

USO DE TÉCNICAS MOLECULARES Y ANALISIS DISCRIMINANTES PARA DIFERENCIAR MEDIANTE BIOMETRÍA DOS SUBESPECIES DE ESCRIBANO PALUSTRE *EMBERIZA SCHOENICLUS*

Eduardo J. BELDA*¹, Laura KVIST**, Juan S. MONRÓS***, Suvi PONNIKAS**
y Carlos TORRALVO****

SUMMARY.—*Use of molecular techniques and discriminant analyses to determine with biometric measurements two subspecies of reed bunting *Emberiza schoeniclus*.*

Aims: To compare the biometry of the endangered western iberian reed bunting *Emberiza schoeniclus witherbyi* with the wintering populations of the nominal subspecies *E. schoeniclus schoeniclus*, using a sample of individuals previously identified by molecular techniques, and to obtain a discriminant function to easily determine the subspecies of birds in hand.

Location: Birds were captured in different populations in Spain, Portugal and Finland.

Methods: Blood, feathers or tissues samples from 99 individuals were used for extracting DNA to taxonomically classified two subspecies of reed buntings. Biometric measures were compared between *E. s. schoeniclus* and *E. s. witherbyi* subspecies for the 43 individuals for which subspecies assignation was known by molecular analysis. Discriminant analyses were used to identify the best traits for discriminating between the two subspecies. Biometric measurements from another different 105 reed buntings were externally used to validate the discriminant function.

Results: The molecular analysis classified correctly most of the individuals to the subspecies where they were initially assigned. There were significant differences in bill length, bill width, bill height and tarsus between the two subspecies studied. The best discriminant function included only bill height as the predictor variable and correctly classified 95 % of individuals included in the molecular subspecies sample, and 99 % of individuals from the external sample. A bird will be classified as *Emberiza schoeniclus witherbyi* if bill height is > 5.9 mm and as *Emberiza schoeniclus schoeniclus* if bill height is < 5.9 mm.

Conclusions: The discriminate function obtained using measurements of individuals previously assigned to each subspecies by molecular analyses showed that it is possible to distinguish between the two subspecies with high accuracy using only bill height as a simple biometric measurement. From an evolutionary point of view, this difference in bill shape and size may be explained by an adaptation to different feeding habits.

* Instituto de Investigación para la Gestión Integrada de Zonas Costeras-IGIC.
Universidad Politécnica de Valencia. C/Paranimf nº 1, Gandía (Valencia), E-46730, Spain.

** Department of Biology. University of Oulu. Oulu, FIN-90014, Finland.

*** Instituto “Cavanilles” de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Universidad de Valencia.
Apartado Oficial 2085, E-46071, Valencia, Spain.

**** Avd. Don Juan de Austria Blq. D, 2º C, E-11380, Tarifa (Cádiz), Spain.

¹ Corresponding author: ebelda@dca.upv.es

Key words: biometry, discriminant function analysis, *Emberiza schoeniclus schoeniclus*, *E. schoeniclus witherbyi*, microsateélites.

RESUMEN.—*Uso de técnicas moleculares y análisis discriminantes para diferenciar mediante biometría dos subespecies de escribano palustre* *Emberiza schoeniclus*.

Objetivos: Comparar la biometría del escribano palustre iberoriental *Emberiza schoeniclus witherbyi*, con la población invernante de la subespecie nominal de escribano palustre *E. schoeniclus schoeniclus*, usando una muestra de individuos previamente identificados mediante técnicas moleculares, y obtener una función discriminante que nos permita determinar la subespecie mediante medidas biométricas.

Localidad: Las aves se capturaron en diversas localidades de Finlandia, Portugal y España.

Métodos: Se tomaron muestras de sangre, tejidos o plumas para los análisis moleculares de un total de 99 escribanos palustres. Los análisis moleculares se realizaron usando microsateélites. Se comparó la biometría para los individuos cuya subespecie se confirmó mediante técnicas moleculares (n = 43). Para identificar qué caracteres morfológicos permitirían diferenciar entre las subespecies *schoeniclus* y *witherbyi* se realizó un análisis discriminante. Éste se validó empleando datos biométricos de otros 105 escribanos palustres.

