, además, diversos factores que afectan al éxito reproductor de la especie, como son la edad de los reproductores, la calidad del territorio o determinadas condiciones ambientales como la precipitación. Se llevó a cabo un análisis para establecer los valores de referencia en la bioquímica de plasma en pollos, y, por último, se expuso cómo la mortalidad debida a factores humanos puede alterar la estructura genética de las poblaciones actuando de forma antagónica a la selección natural. El otro gran aspecto tratado en esta tesis doctoral fue la dispersión juvenil. Mediante radiotelemetría VHF se estudiaron los movimientos de varios juveniles desde los 50 días hasta aproximadamente los 2.5 años de edad. Mediante ese método se obtuvo



Introducción general

información sobre el período de dependencia de la especie en 28 individuos y sobre el comportamiento de los jóvenes una vez que son independientes y salen fuera de los territorios de cría en 10 ejemplares. Además, se describió la selección de hábitat de los juveniles durante la etapa de dispersión juvenil y se elaboró cartografía predictiva de las zonas más frecuentemente utilizadas durante ese período. Las implicaciones para la conservación de la especie se pusieron de manifiesto y entre las perspectivas futuras se destacaba la necesidad de marcar juveniles en otras zonas de España para sacar el mayor rendimiento posible a los datos recopilados y tratar de prolongar el período de estudio hasta la fase de incorporación de los individuos marcados a la población reproductora, para así averiguar cuáles son las tasas de inmigración y emigración en las diferentes poblaciones.

La tercera tesis en estudiar la población ibérica de águila-azor perdicera ("Population genetics of an endangered species: the Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus*, Mira 2006) abordó exclusivamente aspectos genéticos. En ella se desarrollaron marcadores moleculares de microsátélites y con ellos se estudiaron muestras de individuos procedentes, fundamentalmente, del suroeste y noreste de Portugal, y de dos poblaciones localizadas en la mitad occidental de España. Como resultado se encontraron unos niveles de diversidad genética moderados y más altos de lo que cabría esperar en una población en declive, a excepción de la población del suroeste portugués, en la que se encontró baja diversidad. Contrariamente a lo esperado, no se hallaron evidencias de la existencia de cuellos de botella ni de endogamia, lo cual sugería panmixia dentro de cada población. Sin embargo, las cuatro poblaciones presentaron una estructura genética y espacial significativa, cuya explicación se fundamentó en base al probable comportamiento filopátrico de la especie. Además de ello, en la tesis se propuso la existencia de un patrón de aislamiento comportamental en la población del suroeste portugués, debido a su estrategia de nidificación en árbol. La tesis finalizaba poniendo de manifiesto algunos aspectos importantes para la preservación de las poblaciones estudiadas de forma que pudiera mantenerse la diversidad genética y comportamental existente.

El rasgo común de estas investigaciones anteriores es que todas proporcionan una visión local de los problemas que abordan, contribuyendo al conocimiento de la

estructura poblacional del águila-azor perdicera sólo de manera parcial, debido a la limitación geográfica de sus áreas de estudio (Cataluña, Andalucía y Portugal y parte occidental de España). Por el contrario, la presente tesis doctoral trasciende el ámbito de las anteriores, ya que la investigación que se plantea ha pretendido comprender el conjunto de la Península Ibérica. La especie se distribuye de manera irregular por el territorio peninsular, de acuerdo a los requerimientos ecológicos de las parejas nidificantes (Urios 1986, Gil-Sánchez et al. 1996, Gil-Sánchez 1998, 2000, Ontiveros 1999, López-López et al. 2006) (Fig. 2) y algunos estudios locales han sugerido la existencia de patrones regulares o contagiosos en la estructura espacial de los territorios (Urios 1986, López-López et al. 2004). Como se ha comentado, los juveniles tienen una elevada capacidad de movimiento, y a raíz de ahí se plantea la cuestión de si, a través de sus desplazamientos, ponen en contacto diferentes áreas donde la especie cría. Para tratar de contestar a esta pregunta, hemos analizado el proceso de dispersión natal en juveniles marcados a lo largo del extremo oriental de España y cuyos movimientos se han desarrollado por buena parte del territorio peninsular. Para el estudio se ha utilizado telemetría vía satélite, a fin de averiguar el destino de los individuos dispersantes y el efecto de su dispersión en la estructura de la población. Se ha analizado también la diversidad genética contenida en secuencias de ADN mitocondrial y se ha explorado la existencia de una posible estructuración genética de las poblaciones peninsulares.

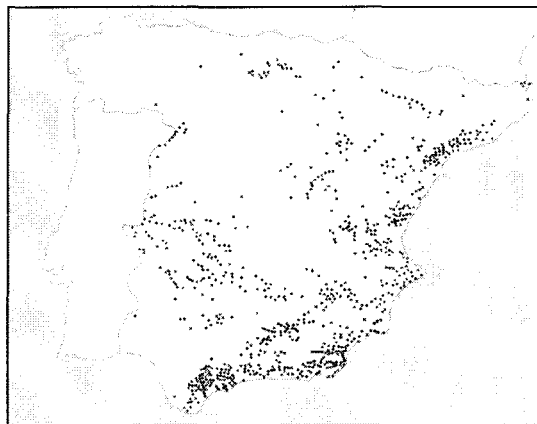


Figura 2: Distribución de las parejas nidificantes de águila-azor perdicera en España (modificado de Arroyo et al. 1995).



Introducción general

A la escala de la Península Ibérica, la relación entre los núcleos poblacionales del águila-azor perdicera puede determinar la existencia de tres escenarios distintos: i) la población es panmíctica, es decir, el apareamiento ocurre al azar y no hay estructura; ii) se da un fuerte grado de filopatria, existen núcleos diferenciados que no están interconectados, con lo cual existe una estructura poblacional clara; y iii) existen flujos diferenciales y restringidos de individuos, diversos grados de filopatria, grupos de poblaciones conectadas, dinámicas fuente-sumidero, es decir, existe una potencial estructura de tipo metapoblacional. La aplicación de las dos perspectivas metodológicas mencionadas de manera complementaria tiene como objeto posibilitar el contraste de los resultados obtenidos, fundamentando o rebatiendo las conclusiones extraídas con cada una de ellas y permitiendo una mejor comprensión del proceso estudiado (Avise et al. 1992). La utilización de ambas aproximaciones justifica la división en dos grandes secciones de la presente tesis doctoral. Los objetivos de la tesis se detallan a continuación.

Objetivo General.

Conocer si existe estructura en la población de águila-azor perdicera en la Península Ibérica.

Objetivos Parciales.

- Averiguar cómo el proceso de dispersión natal configura la potencial existencia de estructura en la población ibérica de águila-azor perdicera a través del flujo de individuos entre diferentes zonas.
- Profundizar en el conocimiento de las diferentes fases del proceso de dispersión natal en la especie.
- Aportar herramientas metodológicas que faciliten el estudio de la dispersión en especies como el águila-azor perdicera y otras grandes rapaces amenazadas.
- Estudiar los niveles de diversidad genética y la posible existencia de una estructura genética en la población ibérica de águila-azor perdicera.
- Aportar conocimiento para tomar decisiones de manejo y conservación de la especie.

Organización de la tesis.

La utilización de las dos aproximaciones arriba comentadas, es decir, el estudio de la dispersión natal y el trabajo de genética de poblaciones, justifica la división en dos grandes secciones de la presente tesis doctoral. La primera de ellas abarca los capítulos 1 a 6, perteneciendo los capítulos 7 y 8 a la segunda sección. Todos los capítulos, a excepción del quinto, corresponden a artículos científicos publicados o en diferentes fases del proceso de publicación. Una tesis con estas características presenta dos ventajas fundamentales: cada capítulo aborda un aspecto concreto de manera concisa y focalizada y, al mismo tiempo, la calidad de los trabajos que ya han sido aceptados está incrementada, gracias a la mejora que conlleva el proceso de revisión de las correspondientes revistas científicas. A continuación se resumen los contenidos de los capítulos comprendidos en cada sección.

Sección I: Estudio de la dispersión natal en el águila-azor perdicera mediante telemetría vía satélite.

La relación directa de la dispersión natal con la estructura de la población proviene del traslado *per se* de ejemplares de unas zonas a otras. Sin embargo, el proceso consta de tres etapas sucesivas en las que el comportamiento y los patrones de movimiento de los individuos son diferentes: el abandono del territorio paterno ('emigración'), el período intermedio ('transferencia') y el encuentro de pareja y asentamiento para criar ('inmigración') (Clobert et al. 2001, Andreassen et al. 2002). Al abordar el estudio de la dispersión natal en el águila-azor perdicera hemos obtenido información referente a cada una de esas tres fases, y es por ello que el primer bloque de la presente tesis está conformado por capítulos que desarrollan aspectos correspondientes a cada una de ellas.

Los capítulos 1 y 2 se enmarcan en la etapa de 'emigración' y abordan el problema de conseguir una detección precisa del comienzo de la dispersión, es decir, del momento en el cual los juveniles de águila-azor perdicera (y otras especies) abandonan el territorio natal, cuando son estudiados mediante sistemas de



seguimiento remoto, como radiotelemetría o seguimiento por satélite. Esta información resulta de importancia para entender la relación existente entre diversos factores (p.e., disponibilidad de alimento, condición física, sexo, presencia de hermanos, etc.) y el inicio de la dispersión. En el **capítulo 1** (**'Estimating the onset of dispersal in endangered Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* tracked by satellite telemetry: a comparison among methods'**) se establece una comparación entre nueve métodos basados bien en establecer una distancia mínima de dispersión o bien en estudiar los patrones de movimiento de los juveniles, ya sea por observación directa o utilizando una medida de variabilidad en las distancias al nido. Se concluye que los métodos más consistentes son aquellos que incluyen una condición que trata de evitar el efecto de los movimientos exploratorios previos al inicio real de la dispersión, así como la observación directa del comportamiento de alejamiento del nido. Los resultados evidencian el claro carácter dispersivo de la especie.

En el **capítulo 2** (**'Dispersal of raptors detected by location distribution and vectors'**) se utilizan los dos métodos que proporcionan los mejores resultados en el capítulo anterior y se aplican a datos de dispersión de cinco especies de rapaces (águila-azor perdicera, águila real, pigargo europeo, busardo ratonero y azor común) estudiadas bien mediante radiotelemetría VHF o mediante telemetría vía satélite. Se utiliza, además, un método novedoso basado en la distribución de las localizaciones y en el uso de vectores (DAV, "Distribution-And-Vector"). La principal ventaja de este método es que la detección de la dispersión se realiza directamente a partir de la distribución de las localizaciones de los individuos, sin utilizar criterios subjetivos o establecer *a priori* distancias mínimas de dispersión. De la comparación entre los tres métodos se extrae que el DAV es más consistente y más preciso en reconocer individuos dispersantes, no dispersantes y de comportamiento no claramente definido ('ambiguos'). Se observa, además, una mayor proporción de resultados similares entre métodos en aquellas especies donde todos los individuos se dispersan.

En el **capítulo 3** (**'Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* juvenile dispersal: hourly and daily movements tracked by GPS'**) se utilizan emisores satelitales de

GPS por primera vez con la especie, y se aportan datos sobre la extensión de los movimientos horarios y diarios durante la etapa inicial de la dispersión (inicio del período de ‘transferencia’). Los mayores desplazamientos se dan a mediodía y en las primeras horas de la tarde, lo cual probablemente está relacionado con la disponibilidad de térmicas, y se observa que los movimientos diarios no suelen exceder los 20 km, a excepción de episodios puntuales donde se pueden alcanzar casi 250 km/día.

El **capítulo 4** (**‘Survival and movements of satellite-tracked Bonelli’s Eagles *Hieraetus fasciatus* during their first winter’**) proporciona información preliminar sobre los movimientos de abandono del nido, inicio de la fase exploratoria de ‘transferencia’ y asentamiento en áreas de dispersión que ocurren durante el primer invierno de vida de los juveniles de águila-azor perdicera. Se incluyen también una estima de la supervivencia en ese período y comparaciones entre sexos y entre hermanos.

En el **capítulo 5** (**‘Patrones de movimiento y áreas vitales en el águila-azor perdicera *Hieraetus fasciatus* durante el período de dispersión juvenil en España’**) se describen los patrones de movimiento de 15 jóvenes de águila-azor perdicera durante el proceso de dispersión juvenil, es decir, el período que precede al reclutamiento a la población reproductora. Se explora el patrón de alejamiento de las áreas natales, las diferencias entre sexos, se propone un método para la identificación de dormideros a partir de los datos del sistema Argos y se delimitan y caracterizan de manera general las áreas de dispersión, señalando las implicaciones que conlleva su localización para la conservación de la especie.

En el **capítulo 6** (**‘From hatching to parenthood: recruitment to the breeding population of a Bonelli’s eagle *Hieraetus fasciatus* after four years of satellite tracking’**) se describe el proceso completo de dispersión natal en el águila-azor perdicera, a partir del registro, por primera vez, de un reclutamiento a la población reproductora. Se aporta, así, información sobre la última etapa (‘inmigración’) de las arriba comentadas. El registro de una distancia de dispersión natal de aproximadamente 440 km evidencia una conexión entre diferentes áreas en la Península Ibérica, la ausencia de filopatria obligatoria en la especie y la



Introducción general _____

existencia, por tanto, de flujo génico. Las implicaciones que estos resultados tienen para la conservación son puestas de manifiesto.

Sección II: Estudio de la diversidad y estructura genética en el águila-azor perdicera en la Península Ibérica utilizando secuencias de ADN mitocondrial.

El segundo bloque de esta tesis doctoral consiste en una aproximación genética al estudio de la estructura de la población ibérica de águila-azor perdicera y consta de dos capítulos.

En el **capítulo 7 ('Low mitochondrial DNA diversity in the endangered Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) from SW Europe (Iberia) and NW Africa')** se explora la diversidad y potencial existencia de estructura genética mediante el uso de secuencias de ADN mitocondrial, utilizando individuos provenientes de España, Portugal y el noroeste de África. Se encuentran unos niveles muy bajos de diversidad nucleotídica y haplotípica, así como ausencia de una estructuración genética en la población muestreada, y se plantean varias hipótesis que expliquen los resultados obtenidos.

Una de esas hipótesis considera la posibilidad de que una mayor diversidad genética esté contenida en otras regiones del ADN mitocondrial. De ella surge el **capítulo 8 ('Repeated sequence homogenization in the subfamily Aquilinae as revealed by the structure of the mitochondrial control and pseudo-control regions')**, que en origen consiste en una descripción y caracterización de las dos regiones no codificantes del ADN mitocondrial, la 'región control' y la 'pseudoregión control', con objeto de identificar aquellas zonas polimórficas que puedan ser utilizadas como marcadores moleculares. Además de ello, durante el transcurso del estudio se detecta una homología intra-genómica entre ambas regiones, de modo que se explora su existencia en otras especies filogenéticamente emparentadas y se analizan las implicaciones evolutivas que ello conlleva a partir de los datos disponibles en la actualidad.

Como apartado final de la tesis se presenta una lista de **Conclusiones** derivadas de los resultados obtenidos en los diversos capítulos. En ellas se ponen de

manifiesto las contribuciones y avances conceptuales y metodológicos más importantes de la tesis, así como las principales aplicaciones en lo que respecta a la conservación de la especie.

Referencias.

- Amadon, D. 1982. The genera of Booted Eagles: *Aquila* and relatives. *Journal of the Yamashima Institute of Ornithology* 14: 108-121
- Amos, W. & Balmford, A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* 87: 257-265.
- Andreassen, H.P., Stenseth, N.C. & Ims, R.A. 2002. Dispersal behaviour and population dynamics of vertebrates. En: Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. (eds). *Dispersal Ecology*. Oxford: Blackwell.
- Andrewartha, H.G. & Birch, L.C. 1954. *The distribution and abundance of animals*. The University of Chicago Press.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1992. Factores limitantes de la población de águila perdicera en España. Madrid: Informe técnico ICONA.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1995. El águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en España. Censo, reproducción y conservación. Technical report. Madrid: Technical collection ICONA.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Londres: Harvard University Press.
- Avise, J.C., Alisauskas, R.T., Nelson, W.S. & Ankney, C.D. 1992. Matriarchal population genetic structure in an avian species with female natal philopatry. *Evolution* 46: 1084-1096.
- Baker, A.J. & Marshall, H.D. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. En: Mindell, D.P. (ed). *Avian molecular evolution and systematics*. Londres: Academic Press.
- Balbontín, J. 2003. El águila perdicera en Andalucía: ecología y dispersión juvenil. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Balbontín, J., Penteriani, V. & Ferrer, M. 2000. El águila perdicera en Andalucía: situación actual y tendencias en las áreas de reproducción y de dispersión juvenil. Informe técnico inédito. Consejería de Medio Ambiente – Junta de Andalucía.
- Beebee, T. & Rowe, G. 2004. *An introduction to molecular ecology*. Nueva York: Oxford University Press.
- Bevens, M. & Flather, C.H. 1999. The distribution and abundance of populations limited at multiple spatial scales. *Journal of Animal Ecology* 68: 976-987.
- Billet, J.-M. 1991. Premier cas connu en France de la nidification arboricole de l'Aigle de Bonelli *Hieraaetus fasciatus*. *Alauda* 59: 111.
- BirdLife International. 2004. *Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status*. Cambridge: BirdLife International.
- Bohonak, A.J. 1999. Dispersal, gene flow and population structure. *The Quarterly Review of Biology* 74: 21-45.
- Brodeur, S., Savard, J.-P. L., Robert, M., Laporte, P., Lamothe, P., Titman, R.D., Marchand, S., Gilliland, S. & Fitzgerald, G. 2002. Harlequin duck *Histrionicus*

- histrionicus* population structure in eastern Nearctic. *Journal of Avian Biology* 33: 127-137.
- Brown, L.H. & Amadon, D. 1968. Classification and distribution. En: *Eagles, Hawks and Falcons of the World*, vol. 1. Feltham: Country Life Books.
- Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. (eds). 2002. *Dispersal Ecology*. Oxford: Blackwell.
- Cabot, J., Jordano, P., Ruiz, M. & Villasante, J. 1978. Nidificación de águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*, Viell.) en árbol. *Ardeola* 24: 215-217.
- Camus, P.A. & Lima, M. 2002. Populations, metapopulations and the open-closed dilemma: the conflict between operational and natural population concepts. *Oikos* 97: 433-438.
- Cardia, P., Fraguas, B., Pais, M., Guillemaud, T., Palma, L., Cancela, M.L., Ferrand, N. & Wink, M. 2000. Preliminary genetic analysis of some western Palearctic populations of Bonelli's eagle, *Hieraaetus fasciatus*. En: Chancellor, R.D. & Meyburg, B.-U. (eds). *Raptors at risk*. Berlín: WWGBP / Hancock House.
- Cardia, P., Fraguas, B., Pais, M., Silva, S., Guillemaud, T., Palma, L., Cancela, M.L. & Ferrand, N. 2002. Análise da variação genética de proteínas em populações mediterrânicas de águia-perdigucira *Hieraaetus fasciatus*. *Airo* 12: 71-74.
- Carrete, M., Sánchez-Zapata, J.A., Martínez, J., Sánchez, M. & Calvo, J. 2002. Factors influencing the decline of a Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* population in southeastern Spain: demography, habitat or competition? *Biodiversity and Conservation* 11: 975-985.
- Cheyran, G., Ravayrol, A., Cugnasse, J.-M., Billet, J.-M. & Joulot, C. 1996. Dispersion des Aigles de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* juveniles bagués en France. *Alauda* 64: 413-419.
- Clobert, J., Danchin, E., Dhont, A.A. & Nichols, J. (eds). 2001. *Dispersal – causes, consequences and mechanisms of dispersal at the individual, population and community level*. Oxford: Oxford University Press.
- Del Hoyo, J., Elliot, A. & Sargatal, J. 1994. *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 2: *New World Vultures to Guinea-fowl*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Del Moral, J. 2006. *El águila perdicera en España. Población en 2005 y método de censo*. Madrid: SEO/BirdLife. Madrid.
- Dizon, A.E., Lockyer, C., Perrin, W.F., Demaster, D.P. & Sisson, J. 1992. Rethinking the stock concept: a phylogeographic approach. *Conservation Biology* 6: 24-36.
- Ferguson-Lees, J. & Christie, D.A. 2004. *Rapaces del mundo*. Barcelona: Ed. Omega.
- Ferrer, M. 1993. Juvenile dispersal behaviour and natal philopatry of a long-lived raptor, the Spanish imperial eagle *Aquila adalberti*. *Ibis* 135: 132-138.
- Ferrer, M. 2001. *The Spanish Imperial Eagle*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Frankham, R., Ballou, B.D. & Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.

Introducción general

- Futuyma, D.J. 1986. Evolutionary Ecology, 2nd Edition. EE.UU.: Sinauer.
- Gil-Sánchez, J.M. 1998. Selección de presa por el águila-azor perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) durante el período de nidificación en la provincia de Granada (SE de España). *Ardeola* 45: 151-160.
- Gil-Sánchez, J.M. 2000. Efecto de la altitud y de la disponibilidad de presas en la fecha de puesta del águila-azor perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en la provincia de Granada (SE de España). *Ardeola* 48: 1-8.
- Gil-Sánchez, J.M., Moleón, M., Otero, M. & Bautista, J. 2004. A nine-year study of successful breeding in a Bonelli's eagle population in southeast Spain: a basis for conservation. *Biological Conservation* 118: 685-694.
- Gil-Sánchez, J.M., Molino, F. & Valenzuela, G. 1994. Parámetros reproductivos y alimentación del águila real (*Aquila chrysaetos*) y del águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en la provincia de Granada. *Aegypius* 12: 47-51.
- Gil-Sánchez, J.M., Molino, F. & Valenzuela, G. 1996. Selección de hábitat de nidificación por el águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en Granada (SE de España). *Ardeola* 43: 189-197.
- Gil-Sánchez, J.M., Molino, F., Valenzuela, G. & Moleón, M. 2000. Demografía y alimentación del águila-azor perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en la provincia de Granada. *Ardeola* 47: 69-75.
- Godoy, J.A., Negro, J.J., Hiraldo, F. & Donazar, J.A. 2004. Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered Bearded Vulture (*Gypaetus barbatus*, L.) as revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 13: 371-390.
- Greenwood, P.J. & Harvey, P.H. 1982. The natal and breeding dispersal of birds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 1-21.
- Haller, H. 1996. Der Steinadler in Graubünden. Langfristige Untersuchungen zur Populationsökologie von *Aquila chrysaetos* im Zentrum der Alpen. *Ornithol. Beob. Beiheft* 9: 1-167.
- Hanski, I. 1999. *Metapopulation Ecology*. Nueva York: Oxford University Press.
- Hanski, I. & Gilpin, M. 1991. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society* 42: 3-16.
- Haring, E., Riesing, M.J., Pinsker, W. & Gamauf, A. 1999. Evolution of a pseudo-control region in the mitochondrial genome of Palearctic buzzards (genus *Buteo*). *Journal of Zoology Systematics and Evolutionary Research* 37: 185-194.
- Hedrick, P.W. 2004. Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecology and Management* 197: 3-19.
- Helbig, A.J., Kocum, A., Seibold, I. & Braun, M.J. 2005. A multi-gene phylogeny of aquiline eagles (Aves: Accipitriformes) reveals extensive paraphyly at the genus level. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 147-164.
- Howard, W.E. 1960. Innate and environmental dispersal of individual vertebrates. *American*

- Midland Naturalist 63: 152-161.
- Johnson, M.L. & Gaines, M.S. 1990. Evolution of dispersal: theoretical models and empirical tests using birds and mammals. Annual Review of Ecology and Systematics 21: 449-480.
- Kenward, R.E. 2001. A Manual for Wildlife Radio Tagging. Londres: Academic Press.
- Kenward, R.E., Rushton, S.P., Perrins, C.M., Macdonald, D.W. & South, A.B. 2002. From marking to modelling: dispersal study techniques for land vertebrates. En: Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. (eds). Dispersal Ecology. Oxford: Blackwell.
- Kruckenhauser, L., Haring, E., Pinsker, W., Riesing, M.J., Winkler, H., Wink, M. & Gamauf, A. 2004. Genetic vs. morphological differentiation of Old World buzzards (genus *Buteo*, Accipitridae). Zoologica Scripta 33: 197-211.
- Leiva, A., Pareja, G. & Aragonés, J. 1994. Alimentación del águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en la provincia de Córdoba. Aegypius 12: 15-21.
- Lerner, H.R.L. & Mindell, D.P. 2005. Phylogeny of eagles, Old World vultures, and other Accipitridae based on nuclear and mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 37: 327-346.
- Levin, S.A. 1992. The problem of pattern and scale in ecology: The Robert H. MacArthur Award Lecture. Ecology 73: 1943-1967.
- López-López, P., García-Ripollés, C., Aguilar, J.M., García-López, F. & Verdejo, J. 2006. Modelling breeding habitat preferences of Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in relation to topography, disturbance, climate and land use at different spatial scales. Journal of Ornithology 147: 97-107.
- López-López, P., García-Ripollés, C., García-López, F., Aguilar, J.M. & Verdejo, J. 2004. Patrón de distribución del águila real *Aquila chrysaetos* y del águila-azor perdicera *Hieraaetus fasciatus* en la provincia de Castellón. Ardeola 51: 275-283.
- Mindell, D.P. 1997 (ed). Avian molecular evolution and systematics. Londres: Academic Press.
- Mínguez, E., Angulo, E. & Sicbering, V. 2001. Factors influencing length of the post-fledging period and timing of dispersal in Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in Southwestern Spain. Journal of Raptor Research 35: 228-234.
- Mira, S., Wolff, K. & Cancela, M.L. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers in Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*). Molecular Ecology Notes 5: 493-495.
- Mira, S. 2006. Population genetics of an endangered species: the Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*). Tesis doctoral. Universidad del Algarve.
- Mullis, K.B. & Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polimerase chain reaction. Methods in Enzymology 155: 335-350.
- Newton, I. 1979. Population ecology of raptors. Londres: Ed. T. & A.D. POYSER.
- Nittinger, F., Haring, E., Pinsker, W., Wink, M. & Gamauf, A. 2005. Out of Africa: phylogenetic relationships between *Falco*

Introducción general

- biarmicus* and the other Hierofalcons (Aves: Falconidae). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 43: 321-331.
- Ontiveros, D. 1999. Selection of nest cliffs by Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in Southeastern Spain. Journal of Raptor Research 33: 110-116.
- Palomares, F., Godoy, J.A., Píriz, A., O'Brien, S.J. & Johnson, W.E. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. Molecular Ecology 11: 2171-2182.
- Pennycuik, C.J. 1998. Field observations of thermals and thermal streets, and the theory of cross-country soaring flight. Journal of Avian Biology 29: 33-43.
- Pianka, E.R. 1988. Evolutionary Ecology, 4th Edition. Nueva York: Harper & Row, Publishers.
- Pulliam, H.R. 1988. Sources, sinks and population regulation. The American Naturalist 132: 652-661.
- Real, J. 1991. L'àliga perdiguera *Hieraaetus fasciatus* a Catalunya: status, ecologia tròfica, biologia reproductora i demografia. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- Real, J. 2004. Águila-azor perdicera, *Hieraaetus fasciatus*. En: Madroño, A., González, C. & Atienza, J.C. (eds). Libro Rojo de las Aves de España. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad-SEO/Birdlife.
- Real, J. & Mañosa, S. 2001. Dispersal of juvenile and immature Bonelli's Eagles in Northeastern Spain. Journal of Raptor Research 35: 9-14.
- Real, J., Mañosa, S. & Codina, J. 1998. Post-nestling dependence period in the Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus*. Ornis Fennica 75: 129-137.
- Riesing, M.J., Kruckenhauser, L., Gamauf, A. & Haring, E. 2003. Molecular phylogeny of the genus *Buteo* based on mitochondrial marker sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 27: 328-342.
- Roques, S. & Negro, J.J. 2005. MtDNA genetic diversity and population history of a dwindling raptorial bird, the red kite (*Milvus milvus*). Biological Conservation 126: 41-50.
- Rudnick, J., Katzner, T., Bragin, E., Rhodes, O. & Dewoody, J. 2005. Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analysis and population monitoring in an endangered eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. Molecular Ecology 14: 2959-2967.
- Sarasola, J.H. & Negro, J.J. 2005. Hunting success of wintering Swainson's hawks: environmental effects on timing and choice of foraging method. Canadian Journal of Zoology 83: 1353-1359.
- Siméon, D., Cheylan G. & Fonters, C. 1982. Premier cas de nidification réussie d'un Aigle de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* sur un pylône électrique en Provence. Alauda 50: 69-70.
- Sloane, M., Sunnicks, P., Alpers, D., Bechegaray, L. & Taylor, A. 2000. Highly reliable genetic identification of individual

- Northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censusing method. *Molecular Ecology* 9: 1233-1240.
- Soutullo, A., Urios, V., Ferrer, M. & Peñarrubia, S. 2006. Post-fledging behaviour in Golden Eagles *Aquila chrysaetos*: onset of juvenile dispersal and progressive distancing from the nest. *Ibis* 148: 307-312.
- Spielman, D., Brook, B.W. & Frankham, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101: 15261-15264.
- Taberlet, P., Camarra, J., Griffin, S., Uhrès, E., Hanotte, O., Waits, L., Dubois-Paganon, C., Burke, T. & Bouvet, J. 1997. Non-invasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6: 869-876.
- Urios, V. 1986. Biología, requerimientos ecológicos y relaciones interespecíficas del águila real *Aquila chrysaetos homeyeri* Severtzov, 1888 y del águila perdicera *Hieraaetus fasciatus fasciatus* Viellot, 1822 (Accipitriformes, Accipitridae) en la provincia de Valencia. Tesis de Licenciatura. Universidad de Valencia.
- Väli, Ü. 2002. Mitochondrial pseudo-control region in old world eagles (genus *Aquila*). *Molecular Ecology* 11: 2189-2194.
- Walls, S.S. & Kenward, R.E. 1995. Movements of radio-tagged buzzards *Buteo buteo* in their first year. *Ibis* 137: 177-182.
- Wink, M. 2000. Advances in DNA studies of diurnal and nocturnal raptors. En: Chancellor, R.D. & Meyburg, B.-U. (eds). Berlin: Raptors at risk. WWGBP / Hancock House.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

SECCIÓN I

D DISPERSIÓN N NATAL



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

METODOLOGÍA
GENERAL



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

El objetivo de este apartado es proporcionar información general sobre Argos, el sistema de seguimiento por satélite que ha sido utilizado en el estudio de la dispersión natal del águila-azor perdicera en la presente tesis doctoral. Dado que su funcionamiento se comenta sólo de manera somera en los capítulos correspondientes, aquí presentamos una explicación más detallada y completa.

La telemetría vía satélite ha estado en funcionamiento desde 1978, a raíz de un proyecto de cooperación internacional entre la NOAA (Agencia Nacional Oceánica y Atmosférica, EE.UU.), la NASA (Agencia Nacional de Aeronáutica y Espacio, EE.UU.) y el CNES (Centro Nacional de Estudios Espaciales, Francia). Se trata de un sistema de compilación y gestión de datos a partir de receptores situados en satélites pertenecientes a la NOAA y a Eumetsat (Organización Europea para la Explotación de los Satélites Meteorológicos), estos últimos aún en proceso de validación. Comprende, además, una red de estaciones regionales de recepción, seguimiento y comunicación que transfieren las señales de los satélites a alguno de los dos centros generales de procesamiento de datos, en Largo (Washington, EE.UU.) o Toulouse (Francia), bien directamente o bien pasando antes por los centros de procesamiento regionales de Japón, Australia o Perú, dependiendo de la ubicación de cada estación regional. A partir de ahí, los usuarios pueden tener acceso a los resultados mediante diferentes sistemas (conexiones mediante Internet o Telnet, disquetes, CD-ROM u hojas impresas en diferentes formatos).

Las órbitas de los satélites utilizados por el sistema Argos son quasi-polares y sincrónicas al Sol, lo cual permite cubrir un área determinada aproximadamente a la misma hora cada día. Un mínimo de dos satélites están operando en cada momento, proporcionando una total cobertura del globo terrestre. Se encuentran a una altura de 850 km y su área de visibilidad es una circunferencia de unos 5000 km de diámetro.

El satélite localiza un emisor (comúnmente denominado PTT, 'Platform Transmitter Terminal') estimando el efecto Doppler a partir de su frecuencia. El efecto Doppler consiste en el cambio de frecuencia en una onda sonora o electromagnética cuando la fuente de transmisión y el observador están en movimiento relativo uno con respecto del otro (por ejemplo, cuando vamos caminando por la calle y escuchamos una ambulancia que se acerca, pasa a nuestro

Metodología general

lado y después se aleja). Mientras el emisor está activado, emite una señal en una frecuencia determinada ($401.650 \text{ MHz} \pm 4\text{kHz}$). Cuando el satélite y el emisor se “acercan” (en un sentido amplio, ya que la diferencia de altura entre ellos es de unos 850 km), el satélite lee una frecuencia que es mayor que la que emite realmente el emisor, hay un momento en el que lee la real, y luego lee una más baja cuando se alejan uno del otro (Fig. 1). Esa señal se retransmite entonces a alguna estación de recepción regional, situada en algún punto de la superficie terrestre y, de ahí, se envía a los centros de procesamiento. En ellos, el cambio en la frecuencia antes y después de la pasada del satélite es utilizado para calcular la posición del emisor. Para ello, el sistema realiza una estima inicial de la posición que es función, por un lado, del primer y del último mensaje recibido en una pasada del satélite (que están separados por un tiempo determinado en cada caso) y, por otro, de la frecuencia calculada más reciente. A partir de esa función se generan dos conos imaginarios de localizaciones posibles del emisor, de eje horizontal y cuyos vértices son las posiciones del satélite en el primer y último mensaje. Esos dos conos intersecan la superficie terrestre en dos puntos, dando lugar a dos posibles localizaciones. Aquella con una mejor continuidad en la frecuencia con respecto a la última frecuencia calculada se elige como la posición verdadera, y la otra se considera su “imagen”.

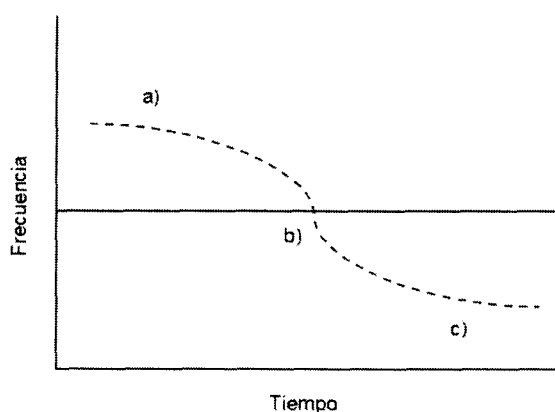


Figura 1: Cambio en la frecuencia recibida por el satélite desde un emisor a través del sistema Argos. Línea continua: frecuencia de la señal del emisor, que se mantiene estable con respecto al tiempo ($401.650 \text{ MHz} \pm 4\text{kHz}$). Línea punteada: (a) frecuencia que recibe el satélite cuando se acerca al emisor, que es más alta que la real; (b) momento en el que el satélite está más cerca del emisor, cuando la frecuencia emitida y la recibida se igualan; y (c) cuando el satélite se aleja recibe una frecuencia menor

que la que el emisor envía realmente. Esta variación en la frecuencia se conoce como efecto Doppler y es utilizada por el sistema Argos para calcular la posición del emisor.

La localización seleccionada pasa una serie de tests de plausibilidad para su validación y todo el proceso da como resultado una posición con una Clase de Localización (LC) asignada, que dependerá de la geometría del “encuentro” entre el satélite y el transmisor, del número de mensajes recibidos durante la pasada del satélite (al menos cuatro transmisiones o mensajes satisfactorios son necesarios para que el sistema pueda dar una localización con coordenadas de precisión calculada) y de la estabilidad de la frecuencia del transmisor (que depende, a su vez, de otra serie de factores). Finalmente se obtiene una localización que pertenecerá a alguna de las siete LC de Argos (Argos 1996, Kenward 2001) (Tabla 1).

Tabla 1: Clases de Localización del Sistema Argos.

LC	Precisión de la localización	Número de mensajes necesarios
3	< 150 m	Al menos cuatro
2	150 - 350 m	Al menos cuatro
1	350 - 1000 m	Al menos cuatro
0	> 1000 m	Menos de cuatro
A	No estimada	Tres
B	No estimada	Dos
Z	Datos no válidos	-

Además del número de mensajes recibidos en cada una de las pasadas del satélite, las LC son también necesarias por la existencia de una serie de factores, bien intrínsecos al emisor o externos a él, que reducen la precisión de las localizaciones. Entre éstos se encuentran el movimiento del emisor, la altitud a la que se encuentra, la topografía, la estabilidad del oscilador del transmisor (pequeño componente interno que regula la frecuencia de transmisión) o la temperatura exterior. Diversos trabajos han analizado la influencia de estos factores en la precisión de las localizaciones de satélite a partir de estudios sobre diferentes grupos animales cuyos movimientos se han monitorizado mediante el sistema Argos (Fancy et al. 1988, Keating et al. 1991, Kenward 2001, Vincent et al. 2002, Soutullo et al. 2007).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Metodología general _____

De manera general, en la presente tesis doctoral se han utilizado los datos pertenecientes a LC 3, 2 y 1. Además, se han tomado aquellas posiciones que, perteneciendo a una LC menor o no garantizada (LC 0, A y B), eran congruentes con el desplazamiento de los juveniles en términos de distancia recorrida y tiempo transcurrido entre localizaciones. Los datos de LC Z no fueron utilizados, ya que indican que el PTT envió señal, pero no proporcionan la posición de los individuos. Para seleccionar los datos adecuados también se tuvo en cuenta información disponible sobre la extensión de los movimientos realizados por juveniles seguidos mediante GPS (capítulo 3 de esta tesis).

Referencias.

- Argos. 1996. User's Manual. CLS/Service Argos. Toulouse.
- Fancy, S.G., Pank, L.F., Douglas, D.C., Curby, C.H., Garner, G.W., Amstrup, S.C. & Regelin, W.L. 1988. Satellite telemetry: a new tool for wildlife research and management. US Fish and Wildlife Service Resource Publication 172.
- Keating, K.A., Brewster, W.G. & Key, C.H. 1991. Satellite telemetry: performance of animal-tracking systems. *Journal of Wildlife Management* 55: 160-171.
- Kenward, R.E. 2001. *A Manual for Wildlife Radio Tagging*. Londres: Academic Press.
- Soutullo, A., Cadahía, L., Urios, V., Ferrer, M. & Negro, J.J. 2007. Accuracy of lightweight satellite telemetry: a case study in the Iberian Peninsula. *Journal of Wildlife Management*. DOI 10.2193/2006-42
- Vincent, C., McConnel, B.J., Fedak, M.A. & Ridoux, V. 2002. Assessment of Argos location accuracy from satellite tags deployed on captive grey seals. *Marine Mammal Science* 18: 301-322.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 1

Estimating the onset of dispersal
in endangered Bonelli's Eagle *Hieraaetus*
fasciatus tracked by satellite telemetry:
a comparison among methods.

Cadahía, L., López-López, P., Urios, V. & Negro, J.J. Ibis. Aceptado.

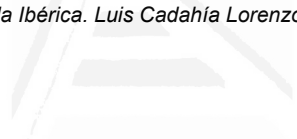


Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Abstract.

Defining the onset of dispersal can be difficult, so studies typically rely on their own subjective rules. We used data from 14 satellite-tracked Bonelli's Eagles *Hieraaetus fasciatus* to compare the appropriateness of 9 methods that identify the onset of dispersal. The methods were also tested by comparing them with high quality GPS data from two birds fitted with Argos/GPS transmitters. Birds were tagged as nestlings in eastern Spain between 2002 and 2004 and followed by satellite telemetry during their first year of life. Four of the methods set a minimum distance, based on the parental territory size, beyond which dispersal was considered to have occurred. Five methods used the juveniles' pattern of movements, relying on either the direct observation of birds' behaviour or the use of the coefficient of variation to identify a period of increased variability in the distances to the nest. Except for one, the results of all methods were not significantly different. However, the most consistent results were from methods that applied a condition that sought to lessen the effect of early exploratory movements. Direct observation of birds' behaviour provided the best agreement with GPS data. The results highlight that Bonelli's Eagle behaves as a clear disperser species. The advantages and disadvantages of each method are discussed and the combined use of two methods to describe the onset of dispersal in Bonelli's Eagle when studied by satellite telemetry is proposed.

Key words: Argos satellite telemetry; Bonelli's Eagle; GPS satellite telemetry; *Hieraaetus fasciatus*; onset of dispersal.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Introduction.

Dispersal is an essential process in population biology (Gadgil 1971, Johnson & Gaines 1990, Kenward *et al.* 2002) that links diverse ecological, evolutionary and behavioural factors (Andreassen *et al.* 2002). It is composed of three sequential, behaviourally different phases: emigration, transfer and immigration (Andreassen *et al.* 2002). The movement of a bird leaving its natal home range and thereafter settling in a breeding place was named 'dispersal' by Howard (1960) and Berndt and Sternberg (1968), and 'natal dispersal' by Greenwood and Harvey (1982). The movement between different breeding grounds was named 'breeding dispersal' by Greenwood and Harvey (1982). Movements performed by juveniles once they become independent have also been called 'juvenile dispersal' (González *et al.* 1989). Kenward *et al.* (2002) proposed a more detailed description of these movement events, based on defining home range as an "area repeatedly traversed within a life path" and dispersal as an "unidirectional movement between home ranges".