Resultados: El análisis de asignación situó correctamente todos los individuos en la subespecie en la que habían sido asignados inicialmente. Encontramos diferencias significativas en la altura del pico, longitud del pico, anchura del pico y tarso entre *E. s. witherbyi* y *E. s. schoeniclus*. La función discriminante incluyó sólo la altura del pico y clasificó correctamente el 95 % de las muestras incluidas en el análisis y el 99 % del resto de las muestras. Un escribano capturado en España será un *E. s. witherbyi* si la altura de pico es > 5.9 mm.

Conclusiones: Existe un claro dimorfismo en el tamaño del pico entre las dos subespecies de escribano palustre estudiadas, siendo la iberoriental la que presenta un pico de mayor tamaño. Desde un punto de vista evolutivo, esta diferencia en la forma y tamaño del pico puede indicar diferentes adaptaciones en los hábitos alimenticios. El análisis discriminante basado en individuos en los que previamente se confirmó su asignación a una de las dos subespecies demostró que es posible diferenciar entre ambas subespecies con gran exactitud usando simples medidas biométricas. Estos resultados ayudarán al estudio de la biología del escribano palustre iberoriental, subespecie cuyas poblaciones en España están catalogadas como “en peligro”.

Palabras clave: análisis discriminante, biometría, *Emberiza schoeniclus schoeniclus*, *E. schoeniclus witherbyi*, microsateélites.

INTRODUCCIÓN

Actualmente en ornitología se están aplicando técnicas de biología molecular en estudios de aves en los que es necesario diferenciar entre grupos de individuos de una especie en función del sexo, origen geográfico, comportamiento migratorio o subespecie, especialmente cuando las diferencias no son claras (p.e., Griffiths *et al.*, 1998; Balbontín *et al.*, 2001; Bensch *et al.*, 2002; Hobson *et al.*, 2004; Mila *et al.*, 2007; Vögelli *et al.*, 2007). Sin embargo, estas técnicas son caras y requieren recursos de difícil acceso para muchos investigado-

res y ornitólogos en general. Una alternativa sencilla y que da muy buenos resultados es el uso de técnicas multivariantes basadas en rasgos morfológicos, como es el caso del uso de análisis discriminantes (p.e. Svensson, 1996; Pérez-Tris *et al.*, 1999; Copete *et al.*, 1999; Balbontín *et al.*, 2001; Sarasola and Negro, 2004; Figuerola *et al.*, 2006; Hermosell *et al.*, 2007; de la Hera *et al.*, 2007). Esta técnica estadística se usa para construir un modelo predictivo que permita pronosticar el grupo de pertenencia de un caso a partir de las características observadas en una muestra de individuos. El procedimiento genera una función dis-

criminante (D) basada en combinaciones lineales de un grupo de variables independientes (en este caso variables morfológicas) que proporcionan la mejor discriminación posible entre los grupos. Las funciones se generan a partir de una muestra de casos para los que se conoce el grupo de pertenencia; posteriormente, las funciones pueden ser aplicadas a nuevos casos que dispongan de medidas para las variables predictivas pero de los que se desconoce el grupo de pertenencia.

El escribano palustre *Emberiza schoeniclus* está en declive en parte de Europa (Tucker and Heath, 1994). En España sólo crían dos subespecies de las cerca de 30 descritas de escribano palustre (Byers *et al.*, 1995): el escribano palustre iberoccidental *E. schoeniclus lusitana* (Steinbacher, 1930; en el noroeste peninsular) y el escribano palustre iberoriental *E. schoeniclus witherbyi* (Von Jordans, 1923; este peninsular y Baleares). Los efectivos poblacionales de escribano palustre experimentan un incremento en invierno debido a la llegada del contingente europeo que pertenece a la subespecie nominal *E. schoeniclus schoeniclus* (Linnaeus, 1758). El escribano palustre iberoriental se encuentra distribuido en unos pocos humedales en España, sur de Francia (Poulin *et al.*, 2002), y al menos en una localidad en el norte de Marruecos (Rbidi, H. obs. pers.). En España su población estimada es de tan sólo 254 - 360 parejas (Atienza, 2006). Debido a estas causas, el escribano palustre iberoriental está catalogado como "en peligro" en España conforme a los criterios de la UICN (Madroño *et al.*, 2004; Atienza, 2006). Sin embargo, y pese a su precario estado de conservación, son muy escasos los trabajos publicados sobre esta subespecie (véase Isenmann, 1990; Copete *et al.*, 1999; Atienza, 2006).