Whatever the name, the emigration phase corresponding to the end of the post-fledging period (Tyack *et al.* 1998, Mínguez *et al.* 2001) and departure from the natal home range is usually difficult to determine precisely. Because of this, dispersal can be best detected by *post hoc* examination of the data (Kenward *et al.* 2002). Even then, determination of the 'onset of dispersal' is not straightforward and different studies have defined this differently (e.g. Ferrer 1993, Kenward *et al.* 1993, Walls & Kenward 1995, Cadahía *et al.* 2005). Different factors, including the accuracy of the tracking system or the rate at which location data are collected, may make it difficult to estimate precisely when birds leave their natal territories. Moreover, the onset of dispersal may not always be a particular event, but rather a process, in which juveniles progressively detach from the territory of their parents. Some studies have documented a period between the moment juveniles become independent from the adults in terms of food and the moment they move away from the natal home range, named 'local dispersal' by Ferrer (2001) (see also Arroyo *et al.* 1992, Real *et al.* 1998).

The difficulty to detect *post hoc* the onset of dispersal becomes particularly apparent when studying animals by satellite telemetry using the Argos system. Up until recently, the use of alternative systems, like GPS, was not possible in birds given the great volume of tags. However, the recent availability of light-weight GPS satellite telemetry might help clarify this, given the greater number of locations and the higher accuracy it provides. Soutullo *et al.* (2006) evaluated several methods intended to detect the onset of dispersal in Golden Eagles *Aquila chrysaetos* studied by satellite telemetry, and posed the question as to how they would perform on different species. Here we assess the performance of the methods they evaluated in satellite tracked Bonelli's Eagles *Hieraaetus fasciatus*, an 'endangered' raptor in Europe (Real 2004), using two different approaches. First, we compare the relative consistency among methods using Argos tracking data only. Afterwards we compare these results with GPS data from two juveniles experimentally fitted with Argos/GPS transmitters. We describe the onset of dispersal in these two birds and compare it with the results obtained when applying the methods used by other authors. The relative performance of the methods and the advantages and drawbacks of them are also discussed. Finally, a combined approach to describe the onset of dispersal in Bonelli's Eagle when studied by satellite telemetry is proposed.

Methods.

Birds' tagging.

Between 2002 and 2004 we tagged 14 juvenile Bonelli's Eagles with satellite transmitters (PTT, Platform Transmitter Terminals) in eastern Spain (Communities of Valencia, Catalonia and Murcia) (Fig. 1), 12 nestlings and two recent fledglings, using a breakaway Teflon harness (Kenward 2001). Blood samples were used to sex the individuals (Griffiths *et al.* 1998, Fridolfsson & Ellegren 1999). Birds were fitted with three types of PTTs: five 30-g battery powered PTT-100s, seven 35-g solar powered PTT-100s and two 45-g Argos/GPS PTT-100s, manufactured by Microwave Telemetry, Inc. (USA) (www.microwavetelemetry.com). Transmitters were set to an 8-h on / 120-h off duty cycle, except for the two Argos/GPS PTTs,

which were set to 16-h on / 72-h off. Argos/GPS transmitters permit birds to be tracked by the Argos and the GPS systems simultaneously. Transmitter's weight never exceeded 3% of the birds' body mass (2.1 ± 0.5 %, mean \pm SD; $n = 14$; range: 1.3 – 3.0%), as recommended by Kenward (2001).

Estimation of the locations was made by Argos system, a satellite-based location and data collection system (Argos 1996, Kenward 2001). Argos location classes (LC) 3, 2 and 1, with nominal accuracy < 150 m, 150-350 m and 350-1000 m, respectively, were used in this study (Argos 1996, but see Keating *et al.* 1991, Soutullo *et al.* in press). We also included locations of lower quality (LC 0, A and B), using available information on eagles' movements, based on high quality GPS data and on Argos accuracy tests (see Cadahía *et al.* in press, Soutullo *et al.* in press), to filter the data sets.

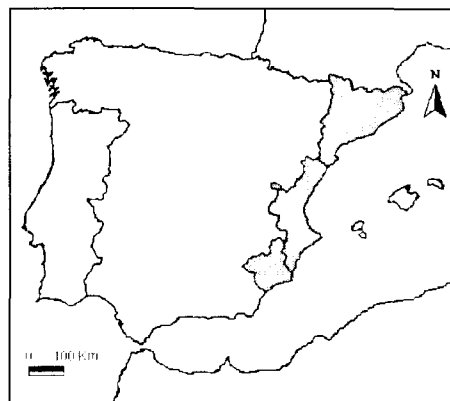


Figure 1: Study area in eastern Spain where 14 Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* nestlings were tagged with satellite transmitters to study their dispersal period.

Onset of dispersal in Argos-tracked birds.

Birds were tracked throughout their first year of life or until the PTT's signal was lost. To identify the onset of dispersal, here defined as the moment when juveniles become independent from their parents, a comparison between nine methods was performed (Soutullo *et al.* 2006). The average distance between nests in the region where birds were tagged was 10.1 km – 12.7 km (mean = 11.4 km, $n = 205$) (Arroyo *et al.* 1995). We considered the onset of dispersal to happen (1) the first day the bird was located beyond the average inter-nests distance (11.4 km) and (2) beyond the parental territory, estimated as a circular home range of radius equal to half the inter-nests distance (5.7 km) (McLeod *et al.* 2002). To avoid considering



premature exploratory movements ('excursions') as actual dispersal, a condition of not being located within those distances in the two following records was incorporated – methods (3) and (4), respectively (Kenward *et al.* 1993, Walls & Kenward 1995) (Table 1). If a clear dispersal event could be recognised, i.e., an abrupt departure from the nest area and subsequent settlement in a different range (Walls & Kenward 1995), dispersal was considered to happen (5) the first day after that sudden departure (for posterior settlement see Cadahía *et al.* 2005). This method differs from the rest in not being computed but being based on visual observation of the pattern of locations.

The last four methods assumed that the onset of dispersal is characterized by the contrast between the restricted pre-dispersal movements and the subsequent exploratory stage. This will probably be reflected by an increased variability in the distances to the nest which can be used to detect dispersal (Soutullo *et al.* 2006). The study time was divided into 30-day long months and the coefficient of variation (CV) of the distance to the nest was calculated for each month. The onset of dispersal was considered to be (6) the date halfway through the period in which the CV was maximum. Similarly, the moving averages and variances were calculated every 3, 5 and 10 consecutive locations (one record forward each time), the CV computed for each of those periods and the onset of dispersal defined as the date halfway through the 3, 5 or 10 locations period where the CV was maximum (Soutullo *et al.* 2006) (methods (7), (8) and (9), respectively) (Table 1). Because of the duty cycle of the PTTs, the mean number of days between consecutive locations ranged from 0.07 (SD = 0.27) to 20.36 (SD = 10.43).

We used a Kruskal-Wallis test to compare the age at the onset of dispersal calculated by each method and a Games-Howell multiple comparison test (Zar 1999) to perform all two-method comparisons. Within every method the CV was computed and utilized as a measure of internal consistency (Soutullo *et al.* 2006), making it possible to compare the relative amounts of variation among methods.



Onset of dispersal in GPS-tracked birds.

The GPS data from the two Argos/GPS-tagged (non-sibling) birds were grouped into 10-day periods after fledging, and average distance to the nest in each period was computed. As one of the birds' signal was lost around 160 days after fledging, analyses of both individuals were carried out until that moment. A Kruskal-Wallis test was used to compare the distance to the nest amongst all periods, and a Games-Howell multiple comparison test (Zar 1999) to perform all two-period comparisons. With this analysis we obtained the age at the onset of dispersal estimated from the GPS data for these two birds. We compared this value with those estimated using only Argos data (from the same birds) by each of the nine methods explained above. All analyses were carried out with SPSS 13.0.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

Table 1: Methods used to estimate the age at the onset of dispersal in 14 Bonelli's Eagles *Hieraetus fasciatus* tracked by satellite telemetry in Spain.

Method	Description	Advantages	Disadvantages	Citation
(1)	First day beyond average inter-nests distance (1.4 km).	Simple to compute fixes beyond threshold.	Requires natal territory data; biased by excursive behaviour.	Soutullo <i>et al.</i> 2006.
(2)	First day beyond circular parental territory (radius 5.7 km).	Simple to compute fixes beyond threshold.	Requires natal territory data; biased by excursive behaviour.	Soutullo <i>et al.</i> 2006.
(3)	(1) + not within that distance the next two records.	Minimises excursion-based bias.	Requires natal territory data.	Kenward <i>et al.</i> 1993, Walls & Kenward 1995.
(4)	(2) + not within that distance the next two records.	Minimises excursion-based bias..	Requires natal territory data.	Kenward <i>et al.</i> 1993, Walls & Kenward 1995.
(5)	Observed location pattern.	Observation of pattern of all locations.	Not computed.	Walls & Kenward 1995.
(6)	Date halfway through the 30-day "month" with maximum CV in distance to the nest.	Computed from distribution of all locations.	Requires many location data.	Soutullo <i>et al.</i> 2006.
(7)	Date halfway through the 3 consecutive locations period (one record forward each time) with maximum CV in distance to the nest.	Computed from distribution of all locations.	Requires many location data.	Soutullo <i>et al.</i> 2006.
(8)	Date halfway through the 5 consecutive locations period (one record forward each time) with maximum CV in distance to the nest.	Computed from distribution of all locations.	Requires many location data.	Soutullo <i>et al.</i> 2006.
(9)	Date halfway through the 10 consecutive locations period (one record forward each time) with maximum CV in distance to the nest.	Computed from distribution of all locations.	Requires many location data.	Soutullo <i>et al.</i> 2006.

Results.

Table 2 shows the dispersal dates determined by the nine methods. On average, dispersal occurred in August, around the fifth month of life. Method (2) (circular parental territory radius) estimated a significantly lower age at dispersal than the others ($H = 19.715$, d.f. = 8, $p = 0.011$). Apart from it, all other two-method comparisons did not differ significantly (Games-Howell test $p > 0.254$). The most consistent method, i.e., that with a lowest internal variation (lowest CV), was method (3) (average inter-nests distance + 2 records), followed by method (5) (observed location pattern). The highest internal variation occurred in the methods using the circular parental territory radius, i.e., (2) and (4), followed by method (1) (average inter-nests distance). Those methods involving the CV scored intermediate levels of consistency (Table 2).

According to method (5), only one bird behaved as drifter (Walls & Kenward 1995), i.e., wandered away from its natal home range until it died the following winter. Another (Argos-tracked) bird stayed within the inter-nests distance except for one excursion, in which it reached 19 km from the nest, then returned to the natal home range and died before performing any sudden departure.

When studying the post-fledging period of the two Argos/GPS-tagged birds, three distinct phases became apparent (Games-Howell test $p > 0.058$). The first one lasted until the 20th day and the second one until the 105th day after fledging (91st and 176th day after hatching, respectively). We considered the onset of dispersal to happen at the beginning of the last phase (i.e., at 105th day after fledging). When applying the nine methods to the Argos data of these two birds, the determination of dispersal using the GPS data was most similar to method (5) (observed location pattern) (Table 2).

Table 2: Age (in days) at the onset of dispersal in 14 Bonelli's Eagles *Hieraaetus fasciatus* estimated by nine different methods based on either the natal home range size or the patterns of movement in Spain.

Bird	Sex	(1) beyond 11,4 km	(2) beyond 5,7 km	(3) 11,4 km + 2 records	(4) 5,7 km + 2 records	(5) observed location pattern	(6) 1st year monthly CV	(7) 1st year 3-year records CV	(8) 1st year 5-year records CV	(9) 1st year 10-year records CV
1	F	150	134	150	134	drifter	153	145	144	144
2	M	177	120	177	177	183	121	177	177	162
3	F	150	150	150	150	156	102	150	150	150
4	M	158	147	158	158	158	133	147	147	158
5	F	114	114	114	114	114	102	103	93	114
6	F	135	85	135	135	135	127	112	107	90
7	F	152	152	163	152	163	156	152	152	141
8	F	136	109	died before	136	died before	125	125	157	141
9 (Argos)	M	90	63	150	63	150	95	147	144	141
10 (Argos)	F	111	108	147	147	174	154	144	168	159
9 (GPS)	M	141	133	145	133	151	127	96	113	150
10 (GPS)	F	132	121	159	121	183	167	112	157	156
11	M	138	90	154	127	154	146	148	143	138
12	F	109	109	141	141	141	120	135	135	130
13	F	130	130	135	130	140	140	135	135	130
14	F	131	131	148	148	148	140	136	136	148
mean		134,4	117,3	147,8	136,6	151,3	129,6	139,7	142,0	139,0
SD		22,86	25,96	15,16	26,07	18,18	20,10	18,10	21,63	19,05
CV (%)		17,0	22,1	10,3	19,1	12,0	15,5	13,0	15,2	13,7

Discussion.

The nine methods intended to detect the onset of dispersal can be grouped into three different categories. Methods (1) to (4) are based on the knowledge of the natal home range size and set a minimum distance beyond which dispersal occurred. These methods share the drawback that researchers have to subjectively decide upon the distance to set (e.g., Kenward *et al.* 1993, Ferrer 2001, Cadahía *et al.* 2005). In line with Soutullo *et al.* (2006), we found that using the inter-nest distances is a more consistent decision than using the home range radius, because it probably does not realistically depict the shape of the parental territory. The condition introduced in methods (3) and (4) aims at avoiding biases caused by early exploratory movements (Kenward *et al.* 1993, Walls & Kenward 1995). Its usage not only yields the most consistent result - method (3) -, but also estimates relatively late dispersal dates, indicating that other methods prematurely define excursions as dispersal for some individuals (Table 2).

The second category comprises method (5) and here the detection of dispersal is based on the observation of movement patterns. The movements of an animal throughout its life can be described as a path encompassing repetitive movements within home ranges and transition movements between them (Kenward *et al.* 2001). The first area Bonelli's Eagle fledglings traverse in their lives is their natal home range, and the first transition movement they perform will be the departure from it, i.e., the onset of dispersal. Method (5) detects this transition movement by direct observation of the birds' behaviour, since it occurs in a sudden way which is easily recognizable in this species. The elevated consistency and the coincidence between this method and the high quality GPS data must be emphasized, since it performs better than most of the computed solutions, despite being based on the observer's interpretation. Its usefulness is linked to the fact that raptors, in general, tend to disperse abruptly (Kenward *et al.* 2002), which also seems to be the case in our study, where all birds but one behaved as clear dispersers (Table 2).

In the third category, dispersal is detected using a mathematical approach. Methods (6) to (9) assume that the CV of the distance to the nest is at its maximum during the period in which birds leave their natal home range (Soutullo *et al.* 2006).



These methods should in principle be particularly useful, because they only require the location data with no information about distribution or size of breeding territories. Nonetheless, they provide heterogeneous results in terms of consistency. Bonelli's Eagle juveniles make early exploratory movements before definitively leaving the parental territory. During these excursions the variability in distances to the nest increases in a particular period, resulting in an enlarged CV value and, possibly, in a premature detection of dispersal. Furthermore, estimating centre-period dispersal dates may be too inaccurate when periods considered are too long because of intermittent nature or low volume of data, as it occurs with satellite telemetry (1 to 20 days in this study). That is the probable reason for the lower consistency of method (6) (monthly CV), compared with the other CV-based methods.

The GPS system holds several advantages over conventional Argos telemetry. It provides a greater number of fixes, its nominal accuracy is better than 15 m (Microwave Telemetry 2006) and its performance seems to be better than Argos' transmitters right after tagging. These features make GPS tracking especially suitable for the detailed study of the post-fledging period, which is otherwise difficult to survey by conventional Argos telemetry. Furthermore, the relative inaccuracy of Argos locations would require larger thresholds when detecting dispersal by methods (1) to (4) than would be necessary for GPS (or VHF) data. The small difference between the age at dispersal estimated by method (5) (observed location pattern) and that calculated with the GPS reinforces the idea that Bonelli's Eagle is a species with well developed disperser behaviour (dispersing abruptly, exploring and eventually settling; Walls & Kenward 1995).

Based on our results, we propose the combined use of method (3) (average inter-nests distance + 2 records), i.e., the most consistent one, and method (5) (observed location pattern), i.e., the most similar to the high-quality GPS data and the second most consistent, to describe the onset of dispersal in Bonelli's Eagle when tracked by satellite telemetry. Real *et al.* (1998) considered young Bonelli's Eagles to be independent once parental feeding ceased. Ferrer (2001) also considers independence to happen when young Spanish Imperial Eagles *Aquila adalberti* stop



being fed by their parents, and thinks this event is synchronous to juveniles' departure from the natal home range. Unfortunately, it is not possible to observe when parental feeding ceases by satellite telemetry, but we also consider this as one plausible explanation for the onset of dispersal. In addition, some studies regard dispersal as a sudden movement in Bonelli's Eagle (Real *et al.* 1998, Mínguez *et al.* 2001), which is in line with Kenward *et al.*'s (2001) 'transition-between-home-ranges' concept and the tendency of raptors to disperse abruptly (Kenward *et al.* 2002). For these reasons, we propose using method (5) to identify dispersal when high-quality GPS data are available. In those cases in which only Argos data are accessible, we recommend the use of method (3). This proposal applies to Bonelli's Eagle, a clear disperser species, when tracked by satellite telemetry. Its performance in species with more complex dispersal behaviour has still to be surveyed.



Acknowledgements.

Thanks are due to the Conselleria de Territori i Habitatge of the Generalitat Valenciana (J. Jiménez, P. Mateache, A. Izquierdo and A. García i Sanz) and the Spanish Ministerio de Medio Ambiente (V. García Matarranz, P. García Domínguez) for permission to get access to the nests, partial funding and priceless field assistance. This project was funded by Terra Natura Foundation. We are grateful to Á. Soutullo, C. García, R. Kenward and an anonymous referee for critical comments on early drafts of the manuscript. L. Cadahía is supported by a grant of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (reference AP2001-1444). This paper is part of L. Cadahía's Ph.D. at the University of Alicante.

References.

- Andreassen, H.P., Stenseth, N.C. & Ims, R.A. 2002. Dispersal behaviour and population dynamics of vertebrates. In: Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. (eds) *Dispersal Ecology*. Oxford: Blackwell.
- Argos. 1996. User's Manual. CLS/Service Argos, Toulouse.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1992. Factores Limitantes de la Población de Águila Perdicera en España. Technical report. Madrid: ICONA.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1995. El águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en España. Censo, reproducción y conservación. Technical report. Madrid: Technical collection ICONA.
- Berndt, R. & Sternberg, H. 1968. Terms, studies and experiments on the problems of bird dispersion. *Ibis* 110: 256-269.
- Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. 2005. Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's Eagles *Hieraaetus fasciatus* during their first winter. *Ibis* 147: 415-419.
- Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* juvenile dispersal: hourly and daily movements tracked by GPS. *Bird Study* 54. In press.
- Ferrer, M. 1993. Juvenile dispersal behaviour and natal philopatry of a long-lived raptor, the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti*. *Ibis* 135: 132-138.
- Ferrer, M. 2001. The Spanish Imperial Eagle. Barcelona: Lynx Edicions.
- Fridolfsson, A.-K. & Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.
- Gadgil, M. 1971. Dispersal: population consequences and evolution. *Ecology* 52: 253-261.
- González, L.M., Heredia, B., González, J.L. & Alonso, J.C. 1989. Juvenile dispersal of Spanish Imperial Eagles. *Journal of Field Ornithology* 60: 369-379.
- Greenwood, P.J. & Harvey, P.H. 1982. The natal and breeding dispersal of birds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 1-21.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Howard, W.E. 1960. Innate and environmental dispersal of individual vertebrates. *American Midland Naturalist* 63: 152-161.
- Johnson, M.L. & Gaines, M.S. 1990. Evolution of dispersal: theoretical models and empirical tests using birds and mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 449-480.
- Keating, K.A., Brewster, W. G., and C. H. Key. 1991. Satellite telemetry: performance of animal-tracking systems. *Journal of Wildlife Management* 55: 160-171.
- Kenward, R.E. 2001. *A Manual for Wildlife Radio Tagging*. London: Academic Press.
- Kenward, R.E., Marström, V. & Karlbom, M. 1993. Post-nestling behaviour in goshawks, *Accipiter gentilis*: I. The causes of dispersal. *Animal Behaviour* 46: 365-370.
- Kenward, R.E., Rushton, S.P., Perrins, C.M., Macdonald, D.W. &

Capítulo 1

- South, A.B. 2002. From marking to modelling: dispersal study techniques for land vertebrates. In: Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. (eds) *Dispersal Ecology*. Oxford: Blackwell.
- Kenward, R.E., Walls, S.S. & Hodder, K.H. 2001. Life path analysis: scaling indicates priming effects of social and habitat factors on dispersal distances. *Journal of Animal Ecology* 70: 1-13.
- McLeod, D.R.A., Whitfield, D.P., Fielding, A.H., Haworth, P.F. & McGrady, M.J. 2002. Predicting home range use by Golden Eagles *Aquila chrysaetos* in western Scotland. *Avian Science* 2: 183-198.
- Microwave Telemetry. 2006. <http://www.microwavetelemetry.com>. Access 14 April 2006.
- Mínguez, E., Angulo, E. & Siebering, V. 2001. Factors influencing length of the post-fledging period and timing of dispersal in Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in Southwestern Spain. *Journal of Raptor Research* 35: 228-234.
- Real, J. 2004. Águila-azor perdicera, *Hieraaetus fasciatus*. In: Madroño A, González C. & Atienza JC (eds). *Red Book of the Birds of Spain*. Libro Rojo de las Aves de España. Dirección General para la Biodiversidad-SEO/Birdlife. Madrid.
- Real, J., Mañosa, S. & Codina, J. 1998. Post-nestling dependence period in the Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus*. *Ornis Fennica* 75: 129-137.
- Soutullo, A., Cadahía, L., Urios, V., Ferrer, M. & Negro, J.J. Accuracy of lightweight satellite telemetry: a case study in the Iberian Peninsula. *Journal of Wildlife Management*. In press.
- Soutullo, A., Urios, V., Ferrer, M. & Peñarrubia, S. 2006. Post-fledging behaviour in Golden Eagles *Aquila chrysaetos*: onset of juvenile dispersal and progressive distancing from the nest. *Ibis* 148: 307-312.
- Tyack, A.J., Walls, S.S. & Kenward, R.E. 1998. Behaviour in the post-nestling dependence period of radio-tagged Common Buzzards *Buteo buteo*. *Ibis* 140: 58-63.
- Walls, S. & Kenward, R. 1995. Movements of radio-tagged buzzards *Buteo buteo* in their first year. *Ibis* 137: 177-182.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th edn. New Jersey: Prentice Hall.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 2

D

ispersal of raptors
detected by location distribution
and vectors.

Cadahía, L., Kenward, R.E., Walls, S.S., Marcström, V., Nygård, T., Einvik, K.,
López-López, P., Soutullo, A. & Urios, V. *Journal of Animal Ecology*.
En revisión.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Abstract.

Many studies of dispersal require accurate detection of when an animal departs from its natal area. However, use of arbitrary detection rules has hindered comparisons within and between previous studies. We use data from five raptor species to compare three methods for detecting the time of dispersal. A new location distribution-and-vector method (DAV) is compared with the previous subjective method based on direct observation of location patterns (OLP) and another objective method based on an inter-nest distance-threshold (INT). DAV was more consistent than OLP, and more accurate in terms of known behaviour for each species, in assigning birds to 'disperser', 'non-disperser' and 'ambiguous' categories, with intermediate results for INT. Agreement between methods was greatest for species in which all juveniles disperse. DAV also gave the earliest detection of dispersal when sampling was by VHF telemetry, and dates comparable with OLP and INT for the less precise locations from the Argos satellite system. Dispersal detection computed from the distribution and vectors of radio-tracking locations provided a method for comparing dispersal behaviour between species that was more consistent than the alternatives, as well as being least resource-demanding in terms of observer effort needed to make subjective estimates or record nest-spacing.

Key words: animal movement patterns; dispersal detection; distribution and vector detector; inter-nest threshold; observed location pattern.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

**Introduction.**

Dispersal is an ecological process which has great importance in dynamics, spatial distribution and genetic structure of populations (Johnson & Gaines 1990; Paradis *et al.* 1998; Clobert *et al.* 2001; Bullock, Kenward & Hails 2002). In birds, the initial stage of dispersal consists of a decision to leave the natal area (emigration), followed by transitional (transfer) and settlement phases (immigration) (Clobert *et al.* 2001; Andreassen, Stenseth & Ims 2002). Investigating causes of leaving, as well as factors acting in the transfer and settlement phases, depends on accurate detection of when birds leave their natal area. However, although there are quantitative studies of individual raptors radio-tracked during the post-fledging period (Kenward, Marcström & Karlbom 1993a, b; Tyack, Walls & Kenward 1998; Mínguez, Angulo & Siebering 2001), it is hard to detect in the field when they leave their parental territories (Kenward *et al.* 2002). The variety of dispersal behaviours between and within species (Greenwood & Harvey 1982; Walls & Kenward 1995; Paradis *et al.* 1998) makes this detection even more complicated.

Several intrinsic or environmental factors acting at different scales may be involved in the dispersal process, including nutritional condition of juveniles (Ferrer 1992; Balbontín & Ferrer 2005), food availability (Walker 1988; Wood, Collopy & Sekerak 1998; Kenward, Walls & Hodder 2001; Mínguez *et al.* 2001), potential effect of siblings (Ferrer 1992; Massot & Clobert 2000; Kenward *et al.* 2001; Massot *et al.* 2003), sex (Kenward *et al.* 1993a, b), weather (Ferrer 1993b; Walls, Kenward & Holloway 2005) and the potential quality of territories for settling (Walls *et al.* 1999; Ekman *et al.* 2001). The identification of relationships between such factors and dispersal often needs an accurate estimation of when the event takes place. However this estimation has typically relied on subjective or arbitrary rules (e.g. Ferrer 1993a; Kenward *et al.* 1993a; Walls & Kenward 1995; Mínguez *et al.* 2001; Cadahía, Urios & Negro 2005; Montadert & Léonard 2006). Thus, subjectivity affects the results and hinders comparison between studies.

Some attempts have been made to determine the most appropriate means to identify the time of dispersal. Soutullo *et al.* (2006) compared monthly variability in distances to the nest of Golden eagles *Aquila chrysaetos* by computing the



coefficient of variation (CV), but this (a) requires high numbers of locations that are normally available only from automated tracking (e.g. by satellite or GPS tags) and (b) tends to underestimate age at dispersal when excursive activity is present (Cadahía *et al.* in press). In comparison, Cadahía *et al.* (in press) found the use of the inter-nest distance to set a threshold to be a more consistent estimator of dispersal in Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus*, although direct observation of location patterns (OLP) yielded the best result when compared with high quality GPS data. Unfortunately, OLP gives scope for subjectivity, since it is not computed in any way.

In this paper we compare a computed method, based on location distributions and vectors (DAV), with both the observed-location-pattern method and the inter-nest distance-threshold (INT), using data from five raptor species collected with and without automation. DAV and INT were computed within Ranges 6 software (Kenward, South & Walls 2003). The subjective OLP method was applied by ten people to estimate dispersal dates for the same data set. The study objectives were to elucidate which of the three systems was most consistent in detecting dispersal and to establish which setting for the DAV method was most concordant with other methods for between-species comparisons.

Materials and Methods.

Location data came from 74 birds belonging to five raptor species (Table 1). They were tracked either with VHF radios or the Argos satellite system, as described by Walls & Kenward (1995) for buzzards, Kenward *et al.* (1993a) for goshawks, Nygård, Kenward & Einvik (2000) for sea-eagles, Soutullo *et al.* (2006) for golden eagles and Cadahía *et al.* (in press) for Bonelli's eagles.



Table 1: Location data sets used to compare the performance of the distribution-and-vector (DAV), the observed-location-pattern (OLP) and the inter-nest distance-threshold (INT) dispersal detection methods.

Species	n	Tracking system	Where	When	Inter-nest distance (m)	Tracking frequency
Common Buzzard (<i>Buteo buteo</i> Linnaeus)	20	Radio (VHF)-tracking	Southern England	1990 – 1993	1500 (n=195)	From twice a week to once a month
Northern Goshawk (<i>Accipiter gentilis</i> Linnaeus)	20	Radio (VHF)-tracking	Gotland, Sweden	1980 – 1985	3371 (n=23)	Every 2–5 days
White-tailed Sea-eagle (<i>Haliaeetus albicilla</i> Linnaeus)	20	Radio (VHF)-tracking	Northern Norway	1989 – 1993	4055 (n=23)	Every 5 to 12 days for August-October, then once a month
Golden Eagle (<i>Aquila chrysaetos</i> Linnaeus)	8	Argos satellite telemetry	Southeast Spain	2002 – 2003	10000 ^a (n=61)	Every 5 days
Bonelli's Eagle (<i>Hieraetus fasciatus</i> Vieillot)	6	Argos satellite telemetry	Spain	2002 – 2003	11400 ^b (n=205)	Every 5 days
Total	74	-	-	-	-	-

^aUrios 1986, Sánchez-Zapata *et al.* 2000.

^bArroyo *et al.* 1995.

*Distribution-and-vector dispersal detector (DAV).*

The DAV method starts by measuring the distances and the direction from the nest to each single location. It is based on the principle that if locations around the nest conform to a particular distribution before dispersal, locations after dispersal will (i) fall outside that distribution and (ii) occur in one direction (Kenward *et al.* 2002). The system uses the distribution of locations around the nest to set a threshold for likely pre-dispersal distance. The first three locations beyond that threshold define dispersal only if they are all beyond the threshold along a “movement vector” (i.e. in the same direction), to reduce the risk of premature detector triggering through omni-directional excursions and accuracy-based scattering. As it is based on the distribution of locations, the detector does not need a natal area size estimate, although a “minimum dispersal distance” (*MDD*) is required to avoid early false-triggering when VHF-tracked birds merely leave the nest but not yet the natal area. The *MDD* also accommodates accuracy-based scattering of Argos satellite data. To arrive at a standard for the *MDD*, settings of 5X, 10X and 20X were used, where X was the tracking resolution (100m in radio-tracking, 1000m in satellite tracking).

The DAV dispersal detection starts with the first 3 locations (**N**), and estimates their arithmetic mean centre (Ac_1) and their confidence limit for distance from the Ac_1 , using pre-set probability levels of either 1%, 5% or 10% and assuming a circular normal distribution around the Ac_1 . It then estimates the arithmetic mean for the next **n** locations in the data set (Ac_2), where **n** is usually 3 (but see below), and defines the “movement vector” (i.e. average direction of dispersal) between Ac_1 and Ac_2 . The detector triggers (i.e. dispersal is recognised) if the orthogonal distances of the **n** locations along this vector are all outside the confidence limit for the first **N** (i.e. 3). If not, **N** increments by 1 and the process repeats through the set of locations (Fig. 1). The estimation is only rigorous with $\mathbf{N+n} > 5$. However, missing values in the data set are assumed to represent occasions when the animal was sought but not found and was outside the confidence limit for the current **N**. Therefore, dispersal is recognised with a minimum of 4 (3+1) locations if

coordinates for the last two locations are missing (Kenward 2001; Kenward *et al.* 2002).

The data for each bird were assigned to one of the categories ‘disperser’, ‘non-disperser’ or ‘ambiguous’ by using the nine possible combinations of *MDD* (5X, 10X, 20X) and significance level (1%, 5%, 10%). Those birds for which all nine analyses agreed that they had dispersed were set as ‘dispersers’. Conversely, those birds in which all the analyses considered them not to have dispersed were set as ‘non-dispersers’. The remaining cases were set as ‘ambiguous’.

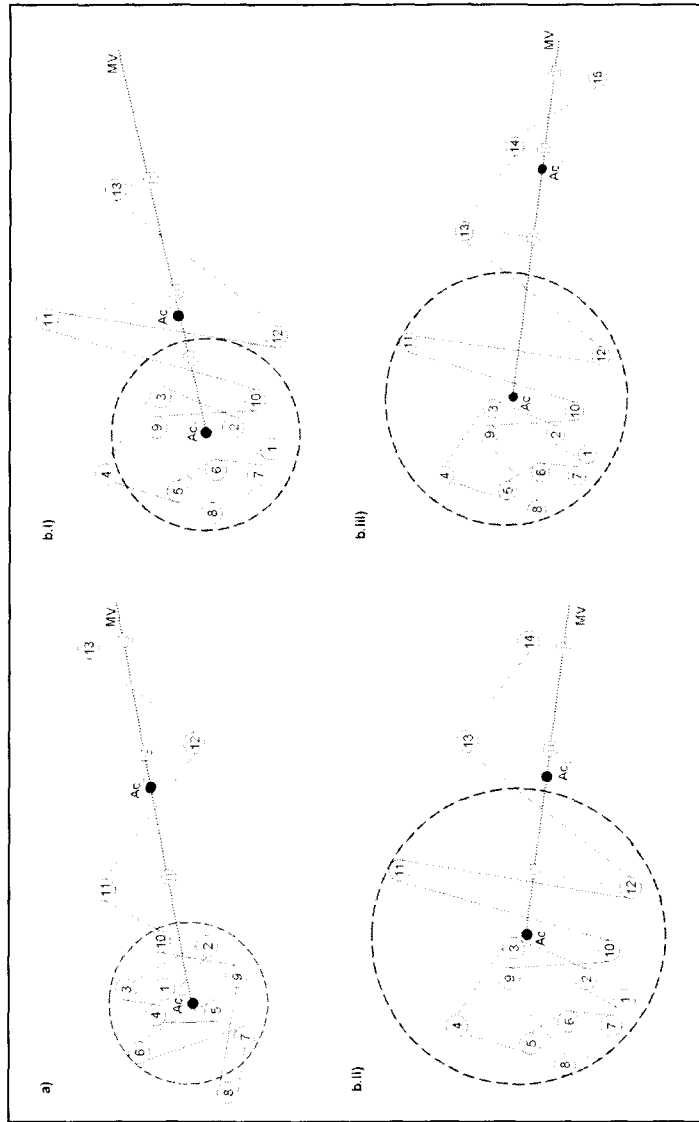
Observed-location-pattern method (OLP).

To compile subjective decisions about dispersal, ten people unfamiliar with dispersal studies were trained by displaying map and distance patterns for birds exhibiting three different behaviours: a clear disperser, a drifter and an animal following a “staying-at-home” strategy (Walls & Kenward 1995), as represented in Fig. 2 a,b,c. They were then shown the 74 sets of location data and asked to record whether the bird dispersed and, if so, on what day of the year. For comparison between methods, we considered as ‘ambiguous’ those birds with between eight and two positive replies (binomial probability ≥ 0.11), as ‘non-dispersers’ those with zero or one positive replies and as ‘dispersers’ those with 10 or nine positive answers (binomial probability ≤ 0.02 in both cases).

Inter-nest distance threshold method (INT).

Inter-nest distances, used as distance thresholds for detecting dispersal, were calculated using Ranges 6 for buzzards, goshawks and sea-eagles and retrieved from the literature in the case of golden and Bonelli’s eagles (Urios 1986; Arroyo, Ferreiro & Garza 1995; Sánchez-Zapata *et al.* 2000) (Table 1). Dispersal was recorded the first day each bird flew beyond this threshold and was not located within that distance from the nest in the two following records (Kenward *et al.* 1993a; Walls & Kenward 1995; Soutullo *et al.* 2006; Cadahía *et al.* in press). There was no ‘ambiguous’ category.

Figure 1: Functioning of the DAV dispersal detector (Ac_1 and Ac_2 : arithmetic mean centres for the N and n locations, respectively; MV: movement vector; 11', 12', etc.: orthogonal projection of the n locations on the movement vector).
 a) Dispersal is detected because all n distances, i.e., 11' to Ac_1 , 12' to Ac_1 and 13' to Ac_1 , are outside the confidence limit (circle) for the first N , in this case the first ten locations. b.i) Although Euclidean distances from Ac_1 to 11, 12 and 13 are beyond the confidence limit of the first ten locations (N), the orthogonal distance



of 12 along the movement vector is not and so dispersal is not flagged. b.ii) Adding location 13, with the confidence limit expanded from Ac_1 by adding the 11th location, dispersal is not flagged because the distance 12'- Ac_1 is now not outside the new confidence limit until. (b.iii) adding the next location puts orthogonal distances 13' to Ac_1 , 14' to Ac_1 and 15' to Ac_1 all outside the confidence limit for N (now 12 locations) and the DAV detector triggers.

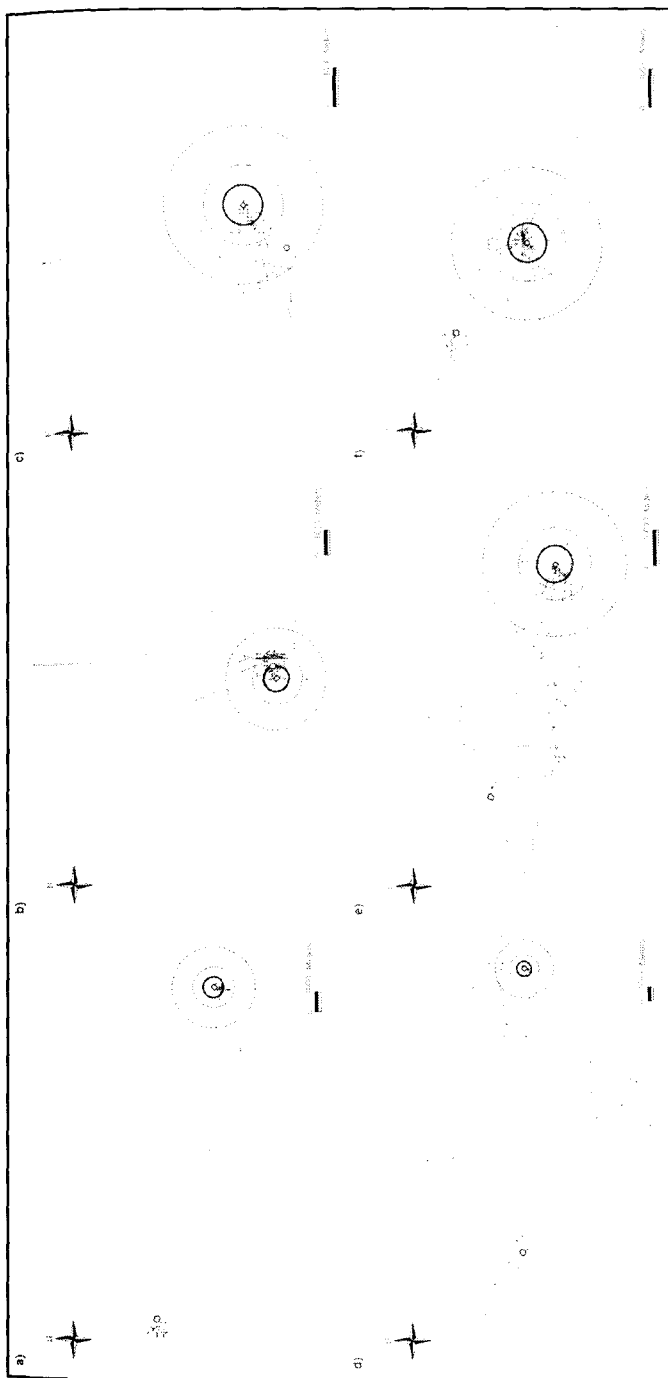


Figure 2: Examples of different movement patterns of raptors during dispersal. Diamonds indicate nests and small circles indicate the last location. The concentric circles correspond to three *MDD* (minimum dispersal distance) settings of 5X, 10X and 20X the tracking resolution, respectively, used within the DAV method to detect dispersal (see methods). a) Disperser buzzard; b) non-disperser buzzard; c) ambiguous buzzard; d) disperser golden eagle and f) ambiguous golden eagle. Note the different scale between a), b), c) and d) (VHF radio-tracked birds) and e) and f) (Argos tracked birds), due to the different accuracy of the tracking system.

*Comparisons between methods.*

We compared the overall number of birds considered as 'ambiguous' by the DAV and OLP methods and explored this relationship within each species. Bonelli's and golden eagles' data sets were not included in this comparison because of the low sample size.

The five species exhibit known differences in dispersal behaviour. For instance, buzzard behaviour is known to be complex at dispersal, with individuals exhibiting different strategies (dispersing in autumn or in the following spring, making many excursions and sometimes drifting rather than dispersing abruptly) (Walls & Kenward 1995, 1998). In contrast, all young goshawks on Gotland had been considered by experienced researchers to leave their natal areas in autumn (Kenward *et al.* 1993a) and the same was true for sea-eagles in northern Norway (Nygård *et al.* 2000). Thus, those cases in which either people, the INT method or the DAV detector set a goshawk or sea-eagle as 'non-disperser' were considered as misassignments or "errors". The number of misassignments was compared between the three methods (pairwise comparisons) using the Wilcoxon test within relevant data sets.

A categorical value (*AGREE*) was used to compare OLP with DAV. *AGREE* reflected both agreement among the 10 OLP responses for each bird and whether it dispersed or not. Subtracting the number of negative responses from the number of positive responses (and dividing by two) gave *AGREE* scores from -5 to 5 in which negative values represent 'non-dispersers' and positive values represent 'dispersers', with higher absolute values representing more agreement among people. Concordance values from binary logistic regression of *AGREE* on DAV scores of dispersed (1) or not dispersed (0) were obtained for each of the nine DAV settings.

The dispersal dates calculated with each DAV setting were compared, firstly, with a median "observed" dispersal date estimated from the ten OLP responses for each bird (nine comparisons) and, secondly, with the date estimated by the INT method (nine comparisons). The dispersal dates estimated by OLP and INT were also compared, in all cases using a Wilcoxon test. All these analyses were carried

out separately for each species. Statistical analyses were performed in MINITAB version 13.0 and SPSS version 13.0.

Results.

The DAV detector considered six birds ‘ambiguous’ (e.g. Fig. 2c,f), in contrast to 25 from the OLP method (Fig. 3a), with equal or greater ambiguity from OLP in each species. Differences were greatest for goshawks and sea-eagles, for which there was no ambiguity in DAV computations compared with ambiguous OLP ratings for 11 and 4 birds, respectively (Fig. 3a). Ambiguity was greatest in both DAV and OLP methods for buzzards, in which both methods also recorded most non-dispersers. Ambiguity was most strongly associated with non-dispersal by this species with the DAV method (‘non-dispersers’/‘dispersers’ ratio vs. ‘ambiguous’, Spearman’s $\rho = 0.894$, $p = 0.041$, see Fig. 3b).

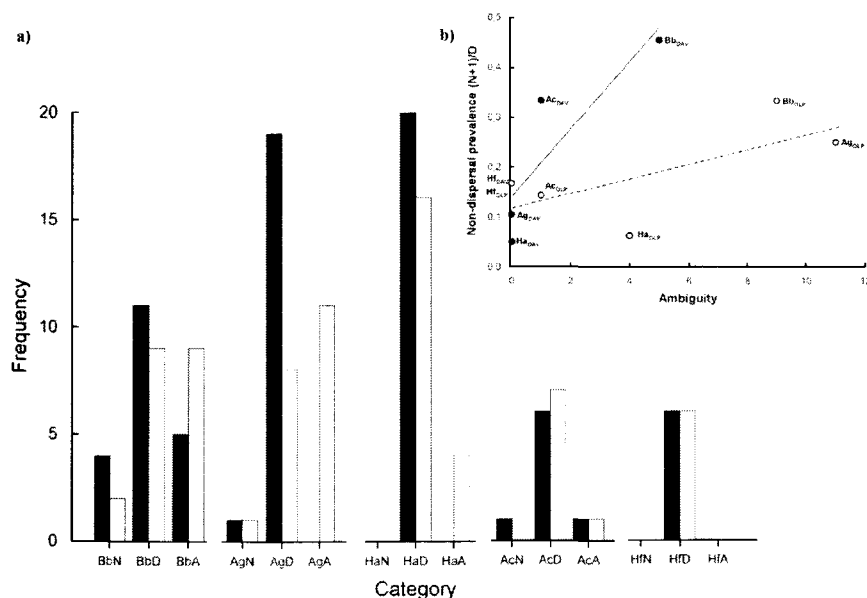


Figure 3a: Number of birds set as ‘non-dispersers’ (N), ‘dispersers’ (D) and ‘ambiguous’ (A) by DAV (black columns) and OLP (white columns) within five raptor species (Bb: buzzards *Buteo buteo*; Ag: goshawks *Accipiter gentilis*; Ha: sea-eagles *Haliaeetus albicilla*; Ac: golden eagles *Aquila chrysaetos*; Hf: Bonelli’s eagles *Hieraaetus fasciatus*). **Figure 3b:** The prevalence of non-dispersal (N+1/D) plotted against ambiguity (A) for the five species for DAV (filled circles) and OLP (open circles).



The DAV detector misassigned one of 40 goshawks and sea-eagles to the 'non-disperser' category whereas the INT method misassigned five. With the OLP method, five of ten people misassigned one bird, three people had 4-6 errors, one had 16 and one had 30. The number of misassignments differed significantly between the DAV and OLP methods ($Z = -2.023$; $p = 0.043$) but not between INT and OLP ($Z = -0.483$; $p = 0.629$).

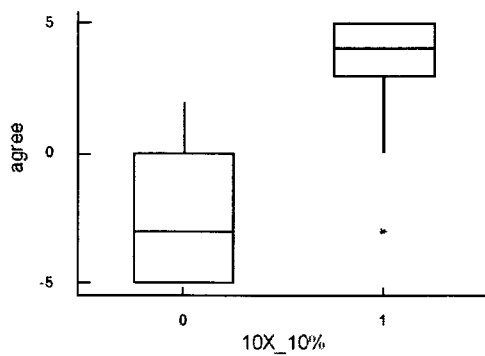


Figure 4: Boxplot of the OLP variable *AGREE* against DAV dispersal results (for which 0 = non-dispersers, 1 = dispersers) with the most concordant combination of settings (10X tracking resolution, 10% probability level).

A tracking resolution of 10X and a 10% probability level provided the best agreement between DAV and OLP (Table 2). However, the 5X setting gave similar concordance and only the 20X setting was appreciably worse. For those birds that the DAV detector considered 'dispersers', the interquartile range of human OLP assessments was narrower (greater agreement) than for 'non-dispersers' (Fig. 4), for which the OLP interquartiles spread from complete agreement on dispersal (category -5) to ambiguity (category 0).

Concordance value	1%	5%	10%
5X	97.3%	97.3%	97.3%
10X	97.4%	97.4%	97.4%
20X	87.5%	92.5%	94.4%

Table 2: Concordance values output from a binary logistic regression of the variable *AGREE* (see Methods) against the nine combinations of settings of the DAV dispersal detector.

All nine DAV settings provided similar dispersal dates to OLP (i.e. comparisons were non-significant) for Bonelli's and golden eagles ($p > 0.102$ in all 18 cases), but this occurred in only seven instances for goshawks (with $p < 0.012$ in the other two cases), three for buzzards (with $p < 0.035$ in the other six cases) and none for sea-eagles ($p < 0.001$ in all nine cases) (Fig. 5). Results from the INT method and the DAV detector were similar for Bonelli's eagle ($p > 0.180$ in all nine cases), but INT gave less agreement than DAV with OLP for golden eagles ($p < 0.039$ in two cases), goshawks ($p < 0.05$ in eight cases) and buzzards ($p < 0.028$ in eight cases). Median dispersal dates estimated by DAV, OLP and INT were within 10 days for Bonelli's eagles and goshawks (Table 3), and within a month for golden eagles. However, dates from OLP or INT could exceed two months later than from DAV for buzzards and sea-eagles, with differences between INT and OLP also significant ($p = 0.005$) for the latter species.

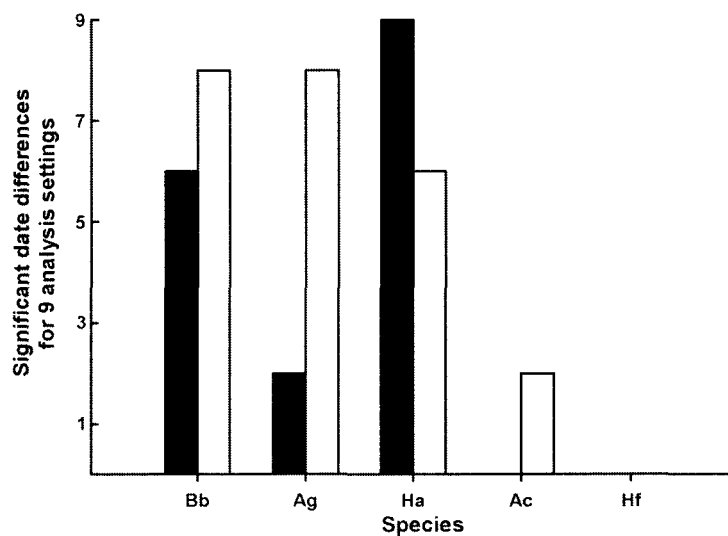


Figure 5: Columns represent dissimilarity of estimated dates of dispersal (i.e. number of significant differences in pairwise comparisons) for the nine analysis settings of the DAV detector with either the subjective OLP method (filled columns) or the inter-nest distance-threshold-based (INT) method (empty columns), for five raptor species (Bb: buzzards *Buteo buteo*; Ag: goshawks *Accipiter gentilis*; Ha: sea-eagles *Haliaeetus albicilla*; Ac: golden eagles *Aquila chrysaetos*; Hf: Bonelli's eagles *Hieraaetus fasciatus*).

Table 3: Median, range, mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV%) of the dispersal day estimated from the distribution-and-vector (DAV), the observed-location-pattern (OLP) and the inter-nest distance-threshold (INT) methods for five raptor species.

Species	Statistics	DAV	OLP	INT
<i>Buteo buteo</i>	Median (min – max)	240 (220 – 551)	277 (199 – 480)	305 (223 – 463)
	Mean	308.6	315.2	337.8
	SD	109.38	71.81	97.29
	CV (%)	35.4	22.8	28.80
<i>Accipiter gentilis</i>	Median (min – max)	230 (222 – 264)	232 (221 – 450)	238 (222 – 472)
	Mean	232.4	247.2	258.9
	SD	6.22	33.12	62.67
	CV (%)	2.7	13.4	24.20
<i>Haliaeetus albicilla</i>	Median (min – max)	281 (221 – 576)	353 (210 – 1487)	305.5 (252 – 576)
	Mean	304.1	417.9	338.7
	SD	65.36	140.25	84.45
	CV (%)	21.5	33.6	24.94
<i>Aquila chrysaetos</i>	Median (min – max)	325 (266 – 436)	294 (165 – 508)	317 (266 – 381)
	Mean	337.9	313.4	321.6
	SD	57.95	74.94	49.41
	CV (%)	17.2	23.9	15.36
<i>Hieraaetus fasciatus</i>	Median (min – max)	225 (186 – 252)	228 (186 – 282)	220.5 (186 – 252)
	Mean	222.6	230.9	221.2
	SD	22.88	21.08	23.04
	CV (%)	10.3	9.1	10.42

Discussion.

Researchers frequently use arbitrary rules to define when dispersal occurs (Kenward *et al.* 2002; Cadahía *et al.* in press), which hinders finding a universal method to determine when a bird leaves its parental territory. A better alternative is to apply tools that are as objective and rational as possible (Kenward *et al.* 2001). The DAV dispersal detector uses both the distribution of locations and a dispersal vector, to avoid false dispersal detections due to omni-directional excursions or the accuracy-scattering of Argos system. Use of the pattern subjectivity by people gave results that were less consistent, not only by categorising more birds as 'ambiguous' than with the DAV detector but also by providing a higher number of misassignments.

At the species level, the different performance of the DAV and OLP methods probably results mainly from real interspecific differences in dispersal behaviour. Goshawks, Bonelli's and sea-eagles are disperser species (Kenward *et al.* 1993a; Nygård *et al.* 2000; Cadahía *et al.* 2005) whereas golden eagles and, especially, buzzards exhibit more complex dispersal patterns (Walls & Kenward 1995, 1998; Soutullo *et al.* 2006). It was therefore very appropriate that the DAV approach only found 'ambiguous' birds amongst these two species (Fig. 3). Buzzard juveniles were especially prone to drift and excursive behaviour (Walls & Kenward 1995). Such individuals were considered 'dispersers' with one combination of DAV settings and 'non-dispersers' with another. Thus, varying the DAV settings can indicate when behaviour is genuinely ambiguous without the subjectivity of the OLP method (Fig. 2, Fig. 3).

DAV settings need to accommodate differences in movement patterns between species, with all individuals dispersing in some whereas in other cases some juveniles stay in the nest vicinity (see Greenwood & Harvey 1982; Walls & Kenward 1995, 1998; Kenward *et al.* 2002), and also differences in movement patterns within species. For example, low probability levels should help to avoid false positives in species prone to perform excursions. Although setting a realistic *MDD* may be important, the probability level had little effect on the result for 10X and 5X the tracking resolution (Table 2). The differences occurred with 20X,

perhaps because movements, and hence location patterns, are more complex at that distance than in the nest vicinity because birds move in a less site-orientated way after dispersal (Fig. 2). The 10X threshold also concurs with previous arbitrary estimates. Thus, Kenward *et al.* (1993a) considered VHF-tracked goshawks to have dispersed when they flew beyond 1.5 km from the nests, Walls & Kenward (1995) used 1 km for similarly tracked buzzards, while Soutullo *et al.* (2006) used 10 km with golden eagles and Cadahía *et al.* (in press) 11.4 km for Bonelli's eagles when both species were tracked by satellites.

The agreement between the DAV and OLP methods was higher in 'disperser' than 'non-disperser' birds, probably because people most easily recognise clear patterns. Typical 'disperser' data consisted of a number of locations around the nest, then a clear and often abrupt break which corresponded to dispersal, with the following locations assembling again when the bird settled elsewhere (Walls & Kenward 1995; Andreassen *et al.* 2002; Kenward *et al.* 2002). The clear and sudden break was easy to recognise, unlike other movement patterns like drifting away from the nest or performing several excursions but not eventually leaving. Thus, recognising dispersal was easier for people than unquestionably rejecting it.

The three methods also differed between species in estimating the day of dispersal. Almost complete agreement between DAV, OLP and INT for Bonelli's eagle may partly reflect small sample size, but also that it is considered a 'disperser' species (Cheylan *et al.* 1996; Real, Mañosa & Codina 1998; Cadahía *et al.* 2005), because the same correspondence between methods was found for goshawk. The similarity of dates from DAV and INT also confirms the value of using the inter-nest distance to detect dispersal in Bonelli's eagle in previous studies (Cadahía *et al.* in press). The reduced agreement of dates from DAV and INT for golden eagles may well be due to this species exhibiting more complex dispersal behaviour (Soutullo *et al.* 2006), with agreement also especially poor with the complex dispersal patterns of buzzards (Walls & Kenward 1995). The large differences in dates estimated by different methods for sea-eagles (with the only serious discrepancy between OLP and INT) may reflect the low frequency of locations (Table 1). INT provided some agreement with the DAV detector, but perceiving clear movement patterns for OLP

was not straightforward for the 10 observers and gave little agreement with DAV. However, despite the relatively small number of locations, the DAV method gave the same median date as estimated by the experienced radio-tracker of this species (Nygård *et al.* 2002).

The coincidence of INT and DAV was poor for individual goshawks (Fig. 5), with relatively very high variability for estimates from INT although they were only an average 8 days later (Table 3). This was probably in part because the inter-nest distance-threshold for goshawks was 3.5 km, whereas radio-trackers reported that birds flying beyond 1.5 km did not usually return to their nests (Kenward *et al.* 1993a). Setting too large a threshold, for forest-dwelling hawks with dispersal perhaps less influenced by parental home range size than in the other species, would predispose late detection with the INT method. However, it was noticeable that DAV gave earlier dispersal dates for all species tracked by VHF telemetry, probably because the precision of the technique is served best by accurate data. Data from the ARGOS system were at least an order of magnitude less accurate than the VHF tracking (Cadahía *et al.* in press), which would hinder computation of accurate distributions and vectors until dispersal was clearly established.

Although DAV performed surprisingly well with low numbers of locations (Table 1), researchers should ideally locate animals at a rate giving at least 10 locations before the earliest dispersal or, if delayed, once every 2-3 days. The highest sampling effort should be in the initial stages of birds' life, so that the likelihood of missing dispersal is low, but the expense of sampling may require trade-offs. *MDD* settings of 5X and 10X the tracking resolution provided the most consistent results in this study and the combination 10X-10% significance level will hold the best agreement with subjective perception. To obtain a subjective estimate of dispersal tendency, a comparison with 20X and 1% might be useful.

The CV-based method used by Soutullo *et al.* (2006) requires a higher sampling frequency than used for these animals and gave poorer results than INT for the Bonelli's eagle data (Cadahía *et al.* in press). It would be interesting to compare the CV method with DAV for analysing large samples of accurate locations, like those collected by GPS. Conceivably, DAV performance will deteriorate with a



Capítulo 2

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

location frequency greater than once a day, as it may trigger with multiple locations during the same excursion unless there is either (i) subsampling or (ii) increase in the number of locations along a vector that are required for triggering. An automated detector of this type could also be run backwards along animal trajectory data to estimate settling dates objectively and hence divide behaviour into temporary home ranges and transitions (Kenward 2001).

Acknowledgements.

We are indebted to Louise Bardsley, Kathleen Beyer, Claire Cailles, Brian Cresswell, Felicity Crotty, Nicola Gammans, Carolyn Night, Alison Poole, Robert Porteous and Helen Vincent for very kindly carrying out the OLP method. The Spanish eagles (golden and Bonelli's eagles) were tagged and tracked thanks to the Conselleria de Territori i Habitatge of the Generalitat Valenciana (Juan Jiménez, Paloma Mateache, Alejandro Izquierdo and Antoni García i Sanz), the Spanish Ministerio de Medio Ambiente (Víctor García Matarranz, Paco García Domínguez) and Terra Natura Foundation. Goshawk tracking depended extensively on Mats Karlbom, with funding from the Swedish Sportsmens' Association and the German section of Conseil International de la Chasse. Buzzard fieldwork was funded by the Natural Environment Research Council and Biotrack, with contributions from the Royal Society for the Protection of Birds and English Nature, fieldwork assistance from Kathy Hodder and technical help from Andy South and Ralph Clarke. Field assistance in tracking sea-eagles was provided by Bjørn Staven, Ole Martin Dahle and Steinar Garstad. The first author is supported by a grant of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (reference AP2001-1444). This paper is part of Luis Cadahía's PhD at the University of Alicante.

References.

- Andreassen, H.P., Stenseth, N.C. & Ims, R.A. 2002. Dispersal behaviour and population dynamics of vertebrates. In: Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. (eds) *Dispersal Ecology*. Oxford: Blackwell.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1995. El águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en España. Censo, reproducción y conservación. Technical report. Madrid: Technical collection ICONA.
- Balbonín, J. & Ferrer, M. 2005. Factors affecting the length of the post-fledging period in the Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus*. *Ardea* 93: 189-198.
- Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. (eds). 2002. *Dispersal Ecology*. Oxford: Blackwell.
- Cadahía, L., López-López, P., Urios, V. & Negro, J.J. Estimating the onset of dispersal in endangered Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* tracked by satellite telemetry: a comparison among methods. *Ibis*. In press.
- Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. 2005. Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's Eagles *Hieraaetus fasciatus* during their first winter. *Ibis* 147: 415-419.
- Cheylan, G, Ravayrol, Cugnasse, J.-M., Billet J.-M. & Joulot, C. (1996) Dispersion des Aigles de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* juveniles bagués en France. *Alauda* 64: 413-419.
- Clobert, J., Danchin, E., Dhont, A.A. & Nichols, J. (eds). 2001. Dispersal – causes, consequences and mechanisms of dispersal at the individual, population and community level. Oxford: Oxford University Press.
- Ekman, J., Eggers, S., Griesser, M. & Tegelström, H. 2001. Queuing for preferred territories: delayed dispersal of Siberian jays. *Journal of Animal Ecology* 70: 317-324.
- Ferrer, M. 1992. Natal dispersal in relation to nutritional condition in Spanish imperial eagles. *Ornis Scandinavica* 23: 104-107.
- Ferrer, M. 1993a. Juvenile dispersal behaviour and natal philopatry of a long-lived raptor, the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti*. *Ibis* 135: 132-138.
- Ferrer, M. 1993b. Wind-influenced juvenile dispersal of Spanish Imperial Eagles. *Ornis Scandinavica* 24: 330-333.
- Greenwood, P.J. & Harvey, P.H. 1982. The natal and breeding dispersal of birds. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 13: 1-21.
- Johnson, M.L. & Gaines, M.S. 1990. Evolution of dispersal: theoretical models and empirical tests using birds and mammals. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 21: 449-480.
- Kenward, R. 2001. *A manual for wildlife radio tagging*. London, San Diego: Academic Press.
- Kenward, R.E., Marcström, V. & Karlbom, M. 1993a. Post-nestling behaviour in goshawks, *Accipiter gentilis*: I. The causes of dispersal. *Animal Behaviour* 46: 365-370.
- Kenward, R.E., Marcström, V. & Karlbom, M. 1993b. Post-nestling behaviour in goshawks, *Accipiter gentilis*: II. Sex differences in sociality and nest-switching. *Animal Behaviour* 46: 371-378.

- Kenward, R.E., Rushton, S.P., Perrins, C.M., Macdonald, D.W. & South, A.B. 2002. From marking to modelling: dispersal study techniques for land vertebrates. In: Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. (eds). *Dispersal Ecology*. Oxford: Blackwell.
- Kenward, R.E., South, A.S. & Walls, S.S. 2003. Ranges6: for the analysis of tracking and location data. Online manual. Anatrack Ltd. Wareham, UK.
- Kenward, R.E., Walls, S.S. & Hodder, K.H. 2001. Life path analysis: scaling indicates priming effects of social and habitat factors on dispersal distances. *Journal of Animal Ecology* 70: 1-13.
- Massot, M. & Clobert, J. 2000. Processes at the origin of similarities in dispersal behavior among siblings. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 707-719.
- Massot, M., Huey, R.B., Tsuji, J. & van Berkum, F.H. 2003. Genetic, prenatal and postnatal correlates of dispersal in hatchling fence lizards (*Sceloporus occidentalis*). *Behavioural Ecology* 14: 650-655.
- Mínguez, E., Angulo, E. & Siebering, V. 2001. Factors influencing length of the post-fledging period and timing of dispersal in Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in Southwestern Spain. *Journal of Raptor Research* 35: 228-234.
- Montadert, M. & Léonard, P. (2006) Post-juvenile dispersal of Hazel Grouse *Bonasa bonasia* in an expanding population of the southeastern French Alps. *Ibis* 148: 1-13.
- Nygård, T., Kenward, R.E. & Einvik, K. (2000) Radio telemetry studies of dispersal and survival in juvenile white-tailed sea-eagles *Haliaeetus albicilla* in Norway. In: Chancellor, R.D. & Meyburg, B.-U. (eds). *Raptors at risk*. WWGBP / Hancock House.
- Paradis, E., Baillie, S.R., Sutherland, W.J. & Gregory, R.D. 1998. Patterns of natal and breeding dispersal in birds. *Journal of Animal Ecology* 67: 518-536.
- Real, J., Mañosa, S. & Codina, J. 1998. Post-nestling dependence period in the Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus*. *Ornis Fennica* 75: 129-137.
- Sánchez-Zapata, J.A., Calvo, J.F., Carrete, M. & Martínez, J.E. 2000. Age and breeding success of a Golden Eagle *Aquila chrysaetos* population in southeastern Spain. *Bird Study* 47: 235-237.
- Soutullo, A., Urios, V., Ferrer, M. & Peñarrubia, S. 2006. Post-fledging behaviour in Golden Eagles *Aquila chrysaetos*: onset of juvenile dispersal and progressive distancing from the nest. *Ibis* 148: 307-312.
- Tyack, A.J., Walls, S.S. & Kenward, R.E. 1998. Behaviour in the post-nestling dependence period of radio-tagged Common Buzzards *Buteo buteo*. *Ibis* 140: 58-63.
- Urios, V. 1986. Biología, requerimientos ecológicos y relaciones interespecíficas del águila real *Aquila chrysaetos homeyeri* Severtrov, 1888 y del águila perdicera *Hieraaetus fasciatus fasciatus* Vieillot, 1822 (Accipitriformes, Accipitridae) en la Provincia de Valencia. BSc thesis, University of Valencia.
- Walker, D.G. 1988. The behaviour and movements of a juvenile



Capítulo 2

- Golden Eagle *Aquila chrysaetos* in England in 1986. *Ibis* 130: 564.
- Walls, S. & Kenward, R. 1995. Movements of radio-tagged buzzards *Buteo buteo* in their first year. *Ibis* 137: 177-182.
- Walls, S. & Kenward, R. 1998. Movements of radio-tagged buzzards *Buteo buteo* in early life. *Ibis* 140: 561-568.
- Walls, S., Kenward, R. & Holloway, G.J. 2005. Weather to disperse? Evidence that climatic conditions influence vertebrate dispersal. *Journal of Animal Ecology* 74: 190-197.
- Walls, S., Mañosa, S., Fuller, R.M., Hodder, K.H. & Kenward, R. 1999. Is early dispersal enterprise or exile? Evidence from radio-tagged Buzzards. *Journal of Avian Biology* 30: 407-415.
- Wood, P.B., Collopy, M.W. & Sekerak, C.M. 1998. Post-fledging nest dependence period for Bald Eagles in Florida. *Journal of Wildlife Management* 62: 333-339.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 3

B

onelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* juvenile dispersal: hourly and daily movements tracked by GPS.

Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. Bird Study 54. En prensa.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Abstract.

Bonelli's eagles *Hieraaetus fasciatus* cover daily distances not normally exceeding 20 km during the initial phase of dispersal, with the daily peak of movement-activity in the afternoon.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

The Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus*' main strongholds in the Western Palaearctic occur in the Iberian Peninsula and Morocco (Arroyo *et al.* 1995, Palma *et al.* 1996, Real & Mañosa 1997). This western population has undergone a marked decline during recent decades (Real & Mañosa 1997, Real *et al.* 2001), and the species has been reclassified from 'vulnerable' to 'endangered' in Spain (Madroño *et al.* 2003). Most studies of Bonelli's eagles have been concerned with breeding biology and population status (Real & Mañosa 1997, Real *et al.* 1998, Ontiveros 1999, Gil-Sánchez *et al.* 2004), as well as dispersal behaviour (Cheylan *et al.* 1996, Real & Mañosa 2001, Cadahía *et al.* 2005). Nevertheless, various features of the dispersal process, such as the distance the species covers during a given time, remain unknown. Such information is important for understanding behaviours as foraging or habitat selection (Clobert *et al.* 2001). Furthermore, as pre-adult mortality is high in the species (Real & Mañosa 1997, Carrete *et al.* 2002), knowledge of the distances covered by juveniles during the early stages of dispersal, a particularly vulnerable time (Newton 1979), might help to inform conservation measures.

Here we use GPS satellite telemetry to investigate the distances juvenile Bonelli's Eagles cover in an hour and in a day during the initial phase of dispersal. This information may also be a useful guide for researchers using other less accurate tracking systems, such as the conventional Argos telemetry system, when removing unreliable locations from the data sets (Douglas 2000, Hays *et al.* 2001, Vincent *et al.* 2002). As the movements of Bonelli's Eagles during the post-fledging dependence period are limited to a restricted area (Real *et al.* 1998, Mínguez *et al.* 2001), we only analysed movements undertaken after the onset of dispersal (first movement beyond 20 km from the nest; Cadahía *et al.* 2005) and collected data until November, when the transmitter of one of the birds ceased functioning. Consequently, we present distances covered by Bonelli's Eagles during the first three months of juvenile dispersal.

Two nestling Bonelli's Eagles (a male and a female), whose natal nests were 23.8 km apart, were tagged with Argos/GPS solar powered transmitters (Microwave Telemetry Inc. USA, 45g, 83.5 x 28.8 x 21.0 mm, antenna 18 cm) in eastern Spain (province of Castellón) on 14 and 17 May 2004, respectively. Both nests were



located on cliffs surrounded by Mediterranean shrubland. Blood samples were taken to sex the individuals by molecular techniques (Griffiths *et al.* 1998, Fridolfsson & Ellegren 1999). The GPS transmitters were attached to the birds' backs using a breakaway Teflon harness (Kenward 2001) when they were approximately 50 days old. This is the first time Bonelli's Eagles have been fitted with this type of transmitter.

Argos/GPS transmitters contain a GPS receiver which records locations at pre-set intervals (one hour in this study) from the GPS satellites network. These data are then relayed to ground-based Argos processing centres. The GPS system holds two advantages over conventional Argos telemetry: (1) its resolution accuracy is higher than 100 m, better than all Argos locations (Service Argos 1996, Microwave Telemetry); and (2) it can record positions at regular time intervals, making it possible to study particular behaviour patterns, such as hourly movements.

Hourly distances were computed as the straight distance between two successive locations recorded one hour apart. Locations were recorded between 08:00 and 23:00 hours, local time (GMT + 2). The Kruskal-Wallis test was used to evaluate between-hour differences on the distances covered by each bird throughout the day. Subsequently, the data from both birds were pooled together and the Games-Howell multiple comparison test (Zar 1999) was performed to define the daily peak of movement-activity. Daily distances were estimated as the length of the straight line joining the two locations recorded furthest away within a given day (Soutullo *et al.* 2006). Argos/GPS transmitters, although potentially providing hourly fixes, do not always perform to optimal standards, so gaps in the transmitting period were present. We therefore considered only days in which at least three locations were recorded, with at least one of them within the individuals' peak of movement-activity (Soutullo *et al.* 2006), avoiding excessive underestimation of the actual daily distances. The Wilcoxon test was used to explore seasonal changes by comparing the daily distances in summer and autumn (before and after the 1st October; Walls *et al.* 2005). Altogether, 283 hourly movements from 49 days in the female and 359 hourly movements from 58 days in the male were analysed. Statistical analysis was carried out in SPSS version 11.5 (SPSS Inc. 1990).

In both birds, hourly distances changed significantly throughout the day (female $H = 131.29$, $df = 14$, $P < 0.01$; male $H = 110.97$, $df = 14$, $P < 0.01$) (Table 1). The maximum distance recorded in one hour was close to 50 km, although it was below 5 km (83.6%) in most instances. In 89% of the hourly movements the distance covered was less than 10 km and in 95% it was less than 20 km (Fig. 1). The majority of long-distance movements took place between 13:00 and 18:00 hours, the peak of movement-activity, with maximum distances being covered between 13:00 and 14:00 hours. Both birds moved hardly at all after 21:00 hours (Table 1).

The median daily distance was 6.3 km (mean = 23.7). On only 3.7% of the days did the birds cover more than 100 km. These long movements occurred almost exclusively within the first three days after the onset of dispersal, except for one large movement performed by the male in mid-October. In the remaining time, periods with daily distances not exceeding 20 km (68.2%) alternated with less frequent episodes of higher movement-activity, though no seasonal pattern was observed ($P > 0.110$). The maximum distance covered in a particular day was 236.6 km and the most distant locations were 592 km away from the nest for the female and 346 km for the male.

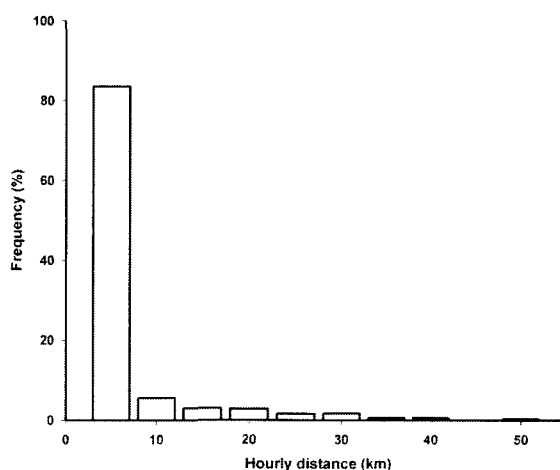


Figure 1: Distribution of the hourly distances travelled by two juvenile Bonelli's Eagles tracked by GPS satellite telemetry in Spain.



Table 1: Hourly distances (in km) covered by two juvenile Bonelli's Eagles tracked by GPS satellite telemetry in Spain during the initial phase of dispersal.

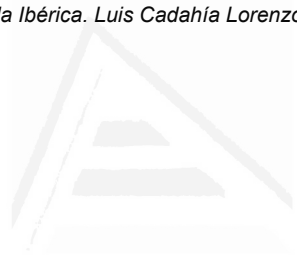
Local hour	Female (n = 283)			Male (n = 359)			Both birds		
	Median	Min-Max	sd	Median	Min-Max	sd	Median	Min-Max	sd
8-9	0.3	0.0-1.6	0.3	0.3	0.0-2.2	0.5	0.3	0.0-2.2	0.5
9-10	0.5	0.0-1.5	0.1	0.1	0.0-1.8	0.4	0.2	0.0-1.8	0.5
10-11	0.4	0.0-15.1	0.3	0.3	0.0-5.6	1.4	0.3	0.0-5.6	2.7
11-12	0.2	0.0-17.5	0.6	0.6	0.0-12.2	4.2	0.4	0.0-12.2	4.2
12-13	2.8	0.0-25.2	0.6	0.6	0.0-37.9	11.0	0.7	0.0-37.9	11.0
13-14	16.9	0.0-49.9	3.3	3.3	0.0-45.8	14.3	3.8	0.0-45.8	14.3
14-15	8.3	0.0-25.2	1.0	1.0	0.0-29.8	9.4	5.7	0.0-29.8	9.4
15-16	6.0	0.3-32.9	0.9	0.9	0.0-17.6	8.4	1.6	0.0-17.6	8.4
16-17	1.5	0.0-28.5	1.2	1.2	0.0-18.7	7.4	1.3	0.0-18.7	7.4
17-18	1.8	0.0-40.2	1.1	1.1	0.0-18.3	8.0	1.4	0.0-18.3	8.0
18-19	0.4	0.0-28.9	0.3	0.3	0.0-6.5	5.3	0.4	0.0-6.5	5.3
19-20	0.2	0.0-3.6	0.1	0.1	0.0-4.7	0.9	0.2	0.0-4.7	0.9
20-21	0.0	0.0-1.0	0.0	0.0	0.0-2.6	0.5	0.0	0.0-2.6	0.5
21-22	0.0	0.0-0.1	0.0	0.0	0.0-0.1	0.0	0.0	0.0-0.1	0.0
22-23	0.0	0.0-0.1	0.0	0.0	0.0-0.4	0.1	0.0	0.0-0.4	0.1

The initial phase of juvenile dispersal is a crucial moment in the life history of raptors, since it is the time when juveniles definitively leave the nest area but are still vulnerable and naive (Newton 1979). The distances they cover, the places they visit and the daily activity patterns they exhibit will probably affect their chances of surviving.

The greatest movements of Bonelli's Eagles are registered predominantly during the afternoon. This may be explained by the juveniles taking advantage of thermals, which are more likely to occur around midday and during the afternoon (Ballam 1984). Soaring on thermals to gain height, alternating with periods of gliding, has been proved to favour long-distance movements (Pennycuick 1998), and is the most likely explanation for the pattern we observe here. The use of thermals has been reported to account for higher flying activity at midday in a number of raptor species (e.g. Haller 1996, Ferrer 2001, Sarasola & Negro 2005).

Although Bonelli's Eagles can be regarded as long-distance dispersers (Cheylan *et al.* 1996, Real & Mañosa 2001, Cadahía *et al.* 2005), the majority of their daily movements occur in a limited area, with an average distance of less than 20 km. The largest movements the species performed were restricted to isolated and infrequent episodes, which usually occurred immediately after the onset of dispersal. This suggests that juveniles moved long distances after leaving the natal territory but settled and performed movements of lesser extent soon after that. Thus, the initial phase of dispersal must have occurred over a short period of time, as suggested for other raptors, such as Common Buzzards *Buteo buteo* (Walls *et al.* 2005).

Besides providing the first detailed description of the daily movements of Bonelli's Eagles, our results may also be useful for researchers using conventional Argos satellite telemetry, which often provides data of low accuracy (Keating *et al.* 1991, Hays *et al.* 2001). The distances recorded using the GPS system, more accurate than Argos, may be of help when filtering Argos data. Fixes corresponding to movements in which birds seem to cover unrealistically long distances can be removed according to the actual (hourly or daily) distances registered with the GPS. The degree of reliability of a particular location can be deduced from the likelihood of birds covering a certain distance in a given time period. This can be estimated



Capítulo 3

from the frequency of different movement distances of the kind that we provide here (Fig. 1). Therefore, our results can be used by other researchers to assess the reliability of locations obtained using the Argos system.

Acknowledgements.

We are grateful to the Consellería de Territori i Habitatge of the Generalitat Valenciana (P. Mateache, M. Romanillos, C. Dolz, A. Izquierdo and A. García i Sanz) and the Spanish Ministerio de Medio Ambiente (V. García Matarranz, P. García Domínguez) for their permission to get access to the nests and invaluable field assistance. Argos staff patiently solved our hesitations. Comments from A. Soutullo, R. Limiñana, O. Monroy-Vilchis and A. Gamauf, as well as those from Sean Walls and Phil Whitfield significantly improved the manuscript. This project was funded by Terra Natura Foundation. L. Cadahía is supported by a grant of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (reference AP2001-1444). This paper is part of L. Cadahía's Ph.D. at the University of Alicante.

References.

- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1995. El águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en España. Censo, reproducción y conservación. Technical collection. Madrid: ICONA.
- Ballam, J.M. 1984. The use of soaring by the Red-Tailed Hawk (*Buteo jamaicensis*). *The Auk* 101: 519-524.
- Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. 2005. Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's Eagles *Hieraaetus fasciatus* during their first winter. *Ibis* 147: 415-419.
- Carrete, M., Sánchez-Zapata, J.A., Martínez, J.E. & Calvo, J.F. 2002. Predicting the implications of conservation management: a territorial occupancy model of Bonelli's Eagle in Murcia, Spain. *Oryx* 36: 349-356.
- Cheylan, G., Ravayrol, A., Cugnasse, J.-M., Billet, J.-M. & Joulot, C. 1996. Dispersion des Aigles de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* juveniles bagués en France. *Alauda* 64: 413-419.
- Clobert, J., Danchin, E., Dhont, A.A. & Nichols, J. (eds). 2001. Dispersal – causes, consequences and mechanisms of dispersal at the individual, population and community level. Oxford: Oxford University Press.
- Douglas, D.C. 2000. PC-SAS Argos Filter V5.0 Software Documentation. United States Geological Survey, Alaska Biological Science Center, Anchorage, AK, USA.
- Ferrer, M. 2001. The Spanish Imperial Eagle. Barcelona: Lynx Edicions.
- Fridolfsson, A.-K. & Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.
- Gil-Sánchez, J.M., Moleón, M., Otero, M. & Bautista, J. 2004. A nine-year study of successful breeding in a Bonelli's Eagle population in southeast Spain: a basis for conservation. *Biological Conservation* 118: 685-694.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Haller, H. 1996. Der Steinadler in Graubünden. Langfristige Untersuchungen zur Populationsökologie von *Aquila chrysaetos* im Zentrum der Alpen. *Ornithol. Beob. Beiheft* 9: 1-167.
- Hays, G.C., Åkesson, S., Godley, B.J., Luschi, P. & Santidrian, P. 2001. The implications of location accuracy for the interpretation of satellite-tracking data. *Animal Behaviour* 61: 1035-1040.
- Keating, K.A., Brewster, W.G. & Key, C.H. 1991. Satellite telemetry: performance of animal-tracking systems. *Journal of Wildlife Management* 55: 160-171.
- Kenward, R. 2001. A manual for wildlife radio tagging. London: Academic Press.
- Madroño, A., González, C. & Atienza, J.C. (eds). 2003. Libro Rojo de las Aves de España. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente – SEO/Birdlife.
- Microwave Telemetry, Inc. Columbia 100 Parkway, Suites K&L. Columbia, MD 21045.

- www.microwavetelemetry.com (access 13 January 2006).
- Mínguez, E., Angulo, E. & Siebering, V. 2001. Factors influencing length of the post-fledging period and timing of dispersal in Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in Southwestern Spain. *Journal of Raptor Research* 35: 228-234.
- Newton, I. 1979. Population ecology of raptors. Berkhamsted: T. & A. D. Poyser Ltd.
- Ontiveros, D. 1999. Selection of nest cliffs by Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in Southeastern Spain. *Journal of Raptor Research* 33: 110-116.
- Palma, L., Pais, M.C. & Fráguas, B. 1996. Status and distribution of Bonelli's Eagle, *Hieraaetus fasciatus*, in Portugal. In: II International Conference on Raptors. Urbino.
- Pennycuik, C.J. 1998. Field observations of thermals and thermal streets, and the theory of cross-country soaring flight. *Journal of Avian Biology* 29: 33-43.
- Real, J., Grande, J.M, Mañosa, S. & Sánchez-Zapata, J.A. 2001. Geographic variation of the causes of death of Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* in Spain. *Bird Study* 48: 221-228.
- Real, J. & Mañosa, S. 1997. Demography and conservation of western European Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* populations. *Biological Conservation* 79: 59-66.
- Real, J., Mañosa, S. & Codina, J. 1998. Post-nestling dependence period in the Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus*. *Ornis Fennica* 75: 129-137.
- Real, J. & Mañosa, S. 2001. Dispersal of juvenile and immature Bonelli's Eagles in Northeastern Spain. *Journal of Raptor Research* 35: 9-14.
- Sarasola, J.H. & Negro, J.J. 2005. Hunting success of wintering Swainson's hawks: environmental effects on timing and choice of foraging method. *Canadian Journal of Zoology* 83: 1353-1359.
- Service Argos. 1996. User's manual. CLS Argos, Toulouse. <http://www.cls.fr>
- Soutullo, A., Urios, V. & Ferrer, M. 2006. How far away in an hour? Daily movements of juvenile Golden Eagles (*Aquila chrysaetos*) tracked with satellite telemetry. *Journal of Ornithology* 147: 69-72.
- SPSS, Inc. 1990. SPSS Reference Guide. SPSS Inc, Chicago, IL, USA.
- Vincent, C., McConnell, B.J., Fedak, M.A. & Ridoux, V. 2002. Assessment of Argos location accuracy from satellite tags deployed on captive grey seals. *Marine Mammal Science* 18: 301-322.
- Walls, S.S, Kenward, R.E. & Holloway, G.J. 2005. Weather to disperse? Evidence that climatic conditions influence vertebrate dispersal. *Journal of Animal Ecology* 74: 190-197.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis, 4th edn. New Jersey: Prentice Hall.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 4

Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* during their first winter.

Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. 2005. *Ibis* 147: 415-419.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Introduction.

Dispersal is one of the most important periods in a raptor's life, impacting upon both survival and subsequently evolution. It comprises three steps: (a) the decision to leave the natal area, (b) a transitional phase and (c) the selection of a new breeding location (Clobert *et al.* 2001). The entire period is called 'natal dispersal' (Greenwood & Harvey 1982) and has become an important study area for researchers and governmental agencies dealing with the conservation of endangered fauna.

Little is known about the transitional phase in most animal species, because not all methods available to study dispersal are effective at gathering good-quality information about this phase. Only methods that provide information continuously on the location of an individual (mainly radiotracking) are adequate to separate different behaviours shown by individuals in this phase of dispersal.

The development of light-weight satellite telemetry has made it possible to study both the migratory and the dispersal movements of medium to large birds (Fuller *et al.* 1995) by using devices generally called platform transmitters terminals (PTTs) (Service Argos 2000).

The Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* has a patchy distribution in the Western Palearctic, mainly around the Mediterranean Sea (Cramp & Simmons 1980). It is considered 'endangered' in Europe (Rocamora 1994) and 'vulnerable' in Spain (Blanco & González 1992), where 80% of the European population lives (Arroyo *et al.* 1992, Real & Mañosa 1997).

Here we report the results of tracking seven Spanish Bonelli's eagles by satellite from fledging to 28 December 2002, including an estimate of survival and an analysis of their movement.

Study Area and Methods.

Eight nestling Bonelli's eagles were fitted with PTTs in five different provinces of Eastern Spain (Fig. 1). Bonelli's eagle nests are usually monitored twice in this region during the breeding season. Brood size was determined during the first visit, in order to determine whether a single nestling or a couple of siblings

could be tagged. Nestling age was estimated using a telescope, on the basis of feather growth and pattern (Torres *et al.* 1981) and hatching date was calculated accordingly. Easily accessible nests were finally selected, which covered a range of latitudes (37° 36' 26'' N - 41° 18' 05'' N).

Nestlings were tagged at around 50 days of age. The exact age in days of each nestling was calculated afterwards using tail length (central rectrix) in the following formula: age = 0.200 x tail length (mm) + 16.262 (Mañosa *et al.* 1995).

Each nestling was removed from the nest, weighed, measured and fitted with a satellite PTT that had a small VHF radiotransmitter glued to it. These were fixed to the birds' back using a breakaway Teflon harness (Kenward 1987). The nestlings were then replaced in their nests.

Two different types of PTTs were used: battery powered (weight 30 g, 17,2 x 18,1 x 64,6 mm, antenna 17,8 cm, Microwave Telemetry Inc., USA) and solar powered (weight 35 g, 17,4 x 29,1 x 62,5 mm, antenna 17,8 cm, Microwave Telemetry Inc., USA). They were set to an 8h on / 120h off duty cycle. VHF radiotransmitters (8 g) had an eight-month battery life expectancy. These were to be used in case of accident, making it possible to locate the injured animals. The full transmitter equipment never exceeded 3% of juveniles' body mass (2.2 ± 0.45 %, n=8; range: 1.9% - 3.0%).

A blood sample was taken from each nestling for sex determination using the polymerase chain reaction (PCR)-based method described by Griffiths *et al.* (1998) and Fridolfsson & Ellegren (1999).

Reception of the locations was managed by Argos, which is a satellite-based location and data collection system (Service Argos 2000). Several factors may reduce the accuracy of satellite location determinations (Fancy *et al.* 1989, Keating *et al.* 1991, Service Argos 2000, Mech & Shannon 2002, Vincent *et al.* 2002). The system provides seven location classes (LC) that reflect the nominal accuracy of a given location. The fact that one location is assigned to a given LC depends on how many times ('uplinks') the satellite receives a signal from the PTT and on the result of four plausibility tests that every datum must undergo. Three LC categories give a

calculated accuracy (LC 3, 2 and 1) whereas other three do not (LC 0, A and B) and there is one non-valid category (LC Z) (Table 1).

Location classes 3, 2 and 1 were used in this study. We also included locations belonging to lower quality LCs (0, A and B) when they were consistent with the juveniles' movements in terms of distance covered and time elapsed between locations. Thus, locations corresponding to movements in which the birds apparently covered unrealistically long distances in a very short period of time were excluded (Hays *et al.* 2001), as well as locations corresponding to movements at night or over the sea.

We considered the onset of dispersal to be the first movement that the juveniles took beyond 20 km from the natal nest (Arroyo *et al.* 1992, Balbontín *et al.* 2000, Ferrer, 1993). The maximum distance from the nest and the distance to the gravity centre of the furthest dispersal area were used as dispersal distance estimators. In the second case, we considered dispersal areas to be those more than 20 km from the nest, and where the distances between successive locations were less than 20 km (Balbontín *et al.* 2000, Ferrer, 1993). The gravity centre of these areas was calculated as the arithmetic mean of the entire set of coordinates corresponding to a given dispersal area. Note that Juvenile 3 was not included in male-female comparisons because it died soon after dispersal and provided few reliable locations. Comparisons among siblings were also carried out, and the routes followed by juveniles were plotted using ArcView version 3.2. Statistical analyses were carried out using SPSS version 11.5.

Results.

One of the eight tagged nestlings died before leaving the parental area and dispersing. Here we present results for the remaining juveniles tracked from fledging until 28 December 2002 or until the individual died. In total, five females and two males were tracked, and 547 locations were received from dispersal to the end of the study period: 259 (47.3%) were useable (Table 1).



Table 1. Summary of the satellite telemetry information used in this study (J1 to J7: valid locations for each bird; n.c.: not calculated).

LC	Total locations	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	Valid locations	% used	Location accuracy	No. of uplinks
3	10	1	2	0	1	3	2	1	10	100.0	< 150m	4
2	20	2	5	1	3	0	5	4	20	100.0	150 – 350m	4
1	86	8	18	4	15	8	17	16	86	100.0	350 – 1000m	4
0	148	9	17	2	12	6	13	11	70	47.3	> 1000m	4
A	107	2	13	1	7	8	7	12	50	46.7	n.c.	4
B	176	7	7	1	1	2	1	4	23	13.1	n.c.	3
Total	547	29	62	9	39	27	45	48	259	-	-	2



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Table 2. Dispersal parameters for averaging the first winter movements in seven Bonelli's eagle juveniles.

	Age at dispersal (days)	Dispersal date	Date of death or signal lost	Departing direction		Distance	
				from parental territory	from nest (km)	Maximum distance from nest (km)	dispersal area from nest (km)
Female 1	151	30/08/02	-	266° (SW)	663	536	
Female 2	103	25/06/02	-	331° (NW)	444	416	
Female 3	122	10/07/02	31/07/02	49° (NE)	367	367	
Male 4	175	05/09/02	-	227° (SW)	332	244	
Male 5	146	06/08/02	-	298° (NW)	589	376	
Female 6	149	10/08/02	-	278° (NW)	165	151	
Female 7	149	02/08/02	01/12/02	231° (SW)	87	80	

Two birds were confirmed dead. Juvenile 8 died before leaving its natal area in Murcia, and the cause of death could not be determined. We therefore consider survival from fledging to dispersal to be 87%. Juvenile 3 died from strychnine poisoning 367 km from its nest at the age of 152 days (August 2002) (Toxicology Service, University of Murcia - Spain). The tag fitted to Juvenile 7 ceased working in early December 2002, when the bird was 268 days old. As the individual was not found, its death cannot be confirmed, so survival from dispersal to the end of the study period ranged from 71% (if Juvenile 7 had died) to 85% (if it had not).

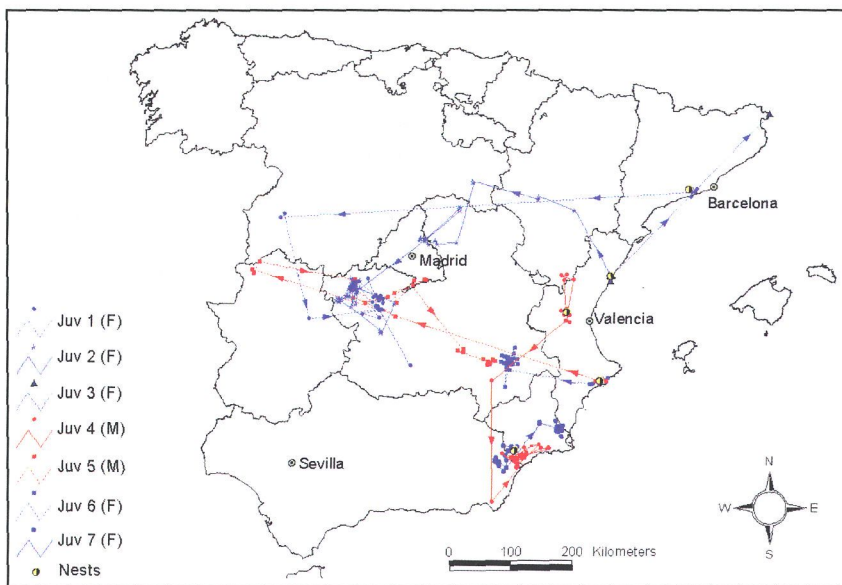


Fig. 1: Movements of seven Bonelli's eagles during their first winter in Spain in 2002. Blue lines: females, red lines: males.

Dispersal movement occurred at an average age of 142 ± 23 sd days. The maximum distance from the nest varied from 87 km (Juvenile 7) to 663 km (Juvenile 1). Distances from dispersal areas to the nest ranged from 80 km (Juvenile 7) to 536 km (Juvenile 1) ($n=7$) (Table 2). We found no differences between sexes either in maximum distance from the nest or in distances from dispersal areas to the

natal nests (max. dist. Mann-Whitney $U = 3,000$, n.s.; disp. areas dist. Mann-Whitney $U = 4,000$, n.s.; $n=6$).

Only one pair of siblings could be compared, because one or both siblings died in the remainder of the cases. Juvenile male 5 was found further away from the nest than his sister Juvenile 6; this was the case both when comparing maximum distances and when comparing the distance from the dispersal areas to their natal nest.

Discussion.

The beginning of the dispersal period in the Bonelli's eagles in our study can be described as wandering behaviour (Cugnasse & Cramm 1990) followed by settlement in dispersal areas. The mean age at dispersal (142 days) was similar to those reported for Bonelli's eagle in central Spain (141.5 days) (Arroyo *et al.* 1992), Andalucía (146.7 days) (Balbontín *et al.* 2000) and Catalonia (163 days) (Real *et al.* 1998).

Our results concerning distances travelled and locations of dispersal areas agree with previous studies using visual sightings of wing-tagged birds and band recoveries (Real & Mañosa 2001), radiotracking (Arroyo *et al.* 1992, Balbontín *et al.* 2000) and previous satellite tracking (Alcántara *et al.* 2001). However, the majority of our juveniles moved further during these first months than did those studied by other authors. Cheylan *et al.* (1996) found movements to locations 32 km from the nests during the first winter in Southern France, and Balbontín *et al.* (2000) reported a maximum distance of 100 km from the nest in young eagles tagged in Andalucía (Southern Spain) in 1998 and 1999. Real and Mañosa (2001), studying birds from Catalonia (NE Spain), found a large proportion of short-distance dispersers and few birds moving to more distant areas. In addition, Bonelli's eagles from an isolated population in Southern Portugal are known to travel short distances during dispersal (Palma, L., Mira, S. & Cancela, L., pers. comm.).

These differences may be the result of different factors, including the method used to monitor dispersal. In conventional radiotracking and sighting / recovery studies the fact that birds are reported more commonly in areas near the nests may



simply reflect the difficulty for researchers to move to distant areas in order to locate the birds. Thus, long-distance dispersers may not be detected. On the other hand, the proximity of potentially suitable dispersal areas might influence the different distances travelled by juveniles (Walls *et al.* 1999). Genetic aspects could also influence dispersal tendencies (Greenwood *et al.* 1979, Newton & Marquiss 1983).

The lack of a sex difference in the distances travelled disagrees with the general dispersal pattern observed in raptors (Greenwood & Harvey 1982). Although sex differences have been reported in previous work on the Bonelli's eagle (Mañosa *et al.* 1998, Real & Mañosa 2001), our data might not fit this pattern because of the reduced sample size or the relatively short period of time considered.

The dispersal areas found in this study are common to several individuals. This means that juvenile Bonelli's eagles do not hold territories, but share the general foraging areas to which they move. Overlapping of dispersal areas has already been described for a number of raptor species, including the Spanish Imperial eagle *Aquila adalberti* (Ferrer 1993), the Northern Goshawk *Accipiter gentilis* (Walls & Kenward 1994) or the Common Buzzard *Buteo buteo* (Walls & Kenward 1995, 2001). Previous studies of Bonelli's eagle have also shown the probable presence of these common dispersal areas in Spain (Arroyo *et al.* 1992, Cheylan *et al.* 1996, Real & Mañosa 1997, 2001). The present study confirms the existence of these areas and the location of some of them, mainly in regions where small game is abundant in the centre of the Iberian Peninsula.

Many deaths of Bonelli's eagle are caused by electrocutions and collisions with power lines (Arroyo *et al.* 1990, Cheylan *et al.* 1996, Real *et al.* 2001). However, the death of Juvenile 3 by strychnine poisoning highlights another factor affecting juvenile survival, and which has been increasing in Spain in recent years (Mateo *et al.* 2004). Poisoning is responsible for 3% of mortality cases in this species in Spain (Real *et al.* 2001). The death of Juvenile 8 could be related to its hunting inexperience or to a predator attack, both of which are likely causes of death in juveniles, because they are typically naïve and vulnerable (Newton 1979). Predation on juvenile Bonelli's eagles has been reported in Spain (Real & Mañosa, 1990).



Juveniles cover large areas after dispersal. The areas in which they settle in their first winter are known to hold high densities of prey. The birds we tracked basically moved to Central Spain. Because of this, conservation efforts of Bonelli's eagles, even when aimed at a regional breeding population, should consider factors at a larger scale.



Acknowledgements.

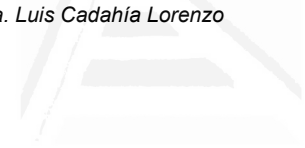
The present study on the “Conservation Biology of Eagles” was conducted under a Terra Natura Foundation project, funded by Terra Natura S.A. The first author was funded by a pre-doctoral scholarship (F.P.U.) from the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (reference AP2001-1444). Juvenile tagging was possible thanks to a collaboration with Conselleria de Vivienda y Territorio of the Generalitat Valenciana (P. Mateache, M. Romanillos, C. Dolz, A. Izquierdo and A. García i Sanz), Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente of Región de Murcia (E. Aledo), Departamento de Medio Ambiente of the Generalitat de Cataluña (X. Parellada), Ministerio de Medio Ambiente (V. García Matarranz, P. García Domínguez), the University of Barcelona (N. Pocino, J. Real) and the University Miguel Hernández (M. Carrete, J. A. Sánchez-Zapata). The Toxicology Service of the Veterinary Medicine Faculty of the University of Murcia conducted the necropsy on the juvenile that died in Murcia. Thanks to R. Díaz-Delgado and J. Peña for help concerning G.I.S. The comments from A.E. Poole, R.J. Porteus and two anonymous referees significantly improved the manuscript.

References.

- Alcántara, M., Ferreiro, E. & Gardiazábal, A. 2001. Dispersal of young Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*): First results by satellite telemetry (LIFE project B4-3200/97/252 Conservation Plan of Bonelli's eagle in Sierra de Guara, Huesca, Aragón). Sevilla: IV Eurasian Congress on Raptors.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1990. Inventario de la población española de águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) y sus áreas de cría. Technical report ICONA (Ministerio de Medio Ambiente), Madrid.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1992. Factores limitantes de la población de águila perdicera en España. Technical report ICONA (Ministerio de Medio Ambiente), Madrid.
- Balbotín, J., Penteriani, V. & Ferrer, M. 2000. El águila perdicera en Andalucía: situación actual y tendencias en las áreas de reproducción y de dispersión juvenil. Unpublished technical report Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- Blanco, J.C. & González, J.L. 1992. Libro rojo de los vertebrados de España. Technical report ICONA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Cheyland, G., Ravayrol, Cugnasse, J.-M., Billet J.-M. & Joulot, C. 1996. Dispersion des Aigles de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* juveniles bagués en France. *Alauda* 64: 413-419.
- Clobert, J., Danchin, E., Dhont, A.A. & Nichols, J. (eds). 2001. Dispersal – causes, consequences and mechanisms of dispersal at the individual, population and community level. Oxford: Oxford University Press.
- Cramp, S. & Simmons, K.E.L. 1980. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa - vol. 2. Oxford: Oxford University Press.
- Cugnasse, J.-M. & Cramm, P. 1990. L'erratismo de l'Aigle de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* en France. *Alauda* 58: 59-66.
- Fancy, S.G., Pank, K.R., Whitten, K.R. & Regelin, W.L. 1989. Seasonal movements of caribou in arctic Alaska as determined by satellite. *Canadian Journal of Zoology* 67: 644-650.
- Ferrer, M. 1993. Juvenile dispersal behaviour and natal philopatry of a long-lived raptor, the Spanish imperial eagle *Aquila adalberti*. *Ibis* 135: 132-138.
- Fridolfsson, A.-K. & Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.
- Fuller, M.R., Seegar, W.S. & Howey, P.W. 1995. The use of satellite systems for the study of bird migration. *Israel Journal of Zoology* 41: 243-252.
- Greenwood, P.J. & Harvey, P.H. 1982. The natal and breeding dispersal of birds. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 13: 1-21.
- Greenwood, P.J., Harvey, P.H. & Perrins, C.M. 1979. The role of dispersal in the great tit (*Parus major*): the causes, consequences and heritability of dispersal. *Journal of Animal Ecology* 48:

- 123-142.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Hays, G.C., Åkesson, S., Godley, B.J., Luschi, P. & Santidrian, P. 2001. The implications of location accuracy for the interpretation of satellite-tracking data. *Animal Behaviour* 61: 1035-1040.
- Keating, K.A., Brewster, W.G. & Key, C.H. 1991. Satellite telemetry: performance of animal-tracking systems. *Journal of Wildlife Management* 55: 160-171.
- Kenward, R. 1987. *Wildlife radio tagging. Equipment, field techniques and data analysis.* London: Academic Press.
- Mañosa, S., Real, J. & Codina, J. 1995. Age estimation and growth patterns in nestling Bonelli's eagles. *Journal of Raptor Research* 29: 273-275.
- Mañosa, S., Real, J. & Codina, J. 1998. Selection of settlement areas by juvenile Bonelli's eagle in Catalonia. *Journal of Raptor Research* 32: 208-214.
- Mateo, R., Blanco, G & Jiménez, B. 2004. Riesgos tóxicos para las aves rapaces en España. XVII Congreso Español de Ornitología. Madrid, Abril 2004.
- Mech, L.D. & Shannon, M. 2002. A critique of wildlife radio-tracking and its use in national parks: a report to the U.S. National Park Service. U.S. Geological Survey, Northern Prairie Wildlife Research Center, Jamestown, N.D. Jamestown, N.D: Northern Prairie Wildlife Research Center home page.
<http://www.npwrc.usgs.gov/resource/2002/radiotrk/radiotrk.htm> (version 30dec2002)
- Newton, I. 1979. *Population ecology of raptors.* London: Ed. T. & A.D. Poyser.
- Newton, I. & Marquiss, M. 1983. Dispersal of sparrowhawks between birthplace and breeding place. *Journal of Animal Ecology* 52: 463-477.
- Real, J., Grande, J.M, Mañosa, S. & Sánchez-Zapata, J.A. 2001. Geographic variation of the causes of death of Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* in Spain. *Bird Study* 48: 221-228.
- Real, J. & Mañosa, S. 1990. Eagle Owl (*Bubo bubo*) predation on juvenile Bonelli's eagles. *Journal of Raptor Research* 24: 69-71.
- Real, J. & Mañosa, S. 1997. Demography and conservation of western European Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* populations. *Biological Conservation* 79: 59-66.
- Real, J., Mañosa, S. & Codina, J. 1998. Post-nestling dependence period in the Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus*. *Ornis fennica* 75: 129-137.
- Real, J. & Mañosa, S. 2001. Dispersal of juvenile and immature Bonelli's eagles in Northeastern Spain. *Journal of Raptor Research* 35: 9-14.
- Rocamora, G. 1994. Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus*. In: Tucker, G.M. & Heath, M.F. *Birds in Europe: their conservation status.* Birdlife International, Cambridge.
- Service Argos. 2000. *User's manual.* CLS Argos.
- Torres, J.A., Jordano, P. & León, A. 1981. *Aves de presa diurnas de la provincia de Córdoba.* Madrid: Publicaciones del Monte de Piedad

- y Caja de Ahorros de Córdoba.
- Vincent, C., McConnel, B.J., Fedak, M.A. & Ridoux, V. 2002. Assessment of Argos location accuracy from satellite tags deployed on captive grey seals. *Marine Mammal Science* 18: 301-322.
- Walls, S. & Kenward, R. 1994. The systematic study of radio-tagged raptors: II. Sociality and Dispersal. In: Meyburg, B.-U. & Chancellor, R.D. (eds.). 1994. *Raptor Conservation Today*. WWGBP / The Pica Press.
- Walls, S. & Kenward, R. 1995. Movements of radio-tagged buzzards *Buteo buteo* in their first year. *Ibis* 137: 177-182.
- Walls, S. & Kenward, R. 2001. Spatial consequences of relatedness and age in buzzards. *Animal Behaviour* 61: 1069-1078.
- Walls, S., Mañosa, S., Fuller, R.M., Hodder, K.H. & Kenward, R. 1999. Is early dispersal enterprise or exile?. Evidence from radio-tagged buzzards. *Journal of Avian Biology* 30: 407-415.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 5

Patrones de movimiento y áreas vitales en el águila-azor perdicera *Hieraaetus fasciatus* durante el período de dispersión juvenil en España.

Cadahía, L.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

**Resumen.**

En este capítulo se describen los patrones de movimiento de 15 jóvenes de águila-azor perdicera durante el proceso de dispersión juvenil, es decir, el período que precede al reclutamiento a la población reproductora, estudiados mediante telemetría vía satélite en España. El patrón de alejamiento de las áreas natales evidencia la existencia de tres fases durante el primer año de vida de los juveniles: el período de dependencia, hasta los 3-4 meses de edad, el abandono del territorio paterno, que ocurre antes y a edades más tempranas en las hembras, y un asentamiento en áreas de dispersión a partir del séptimo mes de vida. Las diferencias entre machos y hembras no resultaron significativas en general, aunque sí reflejaron unas tendencias acordes con trabajos anteriores. Se propone también un método para la identificación de dormideros a partir de los datos del sistema Argos. Por último, se delimitan y caracterizan de manera general las áreas de dispersión, a partir del uso de kernels, que se encuentran repartidas entre 11 Comunidades Autónomas diferentes, siendo las más importantes Castilla La Mancha y Andalucía. En ellas, los juveniles son localizados con mayor frecuencia en zonas manejadas por el hombre, con cultivos de secano y herbáceas. Esto probablemente sea debido a la mayor eficiencia en la captura de presas en esas zonas, dado que son áreas abiertas, y a la ausencia de reproductores. El hecho de que las áreas de dispersión se encuentren en los territorios de 11 Comunidades Autónomas implica la necesidad de una estrategia coordinada de conservación.

Palabras clave: águila-azor perdicera; áreas de dispersión; conservación; dispersión juvenil; dormideros; hábitat; movimientos; telemetría vía satélite.



Capítulo 5

Abstract.

In this chapter we describe the movement patterns of 15 Bonelli's eagle juveniles during their juvenile dispersal period, i.e., the phase preceding the recruitment to the breeding population, studied by satellite telemetry in Spain. The distancing from the natal areas reflects the existence of three distinct phases during the juveniles' first year of life, i.e., the dependence period, until 3-4 months old, the departure from the parental territory, which takes place earlier and at a lower age in females than in males, and a settlement in dispersal areas from the seventh month of life on. In general, between-sex differences were not significant, but several tendencies in accordance with previous studies were clearly noticeable. We also propose a method to identify roosting sites using Argos system data. Finally, we define and generally characterise dispersal areas, using kernel estimators. These areas are located in 11 Autonomous Communities (Spanish administrative units), being the most important Castilla La Mancha and Andalucía. In the dispersal areas, juveniles are more frequently located in man-managed areas, with dry harvest crops and herbaceous plants. This is probably due to the higher efficiency in prey capture, since these are open areas, as well as to the absence of breeding pairs. The fact that these areas occur in 11 Autonomous Communities entails the need for a coordinated conservation strategy.

Key words: Bonelli's eagle; conservation; dispersal areas; habitat; juvenile dispersal; movements; roosting sites; satellite telemetry.

Introducción.

La dispersión es un proceso ecológico con gran importancia en la estructura espacial de las poblaciones, la supervivencia de los individuos o la existencia de flujo génico entre subpoblaciones (Johnson & Gaines 1990, Walls & Kenward 1998, Clobert et al. 2001, Bullock et al. 2002), y afecta, por tanto, a la persistencia, evolución y conservación de las especies (Clobert et al. 2001, Bullock et al. 2002). Los aspectos ecológicos y evolutivos del proceso están directamente relacionados con la 'dispersión natal' (movimiento entre el lugar de nacimiento y el de primera reproducción) y la 'dispersión reproductiva' (movimiento entre sucesivos lugares de reproducción) (Greenwood & Harvey 1982), dado que son los que conllevan flujo de individuos, y por tanto de genes, de unas áreas a otras. Sin embargo, el período transcurrido entre el abandono del sitio natal y el establecimiento para reproducirse por primera vez puede durar varios años en el caso de especies de madurez sexual retardada. Durante ese tiempo, lo que ocurra con los individuos dispersantes cobra importancia, sobretodo desde el punto de vista de la conservación de la especie, puesto que de él dependerá el que los juveniles lleguen a completar el proceso de dispersión natal de manera efectiva y transmitan sus genes a la generación siguiente. Los movimientos que ocurren durante este período han recibido el nombre de 'dispersión juvenil' (Ferrer 1993a, 2001, Soutullo et al. 2006).

El águila-azor perdicera *Hieraaetus fasciatus* es un ave de presa (Accipitridae, Falconiformes) cuya madurez sexual se alcanza a los 3-4 años de edad (Cramp & Simmons 1980), que está catalogada como 'en peligro' en España (Real 2004), donde vive la mayor parte de la población del Paleártico Occidental (Arroyo et al. 1995, Real & Mañosa 1997). El estudio de la dispersión juvenil en esta especie ha sido tradicionalmente complicado, debido, sobretodo, a la elevada capacidad de movimiento de los jóvenes, al igual que ocurre con otras especies de rapaces (Walls & Kenward 1995, Kenward 2001). En los trabajos sobre dispersión en el águila-azor perdicera se han utilizado diferentes metodologías, como la colocación de anillas y marcas alares (Cheylan et al. 1996, Real & Mañosa 2001) o el radioseguimiento (Arroyo et al. 1992, Balbontín et al. 2000, 2003). Sin embargo, estos sistemas pueden no ser efectivos a la hora de reunir información de buena calidad, dados los

potenciales sesgos o el limitado tamaño de las áreas que pueden ser estudiadas (Cadahía et al. 2005, Soutullo et al. 2006). Una alternativa adecuada es la telemetría vía satélite, a través del sistema Argos, que permite un seguimiento continuo de los movimientos de las aves independientemente del tamaño de las áreas que recorren. Como contrapartida, el seguimiento vía satélite presenta dos problemas fundamentales: la inestabilidad en la frecuencia de recepción de datos y un bajo grado de precisión (ver Keating et al. 1991, Britten et al. 1999, Hays et al. 2001, Soutullo et al. en prensa). Estos inconvenientes están empezando a ser solventados gracias a la reciente utilización de emisores GPS de poco peso que ya existen en el mercado.

Los pollos de águila-azor perdicera vuelan fuera del nido a una edad aproximada de 60 días (Real et al. 1998, Mínguez et al. 2001) y pasan varias semanas en las inmediaciones hasta que abandonan el territorio paterno, es decir, se dispersan (Real et al. 1998, Balbontín et al. 2000, Balbontín 2003, Mínguez et al. 2001, Cadahía et al. 2005, en prensa a). En los estudios realizados hasta el momento se ha observado la existencia de desplazamientos de gran envergadura y el asentamiento de juveniles en las denominadas áreas de dispersión (Cheylan et al. 1996, Real & Mañosa 2001, Balbontín 2003, Cadahía et al. 2005). En estas áreas existen una serie de amenazas que pueden afectar a la supervivencia de los ejemplares, como los accidentes con líneas eléctricas, la persecución directa o el veneno (Real et al. 2001, Real 2004, Cadahía et al. 2005). La importancia de estas áreas para la conservación de la población ha sido puesta de manifiesto en estudios previos con ésta (Balbontín 2003) y otras especies de rapaces, como el águila imperial ibérica *Aquila adalberti* (Ferrer 2001).

En este capítulo describimos los patrones de movimiento de 15 jóvenes de águila-azor perdicera durante el proceso de dispersión juvenil en España, utilizando telemetría vía satélite para monitorizar sus desplazamientos. Exploramos el patrón de alejamiento de las áreas natales teniendo en cuenta las diferencias entre sexos. También proponemos un método para la identificación de dormideros a partir de los datos del sistema Argos y, por último, delimitamos y caracterizamos de manera

general las áreas de dispersión, señalando las implicaciones que conlleva su localización para la conservación de la especie.

Material y Métodos.

Quince pollos de águila-azor perdicera fueron marcados con emisores satelitales entre 2002 y 2004 en el este de España (Comunidades Autónomas de Cataluña, Comunidad Valenciana y Murcia; 41° 18' 05" N a 37° 36' 26" N) (Fig. 1). Todas las aves fueron capturadas en sus nidos aproximadamente a los 50 días de edad, excepto dos pollos volanderos que fueron capturados con posterioridad, cuando contaban con unos 125 días. Todos los nidos estaban localizados en cortados rocosos, salvo uno que estaba en un pino, rodeados por matorral mediterráneo. Los pollos fueron pesados y medidos y se les colocaron emisores satelitales (de aquí en adelante PTT), sujetos al dorso mediante un arnés de Teflón (Kenward 2001). El sexo de las aves fue establecido a partir de una muestra de sangre, mediante técnicas de sexado molecular (Griffiths et al. 1998, Fridolfsson & Ellegren 1999).

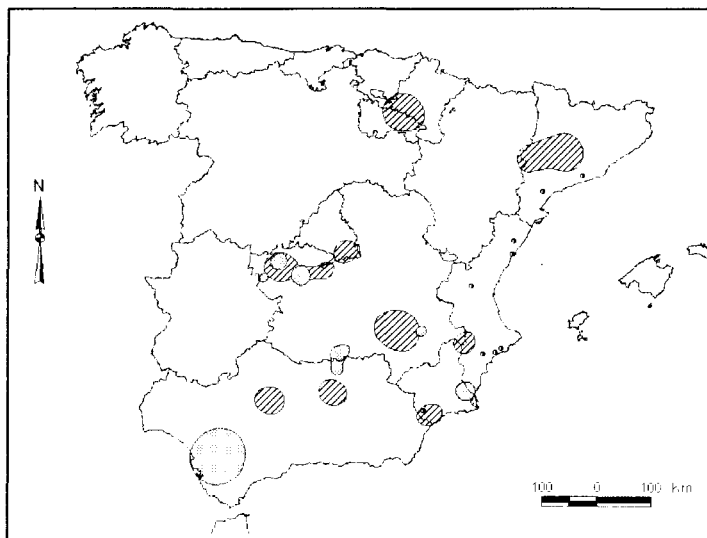


Figura 1. Localización de las áreas de dispersión juvenil de 11 individuos de águila-azor perdicera en España. Las áreas punteadas corresponden a las hembras y las barradas a los machos. La localización de los nidos de procedencia de los juveniles está indicada con el símbolo j.



Se colocaron tres tipos de emisores: seis de batería convencional (30 g, $17.2 \times 18.1 \times 64.6$ mm, antena 17.8 cm), siete de batería solar (35 g, $17.4 \times 29.1 \times 62.5$ mm, antena 17.8 cm), y dos emisores mixtos Argos/GPS (45g, $83.5 \times 28.8 \times 21.0$ mm, antena 18.0 cm), todos manufacturados por Microwave Telemetry, Inc. (EE. UU.). Según nuestros datos, éste es el primer proyecto en el cual se han colocado emisores Argos/GPS en aves rapaces en España, permitiendo un seguimiento de los individuos por ambos sistemas simultáneamente. También fueron colocados emisores VHF convencionales que permiten un radioseguimiento terrestre, con una batería de vida útil de ocho meses (8 gr.). Su función era facilitar la localización de los juveniles durante el inicio de la dispersión, en caso de que fuera necesario. El horario de funcionamiento de los PTT fue de 8 horas de emisión / 120 horas de silencio, excepto en los Argos/GPS, que fue de 16 horas de emisión / 72 horas de silencio. En todos los casos, el peso de los emisores estuvo por debajo del 3% del peso del animal (2.1 ± 0.4 %; $n = 15$; rango: 1.3 – 3.0%), siguiendo las recomendaciones de Kenward (2001). La edad de los pollos fue estimada en función del plumaje cuando se observaron a distancia con telescopio (Torres et al. 1981, Gil-Sánchez 2000). Después del marcaje, la edad exacta fue calculada según la ecuación: edad = $0.200 \times$ longitud cola (mm) + 16.262 (Mañosa et al. 1995).

La recepción y manejo inicial de las localizaciones se realizó a través de Argos, que es un sistema de localización y recolección de datos basado en satélites. Una red de satélites recoge datos de los PTT y los envía a estaciones de recepción y procesamiento situadas en la superficie terrestre (Argos 1996). Las posiciones de los PTT son calculadas en base a la medida del efecto Doppler (para una explicación detallada ver Argos 1996 y Kenward 2001). El sistema proporciona siete clases de localización (LC) que reflejan la precisión nominal de cada dato recibido. Éstas son necesarias porque una variedad de factores, bien intrínsecos al PTT o bien externos a él, puede afectar a la precisión de las localizaciones (discutidas en detalle en Fancy et al. 1988, Keating et al. 1991, Argos 1996, Kenward 2001, Vincent et al. 2002, Soutullo et al. en prensa). En el presente trabajo se utilizaron los datos correspondientes a las LC 3, 2 y 1, que proporcionan una estimación calculada de la precisión, así como localizaciones pertenecientes a LC de peor calidad (LC 0, A y

B) cuando eran consistentes con el movimiento de los juveniles en términos de distancia recorrida y tiempo transcurrido entre localizaciones (Cadahía et al. 2005, Soutullo et al. 2006). Los datos de LC Z no fueron utilizados, ya que indican que el PTT envió señal, pero no proporcionan la posición de los individuos. Para filtrar y seleccionar las localizaciones adecuadas se utilizó información disponible sobre movimientos de juveniles de águila-azor perdicera, basada en datos de GPS de alta calidad y en tests de precisión del sistema Argos (ver Cadahía et al. en prensa a, Soutullo et al. en prensa). Para evitar los sesgos asociados con la autocorrelación espacial y temporal de los datos, se calcularon las medias armónicas de las localizaciones recibidas cada día (Dixon & Chapman 1980, Kenward 2001), que fueron utilizadas para la realización de los cálculos.

El comienzo de la dispersión, aquí considerado como el principio de la etapa en la cual los juveniles se hacen independientes de sus progenitores en términos de alimentación (Ferrer 2001), se definió como el momento en el que las aves volaron más allá de la distancia media entre nidos (11.4 km; Arroyo et al. 1995) y no retornaron a menos de esa distancia en las dos localizaciones siguientes (Cadahía et al. en prensa b). Con objeto de estudiar el comportamiento al inicio de la dispersión, el primer año de vida se dividió en meses de 30 días y se calculó la distancia mensual al nido como la media de todas las distancias correspondientes a un mes dado (Soutullo et al. 2006). Como el abandono del nido en el águila-azor perdicera ocurre aproximadamente a los 60 días de edad (Real et al. 1998, Mínguez et al. 2001), las distancias mensuales se calcularon a partir de ese momento. Para cada individuo, se registraron la edad y la fecha al inicio de la dispersión y se calculó la distribución de utilización de las áreas vitales mediante el método de los contornos kernel (Worton 1989, Kenward 2001), optimizados por un procedimiento de validación cruzada de mínimos cuadrados (LSCV; Kenward 2001, Kenward et al. 2001). A partir de los kernel se estimaron las áreas recorridas anualmente, el área total durante el período de transmisión y las áreas de dispersión juvenil para cada individuo. Las áreas anuales y totales se estimaron mediante el kernel del 95% para evitar el efecto de localizaciones puntuales demasiado alejadas. Las áreas de dispersión juvenil se definieron como aquellas regiones contenidas dentro del kernel

del 50% calculadas después de que los individuos se dispersaran de sus áreas natales. Se utilizó esta cifra en particular porque se ha observado que las distancias recorridas por los juveniles de águila-azor perdicera dentro y fuera de las áreas así estimadas son significativamente distintas (L. Cadahía, datos no publicados), lo cual permite diferenciar entre movimientos exploratorios y asentamientos en áreas de dispersión (Ferrer 1993a). Las áreas anuales, totales y de dispersión fueron calculadas con la extensión 'Animal Movement SA v 2.04' (Hooge & Eichenlaub 1997) dentro del sistema de información geográfica ArcView 3.2.

Se calculó el número de áreas de dispersión de cada individuo y su superficie fue estimada con la extensión 'Animal Movement SA v 2.04' de ArcView. En aquellos individuos con más de un área de dispersión, se calculó la superficie conjunta de todas ellas y se utilizó ese dato en las comparaciones. Se computó el centro de gravedad de las áreas de dispersión como la media armónica de todas las localizaciones contenidas en cada una de ellas (Dixon & Chapman 1980, Kenward et al. 2001) y se calculó la distancia entre éste y el nido natal en cada caso. En los individuos con más de un área de dispersión este cálculo se realizó con la más alejada de ellas, que en general coincidió con aquella en la cual pasaron más tiempo. El número de Comunidades Autónomas con parte de su superficie incluida dentro de las áreas de dispersión fue también registrado.

Se usó el test de Kruskal-Wallis para buscar diferencias entre las distancias mensuales durante el primer año de vida y el test de Games-Howell (Zar 1999) para realizar todas las comparaciones por pares de meses. El test de Mann-Whitney fue utilizado para calcular diferencias entre sexos en la edad y fecha de dispersión, en la distancia máxima al nido alcanzada durante todo el período de emisión, en el tamaño total de las áreas vitales, así como en el número, superficie y distancia al nido natal de las áreas de dispersión. Con objeto de estudiar si conforme pasa el tiempo los movimientos de los individuos se focalizan en un área, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para relacionar el tamaño de las áreas anuales con el tiempo en aquellos individuos que emitieron señales durante los cuatro años del período de estudio. Asimismo, se utilizó la extensión 'Geoprocessing' de ArcView

para calcular el grado de superposición o solapamiento entre las áreas de dispersión de todos los individuos marcados.

El águila-azor perdicera es una rapaz diurna, por lo que las localizaciones que se registran durante la noche deberían corresponder a dormideros de los individuos. A fin de identificar estos lugares dentro de las áreas de dispersión, se definieron los períodos nocturnos en base a las horas del ocaso y del orto de la capital de provincia más próxima a las localizaciones de cada individuo, de acuerdo a la información disponible en la página web del Instituto Geográfico Nacional – Ministerio de Fomento

(www.fomento.es/MFOM/LANG_CASTELLANO/DIRECCIONES_GENERALES/INSTITUTO_GEOGRAFICO/Astronomia/publico/efemerides/salida_puesta_sol.htm). Los cambios entre el horario de invierno y de verano fueron tenidos en cuenta. En este caso no se utilizaron las medias armónicas diarias de las localizaciones, sino los datos originales, y de éstos, los pertenecientes a LCs 3 a 1. Para cada individuo, se utilizó la extensión ‘Distance Matrix of Point Features’ dentro de ArcView para calcular la distancia entre cada localización y todas las demás. La precisión mínima de los datos utilizados para este análisis es de 1000 m (i.e., la correspondiente a LC 1), de modo que aquellas localizaciones nocturnas separadas por menos de 1000 m fueron consideradas como correspondientes a un mismo lugar visitado en dos o más ocasiones y, por tanto, como posibles dormideros. Con esta metodología se registró el número de dormideros de los juveniles dentro de sus áreas de dispersión. En aquellos casos en los que se registraron solapamientos entre las áreas de dispersión de varios individuos, el procedimiento arriba descrito se llevó a cabo con los datos de los ejemplares cuyas áreas se solaparon, a fin de identificar dormideros comunes.

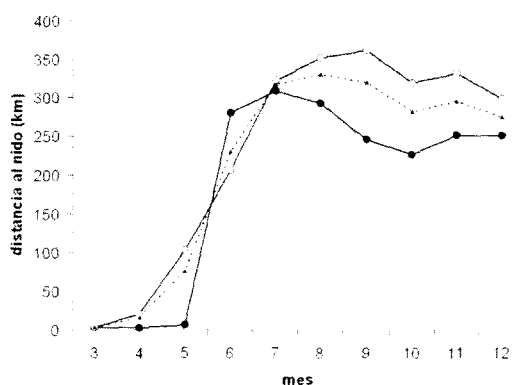
Se exploró si los juveniles pasan más tiempo en ciertos tipos de hábitats que lo esperado por azar. Se utilizó el “Mapa de cobertura de suelo para Europa en el año 2000” (Pekel et al. 2003) para caracterizar las áreas de dispersión en términos de cobertura de suelo. Se utilizó la extensión ‘Animal Movement SA v 2.04’ para seleccionar 50 puntos al azar dentro de esas áreas y luego la extensión ‘Get Grid Value’ de ArcView para asignarles una categoría de cobertura de suelo tanto a esos puntos como a las localizaciones obtenidas por telemetría. En este caso también

usamos las localizaciones originales, únicamente de LCs 3 a 1, para minimizar las probabilidades de una asignación incorrecta. Para cada individuo comparamos la frecuencia de cada tipo de cobertura en cada conjunto de puntos, i.e., localizaciones y puntos al azar, utilizando la prueba de χ^2 . Se utilizaron tablas de contingencia para explorar diferencias entre individuos en la frecuencia de aparición de distintos tipos de cobertura dentro de sus áreas de dispersión, a partir de los puntos al azar, y, por otro lado, en la frecuencia de sus localizaciones en cada tipo de cobertura.

Los análisis estadísticos fueron realizados con SPSS versión 13.0. Los niveles de significación se establecieron en $p < 0.05$.

Resultados.

Uno de los machos marcados murió antes del inicio de la dispersión, de manera que aquí se presentan los resultados correspondientes a los 14 ejemplares restantes. Las hembras tendieron a dispersarse antes y a edades más tempranas que los machos, pero esta diferencia no fue significativa (fecha de dispersión Mann-Whitney $U = 12.000$, $p = 0.355$; edad de dispersión Mann-Whitney $U = 9.000$, $p = 0.164$) (Fig. 2, Tabla 1). La distancia mensual al nido varió a lo largo del primer año (Kruskal-Wallis $H = 58.308$, g.l. = 9, $p < 0.001$). Durante los primeros meses de vida se apreciaron tres etapas claramente diferenciadas (Games-Howell $p > 0.069$ en



grupos de meses similares): una fase inicial de movimientos restringidos al entorno del nido durante el tercer y cuarto mes (período de dependencia), seguida de un rápido incremento en la distancia al nido (inicio de la dispersión), y un asentamiento desde el séptimo mes en adelante.

Figura 2. Evolución de la distancia mensual al nido en 14 juveniles de águila-azor perdicera durante su primer año de vida. Puntos negros: machos; puntos blancos: hembras; línea punteada: media de todos los individuos.

El inicio de la dispersión, que ocurrió de manera repentina y en un corto lapso de tiempo, fue más prolongado en las hembras (quinto y sexto mes) que en los machos (sexto mes), presentando las hembras un comportamiento más errático mientras que los machos se asentaron rápidamente después de abandonar el territorio paterno (Fig. 2).

Durante todo el período de transmisión las distancias máximas al nido alcanzadas estuvieron entre 19 km y los 663 km, y no fueron diferentes entre sexos (Mann-Whitney $U = 17.000$, $p = 0.671$), al igual que el área total cubierta por los juveniles (Mann-Whitney $U = 8.000$, $p = 0.088$) (Tabla 1, Tabla 2). Es preciso comentar que tres de los juveniles sólo emitieron una o dos localizaciones tras dispersarse del territorio natal, de modo que no pudo calcularse el tamaño de sus áreas anuales. El número de áreas de dispersión estuvo afectado por el sexo (Mann-Whitney $U = 4.000$, $p = 0.029$), ya que todos los machos pero únicamente dos hembras presentaron una segunda área de dispersión. La superficie y la distancia al nido natal de éstas no varió entre sexos (superficie Mann-Whitney $U = 7.000$, $p = 0.186$; distancia Mann-Whitney $U = 11.000$, $p = 0.571$) (Tabla 1). Las áreas de dispersión se situaron en territorios pertenecientes a 11 Comunidades Autónomas, siendo las más representadas Castilla La Mancha y Andalucía (Fig. 1, Tabla 2).



Tabla 1: Diferencias entre sexos en las variables relacionadas con la dispersión juvenil en 14 jóvenes de águila-azor perdicera estudiados por telemetría vía satélite en España.

	Fecha dispersión	Edad dispersión (días)	Área total (km ²)	Distancia máxima (km)	Áreas dispersión (km ²)	Distancia dispersión (km)	área
Machos (n = 4)	1 Septiembre ± 22.5	158.5 ± 13.5	29237 ± 17930	442.8 ± 111.3	5591 ± 3657	280.8 ± 77.2	
Hembras (n = 10)	16 Agosto ± 22.8	143.9 ± 14.8	17732 ± 21956	474.8 ± 204.7	3062 ± 3048	353.1 ± 188.9	
Max - Min	5 Julio - 2 Octubre	114 - 177	63775 - 980	662.9 - 18.8	10125 - 264	533.5 - 80.7	
Total	21 Agosto ± 23.0	148.4 ± 15.5	21916 ± 24066	458.8 ± 153.5	3982 ± 3349	326.8 ± 156.6	



Tabla 2: Variables relacionadas con la dispersión juvenil en 14 jóvenes de águila-azor perdicera estudiados por telemetría vía satélite en España.

Ind	Sexo	Área total (km ²)	Dist máx nido (km)	Nº áreas disp	Área disp (km ²)	Dist área disp- nido (km)	Número CC. AA.	CC.AA.	Dormideros
1	H	5292	90	1	903	81	2	Murcia, Comunidad Valenciana	2
2	M	15205	367	2	2132	245	4	Comunidad Valenciana, La Mancha, Murcia, Andalucía	8
3	H	980	185	1	264	148	1	La Mancha	5
4	M	39130	589	2	6929	421	1	La Mancha	0
5	H	6692	541	2	844	442	2	La Mancha, Extremadura	6
6	H	0*	367	-	-	-	-	-	-
7	H	24938	663	1	6409	534	2	Madrid, La Mancha	0
8	H	0*	19	-	-	-	-	-	-
9	M	49488	346	2	10125	321	5	La Rioja, País Vasco, Navarra, Aragón, Cataluña	8
10	H	17488	592	2	3815	519	1	Andalucía	3
11	M	13126	471	2	3180	433	2	Madrid, La Mancha	4
12	H	0*	377	-	-	-	-	-	-
13	H	4956	278	1	1296	256	2	La Mancha, Andalucía	1
14	H	63775	548	1	7906	513	1	Andalucía	1

* Sólo emitieron una o dos localizaciones tras dispersarse del territorio natal, con lo que no pudo calcularse ningún área.

Sólo dos de los 14 ejemplares emitieron señales durante los cuatro años. En uno de ellos, la hembra 5, se observó una reducción progresiva del tamaño del área anual con el tiempo (Spearman $\rho = 1.00$, $p < 0.001$), pero esta relación no ocurrió en el otro individuo, el macho 2 (Spearman $\rho = 0.40$, $p = 0.600$). La evolución de los tamaños de las áreas anuales de todos los individuos puede ser observada en la Tabla 3.

De entre todos los ejemplares marcados, las áreas de dispersión de los individuos 3, 4, 5, 7 y 11 presentaron solapamientos entre sí (Fig. 1). Éstos se han representado en la Tabla 4, que es una matriz de solapamientos. El grado de solapamiento entre algunos de estos pares de individuos varió entre el 1% y el 77% del territorio contenido dentro de las áreas de dispersión.

Tabla 3: Evolución del tamaño de las áreas anuales en 14 individuos de águila-azor perdicera estudiados mediante telemetría vía satélite durante el período dispersión juvenil en España. Los valores representan km^2 .

Individuo	1 ^{er} año	2 ^o año	3 ^{er} año	4 ^o año
1	5292	-	-	-
2	3356	14532	2654	23835
3	2604	-	182	-
4	50456	32747	-	-
5	13784	8591	3610	595
6	-	-	-	-
7	6441	9778	-	-
8	-	-	-	-
9	49488	-	-	-
10	17488	-	-	-
11	4721	16767	-	-
12	-	-	-	-
13	4956	-	-	-
14	63775	-	-	-

Tabla 4: Matriz de solapamientos entre las áreas de dispersión de cinco juveniles de águila-azor perdicera. Las cifras indican porcentaje de solapamiento. Los datos de la matriz deben leerse desde las filas, p. e., el 27% del área de dispersión del individuo 3 se solapa con la del individuo 4, solapamiento que para éste representa el 1% de su área de dispersión.

Individuo	3	4	5	7	11
3	100	27	–	–	–
4	1	100	9	2	2
5	–	77	100	–	–
7	–	3	–	100	12
11	–	4	–	24	100

En algunas aves no se identificó ningún dormitorio, mientras que en otros casos llegaron a registrarse hasta un total de ocho (Tabla 2). En el caso de los ejemplares cuyas áreas de dispersión estaban solapadas en algún porcentaje, los individuos 3 y 4 no presentaron ningún dormitorio común, mientras que en los ejemplares 4 y 5, por un lado, y 7 y 11, por otro, se identificó un dormitorio utilizado, en cada caso, por ambos, aunque de manera no simultánea.

De manera general, un total de 10 categorías de cobertura de suelo aparecieron dentro de las áreas de dispersión de los juveniles. En todos los individuos excepto en dos (individuo 4 $\chi^2 = 11.649$, g.l. = 4, $p = 0.02$; individuo 9 $\chi^2 = 180.506$, g.l. = 8, $p < 0.001$), no existieron diferencias entre la frecuencia de localizaciones en las distintas coberturas de suelo y la proporción observada en las áreas de dispersión (demás individuos $p > 0.115$). En general, los individuos fueron localizados más frecuentemente en el tipo de cobertura más abundante en las áreas de dispersión, que corresponde a zonas manejadas, con cultivos de secano y herbáceas, y, de manera secundaria, en matorrales y en zonas manejadas con cultivos de regadío. Los dos individuos que presentaron diferencias también fueron localizados con mayor frecuencia en ese tipo de cobertura, si bien sus áreas de dispersión presentaban un mosaico más heterogéneo de ambientes. Se encontraron diferencias significativas entre las áreas de dispersión de los juveniles en cuanto a la proporción de los distintos tipos de cobertura dentro de ellas ($\chi^2 = 65.336$, g.l. = 90, $p = 0.002$); en algunas la cobertura de zonas manejadas, con cultivos de secano y

herbáceas fue la más abundante, mientras que otras presentaron un mosaico más heterogéneo de ambientes. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre individuos en la frecuencia de localizaciones en los distintos tipos de cobertura dentro de sus áreas de dispersión ($\chi^2 = 39.949$, g.l. = 90, $p = 0.158$), es decir, todos utilizaron preferentemente el mismo tipo de ambiente.

Discusión.

El período de dispersión juvenil en el águila-azor perdicera ha sido hasta ahora difícil de estudiar debido a la elevada capacidad de movimiento de los individuos. Sin embargo, el desarrollo de la telemetría vía satélite ha brindado la oportunidad de documentar los grandes desplazamientos realizados por los jóvenes tras el abandono del territorio paterno y, de ese modo, recabar información sobre los movimientos que realizan y las áreas que recorren. Los primeros meses de la dispersión constan de diferentes etapas que probablemente reflejan sucesivos estadios de la ontogenia de la especie (Fig. 2) (Soutullo et al. 2006). Los movimientos iniciales ocurren dentro del territorio paterno y constituyen el período de dependencia, en el cual los juveniles todavía son dependientes de sus padres en términos de alimentación (Real et al. 1998, Ferrer 2001). El abandono del nido en el águila-azor perdicera ocurre, en España, cuando los pollos tienen de 44 a 69 días de edad (Real et al. 1998, Mínguez et al. 2001), y el comienzo de la dispersión que nosotros hemos registrado ocurrió entre los 114 y los 177 días de edad (Tabla 1), de manera que el período de dependencia en el águila perdicera dura alrededor de 70-108 días. Estos datos están en consonancia con los encontrados anteriormente por Mínguez et al. (2001) (43-131 días, $n=10$), Real et al. (1998) (57-95 días, $n=5$) y Balbontín (2003) (50-114, $n=28$). La edad media al comienzo de la dispersión coincide con estudios previos sobre la especie, con cifras observadas de 142 días (Cadahía et al. 2005), 147 días (Balbontín et al. 2000), 149 días (Mínguez et al. 2001), y es ligeramente menor a los 163 días encontrados por Real et al. (1998). En otras especies de rapaces, como el águila real o el águila imperial ibérica (Ferrer 2001, Soutullo et al. 2006), se ha descrito una fase intermedia entre la independencia de los juveniles con respecto de sus progenitores y el abandono definitivo del

territorio paterno, que Ferrer (2001) denominó ‘dispersión local’ para el águila imperial ibérica. A diferencia de estas especies, nosotros encontramos que el águila-azor perdicera presenta un comportamiento claramente dispersante (*sensu* Walls & Kenward 1995), es decir, una vez que los juveniles abandonan el territorio paterno recorren largas distancias, sin demorarse en las inmediaciones de su área natal. No obstante, una fase de características similares a la ‘dispersión local’ ha sido descrita por Real et al. (1998) para el águila-azor perdicera, en un estudio mediante radioteleimetría VHF y observaciones de campo.

Tanto las hembras como los machos presentan una fase diferenciada en la que la distancia al nido se incrementa de manera pronunciada, corroborando el patrón de que las rapaces tienden a dispersarse de forma abrupta (Kenward et al. 2002). Este período corresponde a una etapa exploratoria observada en estudios previos en esta y otras especies de águilas (Cugnasse & Cramm 1990, Ferrer 2001, Cadahía et al. 2005). Este rápido incremento en la distancia al nido es más acusado en los machos que en las hembras, puesto que los machos se dispersan más tarde pero se asientan pronto en áreas de dispersión, mientras que las hembras dedican más tiempo a explorar antes de asentarse definitivamente (Fig. 2). Alrededor del séptimo mes de vida la distancia al nido se estabiliza, lo cual indica que los juveniles dejan de explorar y se asientan en áreas de dispersión.

Hacia el final del primer año de vida es posible apreciar un descenso moderado (no significativo) en la distancia a los nidos natales (Fig. 2), que en realidad está originado por el comportamiento de cuatro juveniles. Dos hembras y dos machos realizaron movimientos breves y puntuales fuera de sus áreas de dispersión y se desplazaron, de manera general, hacia sus territorios paternos. En estos desplazamientos se registraron acercamientos a sus nidos natales de hasta 33 km. La baja y en ocasiones irregular frecuencia de los datos de satélite (Soutullo et al. 2006, Cadahía et al. en prensa b, Soutullo et al. en prensa) deja períodos en blanco de 1 a 20 días en los que no se registra ninguna localización (Cadahía et al. en prensa b) y que podrían estar ocultando mayores acercamientos a las áreas natales. Este tipo de retornos se ha observado en algunas especies de rapaces estudiadas por radioteleimetría, como el águila imperial ibérica (Ferrer 1993a, 2001)



o el busardo ratonero (Walls & Kenward 1995, 1998), y ya habían sido sugeridos en el águila-azor perdicera con anterioridad (Real & Mañosa 2001). Dos hipótesis han sido propuestas para explicar este patrón. Por un lado, se ha sugerido que los juveniles podrían estar usando sus áreas natales simplemente como un área de dispersión más, basándose en la potencial mayor densidad de presas (Ferrer 1993a). A pesar de que esto pueda ser posible en algunos casos, como en el del águila imperial ibérica (Ferrer 2001), es cuestionable que aves que ya están asentadas en lugares que distan de 81 km a 534 km de sus áreas natales vuelvan a éstas solamente para utilizarlas como otra área de dispersión. También se ha propuesto que con estos movimientos los juveniles comprueban la existencia de algún hueco en la población reproductora. De hecho, en España se ha identificado una tendencia creciente a que águilas jóvenes intenten la cría, lo cual se ha sugerido como una posible señal de aviso de cambios en la tendencia de la población (Balbontín et al. 2003). En parejas donde uno o ambos individuos son subadultos, el riesgo de fallo reproductor es alto, debido a la inmadurez, la baja experiencia y a la posible instalación en territorios subóptimos, afectando, por tanto, a parámetros demográficos como la productividad (Balbontín et al. 2003). Sin embargo, datos recientes que descartan la existencia de filopatria en el águila-azor perdicera, al menos en todos los casos, en principio estarían en desacuerdo con la hipótesis de comprobación de huecos para reproducirse (Cadahía et al. en revisión).

A pesar de que en general no fueron significativas, se observaron tendencias en lo que respecta a las diferencias entre sexos, como el hecho de que las hembras se dispersaron antes o que el tamaño de las áreas de dispersión de los machos fue mayor. Real et al. (1998) señalan una tendencia a que los machos tengan períodos de dependencia más prolongados, dispersándose por tanto a mayor edad, lo que concuerda con el patrón aquí encontrado. La falta de diferencias entre sexos en el comienzo de la dispersión también ha sido observada en el águila-azor perdicera con anterioridad (Balbontín 2003), así como en otras especies de rapaces, como el águila imperial ibérica (Ferrer 1993a, b, 2001), el busardo ratonero (Walls & Kenward 1995) o el águila real (Soutullo et al. 2006). El hecho de que el número de áreas de dispersión sea significativamente distinto podría estar motivado por la diferencia en

el número de machos y hembras marcados. Sin embargo, es también factible que los machos sean peores competidores, debido a su menor tamaño con respecto a las hembras. De ser así, sus áreas de dispersión serían de mayor tamaño, pues se trataría de zonas de peor calidad, con lo que deberían recorrer un mayor territorio para poder tener acceso a las presas, y, además, necesitarían moverse a zonas nuevas para poder alimentarse. Esta hipótesis estaría de acuerdo con los resultados aquí encontrados, pero se necesitan posteriores investigaciones en este sentido para contrastarla.

En este estudio hemos aplicado un método para la identificación de dormideros a partir de datos de seguimiento por satélite. El diferente número de dormideros descritos en los individuos depende fundamentalmente de la inestabilidad en la frecuencia de recepción de datos a través del sistema Argos (Fancy et al. 1988, Keating et al. 1991, Argos 1996, Kenward 2001, Vincent et al. 2002, Soutullo et al. en prensa), que hace que no en todas las ocasiones se disponga de un número suficiente de localizaciones nocturnas de calidad adecuada. Por tanto, las cifras aquí presentadas son, evidentemente, una infraestima del número real de dormideros que usan los individuos. Sin embargo, el uso de emisores GPS programados según un horario de funcionamiento nocturno permitiría una estimación mucho más realista del número y localización de dormideros. El hecho de que existan lugares comunes de descanso en individuos con áreas de dispersión solapadas indica que se trata de lugares que deben reunir unas características adecuadas que probablemente son aprovechadas por muchos individuos dispersantes. El uso de exactamente los mismos puntos como dormidero ha sido registrado con anterioridad en el águila imperial ibérica (Ferrer 2001).

Los juveniles de águila-azor perdicera explotan, durante su período de dispersión, una serie de zonas alejadas de sus territorios natales. El asentamiento en estas áreas de dispersión tras los movimientos exploratorios iniciales había sido ya observado con anterioridad en diversos estudios, independientemente del método utilizado (observación y recuperación de anillas y marcas alares, Real & Mañosa 2001; radiotelemetría VHF, Arroyo et al. 1992, Balbontín 2003; telemetría vía satélite, Alcántara et al. 2001, Cadahía et al. 2005, en prensa a). Estas áreas de dispersión corresponden a zonas más o menos localizadas, donde se agrupan varios



individuos, confirmándose así que los jóvenes de águila-azor perdicera no son territoriales (Real 2004, Cadahía et al. 2005). El presente trabajo corrobora que las Comunidades Autónomas de Castilla La Mancha y Andalucía son los lugares de agrupación de águilas jóvenes más notables, pero resalta también la importancia de otras áreas situadas en el norte y este de la Península Ibérica (Fig. 1). La caracterización general del hábitat resalta la preferencia de los juveniles por áreas con un tipo de cobertura determinado, fundamentalmente cultivos de secano y herbáceas, que son zonas básicamente manejadas por el hombre. La probable mejor accesibilidad a las presas de caza menor, como los conejos o las perdices, en este tipo de coberturas, normalmente más abiertas, junto con la ausencia de parejas de reproductores, probablemente explica esta preferencia y la distribución de las áreas de dispersión en la Península Ibérica (Mañosa et al. 1998, Real 2004). Un tipo de cobertura similar ha sido encontrado con anterioridad en estudios sobre ésta (Mañosa et al. 1998, Balbontín 2005) y otras especies de águila (Ferrer 2001) en sus áreas de dispersión en España. Sin embargo, estas zonas albergan importantes amenazas, como la existencia de tendidos eléctricos peligrosos, que causan muertes por colisiones y electrocuciones, o la persecución por parte del hombre, dado que en ocasiones se trata de cotos de caza donde las águilas compiten directamente con los cazadores (Real et al. 2001, Real 2004).

La existencia de estas áreas de dispersión tiene dos implicaciones fundamentales desde el punto de vista de la conservación de la especie. En primer lugar, se trata de zonas concretas y relativamente delimitables por estudios como el presente, lo cual implica que las acciones de conservación necesarias deben emprenderse en unos lugares determinados con unos problemas particulares y no en todo el territorio en general. De este modo se podrá proteger un elevado porcentaje de la población no reproductora protegiendo un bajo porcentaje de territorio. En otras especies, como el águila imperial ibérica, se ha visto que solucionar problemas en las áreas de dispersión, tales como la toma de medidas para reducir las electrocuciones y la persecución directa, tiene un efecto más beneficioso para la población original que otras actuaciones dirigidas a incrementar la productividad de la misma (Ferrer 2001). La segunda implicación tiene que ver con la gestión. Las



áreas de dispersión identificadas se encuentran en territorios gestionados por 11 Comunidades Autónomas diferentes. Esto pone de manifiesto la evidente necesidad de organización entre las distintas administraciones con el objetivo de adoptar estrategias interregionales de protección dirigidas a la fracción no reproductora de la población que, por extensión, beneficiarán a la totalidad de la especie.

Referencias.

- Alcántara, M., Ferreiro, E. & Gardiábal, A. 2001. Dispersal of young Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*): First results by satellite telemetry (LIFE project B4-3200/97/252 Conservation Plan of Bonelli's eagle in Sierra de Guara, Huesca, Aragón). IV Eurasian Congress on Raptors. Sevilla (Spain).
- Argos. 1996. User's Manual. CLS/Service Argos, Toulouse.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1992. Factores Limitantes de la Población de Águila Perdicera en España. Informe técnico. Madrid: ICONA.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1995. El águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en España. Censo, reproducción y conservación. Informe técnico. Madrid: Colección técnica ICONA.
- Balbontín, J. 2003. El águila perdicera en Andalucía: ecología y dispersión juvenil. Universidad de Sevilla. Tesis Doctoral.
- Balbontín, J. 2005. Identifying suitable habitat for dispersal in Bonelli's eagle: An important issue in halting its decline in Europe. *Biological Conservation* 126: 74-83.
- Balbontín, J., Penteriani, V. & Ferrer, M. 2000. El águila perdicera en Andalucía: situación actual y tendencias en las áreas de reproducción y de dispersión juvenil. Informe técnico Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía (España) / Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Balbontín, J., Penteriani, V. & Ferrer, M. 2003. Variations in the age of mates as an early warning signal of changes in populations trends? The case of Bonelli's Eagle in Andalusia. *Biological Conservation* 109: 417-423.
- Britten, M.W., Kennedy, P.L. & Ambrose, S. 1999. Performance and accuracy evaluation of small satellite transmitters. *Journal of Wildlife Management* 63: 1349-1358.
- Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. 2002 (eds). *Dispersal Ecology*. Oxford: Blackwell.
- Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. 2005. Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's eagles *Hieraaetus fasciatus* during their first winter. *Ibis* 147: 415-419.
- Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* juvenile dispersal: hourly and daily movements tracked by GPS. *Bird Study* 54. En prensa a.
- Cadahía, L., López-López, P., Urios, V. and Negro, J. J. Estimating the onset of dispersal in endangered Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* tracked by satellite telemetry: a comparison among methods. *Ibis*. En prensa b.
- Cadahía, L., López-López, P., Urios, V. & Negro, J.J. From hatching to parenthood: Recruitment to the breeding population of a Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* after four years of satellite tracking. *Journal of Avian Biology*. En revisión.
- Cheyland, G., Ravayrol, C., Cugnasse, J.-M., Billet J.-M. & Joulot, C. 1996. Dispersion des Aigles de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* juveniles

- bagués en France. *Alauda* 64: 413-419.
- Clobert, J., Danchin, E., Dhont, A.A. & Nichols, J. (eds) 2001. *Dispersal – Causes, Consequences and Mechanisms of Dispersal at the Individual, Population and Community Level*. Oxford: Oxford University Press.
- Cramp, S. & Simmons, K.E.L. 1980. *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa - vol. 2*. Oxford: Oxford University Press.
- Cugnasse, J.-M. & Cramm, P. 1990. L'erratismo de l'Aigle de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* en France. *Alauda* 58: 59-66.
- Del Hoyo J., Elliot A. & Sargatal J. 1994. *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 2: *New World Vultures to Guinea-fowl*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Dixon, K.R. & Chapman, J.A. 1980. Harmonic mean measure of animal activity areas. *Ecology* 61: 1040-1044.
- Fancy, S.G., Pank, L.F., Douglas, D.C., Curby, C.H., Garner, G.W., Amstrup, S.C. & W.L. Regelin. 1988. *Satellite telemetry: a new tool for wildlife research and management*. US Fish and Wildlife Service Resource Publication 172.
- Ferrer, M. 1993a. Juvenile dispersal behaviour and natal philopatry of a long-lived raptor, the Spanish imperial eagle *Aquila adalberti*. *Ibis* 135: 132-138.
- Ferrer, M. 1993b. Ontogeny of dispersal distances in young Spanish imperial eagles. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 32: 259-263.
- Ferrer, M. 2001. *The Spanish imperial eagle*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Fridolfsson, A.-K. & Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.
- Gil-Sánchez, J.M. 2000. Efecto de la altitud y de la disponibilidad de presas en la fecha de puesta del águila-azor perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en la provincia de Granada (SE de España). *Ardeola* 47: 1-8.
- Greenwood, P.J. & Harvey, P.H. 1982. The natal and breeding dispersal of birds. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 13: 1-21.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Hays, G.C., Åkesson, S., Godley, B.J., Luschi, P. & Santidrian, P. 2001. The implications of location accuracy for the interpretation of satellite - tracking data. *Animal Behaviour* 61: 1035-1040.
- Hooge, P.N. & Eichenlaub, B. 1997. *Animal Movement Extension to ArcView*. Ver. 1.1. Alaska Science Center – Biological Science Office, U.S. Geological Survey, Anchorage.
- Johnson, M.L. & Gaines, M.S. 1990. Evolution of dispersal: theoretical models and empirical tests using birds and mammals. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 21: 449-480.
- Keating, K.A., Brewster, W.G. & Key, C.H. 1991. *Satellite telemetry: performance of animal-*

- tracking systems. *Journal of Wildlife Management* 55: 160-171.
- Kenward, R. 2001. A manual for wildlife radio tagging. Academic Press, London, San Diego.
- Kenward, R.E., Clarke, R.T., Hodder, K.H. & Walls, S.S. 2001. Density and linkage estimators of home range: Nearest-Neighbour clustering defines multinuclear cores. *Ecology* 82: 1905-1920.
- Kenward, R.E., Rushton, S.P., Perrins, C.M., Macdonald, D.W. & South, A.B. 2002. From marking to modelling: dispersal study techniques for land vertebrates. En: Bullock, J.M., Kenward, R.E. & Hails, R.S. (eds). *Dispersal Ecology*. Oxford: Blackwell.
- Mañosa, S., Real, J. & Codina, J. 1995. Age estimation and growth patterns in nestling Bonelli's eagles. *Journal of Raptor Research* 29: 273-275.
- Minguez, E., Angulo, E. & Siebering, V. 2001. Factors influencing length of the post-fledging period and timing of dispersal in Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in Southwestern Spain. *Journal of Raptor Research* 35: 228-234.
- Pekel, J.F., Vancutsem, N., Deofurney, P., Champeaux, J.L., Gouveia, C., Lobo, A., Griguolo, S., Perdigo, A. & Bartholomé, E. 2003. The Land Cover Map for Europe in the Year 2000. GLC2000 database, European Commission Joint Research Centre. <http://www-gvm.jrc.it/glc2000>.
- Real, J. 2004. Águila-azor perdicera, *Hieraaetus fasciatus*. En: Madroño, A., González, C. & Atienza, J.C. (eds) *Red Book of the Birds of Spain*. Libro Rojo de las Aves de España. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad-SEO/Birdlife.
- Real, J., Grande, J.M., Mañosa, S. & Sánchez-Zapata, J.A. 2001. Geographic variation of the causes of death of Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* in Spain. *Bird Study* 48: 221-228.
- Real, J. & Mañosa, S. 1997. Demography and conservation of western European Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* populations. *Biological Conservation* 79: 59-66.
- Real, J. & Mañosa, S. 2001. Dispersal of juvenile and immature Bonelli's eagles in Northeastern Spain. *Journal of Raptor Research* 35: 9-14.
- Real, J., Mañosa, S. & Codina, J. 1998. Post-nestling dependence period in the Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus*. *Ornis Fennica* 75: 129-137.
- Soutullo, A., Cadahía, L., Urios, V., Ferrer, M. & Negro, J. J. Accuracy of lightweight satellite telemetry: a case study in the Iberian Peninsula. *Journal of Wildlife Management*. En prensa.
- Soutullo, A., Urios, V., Ferrer, M. & Peñarrubia, S. 2006. Post-fledging behaviour in Golden Eagles *Aquila chrysaetos*: onset of juvenile dispersal and progressive distancing from the nest. *Ibis* 148: 307-312.
- Torres, J.A., Jordano, P. & León, A. 1981. Aves de presa diurnas de la provincia de Córdoba. Madrid: Publicaciones del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba.
- Vincent, C., McConnel, B.J., Fedak, M.A. & Ridoux, V. 2002. Assessment of Argos location accuracy from satellite tags deployed on captive grey seals.



-
- Marine Mammal Science 18: 301-322.
- Walls, S. & Kenward, R. 1995. Movements of radio-tagged buzzards *Buteo buteo* in their first year. *Ibis* 137: 177-182.
- Walls, S. & Kenward, R. 1998. Movements of radio-tagged buzzards *Buteo buteo* in early life. *Ibis* 140: 561-568.
- Worton, B.J. 1989. Kernel methods for estimating the Utilization Distribution in home-range studies. *Ecology* 70: 164-168.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th edn. New Jersey: Prentice Hall.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 6

From hatching to parenthood:
recruitment to the breeding population of a
Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus*
after four years of satellite tracking.

Cadahía, L., López-López, P., Urios, V. & Negro, J.J. *Journal of Avian Biology*.
En revisión.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Abstract.

As part of a large-scale dispersal project, in May 2002, a Bonelli's eagle nestling, later known to be a female through molecular gender determination, was tagged in eastern Spain with a solar powered PTT-100. This female has been the first individual known to attempt breeding out of 15 radiotagged between 2002-2004. Her movements were monitored using the Argos system until March 2006. In February 2006, after being tracked for more than 1300 days and having covered at least 9500 km, her satellite locations were confined to a restricted area in central Spain. The individual was searched visually in and around the last coordinates given by the satellite. The female was located along with an unbanded Bonelli's eagle, presumably a male mate. We subsequently confirmed that these birds were attending a newly built nest distant 441 km from her natal nest, and that the nest contained a single egg in April 2006. The egg never hatched, but the pair was still observed in their home range and displayed territorial behaviour through the summer 2006. This is the first time the whole natal dispersal process has been monitored in a Bonelli's eagle. Although pertaining to a single individual, the information presented here confirms that Bonelli's eagle can disperse over very long distances in Spain and suggests the potential for gene flow among different geographic populations in the Iberian Peninsula. The conclusion for conservation is that single individuals may use through their lives non overlapping natal, pre-breeding and breeding areas covering a large part of the Mediterranean region of the Iberian Peninsula. A concerted effort among Autonomous Governments in Spain and Portugal is essential to ensure the protection of the species, as local declines may have causes or consequences in distant sites managed by different administrations.

Key words: Argos satellite telemetry; Bonelli's Eagle; *Hieraaetus fasciatus*; natal dispersal; philopatry; recruitment.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Introduction.

Long-term tracking studies on animal movements are difficult and logistically complex to carry out, typically due to transmitters' limitations in terms of weight, battery duration and performance, the difficulty to trap enough individuals, or, more commonly, due to budget constraints (Kenward 2001). These problems become especially serious when it comes to monitor species with long-distance dispersal movements, broad home ranges and delayed reproduction, for which conventional VHF radio-tracking may not be suitable (Sutherland et al. 2004, Cadahía et al. 2005). In this context, satellite tracking techniques, though expensive, can be very helpful. Bonelli's eagles (*Hieraaetus fasciatus*) are potentially long-distance dispersers (Cadahía et al. 2005) and thus they are hard to track by conventional radio-tracking methods. Juveniles usually leave their natal territory in a sudden way and tend to travel large distances (Balbontín et al. 2000, Cadahía et al. 2005, Cadahía et al. in press b) before using temporary settlement areas (Mañosa et al. 1998, Balbontín et al. 2000, Ferrer 2001).

The strongholds of the European Bonelli's eagle breeding population are in the Iberian Peninsula, but the species is considered as 'endangered' in Spain and Portugal (Martí and Del Moral 2003, Real 2004). Even though main aspects of its biology have been studied (i.e. population trends, breeding performance, habitat selection; Arroyo et al. 1992, Real and Mañosa 1997, Gil-Sánchez 2000, Carrete et al. 2002, López-López et al. 2005), a complete description of the dispersal behaviour and recruitment to the breeding population has not yet been carried out. Knowledge on how individuals recruit into the breeding population is critical to define management units for conservation.

In 2002-2004, we equipped 15 nestlings of Bonelli's eagle with satellite transmitters in eastern Spain. In this paper, our aim is to report the movements and behaviour along the whole natal dispersal period of the first tagged individual that has mated and attempted breeding, a female eagle that has happened to be a long distance disperser. We also provide information on the fate of the remaining tagged individuals.

Methods.

Between 2002 and 2004 we tagged 15 Bonelli's eagle nestlings in eastern Spain. Nestling body mass and tail length were recorded, and the individuals were fitted with solar and battery powered PTT-100s manufactured by Microwave Telemetry, Inc. (USA), which were fixed to the birds' body by a breakaway Teflon harness (Kenward 2001). In addition, an eight-gram VHF transmitter with a battery life expectancy of eight months was glued to the PTT. This would allow tracking the individuals visually during the first stages of dispersal. The PTTs were set either to an 8-h on / 120-h off or a 16-h on / 72-h off duty cycle and their weight was well below the 3% recommended by Kenward (2001) in all cases. Gender of the birds was established molecularly (Griffiths et al. 1998, Fridolfsson and Ellegren 1999) using a blood sample collected when the individual was tagged. Nestlings' age was estimated according to feather growth and pattern (Torres et al. 1981, Gil-Sánchez 2000) while in the nest. Exact age at tagging was calculated as: $\text{age} = 0.200 \times \text{tail length (central rectrix) (mm)} + 16,262$ (Mañosa et al. 1995).

Estimation and initial management of the locations was made by Argos, a satellite-based location and data collection system (for an explanation on how the system works see Argos 1996, Kenward 2001). Argos location classes (LC) 3, 2 and 1, with nominal accuracy < 150 m, 150-350 m and 350-1000 m, respectively, were used in this study (Argos 1996; but see Keating et al. 1991, Soutullo et al. in press). Lower quality locations (LC 0, A and B) were also considered. In this case, we filtered the location data set using available information on juvenile eagles' movements, based on high-quality GPS data and on Argos accuracy tests (see Cadahía et al. in press b, Soutullo et al. in press).

Data transmission has ended for all tagged birds, either because the bird died, a PTT failure or unknown causes. The total number of transmitting days (from tagging to transmission stop) (N_{TD}), the straight distance to the natal nests once transmission stopped (D_{STOP}) and the total distance registered by the satellite have been computed. The ratio $D_{\text{STOP}}/N_{\text{TD}}$ was calculated to get an idea about the birds' mobility patterns.

On 9th May 2002 a female nestling (from a pair of siblings), whose nest was located on a rocky cliff surrounded by Mediterranean scrubland in the 'Dessert de les Palmes' Natural Park (Castellón, Spain; Fig. 1), was tagged with a solar PTT. The onset of dispersal, considered to occur when the bird became independent from her parents (Ferrer 2001, Cadahía et al. in press a), was assumed to happen once the juvenile flew beyond the average inter-nests distance in the region and did not return to the nest vicinity in the following two records (see Cadahía et al. in press a). The date and age at the onset of dispersal were recorded. For each year, we computed the median annual distance and the maximum annual distance to the nest, as well as the annual home range size, using the 95% Minimum Convex Polygon (MCP) method. We also calculated the total maximum distance reached, the total distance covered by the bird as recorded by the tracking system, the natal dispersal distance, i.e., the length of a straight line connecting the natal nest with the first breeding site, and the number of days in which the bird was tracked. Home range sizes were computed using the Home Range extension (Rodgers and Carr 1998), implemented in ArcView 3.2 (ESRI 1999).

Results.

The number of transmitting days in all 15 individuals ranged from 83 to 1508. The distance to the natal nests when data transmission ceased ranged between 7 km and 574 km, and the total distance covered as recorded by the satellite varied between 97 km and 9421 km (Table 1). Different mobility patterns were observable, with some birds moving to very distant locations in short periods of time ($D_{STOP}/N_{TD} = 4.422$) while others stayed closer to their natal areas, despite having transmitted for longer periods ($D_{STOP}/N_{TD} = 0.059$) (Table 1).

Table 1: Tracking and movement parameters of 15 Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* juveniles whose juvenile dispersal was monitored by satellite tracking in Spain.

Individual	Sex	Tagging date	Transmission stops	Number of transmitting days (N _{TD})	Distance to natal nest when transmitting ceased (D _{STOP}) (km)	D _{STOP} /N _{TD}	Total distance recorded (km)
1	M	22 Apr 2002	*	-	-	-	-
2	F	22 Apr 2002	01 Dec 2002	223	79	0.354	432
3	M	26 Apr 2002	12 Jun 2006	1508	261	0.173	8338 ^a
4	F	08 May 2002	15 Jan 2005	983	94	0.096	2404
5	M	08 May 2002	13 Jul 2003	431	426	0.988	2430
6	F	09 May 2002	04 Mar 2006	1395	441	0.316	9421 ^b
7	F	09 May 2002	31 Jul 2002	83	367	4.422	420
8	F	20 May 2002	23 Nov 2003	552	550	0.996	6401
9	F	30 Apr 2003	26 Aug 2003	118	7	0.059	97
10	M	14 May 2004	21 Feb 2005	283	164	0.580	3976
11	F	17 May 2004	13 Nov 2005	545	574	1.053	2736
12	M	11 Jun 2004	10 Feb 2006	609	336	0.552	4780
13	F	11 Jun 2004	20 Sep 2004	101	375	3.713	533
14	F	11 Aug 2004	18 Feb 2005	191	235	1.230	1218
15	F	11 Aug 2004	20 May 2005	282	147	0.521	3308

*Died before starting transmission. ^aMale tracked for more than four years, whose recruitment to the breeding population could not be confirmed. ^bFemale present study.

The PTT of the only individual (a female) in the tagged group that we know eventually mated after four years, ceased transmission on 4th March 2006, when the eagle was 1452 days old. This individual dispersed from its natal territory on 5th July 2002, at the age of 114 days. After crossing six Autonomous Communities (Spanish administrative units) and having covered around 840 km, in early September 2002 she settled in an area in central Spain 420 km distant from her natal nest. The remaining three years she remained in the same general area, at the boundary of two Autonomous Communities (Fig. 1). The annual median and maximum distances to the nest and annual home range sizes are on Table 2. Home range size progressively decreased with time (Fig. 1, Table 2). The maximum distance reached during the whole natal dispersal period from the natal nest was 541 km. The total distance recorded by the tracking system that was covered during the transmitting period was 9421 km. The number of tracking days, i.e., days in which the PTT sent signals, was 229 (or 1/6th of the 1395 days the bird was tracked).

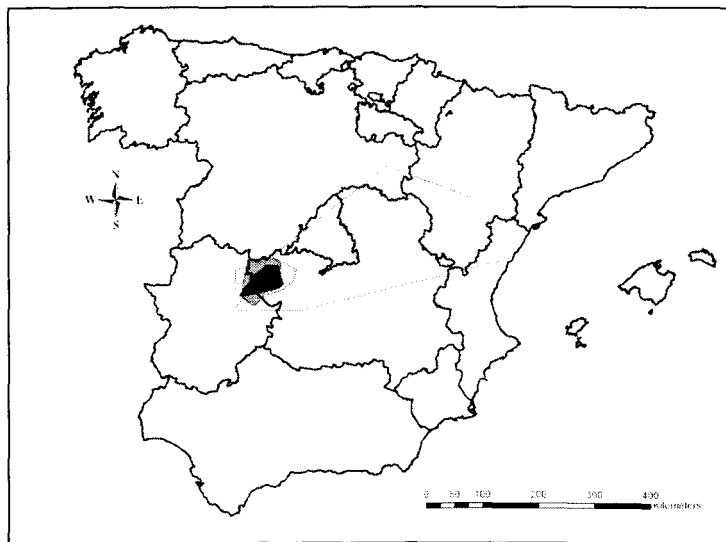


Figure 1: Annual home ranges of a juvenile Bonelli's eagle computed using the 95% Minimum Convex Polygon (MCP) in Spain (Autonomous Communities' boundaries are shown). First to fourth year home range areas are shown in greyscale. The broken arrow represents the natal dispersal distance, i.e., the distance from the natal nest to the first breeding place.



Table 2: Annual movement parameters recorded for a Bonelli's eagle juvenile female tracked by satellite telemetry since the beginning of dispersal until recruitment to the breeding population in Spain.

	1 st year	2 nd year	3 rd year	4 th year
Median annual				
distance to nest	413 km	448 km	434 km	441 km
Maximum annual				
distance to nest	503 km	533 km	498 km	541 km
Annual home range				
size	66609 km ²	5730 km ²	3874 km ²	2468 km ²

At the beginning of 2006 breeding season (January and February), the female's locations were observed to be confined to a restricted area in central Spain. Three field trips (on 31st March, 21st April and 6th June 2006) permitted us to observe that the female was attending a stick nest located on a rocky outcrop 441 km (i.e., the natal dispersal distance) west and slightly south from the natal nest (Fig. 1). During the first visit the female briefly landed in a nest lined with green leaves but no incubation activity was observed from a distant vantage point (after 3 h of observation with spotting scope). The bird showed barred plumage on the remiges and tail, still retaining juvenile characters. The bird also showed a metallic ring in the right tarsus and the PTT on her back, which lead us to verify that it was the female we had tagged four years earlier. In the second visit, the female was observed incubating and turning around a single egg (3 h of observation from the same vantage point as in the previous visit). Her male mate was also observed in the eyrie. After these visits we waited for the egg to hatch, carrying out a third visit 65 days after the first approach to the area (leaving enough time for the incubation period of 37 - 41 days in the Bonelli's eagle; del Hoyo et al. 1994). However, this last visit confirmed the breeding failure, given that the nest seemed to be abandoned by the pair, as there were no green leaves lining the top of the platform and the egg was still unhatched. The pair was sighted in the eyrie and observed displaying territorial

behaviour (e.g., chasing away an intruding juvenile Golden eagle *Aquila chrysaetos*) but no landing at the nest was recorded.

According to our observations, egg laying may have taken place in the first fortnight of April, at some point between our first (when no incubating behaviour was registered) and our second visit (when the egg was first observed). In summer 2006 the female was captured again, the non-working PTT was removed and the bird was fitted with a VHF transmitter, so that her movements could still be monitored in her current eyrie.

Discussion.

Numerous examples of satellite tracking studies are available in the literature (e.g. Weimerskirch et al. 1993, Morreale et al. 1996, Block et al. 1998, Croxall et al. 2005, Weimerskirch et al. 2006). However, multi-annual monitoring studies of the same individual are still scarce (but see <http://www.seaturtle.org/tracking/> for a set of records in several organisms) possibly due to technological limitations of the tracking devices (Kenward 2001). In our case, the uninterrupted use of a single PTT enabled us to track a female Bonelli's eagle during four years and, thus, report for the first time her entire natal dispersal process. Moreover, albeit the whole process could not be tracked in the remaining individuals, we could perform multi-annual monitoring in at least six other cases (four eagles for up to two years, one for up to three years and another one for more than four years; Table 1).

Even though it is believed that the Bonelli's eagle is a long distance disperser, at least in Spain (Real and Mañosa 2001, Cadahía et al. 2005, Cadahía et al. in press b), there remained several aspects of the dispersal period that had not been thoroughly documented yet. One of them concerns the areas visited by the dispersing eagles. The areas the female covered after the initial phase of dispersal and throughout the remaining transmitting time were coincident with those already reported for juveniles of the species in a number of previous studies (Arroyo et al. 1992, Cheylan et al. 1996, Real and Mañosa 1997, 2001, Cadahía et al. 2005). These regions hold important populations of small game, especially rabbits (Arroyo et al. 1992, Cadahía et al. 2005), but there are no territorial adults possibly because of the



absence of suitable cliffs for safe nesting and due to persecution by game caretakers. These areas are in fact known to register a high mortality rate of immature Bonelli's eagles (Real et al. 2001). Other important subject concerning Bonelli's dispersal is related to how and when individuals decide to settle in a potential first-breeding site. The annual home range size progressive contraction around the site eventually chosen for breeding (Fig. 1) might suggest that our female eagle focused on that area at least one or even two years in advance. Whether this is a general pattern or it merely corresponds to individual variation awaits confirmation. Hints suggesting that her mating process corresponded to the formation of a new pair in a marginal area have been pointed out (V. García Matarranz, pers. comm.).

Another essential question is whether Bonelli's eagle is a philopatric species that returns to its natal area to breed. The female that we have monitored cannot be considered philopatric, as it travelled the equivalent to at least 37 Bonelli's eagle's territories (assuming an 11.9 km radius for the average cyrie; Arroyo et al. 1995). This low philopatry is also suggested by the concurrent monitoring of a male Bonelli's eagle we also tracked for four years (1508 tracking days, from 2002 to 2006; Table 1). Although we could not confirm him to settle in a breeding territory, the last locations before losing contact corresponded to a breeding area of the species located around 260 km away from his natal territory. Furthermore, the remaining monitored individuals moved to locations distant from their natal nests, despite not having been tracked for so long.

The recruitment to the breeding population occurring in locations distant from the natal nests entails the existence of gene flow among different populations in the distribution range. Genetic studies based on protein genetic variability and mitochondrial DNA sequencing detected low genetic diversity in the Iberian Peninsula and the absence of a genetic structure, thus concluding that there was no evidence for restriction of gene flow across the distribution range (Cardia et al. 2000, 2002, Cadahía et al. 2007). However, new analyses based on microsatellites indicate that there is certain genetic structure (Mira 2006). These contradicting genetic results, along with the findings we report here, indicate that further research aimed at detecting a potential source-sink dynamics should also be conducted.



The main implication for conservation that can be drawn from our results is that single individuals may use through their lives non overlapping natal, pre-breeding and breeding areas, covering a large part of the Mediterranean region of the Iberian Peninsula. These areas are managed by governments belonging to different Spanish Autonomous Communities (at least six in our case). For this reason we suggest the establishment of an interregional (i.e., among Autonomous Governments in Spain) or even international (i.e., Spain and Portugal) conservation framework for Bonelli's eagle in the Iberian Peninsula. Such a concerted effort will be essential to ensure the protection of the species, as local declines may have causes or consequences in distant sites managed by different administrations.



Acknowledgements.

We are grateful to the Conselleria de Territori i Habitatge of the Generalitat Valenciana (J. Jiménez, P. Mateache, A. Izquierdo and A. García i Sanz, along with the forest rangers), the Consejería de Industria y Medio Ambiente of the Región de Murcia (E. Aledo, E. Cerezo), the Departament de Medi Ambient of the Generalitat de Catalunya (X. Parellada), the universities of Barcelona (J. Real, N. Pocino) and Miguel Hernández of Elche (M. Carrete, J. A. Sánchez-Zapata), the ICRA (M. R. Jané, T. Borau) and the Spanish Ministerio de Medio Ambiente (V. García Matarranz, P. García Domínguez) for permission to get access to the nests, partial funding and support during fieldwork. Thanks are also due to P. González Mencía and S. Villaverde for help in trapping the female in 2006. This project was funded by Terra Natura Foundation. We are grateful to M. Gallardo, R. Limiñana, A. Menargues, C. García, D. Pavón and M. Catalán for their valuable help and support in the field trips as well as for their comments on the manuscript. L. Cadahía is supported by a grant of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (reference AP2001-1444). This paper is part of L. Cadahía's Ph.D. at the University of Alicante.

References.

- Argos. 1996. User's Manual. CLS/Service Argos, Toulouse.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. and Garza, V. 1992. Factores Limitantes de la Población de Águila Perdicera en España. – Technical report. Madrid: ICONA.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. and Garza, V. 1995. El águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en España. Censo, reproducción y conservación. – Technical report. Madrid: Technical collection ICONA.
- Balbontín, J., Penteriani, V. and Ferrer, M. 2000. El águila perdicera en Andalucía: situación actual y tendencias en las áreas de reproducción y de dispersión juvenil. – Unpublished technical report Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía (Spain).
- Block, B. A., Dewar, H., Farwell, C. and Prince, E. D. 1998. A new satellite tracking technology for tracking the movements of Atlantic bluefin tuna. Proceedings of the National Academy of Science USA 5: 9384-9389.
- Cadahía, L., López-López, P., Urios, V. and Negro, J. J. Estimating the onset of dispersal in endangered Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* tracked by satellite telemetry: a comparison among methods. Ibis. In press a.
- Cadahía, L., Urios, V. and Negro, J. J. 2005. Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's eagles *Hieraaetus fasciatus* during their first winter. Ibis 147: 415-419.
- Cadahía, L., Negro, J. J. and Urios, V. 2007. Low mitochondrial DNA diversity in the endangered Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*) from SW Europe (Iberia) and NW Africa. Journal of Ornithology 148: 99-104.
- Cadahía, L., Urios, V. and Negro, J. J. Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus* juvenile dispersal: hourly and daily movements tracked by GPS. Bird Study. In press b.
- Cardia, P., Fraguas, B., Pais, M., Guillemaud, T., Palma, L., Cancela, M. L., Ferrand, N. and Wink, M. 2000. Preliminary genetic analysis of some western Palearctic populations of Bonelli's eagle, *Hieraaetus fasciatus*. In: Chancellor, R. D. and Meyburg, B.-U. (eds). Raptors at risk. WWGBP / Hancock House. Berlin.
- Cardia, P., Fraguas, B., Pais, M., Silva, S., Guillemaud, T., Palma, L., Cancela, M. L. and Ferrand, N. 2002. Análise da variação genética de proteínas em populações mediterrânicas de águia-perdigueira *Hieraaetus fasciatus*. Airo 12: 71-74.
- Carrete, M., Sánchez-Zapata, J. A., Martínez, J. E. and Calvo, J. F. 2002. Predicting the implications of conservation management: a territorial occupancy model of Bonelli's Eagle in Murcia, Spain. Oryx 36: 349-356.
- Cheylan, G., Ravayrol, A., Cugnasse, J.-M., Billet, J.-M. and Joulot, C. 1996. Dispersion des Aigles de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* juveniles bagués en France. Alauda 64: 413-419.
- Croxall, J. P., Silk, J. R. D., Phillips, R. A., Afanasyev, V. and Briggs, D. R. 2005. Global circumnavigations: tracking year-

- round ranges of nonbreeding albatrosses. *Science* 307: 249-250.
- Del Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J. 1994. Handbook of the Birds of the World. Vol. 2. New World Vultures to Guinea-fowl. Barcelona: Lynx Editions.
- ESRI Inc., 1999. ArcView 3.2. Statistical software. Environmental Systems Research Institute.
- Ferrer, M. 2001. The Spanish imperial eagle. Barcelona: Lynx Editions.
- Fridolfsson, A.-K. and Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.
- Gil-Sánchez, J. M. 2000. Efecto de la altitud y de la disponibilidad de presas en la fecha de puesta del águila-azor perdicera (*Hieraetus fasciatus*) en la provincia de Granada (SE de España). *Ardeola* 47: 1-8.
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K. and Dawson, R. J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Keating, K. A., Brewster, W. G. and Key, C. H. 1991. Satellite telemetry: performance of animal-tracking systems. *Journal of Wildlife Management* 55: 160-171.
- Kenward, R. 2001. A manual for wildlife radio tagging. London, San Diego: Academic Press.
- López-López, P., García-Ripollés, C., Aguilar, J. M., García-López, F. and Verdejo, J. 2005. Modelling breeding habitat preferences of Bonelli's eagle (*Hieraetus fasciatus*) in relation to topography, disturbance, climate and land use at different spatial scales. *Journal of Ornithology* 147: 97-106.
- Mañosa, S., Real, J. and Codina, J. 1995. Age estimation and growth patterns in nestling Bonelli's eagle. *Journal of Raptor Research* 29: 273-275.
- Mañosa, S., Real, J. and Codina, J. 1998. Selection of settlements areas by juvenile Bonelli's eagle in Catalonia. *Journal of Raptor Research* 32: 208-214.
- Martí, R. and Moral, J. C. (eds). 2003. Atlas de las Aves Reproductoras de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza – Sociedad Española de Ornitología. Madrid.
- Mira, S. 2006. Population genetics of an endangered species: the Bonelli's Eagle (*Hieraetus fasciatus*). PhD Thesis. Facultad de Medio Ambiente. Universidade do Algarve. Faro.
- Morreale, S. J., Standora, E. A., Spotila, J. R. and Paladino, F. V. 1996. Migration corridor for sea turtles. *Nature* 384: 319-320.
- Real, J. 2004. Águila-azor perdicera, *Hieraetus fasciatus*. In: Madroño, A., González, C. and Atienza, J. C. (eds). Red Book of the Birds of Spain (in Spanish). Dirección General para la Conservación de la Biodiversidad – SEO/BirdLife. Madrid.
- Real, J., Grande, J. M., Mañosa, S. and Sánchez-Zapata, J. A. 2001. Geographic variation of the causes of death of Bonelli's Eagle *Hieraetus fasciatus* in Spain. *Bird Study* 48: 221-228.
- Real, J. and Mañosa, S. 1997. Demography and conservation of western European Bonelli's eagle *Hieraetus fasciatus* populations. *Biological Conservation* 79: 59-66.
- Real, J. and Mañosa, S. 2001.

- Dispersal of juvenile and immature Bonelli's Eagles in Northeastern Spain. *Journal of Raptor Research* 35: 9-14.
- Rodgers, A. R. and Carr A.P. 1998. HRE: The Home Range Extension for ArcView. Ontario Ministry of Natural Resources, Centre for Northern Forest Ecosystem Research, Thunder Bay. Ontario, Canada.
- Soutullo, A., Cadahía, L., Urios, V., Ferrer, M. and Negro, J. J. Accuracy of lightweight satellite telemetry: a case study in the Iberian Peninsula. *Journal of Wildlife Management*. In press.
- Sutherland, W. J., Newton, I. and Green, R. 2004. *Bird Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. USA: Oxford University Press.
- Torres, J.A., Jordano, P. and León, A. 1981. *Aves de presa diurnas de la provincia de Córdoba*. Madrid: Publicaciones del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba.
- Weimerskirch, H., Salamolard, M., Sarrazin, F. and Jouventin, P. 1993. Foraging strategy of Wandering Albatrosses through the breeding season: a study using satellite telemetry. *The Auk* 110: 325-342.
- Weimerskirch, H., Le Corre, M., Marsac, F., Barbraud, C., Tostain, O. and Chastel, O. 2006. Postbreeding movements of frigatebirds tracked with satellite telemetry. *Condor* 108: 220-225.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

SECCIÓN II

GENÉTICA
DE POBLACIONES



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 7

Low mitochondrial DNA diversity in the endangered Bonelli's Eagle *Hieraaetus* *fasciatus* from SW Europe (Iberia) and NW Africa.

Cadahía, L., Negro, J.J. & Urios, V. 2007. *Journal of Ornithology* 148: 99-104.

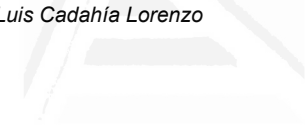


Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

**Abstract.**

This study is an initial survey on the genetic diversity and population structure of the endangered Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in SW Europe (Iberia) and NW Africa, two locations where the species has undergone a severe decrease in numbers during the last decades. It is also the first study in which the mitochondrial control region (CR) has been used to study the genetic diversity and population structure of this species. Samples were obtained from 72 individuals from Spain, Portugal and Morocco, and a 253-bp long fragment of the mitochondrial control region was amplified and sequenced. Only three polymorphisms were present, indicating low nucleotide and haplotype diversity. No evidence of genetic structure was found. Several hypotheses might explain these results, including a possible greater genetic diversity in other regions of the mitochondrial genome or the existence of a presumed ancient bottleneck (last glaciation) possibly followed by a human-induced more recent one (twentieth century).

Key words: Bonelli's eagle; control region; genetic diversity; mitochondrial DNA; western Palaearctic.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Introduction.

Genetic studies of raptors, most of which have involved critically endangered species or populations, have become increasingly important in recent years (Cardia *et al.*, 2002; Godoy *et al.*, 2004; Martínez-Cruz *et al.*, 2004; Roques & Negro, 2005). While the debate on the relationship between genetic factors and conservation of species is ongoing (Amos & Baldford, 2001), it is generally accepted that the loss of genetic diversity is not desirable, especially when dealing with endangered taxa, since it reduces the ability of species to cope with environmental changes (Frankham *et al.*, 2002).

The Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*) is an endangered raptor in Europe (Rocamora, 1994). Its major population fractions occur in Southeastern Asia and the western Palaearctic, with some scattered populations in between. In the western Palaearctic it shows an irregular distribution range but is mostly restricted to the Mediterranean basin (Cramp & Simmons, 1980), with the Iberian Peninsula and Morocco representing the strongholds of this occidental population (Arroyo *et al.*, 1992; Palma *et al.*, 1996). The species has experienced a severe decrease in Spain during the past decades, mainly as a result of powerline accidents and human persecution (Real *et al.*, 2001). Only a few studies on the genetic diversity in Bonelli's eagle are available (Cardia *et al.*, 2000, 2002), and these focus on comparisons of protein genetic variability, the use of inter-simple sequence repeats (ISSR) fingerprints and mitochondrial *cytochrome b* sequencing. Nevertheless, approaches using known non-coding, potentially hypervariable sequences, such as the mitochondrial control region, have not been attempted to date.

Mitochondrial DNA (mtDNA) has been widely utilized as a valuable tool for assessing genetic variation, genetic structure, phylogeographic patterns and phylogeny in different vertebrate groups, including birds (see Avise, 2000; Wink, 2000). The mitochondrial control region (CR) is referred to as the most variable part of the mitochondrial genome, evolving three- to fivefold faster than the remainder of the mtDNA (Baker & Marshall, 1997). As a non-coding region, the CR is not constrained by gene expression limitations, although does contain several short conserved sequence blocks necessary for the replication and transcription of mtDNA

(L'Abbé *et al.*, 1991; Clayton, 1992). Its basic organization encompasses two flanking highly polymorphic domains (I and III) and a more conserved central one (domain II) (Baker & Marshall, 1997).

We present here some preliminary results that constitute an initial assessment of the genetic diversity of Bonelli's eagles based on mitochondrial CR sequences. The potential genetic structure and diversity in populations from part of the western Palaearctic are surveyed by analysing birds from the Iberian Peninsula and NW Africa.

Methods.

Samples.

A total of 72 samples were analysed. Of these, 51 originated from different areas of the species' range in Spain, 13 were from Portugal and eight from Morocco (Fig. 1). Samples were selected to represent all the areas where Bonelli's eagle occurs in a balanced distribution, and they were assigned *a priori* to five different regions according to geographical origin, which were considered to represent different sub-populations (Fig. 1). All of the samples except one – a body feather – consisted of blood preserved in 70% ethanol (41 samples) or Seutin's buffer (19 samples; Seutin

et al., 1991) or blood cells frozen after centrifugation and plasma separation (11 samples).

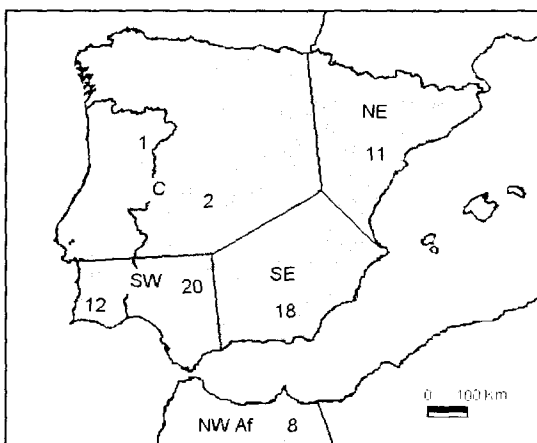


Figure 1: Geographical distribution of the samples used to study the genetic diversity in Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in the western Palaearctic. Letters represent populations defined *a priori*. NE: Northeastern Iberian Peninsula; SE: Southeastern Iberian Peninsula; SW: Southwestern Iberian Peninsula; C: Central Iberian Peninsula; NW Af: Northwestern Africa. Numbers of samples are indicated (in SW and C samples corresponding to Spain and Portugal are specified separately).

DNA extraction and purification.

Genomic DNA was extracted following the proteinase K – LiCl method (Gemmel & Akiyama, 1996). Depending on the material, either 100 µl (in the case of ethanol and Seutin samples), a sample of the frozen blood cells or the calamus of the body feather were incubated at 56°C overnight in extraction buffer (100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 1% SDS; 50 mM EDTA, pH 8; 100 µg/ml proteinase K). Nucleic acids were first extracted with 5 M LiCl and chloroform:isoamyl Alcohol 24:1 and then precipitated with ethanol.

PCR amplification and sequencing.

A fragment of approximately 253 bp encompassing a part of the domain I of the CR was used as a marker sequence. This fragment has been successfully used as a molecular marker in previous studies with other raptor species, since it has been seen to contain most of the polymorphic sites (*Gypaetus barbatus*, Godoy *et al.*, 2004; *Aquila adalberti*, Martínez-Cruz *et al.*, 2004). The primers used bind in the Threonine tRNA gene and in a conserved sequence block (Fbox), respectively: *Thr-F* (5'-TTGGTCTTGTAACCAAARANTGAAG-3'), *Fbox-R* (5'-GGGTTGCTGRTTTCACGTGAG-3') (Godoy *et al.*, 2004).

Amplification was performed in 20-µl volumes containing 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 1U of *Taq* polymerase (Biotaq™ DNA Polymerase kit; Bionline, Turin, Italy), 0.2 mM of each nucleotide and 1 µM of each primer. The PCR reaction was carried out in a PTC-100 (MJ Research, Waltham, Mass.) thermocycler set at the following amplification parameters: an initial 2 min heating at 94°C, followed by 34 cycles of 92°C for 30 s (denaturation), 64°C for 30 s (annealing) and 72°C for 30 s (elongation) and terminated with 5 min at 72°C. Amplified PCR products were purified using Millipore® (Microcon - Genomics) purification columns and TE buffer, pH 8, and sequenced in an ABI Prism 3100 sequencer (PE Biosystems, Foster City, Calif.).

*Sequence analysis.*

Sequences were aligned in ClustalW version 1.82 (Thompson *et al.*, 1994) using default parameters. The Jalview alignment editor (Clamp *et al.*, 2004) was used to edit the sequences manually. A subsequent ends-cut was performed as quality at the sequence extremes was very low in most cases. Comparisons were applied to analyse the divergence among sequences using *P*-distances in MEGA version 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) and a similarity table in PHYLIP version 3.6b (DNADIST) (Felsenstein, 2004). Nucleotide diversity was calculated in MEGA version 2.1 and haplotype diversity in DnaSP version 4.0 (Rozas & Rozas, 1999). The possible existence of population genetic structure in the five sub-populations defined *a priori* was explored by means of an analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) using Φ estimators (Wright, 1965) as implemented in Arlequin (Schneider *et al.*, 2000), considering both the haplotypes frequencies and the molecular distance (Tamura & Nei, 1993) among haplotypes.

Results.

Analysis of the sequences of the 72 samples revealed only three polymorphisms (positions 48, 165 and 208), all of which were A–G transitions, resulting in four haplotypes. One of them was only present in a single individual from Morocco (Table 1). Thus, the relative proportion of segregating sites (S/L) was 0.0119. Mean nucleotide diversity (π) (Nei & Li, 1979) was 0.0024 ± 0.0017 (the standard error was estimated by 1000 bootstrap replicates), haplotype diversity was 0.542 ± 0.046 (\pm SD) and the percentage of divergence between sequences was below 1% (range 0 – 0.79%).

The analysis of molecular variance yielded low, non significant Φ_{ST} values using both haplotype frequencies ($\Phi_{ST} = -0.02622$) and Tamura-Nei molecular distances ($\Phi_{ST} = 0.00423$), with less than 1% of the observed variation partitioned among sub-populations. Thus, most of the variation was found to occur within sub-populations and no genetic structure was recognised (Fig. 2).



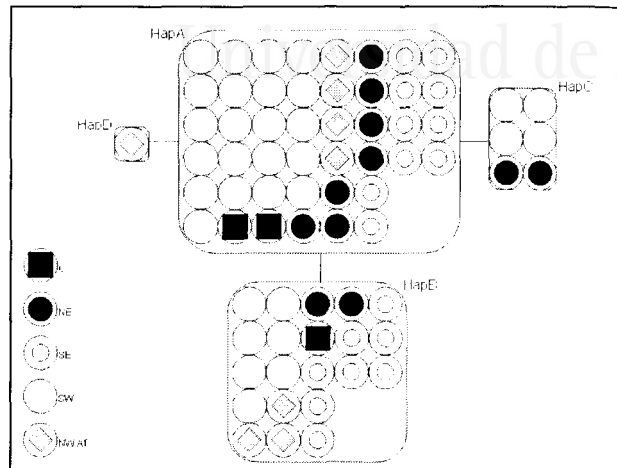
Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

Table 1: Haplotypic variants in a 253-bp long fragment of the mitochondrial control region (CR) in 72 Bonelli's eagles from Morocco, Portugal and Spain.

Haplotype	Position (in bp)		Samples (Frequencies) ^a							TOT
	48	165 208	C	NE	SE	SW	NW Af			
HapA	G	G G	2 (0.661)	7 (0.636)	10 (0.556)	21 (0.656)	4 (0.500)	44 (0.611)		
HapB	A	1 (0.339)	2 (0.182)	8 (0.444)	7 (0.219)	3 (0.375)	21 (0.292)		
HapC	A	-	2 (0.182)	-	4 (0.125)	-	6 (0.083)		
HapD	A	-	-	-	-	1 (0.125)	1 (0.014)		

^a C: Central Iberian Peninsula; NE: Northeastern Iberian Peninsula; SE: Southeastern Iberian Peninsula; SW: Southwestern Iberian Peninsula; NW Af: Northwestern Africa.

Figure 2: Network of the four mitochondrial control region haplotypes present in Bonelli's eagle's western Palaeartic population, showing the relationship with the geographical origin of the individuals studied.



Discussion.

The western population of Bonelli's eagle exhibits a low degree of genetic diversity at the mtCR level. This is reflected both by the small number of polymorphisms found as well as the fact that all of the polymorphisms consisted of transitions, which are far more frequent than transversions within the animal mitochondrial genome (transition / transversion ratio ranges from 15 to 20; Graur & Li, 2000).

This result agrees with that of a previous study on the species involving sequencing of the mitochondrial *cytochrome b* gene and analyses of ISSR markers and protein variation (Cardia *et al.*, 2000). *Cytochrome b* is a leisurely evolving gene that is often used for revealing species' relationships, although it may also be helpful for exploring broad phylogeographic patterns (Avice, 2000). The conclusions arrived at by Cardia *et al.* (2000) based on an analysis of the *cytochrome b* might have been influenced by methodological biases, especially regarding the resolution capacity of the selected marker. Nonetheless, our results are consistent with those of these researchers and show, for example, an analogous percentage of sequence divergence (<1%) within *cytochrome b* and CR sequences, even though the latter is assumed to evolve more rapidly. Other studies using a higher number of protein loci revealed greater genetic diversity than what we obtained here (Cardia *et al.*, 2002).

A similar low level of genetic variation has also been reported in some other large raptor species, such as the Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) (Martínez-Cruz *et al.*, 2004). Other related taxa exhibit somewhat higher levels of nucleotide and haplotype diversities, like the imperial eagle (*Aquila heliaca*) (Martínez-Cruz *et al.*, 2004), the red kite (*Milvus milvus*) (Roques & Negro, 2005) and the bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) (Godoy *et al.*, 2004) (Table 2). In most of these surveys mtDNA sequencing, particularly sequencing of the CR, was the chosen approach. However, it seems that results based on the CR must be taken with caution, since it has been demonstrated that the CR is not always the most variable region within the mitochondrial genome, at least in some avian species (Ruokonen & Kvist, 2002). That is the case in buzzards *Buteo spp.*, where a second highly variable non-coding region, designated the pseudo-control region by Haring *et al.* (1999), has been found to contain a greater genetic diversity than the CR (Kruckenhauser *et al.*, 2004). This region has also been found in other bird species (see Bensch & Härlid, 2000; Eberhard *et al.*, 2001) and it has been successfully used in some molecular studies on raptors (Riesing *et al.*, 2003; Väli, 2002). Within this context, our results could be explained by the fact that the CR of Bonelli's eagle – or at least the fragment we have analysed – is not as variable as in other raptors studied to date. Additionally, another hypothesis that might explain the population's low genetic diversity proposes the existence of one or more possible bottlenecks, either an ancient one during the last glaciation or a human-induced one which would have taken place in the recent past (twentieth century).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Table 2: Mitochondrial control region diversity in Bonelli's eagle and other raptor species.

Species ^a	n ^b	No. of haplotypes	No. of polymorphic sites	Haplotype diversity	Nucleotide diversity	Average no. of	
						pairwise differences	differences
<i>Hieraaetus fasciatus</i>	72	4	3	0.5420±0.0460	0.00238±0.00170	0.602±0.2350	
<i>Aquila adalberti</i>	60	3	2	0.3215±0.0730	0.00098±0.00024	0.338±0.0632	
<i>Aquila heliaca</i>	34	7	8	0.7790±0.0420	0.00548±0.00068	1.891±0.2665	
<i>Milvus milvus</i>	105	10	10	0.6100	0.0032	–	
<i>Gypaetus barbatus</i>	172	50	28	0.9320±0.0120	0.02920±0.01530	6.650±3.1600	

^a Sources: *A. adalberti* and *A. heliaca*, Martínez-Cruz *et al.* 2004; *G. barbatus*, Godoy *et al.* 2004; *M. milvus*, Roques & Negro 2005.

^b n: number of samples.

With respect to genetic structure, the fact that the least frequent haplotype was found in a single individual coming from Morocco may reflect some geographical pattern. However, the remaining haplotypes did not show any geographical distribution. Cardia *et al.* (2000) found a slight difference between eastern and western Mediterranean Bonelli's populations, as well as a possible North-South gradient in one protein locus within Portugal, although the remaining loci they studied did not differ among populations. This result, along with the low diversity and the lack of genetic structure we found, does not provide any evidence for a restriction of gene flow in the western part of the Mediterranean basin. Evidence supporting a more or less panmictic population on the Iberian Peninsula comes from several studies which demonstrate that Bonelli's juveniles travel long distances from their natal places to a few settlement areas (Arroyo *et al.*, 1992; Real & Mañosa, 2001; Cadahía *et al.*, 2005). One hypothesis – that this may increase their chance of meeting potential mates coming from other regions of the species' range – is supported by two pieces of evidence. First, genetic data indicating the possibility of a Spanish bird breeding in SW Portugal have been presented (Cardia *et al.*, 2002). In addition, the case of one bird born in southern Spain (Andalusia) and found breeding around 700 km away, in northern Spain (La Rioja) several years later (Balbontín, J., personal communication) has also been reported recently.

Our results show very little genetic diversity in a fragment of the domain I of the mtCR in Bonelli's eagle. Future investigations should include an increased sample size, especially from the African area, a study of the remainder of the mtCR as well as of other potentially hyper-variable non-coding regions of the mt genome, like the pseudo-CR (Haring *et al.*, 1999), and the analysis of museum samples dating from several decades ago to explore the possibility of a recent bottleneck. Such studies will facilitate the testing of the hypotheses presented here and help us gain a better understanding of the population genetics of Bonelli's eagle as well as make an assessment of the impact of the human activities on this species' genetic diversity in SW Europe and NW Africa.



Acknowledgements.

We are indebted to all the people and organizations that provided samples for the present study: J. Balbontín (Estación Biológica de Doñana), S. Mira (University of Algarve), C. Gerique (C.R.F. El Saler), A. García (GREFA), I. Molina (EGMASA), M.R. Jané (ICRA) and A. Gardiazábal. We are also grateful to the governments of the Comunidad Valenciana, Catalunya and Región de Murcia, the Universities of Barcelona and Miguel Hernández, and the Spanish Ministerio de Medio Ambiente (especially V. García Matarranz) for giving permission to get access to nests and for invaluable field assistance. We appreciatively acknowledge J. Muñoz for his help in the laboratory, as well as the remainder of people working in the Laboratory of Molecular Ecology of the Estación Biológica de Doñana. Also S. Roques, for her help concerning software use. E. Haring, A. Juan, R. Limiñana, E. Micó, A. Soutullo and two anonymous referees provided critical reading and very valuable comments on early versions of the manuscript. This project was funded by Terra Natura Foundation. L. Cadahía is supported by a grant of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (reference AP2001-1444). This paper is part of L. Cadahía's Ph.D. at the University of Alicante.

References.

- Amos, W. & Balmford, A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* 87: 257-265.
- Arroyo, B., Ferreiro, E. & Garza, V. 1992. Factores limitantes de la población de águila perdicera en España. Technical report ICONA (Ministerio de Medio Ambiente), Madrid.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. London, Cambridge: Harvard University Press.
- Baker, A.J. & Marshall, H.D. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. In: D.P. Mindell (ed.). *Avian molecular evolution and systematics*. London: Academic Press.
- Bensch, S. & Härlid, A. 2000. Mitochondrial genomic rearrangements in songbirds. *Molecular Biology and Evolution* 17: 107-113.
- Cadahía, L., Urios, V. & Negro, J.J. 2005. Survival and movements of satellite tracked Bonelli's eagles during their first winter. *Ibis* 147: 415-419.
- Cardia, P., Fraguas, B., Pais, M., Guillemaud, T., Palma, L., Cancela, M.L., Ferrand, N. & Wink, M. 2000. Preliminary genetic analysis of some western Palaearctic populations of Bonelli's eagle, *Hieraaetus fasciatus*. In: Chancellor, R.D. & Meyburg, B.-U. (eds) *Raptors at risk*. WWGBP / Hancock House.
- Cardia, P., Fraguas, B., Pais, M., Silva, S., Guillemaud, T., Palma, L., Cancela, M.L. & Ferrand, N. 2002. Análise da variação genética de proteínas em populações mediterrânicas de águia-perdigueira *Hieraaetus fasciatus*. *Airo* 12: 71-74.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S.M. & Barton, G.J. 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20: 426-427.
- Clayton, D.A. 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. In: Wolstenholme, D.R. & Jeon, K.W. (eds) *Mitochondrial genomes*. International review of cytology, vol. 141. San Diego: Academic Press.
- Cramp, S. & Simmons, K.E.L. 1980. *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa – Vol. 2*. Oxford: Oxford University Press.
- Eberhard, J.R., Wright, T.F. & Bermingham, E. 2001. Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1330-1342.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Frankham, R., Ballou, B.D. & Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Gemmell, N. & Akiyama, S. 1996. An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissue. *Trends in Genetics* 12: 338-339.
- Godoy, J.A., Negro, J.J., Hiraldo, F. & Donazar, J.A. 2004. Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*, L.) as revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 13: 371-390.
- Graur, D. & Li, W.-H. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. 2nd edn. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Haring, E., Riesing, M.J., Pinkser, W. & Gamauf, A. 1999. Evolution of a pseudo-control region in the mitochondrial genome of Palearctic buzzards (genus *Buteo*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 37: 185-194.
- Kruckenhauser, L., Haring, E., Pinksler, W., Riesing, M.J., Winkler, H., Wink, M. & Gamauf, A. 2004. Genetic vs. Morphological differentiation of Old World buzzards (genus *Buteo*, Accipitridae). *Zoologica Scripta* 33: 197-211.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
- L'Abbé, D., Duhaime, J.F., Lang, B.F. & Morais, R. 1991. The transcription of DNA in chicken mitochondria initiates from one major bidirectional promoter. *Journal of Biological Chemistry* 266: 10844-10850.
- Martínez-Cruz, B., Godoy, J.A. & Negro, J.J. 2004. Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Molecular Ecology* 13: 2243-2255.
- Nei, M. & Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 76: 5269-5273.
- Palma, L., Pais, M.C. & Fráguas, B. 1996. Status and distribution of Bonelli's eagle, *Hieraaetus fasciatus*, in Portugal. II International Conference on Raptors. Urbino, Italy.
- Real, J., Grande, J.M., Mañosa, S. & Sánchez-Zapata, J.A. 2001. Geographic variation of the causes of death of Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* in Spain. *Bird Study* 48: 221-228.
- Real, J. & Mañosa, S. 2001. Dispersal of juvenile and immature Bonelli's eagles in Northeastern Spain. *Journal of Raptor Research* 35: 9-14.
- Riesing, M.J., Kruckenhauser, L., Gamauf, A. & Haring, E. 2003. Molecular phylogeny of the genus *Buteo* based on mitochondrial maker sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 328-342.
- Rocamora, G. 1994. Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus*. In: Tucker, G.M. & Heath, M.F (eds). *Birds in Europe: their conservation status*. Cambridge: Birdlife International.
- Roques, S. & Negro, J.J. 2005. MtDNA genetic diversity and population history of a dwindling raptorial bird, the red kite (*Milvus*

- milvus*). *Biological Conservation* 126: 41-50.
- Rozas, J. & Rozas, R. 1999. DnaSP versión 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.
- Ruokonen, M. & Kvist, L. 2002. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 422-432.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. Arlequin ver. 2.000: software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Seutin, G., White, B. N., & Boag, P. T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82-90.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Väli, Ü. 2002. Mitochondrial pseudo-control region in old world eagles (genus *Aquila*). *Molecular Ecology* 11: 2189-2194.
- Wink, M. 2000. Advances in DNA studies of diurnal and nocturnal raptors. In: Chancellor, R.D. & Meyburg, B.-U. (eds). *Raptors at risk*. WWGBP / Hancock House.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 8

Repeated sequence homogenization
in the subfamily Aquilinae as revealed by
the structure of the mitochondrial control
and pseudo-control regions.

Cadahía, L., Pinsker, W., Negro, J.J., Pavlicev, M., Urios, V. & Haring, E.
Molecular Biology and Evolution. En revisión.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Abstract.

Previous genetic studies carried on with Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* initially revealed low genetic diversity in the endangered European population of the species. For this reason, we performed a complete characterization of the mitochondrial control region (CR) and pseudo-control region (Ψ CR) in search of appropriate molecular marker sequences. We used five individuals from which both sections as well as the flanking regions were sequenced. We also used data from other species for comparative purposes. The gene order around the control region turned out to be the same as previously described for other bird species belonging to four different avian orders, i.e., the CR is flanked by *tRNA^{Thr}* and *tRNA^{Pro}* genes, and there exists a Ψ CR between the *tRNA^{Glu}* and *tRNA^{Phe}* genes. Within the CR we could identify the conventional I, II and III domains, and found several conserved blocks previously described, including the ETAS1, the F, E, D and C boxes, the CSBa, CSBb, CSB1 and CSB3. The Ψ CR structure was similar to that described for other genera of birds of prey, with a 5' side non-repetitive section followed by a cluster of 21 repeats, 49 bp long each. When performing an intra-genomic alignment of both regions the existence of homology between them was clearly observable. This supported the assumption that the mitochondrial gene order found in this and other species of Falconiformes originated from a duplication of a section containing the CR and a posterior degeneration of one of the copies. In most representatives of the Falconiformes the homology is no longer detectable. Yet, according to the information extracted from sequences published so far, in the Aquilinae eagles the process of sequence degeneration was slowed down by homogenization events. We recognized different levels of sequence similarity, which probably reflect several successive homogenization episodes within this subfamily.

Key words: Aquilinae; control region; *Hieraaetus fasciatus*; homogenization events; mitochondrial DNA; pseudo-control region.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Introduction.

In vertebrates, the mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular maternally inherited molecule of approximately 15 to 20 kb with a conserved gene content comprising 13 protein coding genes, 22 transfer RNA (tRNA) genes and two ribosomal RNA (rRNA) genes. It also contains a non-coding region, the control region (CR) or D-loop, which is involved in replication and in transcription of the mitochondrial (mt) genes (L'Abbé et al. 1991; Clayton 1992). The CR is commonly considered the most variable part of the mt genome, with a substitution rate of three to five times higher than in the rest of the mtDNA (Baker and Marshall 1997), probably due to the lack of expression constraints (Roques et al. 2004). Sequencing of the first avian mt genome from *Gallus gallus* (Desjardins and Morais 1990) revealed a gene order different from that of other vertebrates studied so far. Later it was assumed that this particular gene order, in which the CR is located between the *tRNA^{Glu}* and *tRNA^{Phe}* genes, may be typical for all birds. However, Mindell, Sorenson and Dimcheff (1998) detected a genomic rearrangement in *Falco peregrinus*, where the functional CR has been shifted to a new position between the *tRNA^{Thr}* and *tRNA^{Pro}* genes while a second non-coding region is located at the original CR site between the *tRNA^{Glu}* and *tRNA^{Phe}* genes. The same deviant gene order was also found in *Buteo buteo* by Haring et al. (1999), who named the additional non-coding section pseudo-control region (Ψ CR). This novel gene order is now known to occur in bird species belonging to four different orders (Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998), in various songbird species (Bensch and Härlid 2000), parrots (Eberhard, Wright and Bermingham 2001), and a number of raptor species (Haring et al. 1999, 2001; Muñoz, Godoy and Negro 2001; Väli 2002). Obviously, it must have originated independently several times during avian evolution.

In birds of prey these two non-coding mt regions have distinct characteristics. The basic organization of the CR encompasses three domains (designated DI, DII and DIII, respectively), differing in variability and nucleotide composition (Baker and Marshall 1997; Randi and Lucchini 1998; Ruokonen and Kvist 2002). Within the CR, a number of conserved sequence blocks have been described (L'Abbé et al.



1991; Clayton 1992; Baker and Marshall 1997) which are likely to be involved in both the replication and the transcription of the mt genome. Most of these conserved blocks are located in DII, though some of them appear in DIII. The remainder of the CR consists of hyper-variable areas within domains I and III, where nucleotide substitutions, length variation and repetitive sequences occur more frequently (Baker and Marshall 1997; Ruokonen and Kvist 2002). These sections are probably not constrained by gene expression limitation (Roques et al. 2004), thus providing a rich source of genetic markers for population studies (Baker and Marshall 1997).

The Ψ CR of the raptor species analyzed so far consists of a 5' non-repetitive region (nr- Ψ CR) followed by a cluster of tandem repeats (r- Ψ CR) (Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; Haring et al. 1999, 2001; Väli 2002). The nr- Ψ CR proved to be even more variable than the CR in a number of raptors, like buzzards, in the family Accipitridae (Kruckenhauser et al. 2004) or falcons, of the family Falconidae (Nittinger et al. 2005), and therefore could be considered as an ideal marker for low level systematics within this group of birds. Up to now it has been used in phylogenetic and phylogeographic studies of several raptor species (see Haring et al. 1999; Väli 2002; Riesing et al. 2003; Kruckenhauser et al. 2004). In the r- Ψ CR, length polymorphisms due to variation in the number of tandem repeats could be used as an additional molecular marker (mitochondrial variable number of tandem repeats = mtVNTR). However, whether this kind of mtVNTRs can provide reliable information is still not clear, especially given the difficulty to rule out the possibility of PCR artefacts (Lunt, Whipple and Hyman 1998; Haring et al. 1999; Roques et al. 2004).

The rearrangement of the mt gene order and the existence of the Ψ CR have been explained by a duplication of the original CR and its flanking sections, followed by a deletion or partial degeneration of one of the two copies (Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; Bensch and Härlid 2000). This would explain the similarity between CR and Ψ CR existing in some bird species (songbirds: Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; parrots: Eberhard, Wright and Bermingham 2001). In raptors, however, no sequence homology between CR and Ψ CR has been reported so far.

In this paper we characterize the mt gene order in Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* in the region comprising the CR and Ψ CR together with the flanking genes. We also describe the internal structure of both non-coding regions (e.g., conserved sequence blocks, repeats) and compare it to that found in other bird as well as mammalian species. *H. fasciatus* belongs to the family Accipitridae of the order Falconiformes (Stresemann and Amadon 1979; del Hoyo et al. 1994; Dickinson 2003). It is mainly distributed in South-eastern Asia and the western Palaearctic, with some scattered populations in between (del Hoyo et al. 1994). The species is considered as "endangered" in Europe (Real 2004) due to a population decline it has gone through during the recent decades, mainly caused by powerline accidents and human persecution (Real et al. 2001). Few studies investigating the genetic diversity of *H. fasciatus* have been carried out. These used allozyme variability (Cardia et al. 2002), ISSR fingerprints (Cardia et al. 2000), sequencing of either the mt *cytochrome b* gene (Cardia et al. 2000) or the DI section of the CR (Cadahía, Negro and Urios 2007), and the development of microsatellites (Mira 2005, 2006). Since genetic diversity was found to be low in the selected 253 bp section of the CR (Cadahía, Negro and Urios 2007), one purpose of the present investigation was to search for a more variable marker, e.g., the remainder of the CR and the nr- Ψ CR. In the course of this study we detected a striking intra-genomic homology between the CR and Ψ CR of *H. fasciatus*. Including published sequence data from other birds of prey we carried out detailed comparisons of the two mt regions and tried to outline an evolutionary scenario which could explain the observed levels of similarity.

Taxonomic remarks.

Recent molecular investigations revealed that within Aquilinae the genera *Spizaetus*, *Aquila* and *Hieraaetus* as currently defined are paraphyletic groups (Lerner and Mindell 2005; Helbig et al. 2005; Haring et al. 2007). Accordingly, several species mentioned in this paper should be renamed. E.g., after Helbig et al. (2005) *H. fasciatus* would be included into the genus *Aquila* and, therefore, should be named *Aquila fasciata*, whereas *Aquila clanga* would be renamed into *Lophaetus*

clanga. Nevertheless, a thorough taxonomic revision of this subfamily implementing the systematic changes based on the phylogenetic implications has not been carried out so far. Therefore, we decided to use the classical names in the present paper and (also concerning orders, families, and subfamilies) to follow Dickinson (2003).

Materials and Methods.

Samples and DNA extraction.

Five samples of *H. fasciatus* were analyzed, one of them consisting of cells frozen after plasma separation (sample 1360, Cádiz, Spain) and the other four consisting of blood, three preserved in ethanol (samples HFA, Murcia, Spain; PD1, Rabat, Morocco; HFC, Alicante, Spain) and one preserved in Seutin buffer (SA2, Morocco) (Seutin et al. 1991). Furthermore, from one sample of *Accipiter gentilis* (HAB-1A, bred in captivity, Austria) the CR and Ψ CR sequences were determined for sequence comparison. Genomic DNA was extracted using a slightly modified version of the proteinase K – LiCl method described by Gemmel and Akiyama (1996). One hundred microlitres of samples in ethanol and Seutin buffer or a piece of the frozen blood cells were incubated at 56°C overnight in 300 μ l extraction buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% SDS, 50 mM EDTA, pH 8, 100 μ g/ml proteinase K). Nucleic acids were extracted with 5 M LiCl and chloroform : isoamyl alcohol 24:1, and then precipitated with ethanol.

PCR amplification, cloning and sequencing.

Primer sequences are listed in Table 1. Primer binding sites and resulting PCR fragments are depicted in Fig. 1. For the determination of the CR sequence, either the complete CR was amplified with primers that bind in the flanking *tRNA^{Thr}* and *tRNA^{Pro}* genes (ThrF / ProR) or the sequence was amplified in two overlapping fragments (361 bp overlap) using the primer pairs Thr1 / CSB- and CR2+ / Pro-. Amplification of the Ψ CR, was performed using the primers nd6-1 / 12S-1 located in the genes for *nd6* and *12S rRNA* respectively. A PCR fragment including the section from the 3' part of the CR, *tRNA^{Pro}*, *nd6* to *tRNA^{Glu}* was amplified with the

primer pair Hier-CR4+ / Hier-Glu2-. PCR amplification was performed in an Eppendorf Thermocycler in a volume of 25 μ l containing 2.5 μ l of PCR buffer, 0.2 mM of each nucleotide, 1 μ M of each primer, 1 unit Dynazyme DNA polymerase (Finnzymes, Espoo Finland) and 100 ng of DNA. The PCR reaction comprised an initial heating for 2 min at 94°C followed by 35 cycles: 10 s at 94°C, 15 s at annealing temperature, and 60 s at 72°C. After the last cycle, a final extension of 5 min at 72°C was performed.

PCR products were extracted from agarose gels with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and cloned using the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Sequencing of the clones (both directions) was performed by primer walking at MWG-Biotech (Ebersberg, Germany).

Sequence Analysis.

Sequences were aligned and edited manually with BioEdit 7.0.1 (Hall 1999). Nucleotide composition was calculated using MEGA version 2.1 (Kumar et al. 2001). Distances (p-distances) were calculated by hand, all gaps were treated as one mismatch irrespective of their size. When targeting mitochondrial sequences, using blood as a source of DNA can be problematic, given that avian erythrocytes are nucleated but are relatively depauperate in mtDNA, so PCR might favour the amplification of 'numts' ('nuclear copies of mitochondrial genes', López et al. 1994). To make sure that we were amplifying mitochondrial fragments, we compared the blood-obtained sequences used in this work with partial CR and Ψ CR sequences obtained afterwards from muscle and feather samples, which are mtDNA-richer tissues (Sorenson and Quinn 1998). These sequences were identical to those obtained using blood as a template, supporting the assumption that the sequences studied here are of mitochondrial nature (data not shown).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Table 1: Primers utilized to amplify the mt CR and nr-ΨCR in Bonelli's eagle *Hieraetus fasciatus*.

Primer	Sequence	Annealing temperature	Region amplified	Ref.
Thr-F	TTGGTCTTGTA AACCCAAARANTGAAG	62° C	CR	a)
Pro-R	AATNCCAGCTTTGGGAGYTG	62° C	CR	b)
Thr-1	AACRTTGGTCTTGTA AACC	50° C	5' section CR	c)
CSB-	ATGTCCAACAAGCATTAC	50° C	5' section CR	
CR2+	AAACCCCTAGCACTACTTGC	54° C	3' section CR	
Pro-	GAGGTTTGAGTCCCTCTTTTC	54° C	3' section CR	d)
nd6-1	ACCCGAATCGCCCCACGAG	57° C	ΨCR	e)
12S-1	ATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTT	57° C	ΨCR	e)
Hier-CR4+	CACCCAAAACAACCTCTA	52° C	3' end CR to tRNA ^{Glu}	
Hier-Glu2-	TTTGGAGAGAAAGCCAAAGCA	52° C	3' end CR to tRNA ^{Glu}	

a) J. Muñoz, pers. comm.

b) Godoy et al. 2004.

c) Haring et al. 1999

d) Nittinger et al. 2005

The following sequences from GenBank were used for comparison: CR: *Spizaetus nipalensis* (AP008238, Asai, Yamamoto and Yamagishi 2006); ΨCR: *Aquila heliaca* (AF435096, Väli 2002), *Aquila pomarina* (AF435093, Väli 2002), *Aquila chrysaetos* (AF435099, Väli 2002); conserved sequence blocks within CR: *Buteo buteo* (AF380305, Haring et al. 2001), *Neophron percnopterus* (AY542899, Roques et al. 2004), *Gypaetus barbatus* (AY542900, Roques et al. 2004), *Falco peregrinus* (DQ144188, Nittinger et al. 2005), *Ciconia ciconia* (AB026818), *Alectoris barbara* (AJ222726, Randi and Lucchini 1998).

Results.

Gene order of CR, ΨCR and flanking genes.

From three samples of *H. fasciatus* (1360, HFA and SA2) the complete CR was amplified using primers that bind in the flanking tRNA genes (PCR fragment f-CR-L in Fig. 1). From two additional samples (HFC, PD1) the complete CR was obtained by isolating two overlapping fragments (PCR fragment f-CR-5', f-CR-3'). Successful amplification of the whole ΨCR (f-ΨCR) was only achieved in one sample (HFC). This fragment includes regions flanking the ΨCR (5' side: part of *nd6* and *tRNA^{Glu}*; 3' side: *tRNA^{Phe}* and part of *12S rRNA*). The sequence analysis confirmed that in *H. fasciatus* the CR is flanked by the *tRNA^{Thr}* and *tRNA^{Pro}* genes, while the ΨCR is located between the *tRNA^{Glu}* and *tRNA^{Phe}* genes. To investigate if the mt gene order in the CR / ΨCR section of *H. fasciatus* is the same as in other birds of prey (e.g., Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; Haring et al. 1999, 2001; Roques et al. 2004; Nittinger et al. 2005; Gibb et al. 2006) we amplified the interjacent sequence (PCR fragment f-nd6). The expected PCR product of 688 bp was obtained from all five individuals. From one sample (HFC) the respective fragment was sequenced and thus the complete sequence spanning from *tRNA^{Thr}* to *12S* was determined in this individual.

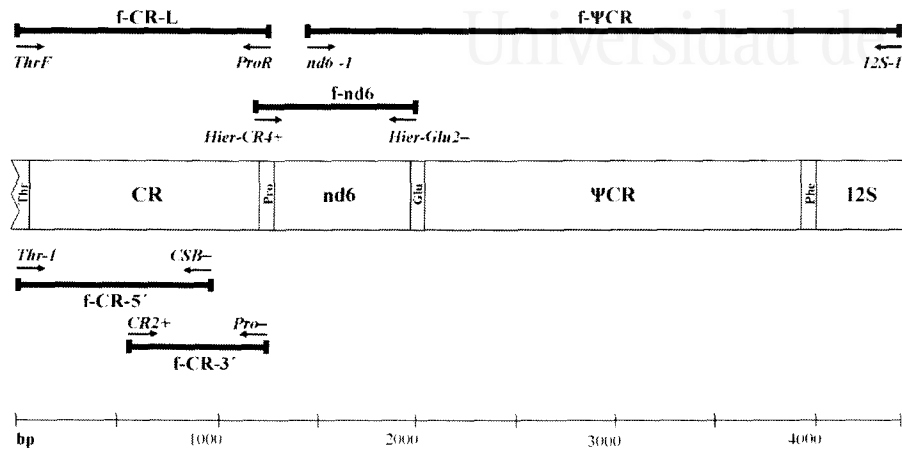


Figure 1: Mt gene order in the region including the mt CR and ΨCR in *H. fasciatus*. Primer binding sites (arrows) and PCR fragments (f-CR-L, f-ΨCR, f-nd6, f-CR-5', f-CR-3') are indicated. Primer names are given in italics.

Structure of the CR.

The complete CR of *H. fasciatus* is 1158 bp long (sample HFC). In the alignment of the five CR sequences seven transitions, no transversions, but several indels were found. The length polymorphisms are located within a long C-stretch in the 5'-region and two T-stretches in the 3'-part and thus might be ascribed to PCR errors. The usually distinguished three domains (DI-DIII) of the CR were also recognized in *H. fasciatus*. We considered DI to comprise the section between *tRNA^{Thr}* and the first conserved sequence box (F box). We placed the border between DII and DIII upstream of the conserved sequence box CSB1, following Sbisà et al. (1997) and Roques et al. (2004) (Fig. 2). The base compositions of the three domains are in agreement with previous observations in other avian species (Baker and Marshall 1997; Ruokonen and Kvist 2002). In general, the CR of *H. fasciatus* is AT rich with a higher content of pyrimidines (T = 33.1%, C = 25.6%) compared to purines (A = 23.9%, G = 17.4%). Specifically, DI is not AC-rich, in contrast to other bird species (Ruokonen and Kvist 2002), but has a higher T content, as described in *Neophron* (Roques et al. 2004), though in *H. fasciatus* this is not due to the presence

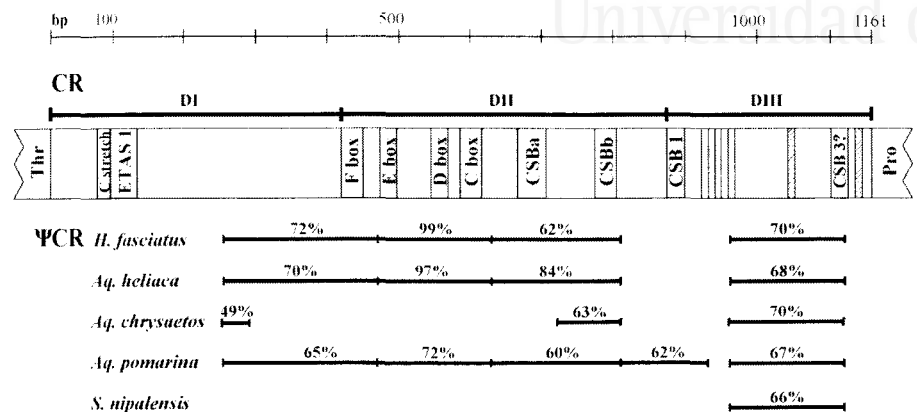


Figure 2: Structure of the CR in *H. fasciatus*. The position of the conserved boxes and the division into the three domains DI, DII, and DIII are shown. Repetitive sequences in DIII are depicted as dark grey and hatched bars. Sections homologous to ΨCR sequences of the species *H. fasciatus*, *A. heliaca*, *A. chrysaetos*, *A. pomarina* and *S. nipalensis* are depicted below together with the sequence similarity (in %) in comparison to the CR sequence of *H. fasciatus*.

of tandem repeats. DII is CT-rich and DIII is AT-rich with a very low proportion of G (Table 2).

Several of the previously described conserved sequence blocks could be identified in the CR of *H. fasciatus*. To illustrate their location and level of conservation we aligned the CR sequence of *H. fasciatus* with sequences of several other bird species: *A. gentilis* (determined in the course of this study), as well as *S. nipalensis*, *B. buteo*, *N. percnopterus*, *G. barbatus*, *F. peregrinus*, *C. ciconia*, *A. barbara* (published sequences). An alignment was readily achieved for DII. But it proved difficult to accomplish in parts of DI and DIII because of length variation due to repeats, which are located at different positions and vary in length, sequence and number. The alignment of the *H. fasciatus* CR with *S. nipalensis* and *A. gentilis* is shown in the electronic supplement (ES. 1).

Table 2: Nucleotide composition of the mt CR and nr-ΨCR in Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus*. Numbers indicate percentages.

	T	C	A	G
DI	29.7	26.9	25.6	17.8
DII	30.4	28.1	19.0	22.6
DIII	42.4	19.8	29.1	8.8
Whole CR	33.1	25.6	23.9	17.4
nr-ΨCR	23.7	34.8	32.4	9.1

Based on the interspecific sequence alignment of Randi and Lucchini (1998), we located and aligned the various conserved sequence boxes (ETAS1, F box, E box, D box, C box, CSBa, CSBb, CSB1, CSB3) in several raptor species as well as in *C. ciconia* and *A. barbara*. We also included the mammalian consensus sequence (Sbisà et al. 1997) (Fig. 3). In the following we will describe the conserved sequence blocks in detail.

In DI (length in HFC: 416 bp) a characteristic motif called C-stretch (Figs. 2, 3) is found close to the 5' end. This motif seems to be a conserved feature present in many species, including birds belonging to Falconiformes, Struthioniformes, Galliformes or Sphenisciformes (Ritchie & Lambert 2000; Haring et al. 2001). Adjacent to the C-stretch follows a section with similarity to the mammalian ETAS1 that is supposed to be involved in the control of H strand synthesis (Sbisà et al. 1997; Roques et al. 2004) (Fig. 2). In the alignment of this putative ETAS1 (Fig. 3) it can be noticed that the 5' section of the ETAS1 is well conserved, whereas the 3' part appears quite variable. Interestingly, the adjacent 20 bp downstream towards the 3' end appear even more conserved than the putative ETAS1 among birds.

The motif 5' TACAT 3', described as "termination associated sequence" (TAS) by Saccone, Pesole and Sbisà (1991), occurs once within ETAS1 and three more times in the remainder of the DI. Such a motif was also found in other species, e.g., *B. buteo* (Haring et al. 2001), *N. percnopterus*, *G. barbatus* (Roques et al. 2004) or *A. barbara* (Randi and Lucchini 1998). However, another conserved TAS motif

(5' TATAT 3') common in some of those taxa is not present. In contrast to other raptor species the DI of *H. fasciatus* has no repeats.

In DII (length in HFC: 454 bp) the F box, E box, D box and C box were identified, which were previously detected in other raptor species (Baker and Marshall 1997; Randi and Lucchini 1998; Haring et al. 2001; Roques et al. 2004) (Fig. 2). The B box or "bird similarity box" described by Ruokonen and Kvist (2002) in eight avian orders (which did not include Falconiformes) is not present. The ETAS2 detected by Sbisà et al. (1997) in DII could not be mapped in *H. fasciatus* either. Additional conserved blocks designated CSBa and CSBb in *B. buteo*, *F. peregrinus* and *C. ciconia* (Haring et al. 2001) were also detected in *H. fasciatus*, *S. nipalensis*, and *A. gentilis*. The F box is not well conserved among the bird species, not even within raptors. Interestingly, the region upstream of the F box appears more conserved than the F box itself. The section between F and E boxes is highly variable as well. The entire section including the E box, the intervening sequence and the D box is highly conserved. Among the six boxes of the DII conserved in birds, the D box is the only one that can be found in the alignment of mammalian sequences provided by Sbisà et al. (1997). The C box is conserved among four of the raptor species, while in the other taxa it shows considerable length variation. CSBa and CSBb are present in all the bird species except *A. barbara*. CSBa is highly conserved except the central T and G stretches that vary in length, while CSBb is more variable.

In DIII (length in HFC: 288 bp) the CSB1 sequence could be identified unambiguously (Fig. 3). It is very similar to the mammalian consensus sequence. Of the other conserved sequence blocks described by Sbisà et al. (1997), CSB2 was not found in *H. fasciatus*, while CSB3 could be identified. The latter has not been found so far in other raptors species, but it is present in the related order Ciconiformes (Yamamoto et al. 2000). It consists of a 21 bp AC-rich region close to the 3' end of the CR and shows 71% similarity to the mammalian CSB3 consensus sequence (Sbisà et al. 1997). We were able to identify the corresponding region also in *S. nipalensis*, *A. gentilis* and even *B. buteo*. However, in contrast to the mammalian CSB3, which includes a highly conserved central AAACCCC motif, it seems not



well conserved in birds. Other features previously described in DIII, which could not be mapped in *H. fasciatus*, are the C-stretch upstream the CSB1, assumed to be the origin of H strand replication (Walberg and Clayton 1981), and the putative bidirectional promoter (L'Abbé et al. 1991). The existence of different sorts of repeats has been reported for the DIII of birds (see also Table 6 in Haring et al. 2001). *H. fasciatus* lacks the long tandem repetitive sequences present in other species (Wenik, Baker and Tilanus 1994; Yamamoto et al. 2000; Haring et al. 2001; Roques et al. 2004); it only harbors two kinds of smaller repeats: one comprises five imperfect repeats of unequal length (9 to 11 bp) in a tandem array, the other is a perfect repeat of 13 bp present in two copies, one upstream and one downstream of CSB3 (Fig. 2).

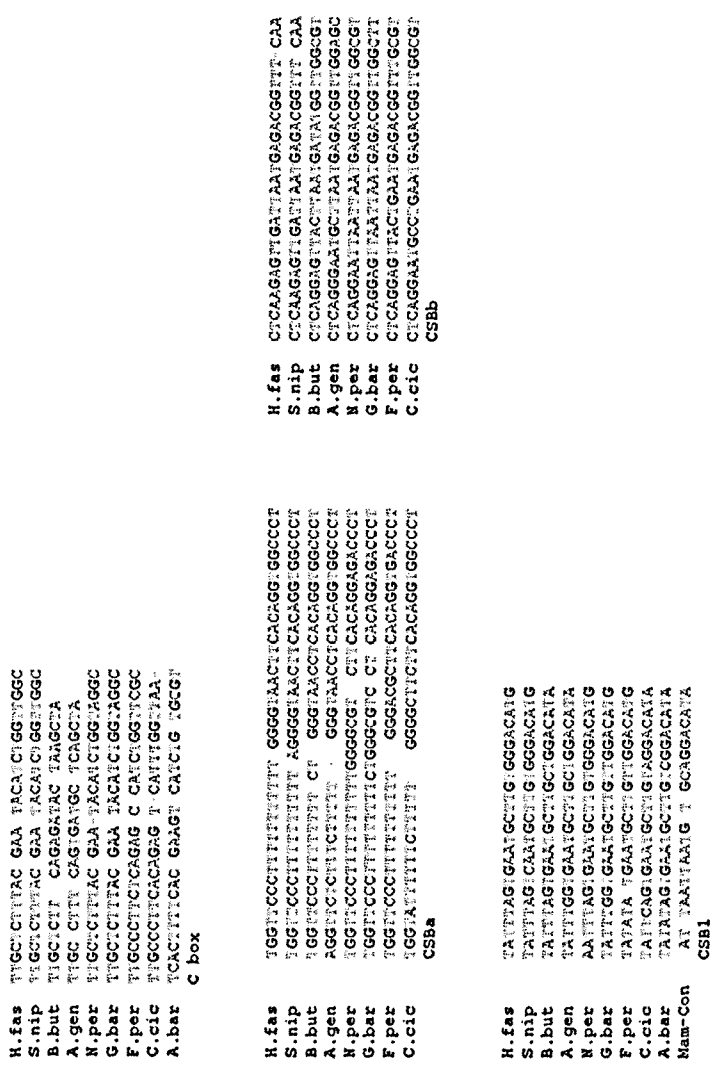


Figure 3: Partial alignments of the CR conserved sequence blocks. We used the sequence blocks as defined by Randi and Luchini (1998) as a reference. For the following boxes the mammalian consensus sequence (Sbisà 1997) was available: ETAS1, D box and CSB1. Flanking sequences are depicted in lower case letters. ETAS1: In birds, ETAS1 is located adjacent to the C-stretch at the beginning of DJ, without any intervening sequence.

Structure of the Ψ CR.

The general structure of the Ψ CR of *H. fasciatus* (Fig. 4) is similar to that found in other genera of birds of prey, like *Falco* (Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; Nittinger et al. 2005), *Buteo* (Haring et al. 1999), *Aquila* (Väli 2002), *Spizaetus* (GenBank AP008238; Asai, Yamamoto and Yamagishi 2006), and *Accipiter* (this study). It starts with a 5' non-repetitive part (nr- Ψ CR) followed by a cluster of tandem repeats, in *H. fasciatus* each 49 bp in length (r- Ψ CR). The nr- Ψ CR of *H. fasciatus* is 882 bp long, is AC-rich and has a low content of G (Table 2). Concerning the r- Ψ CR, it was not possible to span the whole cluster of tandem repeats within one sequence reaction (from the 3' end of the nr- Ψ CR to the 5' end of the *tRNA^{Phe}* gene). Only three repeat copies from the 5' end and eight copies from the 3' end were sequenced. The actual number of 21 tandem repeats was estimated from the size of the PCR fragment in an agarose gel. The first one (adjacent to the nr- Ψ CR) differs from the following copies by one substitution. The last repeat (adjacent to the *tRNA^{Phe}* gene) is incomplete (23 bp).

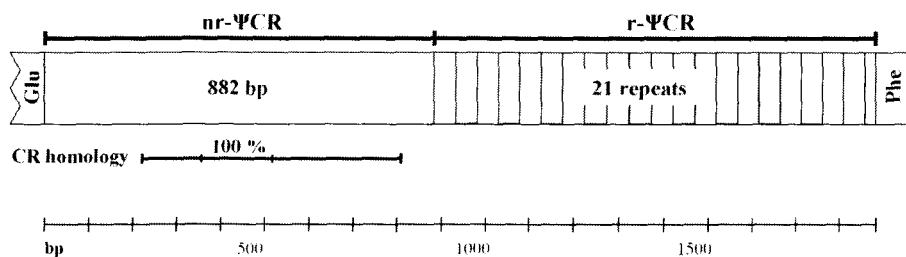


Figure 4: Structure of the Ψ CR in *H. fasciatus*. The non-repetitive section (nr- Ψ CR) is followed by a tandem-repetitive section (r- Ψ CR) consisting of 49 bp repeat units. The part of the nr- Ψ CR which is homologous to the CR is depicted below the Ψ CR.

Homology between CR and Ψ CR.

To address the question of homology between CR and Ψ CR we compared their base compositions: the nr- Ψ CR showed an A + T content (56.1%) higher than G + C, similar to that of the CR (57.0%), but a proportion of G (9.1 %) that is considerably lower than in the CR (17.4%) (Table 2). An intra-genomic alignment

between the CR and nr-ΨCR of *H. fasciatus* revealed that a major part of the nr-ΨCR (732 bp) is homologous to parts of the CR. We identified four sections (1–4 in Fig. 2) within the homologous region that display different similarity values. The homologous CR sections are located between the 3'-end of DI and the middle part of DIII (Fig. 2). As can be seen in the alignment (ES. 2), the 5'-section (119 bp) of the nr-ΨCR, upstream of the CR-homologous region, cannot be aligned unambiguously with the CR; nevertheless, the characteristic C-stretch motif can be recognized. Also in the downstream region of the nr-ΨCR (82 bp) no clear CR homology is found. In section 1 (192 bp) there is a 72% similarity (each gap in the alignment was treated as one mismatch, regardless of the gap size), while the adjacent section 2 (159 bp) is almost identical (99.4%) with the corresponding CR sequence, differing only by a 1 bp deletion. This section includes the conserved boxes E, D and C. It is followed by section 3 (172 bp) with 62% similarity and section 4 (146 bp) with 70% similarity. In the CR the sequences corresponding to sections 3 and 4 are separated by an intervening section of 145 bp which is missing in the nr-ΨCR, probably as the result of a deletion.

For comparison, intra-genomic alignments (CR vs. nr-ΨCR) were also performed in *A. gentilis* and in *S. nipalensis*. Moreover, an interspecific alignment of the nr-ΨCRs of the three species was attempted. The nr-ΨCR sequences of *H. fasciatus* and *S. nipalensis* differed considerably in length (1158 vs. 340 bp), but the shared section turned out to be quite similar (72%). On the other hand, no reasonable alignment of the nr-ΨCR was possible between these two species and *A. gentilis*. In the intra-genomic comparisons no homology between CR and nr-ΨCR is found in *A. gentilis*. In contrast, the nr-ΨCR of *S. nipalensis* contains a short region (147 bp) corresponding to section 4 (Fig. 2) with clear intra-genomic similarity (63%) to the CR. In the interspecific comparison between *S. nipalensis* and *H. fasciatus* this section of the nr-ΨCR showed 84% similarity. The 5'- and 3'-sections of the nr-ΨCR (lacking CR-homology) can be aligned but are less conserved and more variable in length.

The similarity between CR and nr-ΨCR found in *H. fasciatus* and *S. nipalensis* raised the question whether such an intra-genomic homology is present

also in other species. In view of the molecular phylogeny of Accipitridae established by Lerner and Mindell (2005) it becomes apparent that the genera *Hieraaetus* and *Spizaetus* belong to a well supported clade representing the subfamily Aquilinae. All raptor species analyzed so far (1) possess the same gene order, (2) do not show intra-genomic homology, and (3) belong to other subfamilies. Insofar the intra-genomic homology in *Hieraaetus* and *Spizaetus* detected in the present study appeared as a common character of the Aquilinae. Therefore we searched for additional published sequences from species of this subfamily. While no complete CR sequences are available, several Ψ CR sequences exist from species of the genus *Aquila* (Váli 2002). We selected four species representing three distinct lineages of the genus *Aquila* (*A. pomarina* + *A. clanga*, *A. heliaca* and *A. chrysaetos*) and aligned their nr- Ψ CR sequences with the CR and Ψ CR sequences of *H. fasciatus* and *S. nipalensis*. Interestingly, in *A. heliaca*, *A. pomarina* and *A. clanga* we identified CR homologous regions sharing their 5'- and 3'-ends with that found in *H. fasciatus* (Fig. 2; *A. pomarina* and *A. clanga* are so closely related that they are depicted as one bar only). *A. pomarina* has the longest CR homologous section which extends also into the region that is missing in the nr- Ψ CR of *H. fasciatus* (between sections 3 and 4). In *A. chrysaetos* there is a large deletion with respect to the *H. fasciatus* sequence. After a short (38 bp) homologous region at the beginning of section 1 there is a big gap spanning to the middle of section 3. In the rest of section 3 as well as section 4 there is again homology to the CR of *H. fasciatus* and *S. nipalensis*. An alignment of sections 1-4 between the CR sequences of *H. fasciatus* and *S. nipalensis*, their homologous nr- Ψ CR sequences, and the nr- Ψ CR sequences of the four *Aquila* species (for the nr- Ψ CR of *S. nipalensis* this comparison is possible only for section 4) is shown in ES. 2. The four matrices of similarity values for the sections are given in ES. 3. The values obtained in the comparisons between the CR sections of *H. fasciatus* and the corresponding sequences of the nr- Ψ CR of the various species are shown in Fig. 2. While most values are in the range between 60-72%, exceptionally high values are found for parts of the nr- Ψ CR of *H. fasciatus* (99.4% in section 2) and of *A. heliaca* (97% in section 2, 84% in section 3).

Discussion.

We analyzed the organization and structure of the main regulatory region of the mt genome, the CR, along with another important non-coding mt section, the Ψ CR, in *H. fasciatus*. The investigation of sequence and structure of both regions can provide information concerning the selection of molecular marker sequences for population genetic studies (Baker and Marshall 1997). The position of the CR and Ψ CR and the mitochondrial gene order are similar to at least 24 other studied raptor species, as well as to other birds belonging to four avian orders (Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; Haring et al. 2001; Gibb et al. 2006). Also, the general structure of the CR and the overall base composition is similar to those of other raptors.

Concerning the CR, birds of prey are similar in their content of conserved boxes and motifs, many of them shared with other birds or even with mammals, e.g., the ETAS1, the conserved sequence boxes within DII, and the CSB1 within DIII. However, there are some special features characteristic of raptors: In Galliformes and Anseriformes the C-stretch at the beginning of the CR is followed by a G-stretch giving rise to a secondary structure called “goose hairpin” (Quinn and Wilson 1993; Ramirez, Savoie and Morais 1993; Fumihito et al. 1994, 1995; Randi and Lucchini 1998). In raptors, however, the CR lacks the necessary subsequent G-stretch and therefore such a secondary structure cannot be formed (e.g., *Falco*: Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; Nittinger et al 2005; *Buteo*: Haring et al. 2001; *Gypaetus* and *Neophron*: Roques et al. 2004). Moreover, raptors lack the ETAS2 motif (Haring et al. 2001; Roques et al. 2004). Although most conserved boxes could be identified, sequence comparisons over a wide taxonomic range revealed that in several cases the flanking sections are more conserved than the classical boxes. This finding suggests that the selective constraints might extend beyond the described boxes or that the functionally important positions have even shifted along the CR sequence. The CR of *H. fasciatus* differs from that of many other species regarding the occurrence of repeats. The DI contains no repeats and DIII lacks the long tandem repeats described in other birds.

Regarding the Ψ CR, the basic structure in *H. fasciatus* with a non-repetitive part followed by a cluster of tandem repeats is the same as in the raptor species

studied so far. The repetitive section seems to be a characteristic of the Ψ CR of Falconiformes, since no repetitive region is found in the Ψ CR of other bird species (e.g., *Smithornis*, Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; *Phylloscopus*, Bensch and Härlid 2000). The size of the nr- Ψ CR (882 bp) of *H. fasciatus* is in the range of those found by Väli (2002) in several species of the genus *Aquila* (885-962 bp), except *A. chrysaetos*, in which it is much shorter (491 bp). The nr- Ψ CR sections of other raptors are considerably smaller (e.g., *A. gentilis* 310 bp, this study; *B. buteo* 338 bp, Haring et al. 1999; *F. peregrinus* 154-212 bp, Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; *S. nipalensis* 331 bp, Asai, Yamamoto and Yamagishi 2006). A major finding of this study is the intra-genomic homology between CR and Ψ CR detected in *H. fasciatus* as well as other Aquilinae species (genera *Spizaetus* and *Aquila*). The scenarios which might explain the existence of intra-genomic similarity involve duplication as well as homogenization processes.

A reasonable mechanism for the generation of rearrangements within the mt genome includes duplication of a part of the genome followed by deletions and degeneration of one of the two duplicated sections (Moritz, Dowling and Brown 1987; Quinn 1997). Concerning the first rearrangement detected in birds by Desjardins and Morais (1990), two independent deletion events were proposed to explain that there are no remnants of the duplicated section left. Subsequently several cases of avian mt rearrangements were detected revealing the existence of a second non-coding sequence (the Ψ CR), which was in accordance with the duplication hypothesis. Sequence similarity between CR and Ψ CR was first found in species of the order Passeriformes (*Smithornis*, Mindell, Sorenson and Dimcheff 1998; *Phylloscopus*, Bensch and Härlid 2000). Moreover, the existence of two non-degenerated copies of the CR in Psittaciformes (genus *Amazona*) further supported this assumption, and this case was supposed to constitute an earlier stage previous to the degeneration of one copy (Eberhard, Wright and Bermingham 2001). *H. fasciatus*, however, is the first raptor species in which such an intra-genomic similarity has been observed.

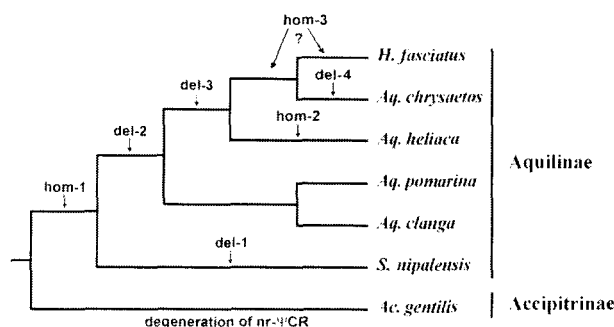
Do our findings support the hypothesis of the Ψ CR having originated via a duplication event? At first sight the intra-genomic homology fits well into the

proposed duplication hypothesis. However, some details require further explanation. The genera *Hieraaetus*, *Aquila*, *Spizaetus*, and *Accipiter* belong to the family Accipitridae within the Falconiformes. It is highly probable that all Falconiformes share the same gene order, since it is present in three distantly related families (Falconidae, Accipitridae and Pandionidae), in all members in which the gene order has been examined. Within Accipitridae, sequence information of CR and nr-ΨCR is available for representatives of the subfamilies Haliacetinae, Buteoninae, Aquilinae, and Accipitrinae. The fact that the CR in *N. pernopterus* and *G. barbatus* is flanked by *tRNA^{Thr}* and *tRNA^{Pro}* indicates that also the subfamilies Gypaetinae and Aegypiinae share the same gene order with the other birds of prey. Thus, despite the fact that the same arrangement obviously originated several times independently in various other groups of the avian order, its presence in Falconiformes is most parsimoniously explained by a single ancestral event. The fact that so far no homology between CR and nr-ΨCR was found in other raptors further supports the assumption that it was one rather ancient event: it would be expected that sequence degeneration has blurred traces of homology after such a long time period.

However, in the case of *H. fasciatus* the question arises, why sequence similarity should have remained preserved over such a long period only in this lineage (i.e., the Aquilinae). It is plausible that a process of continued homogenization would counteract sequence degeneration. In fact, different levels of similarity support the assumption that more than one event of homogenization between CR and nr-ΨCR have occurred during the cladogenesis of the Aquilinae. Most similarity values observed between the CR of *H. fasciatus* and the nr-ΨCR of the various species range between 60% and 72% (Fig. 2, ES 3), which may reflect the general degree of divergence between CR and nr-ΨCR since a homogenization event in the common ancestor of the Aquilinae. The high values found in *H. fasciatus* and *A. heliaca* (sections 2 and 3), however, have to be ascribed to subsequent homogenizations. Possible molecular mechanisms are gene conversion, recombination or transposition. Several studies imply that recombination (homologous as well as non-homologous) does occur in animal mtDNA (for review see Rokas, Ladoukakis and Zouros 2003). Intra-molecular recombination of mtDNA

was shown to take place *in vitro* (Tang et al. 2000) and the ability of the CR to self-recombine was demonstrated by Lunt and Hyman (1997).

We illustrate a possible scenario explaining the presence/absence of homologous sections within the various representatives of Aquilinae in Fig. 5. The fact that a part of the CR homologous section is also present in the nr-ΨCR of *S. nipalensis* suggests that the first homogenization event (probably spanning the entire region from sections 1-4) happened in the common ancestor of Aquilinae species. It is most likely that some sections were subsequently deleted in *S. nipalensis* (del-1). A small deletion should have occurred in the common ancestor of *H. fasciatus* and the *Aquila* species (del-2). In the common ancestor of *H. fasciatus*, *A. heliaca*, and *A. chrysaetos* this deletion was extended (del-3). The highest intra-genomic similarity (99.4%) in section 2 of *H. fasciatus* may result from a rather recent event of homogenization. At first sight it could be assumed that this homogenization has occurred already in the common ancestor of *H. fasciatus* and *A. heliaca* since the latter species shows also a high similarity (97%) with the CR of *H. fasciatus*. But a closer inspection of the alignment of this region suggests two independent homogenization events. One took place in the lineage of *A. heliaca* comprising a 262 bp region covering a part of section 1, the entire section 2 and a part of section 3 (hom-2). The other one led to homogenization of section 2 in the lineage of *H.*



fasciatus (hom-3). In the lineage of *A. chrysaetos* a fourth large deletion (del-4) occurred in the anterior part of the CR homologous section.

Figure 5: Evolutionary scenario proposed for the CR and ΨCR in Aquilinae (*A. gentilis* serves as outgroup). The cladogram reflects the phylogenetic relationships according to the tree of Lerner and Mindell (2005). Only those species from which sequence data were included in the analyses are shown. hom = homogenization event, del = deletion.

Since this scenario is based only on those species from which sequences are currently available, it is not possible to detect precisely all events of homogenization and deletion. Nevertheless, with each published mt sequence of a raptor species the picture is expected to get clearer. The information we have so far enables us to trace the evolutionary events that have occurred in this part of the mt control region in much more detail than it was possible previously. It seems that homogenization may easily occur as long as there is sufficient sequence similarity between the CR and Ψ CR. Moreover, homogenization itself allows perpetuation of this continued equalization. A major factor that may stop this process is obviously deletion. Large deletions (e.g., as those found in *S. nipalensis*) destroy the homology and bring the process to a halt. In such a lineage a “point of no return” is reached and Ψ CR and CR may further diverge independently. This point was obviously reached in the Falconidae and in some Accipitridae, since in these species the nr- Ψ CR is rather short and homology to the CR can no longer be detected (e.g., subfamily Buteoninae, genus *Falco*). The fact that some of the Accipitridae but no Falconidae retain homology underlines the existing divergence between both families, as observed in some previous studies (Lerner and Mindell 2005).

Our results are also important with respect to phylogenetic analyses. The nr- Ψ CR as a molecular marker for phylogenetic and population genetic studies was considered as extremely useful because of its high substitution rate (Väli 2002; Riesing et al. 2003; Kruckenhauser et al. 2004). In the phylogenetic analyses of the genus *Buteo* (Riesing et al. 2003; Kruckenhauser et al. 2004) the results are in accordance with those from another mt marker sequence (*nd6* gene) and the absence of intra-genomic homology (as in the other members of Buteoninae) allows the conclusion that the trees are based on orthologous sequences. In a phylogenetic tree of five *Aquila* species presented by Väli (2002) the nr- Ψ CR based tree included only those sections that are present in all species investigated. Therefore, due to the large deletion in *A. chrysaetos*, the section involved in recent homogenizations determined in our study was not included. Nevertheless, for future analyses the danger of metalogous comparisons should be considered, especially when members of the Aquilinae are analyzed.



Conclusions.

Our results support the assumption that the mt gene order in Falconiformes originated from a duplication of a section containing the CR. In most representatives of this bird group the homology is no longer detectable. In the Aquilinae, however, the process of sequence degeneration was slowed down by homogenization events retaining the sequence similarity at least in some sections. Further research on this topic is needed to clarify the complex sequence evolution in this region of the mt genome in more detail. In particular, additional sequence data of the CR from various *Aquila* species as well as from additional representatives of the Aquilinae (e.g., genera *Hieraaetus*, *Polemaetus*, *Spizaetus*) are required. Tracing the effects of mtDNA recombination by sequence comparisons can, on the one hand, provide further insights into these evolutionary processes and, on the other hand, have important implications on phylogenetic studies.



Acknowledgements.

This project was funded by Terra Natura Foundation and partly by the European Synthesys program (AT-TAF-2434). We are grateful to J. Balbontín (Estación Biológica de Doñana) and the Rabat Zoo (Morocco) for providing part of the samples used in this study. We also thank the governments of the Comunidad Valenciana (J. Jiménez, P. Mateache, A. Izquierdo and A. García i Sanz) and Región de Murcia (E. Aledo, E. Cerezo), the University Miguel Hernández (M. Carrete, J.A. Sánchez-Zapata) and the Spanish Ministerio de Medio Ambiente (V. García Matarranz, P. García Domínguez) for permission to get access to the nests where some of the samples were taken, partial funding and inestimable aid in the field. We appreciatively acknowledge B. Däubel, who provided fundamental help in the lab, as well as the other members of the Lab of Molecular Systematics of the Museum of Natural History in Vienna (L. Kruckenhauser, A. Gamauf, W. Meyer). L. Cadahía is supported by a grant of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (reference AP2001-1444). This paper is part of L. Cadahía's Ph.D. at the University of Alicante.

References.

- Asai, S., Yamamoto, Y., Yamagishi, S. 2006. Genetic diversity and extent of gene flow in the endangered Japanese population of Hodgson's hawk-eagle, *Spizaetus nipalensis*. *Bird Conservation International* 16: 113-129.
- Baker, A.J. & Marshall, H.D. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. In: Mendel, D.P. (ed). *Avian molecular evolution and systematics*. London: Academic Press.
- Bensch, S. & Härlid, A. 2000. Mitochondrial genomic rearrangements in songbirds. *Molecular Biology and Evolution* 17: 107-113.
- Cadahía, L., Negro, J.J. & Urios, V. 2007. Low mitochondrial DNA diversity in the endangered Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*) from SW Europe (Iberia) and NW Africa. *Journal of Ornithology* 148: 99-104.
- Cardia, P., Fraguas, B., Pais, M., Guillemaud, T., Palma, L., Cancela, M.L., Ferrand, N. & Wink, M. 2000. Preliminary genetic analysis of some western Palearctic populations of Bonelli's eagle, *Hieraaetus fasciatus*. In: Chancellor, R.D. & Meyburg, B.-U. (eds). *Raptors at risk*. Berlin: WWGBP / Hancock House.
- Cardia, P., Fraguas, B., Pais, M., Silva, S., Guillemaud, T., Palma, L., Cancela, M.L. & Ferrand, N. 2002. Análise da variação genética de proteínas em populações mediterrânicas de águia-perdigueira *Hieraaetus fasciatus*. *Airo* 12: 71-74.
- Clayton, D.A. 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. In: Wolstenholme, D.R. & Jeon, K.W. (eds). *Mitochondrial genomes. International review of cytology*, vol. 141. San Diego: Academic Press.
- Del Hoyo, J., Elliot, A. & Sargatal, J. 1994. *Handbook of the Birds of the World. Vol. 2: New World Vultures to Guinea-fowl*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Desjardins, P. & Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology* 212: 599-634.
- Dickinson, E.C. 2003. *The Howard and Moore complete checklist of the birds of the world. 3rd Edition*. Princeton: Princeton University Press.
- Eberhard, J.R., Wright, T.F. & Bermingham, E. 2001. Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1330-1342.
- Fumihito, A., Miyake, T., Sumi, S., Takada, M., Ohno, S. & Kondo, N. 1994. One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 91: 12505-12509.
- Fumihito, A., Miyake, T., Takada, M., Ohno, S. & Kondo, N. 1995. The genetic link between the Chinese bamboo partridge (*Bambusicola thoracica*) and the chicken and junglefowls of the

- genus *Gallus*. Proceedings of the National Academy of Science USA 92: 11053-11056.
- Gemmell, N. & Akiyama, S. 1996. An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissue. Trends in Genetics 12: 338-339.
- Gibb, G.C., Kardailsky, O., Kimball, R., Braun, E. & Penny, D. 2006. Mitochondrial genomes and avian phylogeny: complex characters and resolvability without explosive radiations. Molecular Biology and Evolution. In press.
- Godoy, J.A., Negro, J.J., Hiraldo, F., Donazar, J.A. 2004. Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered Bearded Vulture (*Gypaetus barbatus*, L.) as revealed by mitochondrial DNA. Molecular Ecology 13: 371-390.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Haring, E., Riesing, M.J., Pinsker, W. & Gamauf, A. 1999. Evolution of a pseudo-control region in the mitochondrial genome of Palearctic buzzards (genus *Buteo*). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 37: 185-194.
- Haring, E., Kruckenhauser, L., Gamauf, A., Riesing, M.J. & Pinsker, W. 2001. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Buteo buteo* (Aves, Accipitridae) indicates an early split in the phylogeny of raptors. Molecular Biology and Evolution 18: 1892-1904.
- Haring, E., Kvaløy, K., Gjershaug, J.-O., Rørv, N. & Gamauf, A. 2007. Convergent evolution and paraphyly of the hawk-eagles of the genus *Spizaetus*: phylogenetic analyses based on mitochondrial markers. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. In press.
- Helbig, A.J., Kocum, A., Seibold, I. & Braun, M.J. 2005. A multi-gene phylogeny of aquiline eagles (Aves: Accipitriformes) reveals extensive paraphyly at the genus level. Molecular Phylogenetics and Evolution 35: 147-164.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Bioinformatics 17: 1244-1245.
- Kruckenhauser, L., Haring, E., Pinsker, W., Riesing, M.J., Winkler, H., Wink, M. & Gamauf, A. 2004. Genetic vs. Morphological differentiation of Old World buzzards (genus *Buteo*, Accipitridae). Zoologica Scripta 33: 197-211.
- L'Abbé, D., Duhaime, J.F., Lang, B.F. & Morais, R. 1991. The transcription of DNA in chicken mitochondria initiates from one major bidirectional promoter. Journal of Biological Chemistry 266: 10844-10850.
- Lerner, H.R.L. & Mindell, D.P. 2005. Phylogeny of eagles, Old World vultures, and other Accipitridae based on nuclear and mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 37: 327-346.
- López, J.V., Yuhki, N., Masuda, R., Modi, W. & O'Brien, S.J. 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial

- DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution* 39: 174-190.
- Lunt, D.H. & Hyman, B.C. 1997. Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* 387: 247.
- Lunt, D.H., Whipple, L.E. & Hyman, B.C. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology* 7: 1441-1455.
- Mira, S., Wolff, K. & Cancela, M.L. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers in Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*). *Molecular Ecology Notes* 5: 493-495.
- Mira, S. 2006. Population genetics of an endangered species: the Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*). University of the Algarve (Faro, Portugal): PhD Thesis.
- Mindell, D.P., Sorenson, M.D. & Dimcheff, D.E. 1998. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 10693-10679.
- Moritz, C., Dowling, T.E. & Brown, W.M. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269-292.
- Muñoz, J., Godoy, J.A. & Negro, J.J. 2001. Mitochondrial gene order around the control region in raptors. In: Abstracts of the 4th Eurasian Congress on Raptors. Sevilla.
- Nittinger, F., Haring, E., Pinsker, W., Wink, M. & Gamauf, A. 2005. Out of Africa: phylogenetic relationships between *Falco biarmicus* and the other Hierofalcons (Aves: Falconidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43: 321-331.
- Quinn, T.W. 1997. Molecular evolution of the mitochondrial genome. In: Mendel, D.P. (ed). *Avian molecular evolution and systematics*. London: Academic Press.
- Quinn, T.W. & Wilson, A. 1993. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *Journal of Molecular Evolution* 37: 417-425.
- Ramirez, V., Savoie1, P. & Morais, R. 1993. Molecular characterization and evolution of a duck mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution* 37: 296-310.
- Randi, E. & Lucchini, V. 1998. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *Journal of Molecular Evolution* 47: 449-462.
- Real, J. 2004. Águila-azor perdicera, *Hieraaetus fasciatus*. In: Madroño A, González C and Atienza JC, editors. *Red Book of the Birds of Spain. Libro Rojo de las Aves de España*. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad-SEO/Birdlife.
- Real, J., Grande, J.M., Mañosa, S., Sánchez-Zapata, J.A. 2001. Geographic variation of the causes of death of Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* in Spain. *Bird Study* 48: 221-228.
- Riesing, M.J., Kruckenhauser, L., Gamauf, A. & Haring, E. 2003.

- Molecular phylogeny of the genus *Buteo* based on mitochondrial maker sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 328-342.
- Ritchie, P.A. & Lambert, D.M. 2000. A repeat complex in the mitochondrial control region of Adélie penguins from Antarctica. *Genome* 43: 613-618.
- Rokas, A., Ladoukakis, E. & Zouros, E. 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 411-417.
- Roques, S., Godoy, A., Negro, J.J. & Hiraldo, F. 2004. Organization and variation of the mitochondrial control region in two vulture species, *Gypaetus barbatus* and *Neophron percnopterus*. *Journal of Heredity* 95: 332-337.
- Ruokonen, M. & Kvist, L. 2002. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 422-432.
- Saccone, C., Pesole, G. & Sbisà, E. 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution* 33: 83-91.
- Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G. & Saccone, C. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205: 125-140.
- Seutin, G., White, B.N. & Boag, P.T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82-90.
- Sorenson, M.D. & Quinn, T.W. 1998. Numts: a challenge for avian systematics and population biology. *The Auk* 115: 214-221.
- Stresemann, E. & Amadon, D. 1979. Order Falconiformes. In: Mayr E. and Cottrell G.W. (eds). *Check-list of birds of the world*. Volume 1. Second edition. Cambridge, MA.: Museum of Comparative Zoology.
- Tang, Y., Manfredi, G., Hirano, M. & Schon, E.A. 2000. Maintenance of human rearranged mitochondrial DNAs in long-term cultured transmitochondrial cell lines. *Molecular Biology of the Cell* 11: 2349-2358.
- Väli, Ü. 2002. Mitochondrial pseudo-control region in old world eagles (genus *Aquila*). *Molecular Ecology* 11: 2189-2194.
- Walberg, M.W. & Clayton, D.A. 1981. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D4oop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research* 9: 5411-5421.
- Wenik, P.W., Baker, A.J. & Tilanus, M.G.J. 1994. Mitochondrial control-region sequences in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies. *Molecular Biology and Evolution* 11: 22-31.
- Yamamoto, Y., Murata, K., Matsuda, H., Hosoda, T., Tamura, K. & Furuyama, J. 2000. Determination of the complete nucleotide sequence and haplotypes in the D-loop region of the mitochondrial genome in the Oriental white stork, *Ciconia boyciana*. *Genes Genetics and Systematics* 75: 25-32.



Section 2

```
H.fas-CR .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
S.nip-CR .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
H.fas-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.chr-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.hel-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.dom-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.cla-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
S.nip-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
```

```
H.fas-CR .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
S.nip-CR .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
H.fas-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.chr-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.hel-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.dom-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.cla-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
S.nip-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
```

Section 3

```
H.fas-CR .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
S.nip-CR .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
H.fas-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.chr-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.hel-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.dom-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
A.j.cla-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
S.nip-W .....1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9
```




Section 4

H.fas-C
 S.nip-C
 H.fas-W
 Aq.Chri-W
 Aq.hel-W
 Aq.pom-W
 Aq.cla-W
 S.nip-W

H.fas-C
 S.nip-C
 H.fas-W
 Aq.Chri-W
 Aq.hel-W
 Aq.pom-W
 Aq.cla-W
 S.nip-W

3-section

H.fas-C
 S.nip-C
 H.fas-W
 Aq.Chri-W
 Aq.hel-W
 Aq.pom-W
 Aq.cla-W
 S.nip-W



ES. 3. Genetic similarity (in %) among different sections of CR and nr-ΨCR sequences. Sequences of the following species were included:
1) CR sequences of *H. fasciatus* (H.fas-C) and *S. nipalensis* (S.nip-C)
2) nr-ΨCR sequences of *H. fasciatus* (H.fas-Ψ), *S. nipalensis* (S.nip-Ψ), *Aq. chrysaetos* (Aq.chr-Ψ), *Aq. heliaca* (Aq.hel-Ψ), *Aq. pomarina* (Aq.pom-Ψ) and *Aq. clanga* (Aq.cla-Ψ).

The values are based on pairwise alignments. Each gap was treated as 1 mismatch irrespective of size. Lengths of the respective alignments are given above the diagonal. Red = high similarity values indicating homogenization of the nr-ΨCR by CR sequence, Blue = partially deleted section where similarity values are meaningless, del = section completely deleted

Section 1										
	S.nip-C	H.fas-C	H.fas-Ψ	Aq.chr-Ψ	Aq.hel-Ψ	Aq.pom-Ψ	Aq.cla-Ψ	S.nip-Ψ		
S.nip-C	---	25.6	207	1	273	155	155	del	del	del
H.fas-C	67.4	---	203	11	209	154	155	del	del	del
H.fas-Ψ	72.9	71.5	---	41	273	153	157	del	del	del
Aq.chr-Ψ	18.3	15.5	65.9	---	15	1	31	del	del	del
Aq.hel-Ψ	70.8	70.3	61.7	51.5	---	155	155	del	del	del
Aq.pom-Ψ	62.2	64.9	70.9	47.6	71.0	---	153	del	del	del
Aq.cla-Ψ	61.3	62.6	72.6	47.6	68.4	93.8	---	del	del	del
S.nip-Ψ	del	del	del	del	del	del	del	---	del	---

Section 2										
	S.nip-C	H.fas-C	H.fas-Ψ	Aq.chr-Ψ	Aq.hel-Ψ	Aq.pom-Ψ	Aq.cla-Ψ	S.nip-Ψ		
S.nip-C	---	150	160	del	del	159	159	del	del	del
H.fas-C	32.1	---	160	del	150	159	159	del	del	del
H.fas-Ψ	1	1	---	del	160	del	159	del	del	del
Aq.chr-Ψ	del	del	del	---	del	del	del	del	del	del
Aq.hel-Ψ	del	---	159	159	del	del	del
Aq.pom-Ψ	68.3	72.3	71.7	del	71.7	---	158	del	del	del
Aq.cla-Ψ	67.9	69.8	69.2	del	69.4	94.5	---	del	del	del
S.nip-Ψ	del	del	del	del	del	del	del	---	del	---



Section 3

	S.nip-C	H.fas-C	H.fas-Ψ	Aq.chr-Ψ	Aq.hel-Ψ	Aq.pom-Ψ	Aq.cla-Ψ	S.nip-Ψ
S.nip-C	---	184	176	98	181	164	180	del
H.fas-C	57.3	---	176	98	181	164	178	del
H.fas-Ψ	61.4	61.9	---	97	175	157	173	del
Aq.chr-Ψ	65.3	63.3	81.4	---	97	85	85	del
Aq.hel-Ψ	59.5	59.6	62.3	66.0	---	162	173	del
Aq.pom-Ψ	61.0	59.8	75.2	77.8	63.6	---	159	del
Aq.cla-Ψ	57.8	56.3	73.7	71.9	60.1	93.7	---	del
S.nip-Ψ	del	del	del	del	del	del	del	---

Section 4

	S.nip-C	H.fas-C	H.fas-Ψ	Aq.chr-Ψ	Aq.hel-Ψ	Aq.pom-Ψ	Aq.cla-Ψ	S.nip-Ψ
S.nip-C	---	154	150	158	161	161	161	158
H.fas-C	91.5	---	157	158	161	161	161	158
H.fas-Ψ	71.2	70.1	---	147	151	150	150	147
Aq.chr-Ψ	70.5	69.9	92.5	---	150	150	150	147
Aq.hel-Ψ	67.7	67.7	87.4	90.7	---	155	155	150
Aq.pom-Ψ	67.7	67.1	84.0	85.3	97.1	---	153	151
Aq.cla-Ψ	67.1	66.5	84.0	86.7	98.4	97.5	---	151
S.nip-Ψ	62.8	66.0	83.7	86.4	91.2	80.3	80.8	---



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

C ONCLUSIONES



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



CONCLUSIONES.

1 El seguimiento por satélite ha resultado de gran utilidad para estudiar los grandes desplazamientos y áreas vitales del águila-azor perdicera durante su etapa de dispersión juvenil. El uso de la telemetría GPS en varios ejemplares ha permitido mejorar la precisión de los datos obtenidos sobre las águilas en dispersión.

2 Los métodos más consistentes para detectar el inicio de la dispersión en el águila-azor perdicera están basados en la observación directa del comportamiento de los juveniles o bien en establecer una distancia mínima de dispersión junto con una condición que evite el efecto de los movimientos exploratorios previos al abandono definitivo del territorio natal. Sin embargo, el nuevo método basado en la distribución de las localizaciones y en vectores, presentado en esta tesis, permite una detección más consistente y precisa del inicio de la dispersión, posibilitando, además, una comparación objetiva entre diferentes estudios.

3 Al inicio del período de dispersión los juveniles de águila-azor perdicera realizan los mayores desplazamientos a mediodía y en las primeras horas de la tarde, probablemente debido a la más alta disponibilidad de térmicas. Los movimientos diarios no exceden normalmente los 20 km, con episodios muy poco frecuentes que suelen ocurrir inmediatamente después del abandono del territorio natal y en los que se han llegado a alcanzar cerca de 250 km/día.

4 El águila-azor perdicera es una especie con tendencia claramente dispersiva y con una elevada capacidad de movimiento, en la que todos los juveniles abandonan el territorio paterno y recorren grandes distancias. Los individuos no recorren el territorio al azar, sino que seleccionan y se agrupan en unas cuantas 'áreas de dispersión' en el marco de la Península Ibérica. Estas áreas son probablemente seleccionadas debido a la mayor eficiencia en la captura de presas y a la ausencia de reproductores, a causa del tipo de hábitat que en ellas existe.

Conclusiones

5 Las hembras presentan una tendencia a dispersarse antes y a edades más tempranas que los machos, y a que el tamaño de sus áreas de dispersión sea menor que el de éstos.

6 Una distancia de dispersión natal de 441 km registrada para una hembra indica que el águila-azor perdicera no es necesariamente filopátrica e implica la posibilidad de flujo génico entre diferentes áreas de la Península Ibérica.

7 Las secuencias de ADN mitocondrial analizadas revelan unos niveles muy bajos de diversidad genética en la población ibérica y del noroeste de África de águila-azor perdicera, encontrándose únicamente cuatro haplotipos diferentes.

8 De acuerdo con las secuencias analizadas, no se observan evidencias de restricción al flujo génico, y por tanto no hay indicios de estructura genética, en la población ibérica y del noroeste de África de la especie.

9 La caracterización de las dos regiones no codificantes del genoma mitocondrial (la Región Control – CR – y la Pseudo-región Control – Ψ CR) revela que el orden génico en el águila-azor perdicera es similar al de otras especies de rapaces y al de otras aves pertenecientes a cuatro órdenes distintos. La homología entre ambas regiones apoya la teoría de que el orden génico observado procede de la duplicación de una sección del ADN mitocondrial que contenía originalmente a la Región Control y una posterior degeneración de una de las copias. Dentro de las águilas de la subfamilia Aquilinae, esta degeneración probablemente ha sido ralentizada por sucesivos eventos de homogeneización.

10 Los dos métodos utilizados en esta tesis, el genético y el telemétrico, concuerdan en afirmar que las poblaciones de águila-azor perdicera se encuentran conectadas a través del flujo de individuos entre ellas, y que, por tanto, no existe estructura poblacional a la escala de la Península Ibérica.



11 Se han detectado áreas concretas de dispersión que corresponden a una parte muy pequeña del territorio de la Península Ibérica. Mediante su protección se podría preservar un gran número de individuos en una de las fases más vulnerables de su ciclo vital, la dispersión juvenil.

12 La existencia de una población conectada e interdependiente en toda la Península Ibérica muestra la necesidad de establecer las estrategias de conservación a nivel supraautonómico e internacional (considerando, al menos, España y Portugal).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

AGRADECIMIENTOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Normalmente se dice que ésta es la parte de las tesis doctorales que todo el mundo se lee, para ver si el doctor en potencia ha incluido a Fulanito, a Menganita o al que está leyendo en ese momento. Bien, si estás leyendo esto, tu nombre no está por ningún lado y consideras que debería aparecer, te ruego que me disculpes, pero el cerebro de uno es ya bastante 'limitadito' de por sí y, encima, después de la tesis ya no quedan suficientes neuronas funcionales como para recordarlo todo. Dicho esto, debería empezar con la enumeración de personas y entidades a las cuales hay montones de cosas que agradecer, pero antes me gustaría hacer una puntualización. Si hay algo que ha caracterizado a esta tesis ha sido la cantidad de mudanzas, cambios de ciudad, de piso y de mesa donde poner el portátil para trabajar, que la han acompañado. Es por ello que, además de las personas e instituciones que la han ido apoyando de manera constante a lo largo de estos cinco años, ha habido un montón de peña que ha tenido que aguantar a un tío que pululaba por su piso o por su laboratorio durante algunos meses de sus vidas. Trataré de recordarlos a todos.

Y ahora sí, empezamos ya con la consabida lista, que deben encabezar mis directores de tesis, el Dr. Vicente Urios, de la Universidad de Alicante, y el Dr. Juan José Negro, de la Estación Biológica de Doñana. Allá por agosto del 2001 Vicente recibía el contacto de un biólogo gallego que estaba interesado en hacer una tesis. Ese primer contacto cristalizó tras varios meses en la primera mudanza a Sevilla, el encuentro con Juanjo y la decisión de que éste actuaría también como supervisor de una tesis que por aquel entonces todavía estaba muy en pañales. Tras todo este tiempo, ha habido, evidentemente, momentos más fáciles y momentos más difíciles, pero a estas alturas tengo que agradecerle a Vicente el convencimiento de que los proyectos que acomete van a ir hacia delante de un modo o de otro, el buscarnos las habichuelas a todos, el ir añadiendo "dosis de madurez" mediante comentarios y actitudes, el darme toda la libertad que he querido y el contar conmigo para el futuro. En lo que a Juanjo se refiere, he de decir que siempre ha estado ahí para corregir trabajos, sugerir estancias, revistas o referees, aguantar un par de momentos "semi-depresivos" de tesis, y que, además, está contando conmigo en el presente y espero que en el futuro. Gracias a los dos.

Agradecimientos

Las siguientes personas que debo mencionar son Miguel Taberner, Juanma Chuliá y los demás patronos de la Fundación Terra Natura. De ellos han provenido el interés y la fundamental financiación para el estudio del águila-azor perdicera, sin la cual este volumen que ahora tenéis en las manos simplemente no existiría. Gracias por apoyarnos y tenernos en cuenta en todo momento.

El trabajo de campo de la tesis, que fundamentalmente tuvo lugar entre 2002 y 2004, no habría sido posible sin la ayuda de Víctor García Matarranz, del Ministerio de Medio Ambiente. Con él he compartido horas de conversaciones, coñas y canciones con voz de tenor en un todo terreno matrícula MMA, perdidos por algún lugar del Levante peninsular, mientras Víctor estaba, como siempre, de camino a algún sitio, bien “aquí al lado” o en la otra punta del país. Con él me he subido a peñas, paredes y cortados de roca, redescubriéndome a mí mismo que, de manera inevitable, la cabra tira al monte. Compañero de algunas de esas horas ha sido también Paco García Domínguez, que dentro de los trabajos de esta tesis tuvo algún muy muy muy mal momento, pero también alguna que otra situación graciosa, como aquella cena en el bar ultrapijo – con menú de enrejado de gallinero – de Gratallops.

Trabajando con la perdicera hemos necesitado pedir un montón de permisos a las administraciones correspondientes. Asimismo, al abarcar un rango geográfico muy amplio, hemos necesitado también de la colaboración de investigadores y ornitólogos de las diferentes áreas donde queríamos marcar bichos. En la Comunidad Valenciana, Juan Jiménez, Paloma Mateache, Alejandro Izquierdo, Carles Dolz, Margarita Romanillos, Toni García i Sanz, Cati Gerique, el personal de los centros de recuperación de fauna del Saler y de Santa Faz, y un gran número de agentes forestales, todos ellos pertenecientes a la Conselleria de Territori i Habitatge de la Generalitat Valenciana, concedieron los permisos necesarios, monitorizaron nidos durante la época reproductiva y nos acompañaron a marcar a los pollos. En Cataluña estas tareas las llevaron a cabo Xavier Parellada, del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya, Nuria Pocino, Joan Real, Albert Tintó y Santi Mañosa, de la Universidad de Barcelona, y Marc Robert Jané, Toni Borau y demás personal del ICRA de Tarragona, así como los forestales que nos

acompañaron en las visitas de campo. En la Región de Murcia nos echaron una mano Martina Carrete y Toni Sánchez-Zapata, de la Universidad Miguel Hernández, y Emilio Aledo y Ester Cerezo de la Consejería de Industria y Medio Ambiente, además del personal de la guardería. Nuestros bichos presentaron una relación importante con Castilla La Mancha durante sus movimientos, y de esa comunidad es preciso agradecer al personal de la Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Rural, los guardas forestales de la provincia de Toledo y los centros de recuperación de Fauna de Albacete y de Sevilleja de la Jara (Toledo), por su ayuda con los ejemplares electrocutados y en la búsqueda de posibles reclutamientos a la población reproductora de alguno de nuestros bichos. Por último, Carlos González y Ginés Gómez, ornitólogos de la provincia de Almería, nos proporcionaron información e hicieron de guías en la búsqueda del posible nido establecido por uno de nuestros machos. A todos ellos, mis más sinceras gracias.

Los trabajos de campo ocuparon las “primaveras-veranos” de varios años de la tesis y coincidieron o alternaron con diferentes fases de las mudanzas que comentaba arriba. De estas mudanzas, dos de las que tuvieron más trascendencia correspondieron a las estancias en el extranjero. Entre septiembre y diciembre de 2003 trabajé en el Centre for Ecology and Hydrology de Dorset, Inglaterra, con los doctores Robert Kenward y Sean Walls. A ellos, y al resto de la gente con la que trabajé y viví allí, tengo que agradecerles el segundo capítulo de la tesis y el enseñarme cómo es la vida de un científico en el medio de la campiña inglesa (lluvia, bici, ordenador, pub, lluvia, pinta de cerveza, bici, lluvia, lunch en casa del jefe, bici, lluvia...). Entre junio y diciembre de 2005 trabajé en el Laboratorio de Sistemática Molecular del Museo de Historia Natural de Viena, Austria, y a toda la gente de esa estancia tengo que agradecerle que la convirtiesen en toda una experiencia, con mayúsculas, tanto profesional como personalmente hablando. El capítulo octavo de la tesis salió de ella, gracias sobretodo a la ayuda de la Dra. Lisi Haring y del Dr. Willi Pinsker. Sin embargo, no sólo con ellos sino también con la Dra. Luise Kruckenhauser, con Bärbi Däubel, la Dra. Mihaela Pavlicev, la Dra. Anita Gamtauf, el Dr. Werner Meyer o la Dra. Franziska Nittinger aprendí mucho de genética, de trabajo en el laboratorio, de cómo desenvolverme en aquél momento y

Agradecimientos

en el futuro, y de la vida vienesa en general (bici, ópera, lluvia, Schnitzel, bici, Sturm, Heuriger, bici, Käsekrainer mit süssem Senf, ballet, bici, ópera, nieve, Punsch, Musikverein Gebau, bici...). El vínculo personal que se estableció en ese momento, a diferentes niveles con diferentes personas, va a ser difícil de romper.

Saltando hacia atrás en el tiempo, en agosto de 2002 me mudé a Sevilla de nuevo (volvía desde Alicante) para trabajar en el Laboratorio de Ecología Molecular (LEM) de la Estación Biológica de Doñana. Allí, er Quini me colocó un extraño aparato en las manos (una micropipeta Gilson...), poniendo así el punto de partida a mi incursión en el mundo de la genética. En esa época fueron muchas las personas que me echaron una mano: er Quini, er Juanele y er Míguel, Mónica y María, mi súper Cris (de la que hablaré más adelante), Ana Píriz, Severine y demás personal del LEM en ese momento. Ahí arrancó también el esfuerzo por conseguir muestras de algún tejido biológico de la perdi para hacer nuestros análisis, y desde aquí mi agradecimiento a todas las personas y entidades que aportaron material: Javier Balbontín (EBD), Sara Mira (Universidad del Algarbe), Cati Gerique (C.R.F. El Saler), Arantxa García (GREFA), Isabel Molina (EGMASA), Marc Robert Jané (ICRA), Eduardo Mínguez (Conselleria de Territori i Habitatge de la Generalitat Valenciana), Carmelo Fernández (La Rioja), el C.R.F. de Albacete, Andrew Kitchener (National Museums of Scotland, Reino Unido), Anita Gamauf (Naturhistorisches Museum Viena, Austria), Leo Joseph y Nate Rice (Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Estados Unidos), Reuven Yosef (Israel) y el Zoo de Rabat.

A pesar de todas las mudanzas y cambios de residencia, la mayor parte de la tesis se ha desarrollado en la Universidad de Alicante, en el Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales, que es al mismo tiempo el Instituto Universitario CIBIO. Como cualquier lugar de características similares, aquello es un hervidero de profesores, becarios, doctorandos y PAS (personal de administración y servicios) con los que siempre he tenido buen rollo y que de manera general han podido echar una mano en algún aspecto relacionado con la tesis. De entre ellos, Yolanda y M^a José en los inicios, y más modernamente la súper Gema, solucionaron infinidad de historias burocráticas y financieras que se han ido

cruzando por el camino. Durante las primeras etapas alicantinas (años 2002 y 2003) existía un grupo heterogéneo de becarios que confabulábamos a la hora de comer y que de vez en cuando nos escapábamos al Barrio tras cenar en la casa de M^a Ángeles, que también fue mi casa durante bastante tiempo (¡¡gracias Pitu!!). Aunque ahora casi todos han emigrado a nuevos puestos de trabajo, les debo mil gracias por adoptarme e introducirme en el “maravilloso mundo del S.N.” (¡¡tachán tachán!!): Carmina, Ana Juan, M^a Ángeles, Fania, Jorge, Elena, Leti, Sonia, José Gaspar, Loreto, Salima, Celeste, Anabel, Ximo, y, por supuesto, Mati (¿me he dejado a alguien??).

Pero, inevitablemente, unos se van y otros vienen. Ahora existe un grupo de investigación de vertebrados que constituye la expansión de aquel despachito en el que “vivíamos” Vicente y yo hace años, y que son los que han compartido mis idas y venidas, estreses, congresos, viajes, estancias, salidas de campo y prácticas con los alumnos durante estos últimos años. Ellos han corregido manuscritos, discutido ideas, me han “carretado” de aquí para allá en mis mudanzas, y han arreglado mis papeleos cuando yo no estaba; también han animado las mañanas y las tardes, los momentos de cotilleo y los consiguientes ‘¡cierra la puerta!’, las pilladas cuanto montábamos alguna merendola (¡¡Pasbeeeeeeel!!) y hasta han sido un poco partícipes de mi vida personal. Les debo mucho y espero no perder el contacto con ellos: Rubén, digo, Harry, Alvariño (gracias a cuya aparición mi “autoestima” científica se ha recuperado ligeramente ☺), Asun, Teimiky, Miguel, digo, Maiki, Octavio “el güey”, Pascual, Diego, y, aunque ya no ande por allí, también Santi.

Además de “los míos”, que son los petardos del párrafo anterior, y de aquellos que forman el S.N. y que hace tiempo que se han dispersado (¡vaya! ¿será la influencia de la tesis?...), de entre el montón de gente del CIBIO a los cuales debo agradecerles infinidad de momentos durante todo este tiempo, hay dos personas que merecen una mención aparte. Una es Fani (la Dra. Micó), que, aún no sé muy bien cómo, ha estado ahí proporcionando objetividad, perspectiva y consejo desde ‘el otro lado’ (desde el ‘después de la tesis’, se entiende), y cuyas charlas me han servido de mucho. Y la otra es mi amor platónico alicantino, Bea, sin la cual estos años de tesis habrían tenido mucha menos chispa, mucha menos emoción y habrían

Agradecimientos

sido mucho más grises. Ella sabe de sobra qué es todo lo que le debo (desde terapia psicológica profunda – pero profunda, ¿eh? – hasta un colchón donde dormir en los períodos “inter-mudanza”), y sabe que es mucho, y sabe que me ha aportado suficiente claridad mental como para seguir con la tesis hasta llegar al final. Gracias, Marquesa de Fuat.

La última de las mudanzas me ha devuelto a Sevilla por tercera vez y de esta etapa tengo que agradecer el que hayan aguantado el tirón “maniático-psicológico-depresivo” del final de la tesis a Miguelito, que anima el día a día con sus múltiples cualidades en el mundo de los sonidos, entiéndase, la canción ligera y alguna que otra “sonoridad” (jejé), Nuria, con la enorme confianza que hemos pillado en ná de tiempo, Alicia, Ramón, digo, Airam (perdona, “muyayo” ☺), Louise, Amparo, la súper Lola que todo soluciona, er Juanele (¡a ver si acabo ya la tesis y me hago un poco más sociable!), er Quini (gracias, killo, por aquellas cervezas del primer día y por el resto de lo que ya ha habido y de lo que vendrá) y demás peña de becarios, investigadores y secretari@s de la EBD. Entre todo ese personal, hay que nombrar a ‘la Isa’ y a ‘la Cris’ y al súpersofá que ha sido mi cama en tantas ocasiones, cuya dueña fue también María durante un tiempo. Pero a Cris le debo mucho más que el servicio de hotel. Cris es ya la Dra. García desde hace algunos meses, y su experiencia me ha ayudado un montón en esta fase final; ella ha aguantado mareos mentales, tanto de fondo como de forma de la tesis, dudas trascendentales sobre la ciencia y la historia natural, potenciales caminos a seguir y mil historias más de índole diversa. Menos mal que estabas tú por aquí ☺ . Gracias, Dra. Prunus.

A mis etapas alicantinas (y volvemos a saltar...) pertenecen una serie de “personajes” (muy cariñosamente hablando) que, a pesar de que nuestra vinculación no proviene de la universidad o la investigación, también han sufrido, de un modo u otro, las vicisitudes de la tesis. El primero a nombrar es ‘el Manchego’, que aguantó mucho, demasiado, creo, durante el primer par de años. Más adelante apareció la incombustible Vanessa, que aportó locura y formas “alternativas” de trabajar en investigación (jejé), y Marian, que, creo que sin saberlo, me abrió los ojos para un montón de temas y me hizo ver las cosas con los pies mucho más en el suelo de lo que los tenía. Más adelante me encontré con Sito, Txevi y Marisa, que, cada cual a

su modo (charlas, opiniones, experiencias que me aportaban perspectivas interesantes, aunque ellos no fuesen conscientes de ello...), han acercado la tesis y la investigación cada vez más al mundo de lo real, sacándola de las esferas pululantes de mis movidas y mi cabeza. Y ya durante unos tres años, Fran ha estado permanentemente “dando por saco” (y le doy mil gracias por ello) para arrancarme de mi rutina auto-impuesta y pasearme por ahí para despejarme la cabeza, me ha enseñado que uno puede vivir, tener cuatrocientos trabajos, y comprarse un piso teniendo todavía tiempo para el ocio y para la “visita” (¡¡qué fuerte me parece!!); he aprendido mucho de su filosofía “¡¡porque yo lo valgo!!” ☺.

En ese grupo de amigos entra también mi gente, la de toda la vida, la de Chantada, que, de una forma o de otra, apoyó mi emigración de las tierras gallegas y que ha estado siempre ahí cada vez que he vuelto al hogar: Mariquinha, el Froily, Marisoli, Marta Pa, la Churri, Edu, Arantxa, Pauli, el Nené, Aida, Avely, y un largo etcétera de estudiantes, trabajadores, músicos, antiguos alumnos, bailarines y juerguistas en general. De entre ellos tengo que destacar a la Tukys, digo, a (mi) Marta (¡¡iiiiiiiiiiii!!!!!!!), que es la mejor amiga que siempre he tenido y que, de forma inevitable, siempre tendré. Su vida ha cambiado mucho durante estos años de tesis, pero aún así, ella se ha tragado los mareos mentales más duros, las dudas más acuciantes, los problemas más gordos, y todo eso tirando p’alante con su propia vida, que tampoco es para aburrirse precisamente, jeje. Gracias Tukysña, y a ver si ahora tengo más tiempo para ir a verte. Lululúúúú.....

Y tras una duda – breve – acerca del orden de factores, ahora hablaré del tío que me ha puesto la cabeza patas arriba durante los últimos tiempos. Apareció cuando no se le esperaba y se quedó, pero es que, además, no ha desaparecido ni siquiera cuando el que se ha marchado a perderse por el mundo he sido yo. De la ‘locura–crisis–historia mental’ del final de la tesis (y de todas las circunstancias que la han rodeado), yo diría que él se ha llevado una de las peores partes, porque con él y contra él he descargado mis frustraciones, mis malos rollos, mis estreses, mis paranoias, y todo eso sin que el pobre supiera muy bien dónde se estaba metiendo ni qué era lo que le esperaba... Gracias a todo eso, sin embargo, la tesis se ha acabado en este momento, con esta forma y con estos contenidos. La verdad, no tengo muy



Agradecimientos _____

claro cómo habría sido de no aparecer él en esta última etapa. Pero es que además me está “reeducando”, que me hace mucha falta, a ver si me convierto de nuevo en una persona “normal”, con un poco más de perspectiva que la que se reduce a la burbuja tesística en la que llevo imbuido no sé cuánto tiempo, y eso, aunque a veces no lo parezca, se lo agradezco muchísimo. Sabe lo que siento por él, y espero que eso equilibre un poco el balance entre buenos y malos ratos, porque, sí, claro que lo sabes, te quiero tío pendón. ¿Un té? ...

Y por último, y precisamente por ello MÁS importante, está mi familia. No voy a marear la perdiz con toda nuestra historia vital, pero sí que es cierto que han contribuido, de muchas maneras, a la tesis que ahora ya tiene forma. Por concretar algunas: apoyo económico y, sobretodo, apoyo moral, consejos, juergas, llamadas con un “¡coge el tren y vente ya!”, un medio de transporte durante unos meses (sí, Fetty, sí, el Ibiza, jeje), coñas y más coñas que aportan ánimo cuando a uno le hace falta, viajes por España y por el extranjero, recogidas a las tantas de la mañana, camas donde dormir y un “yo-qué-sé-qué-más-cosas” que ni siquiera puedo recordar. Ahora somos más de los que éramos al principio (¡y dentro de poco aún más!), lo que hace que todo sea mucho más divertido. Gracias por TODO a mi madre (María), mi padre (Luis), mi hermana María, mi hermana Bea, mi hermano Toño, mi abuela Alicia y mi sobrino Nacho, que son los que comparten genes conmigo (es que uno está sesgado, jeje), y también a Piliña, Manuel, Eva y Luisa, ¡ah!, e ó Ibán ☺ . Quérovos moito.

Y para no perdernos demasiado, y a modo de curiosidad, a continuación enumero las famosas etapas y mudanzas de las que he estado hablando todo el rato:

- Septiembre 2001 – Diciembre 2001Sevilla
- Diciembre 2001 – Julio 2002.....Alicante (San Vicente del Raspeig y Alicante capital)
- Agosto 2002 – Diciembre 2002.....Sevilla
- Enero 2003 – Septiembre 2003Alicante (capital)
- Septiembre 2003 – Diciembre 2003.....Dorset (Inglaterra)

Agradecimientos

- Enero 2004 – Junio 2005Alicante (capital, playa de San Juan y San Vicente del Raspeig)
- Junio 2005 – Diciembre 2005Viena (Austria)
- Enero 2006 – Enero 2007Alicante (San Vicente del Raspeig)
- Enero 2007 – ActualidadSevilla

Vamos, que no he parao...