Para poder realizar planes de recuperación y conservación de esta subespecie es necesario contar con información detallada de aspectos como el uso del hábitat, movimientos, o coexistencia de las dos subespecies durante el invierno. Además, hasta la fecha, no se ha en-

contrado una descripción biométrica clara de la subespecie. Tomando como referencia la información actual, se diferencia de la subespecie nominal, con la que *a priori* coexiste en invierno, por ser más grande, de coloración más oscura y pico de mayor tamaño (Cramp and Perrins, 1994; Byers *et al.*, 1995). Pero esas diferencias no están claras. Así, mientras que Byers *et al.* (1995) indican longitud alar de 79 - 82 mm, Copete *et al.* (1999) indican una longitud media de 74.5 mm. Además, no existe información sobre las medidas del tamaño del pico, indicándose únicamente que son similares a la de la subespecie *intermedia* (Degland, 1849) (longitud del pico 12 - 14.5 mm; altura 6.9 - 7.8 mm; Byers *et al.*, 1995).

En este artículo, se analiza la biometría del escribano palustre iberoriental. Además, se ha comprobado si es posible diferenciarla de la subespecie nominal a partir de datos biométricos mediante el uso de funciones discriminantes. Para ello se han utilizado datos de escribanos cuya pertenencia a una u otra subespecie fueron confirmadas mediante técnicas moleculares, y validamos posteriormente la función sobre otras muestras no usadas para desarrollar la función discriminante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Biometría

Se capturaron un total de 148 aves de la subespecie *witherbyi* y *schoeniclus* en diferentes localidades peninsulares desde el invierno de 2005 hasta la verano de 2007 en las que se pudo obtener medidas biométricas completas. De estos, 103 individuos se capturaron en invierno en el Parque Natural de la Marjal de Pego-Oliva (Alicante - Valencia) y 45 en época de cría en el Parque Nacional de la Tablas de Daimiel (Ciudad Real), Lagunas de Villafraanca de los Caballeros y Quero (Toledo), Parque Natural de la Marjal de Pego-Oliva y Parque Natural de S'Albufera (Mallorca). Dado

TABLA 1

Lugares de muestreo y número de muestras (N) por localidades y subespecies usadas en los análisis moleculares.

[*Sampling sites and sizes (N) of the reed buntings used in molecular analyses.*]

Subespecie	N	Year	Wetland	Locality	Period	Region
<i>schoeniclus</i>	15	2002-2005		Oulu	Museo	Northern Finland
<i>schoeniclus</i>	23	2005-2006	Marjal Pego-Oliva	Oliva	Primavera-verano	Valencia, Spain
<i>witherbyi</i>	11	1995-2006	Delta del Ebro		Otoño	Cataluña, Spain
<i>witherbyi</i>	11	2002-2007	Lagunas de Villafranca de los Caballeros	Villafranca de los Caballeros	Primavera-verano	Castilla-La Mancha, Spain
<i>witherbyi</i>	19	2006-2007	Tablas Daimiel	Daimiel	Primavera-verano	Castilla-La Mancha, Spain
<i>witherbyi</i>	3	2007	El Masegar	Quero	Primavera-verano	Castilla-La Mancha, Spain
<i>witherbyi</i>	6	2006-2007	Marjal Pego-Oliva	Oliva	Primavera-verano	Valencia, Spain
<i>witherbyi</i>	8	2006-2007	S'Albufera	Mallorca	Primavera-verano	Baleares, Spain

que la subespecie nominal no nidifica en nuestro país, todos los individuos capturados en época de cría se asignaron inicialmente a la subespecie *witherbyi*, y el resto de ellos a la subespecie *schoeniclus*. De cada ave capturada se tomaron medidas de longitud alar según la cuerda máxima alar (A), longitud de la octava primaria (P8), longitud del tarso según el método del tarso doblado (T; Svensson, 1996), la longitud del pico-cráneo (Pc), altura (Palt) y anchura del pico (Pan) medidas a la altura de las narinas. La longitud del ala y P8 se midió con reglas de precisión de 0,5 mm, y la del tarso, Pc, Palt y Pan se obtuvo con un calibrador digital con una precisión de 0,01 mm. Las medidas fueron realizadas por los autores. Aunque en la toma de medidas biométricas han intervenido diversas personas, esto no debe de suponer un problema ya que está demostrado que estas medidas morfométricas muestran una variabilidad baja cuando se toman por diferentes autores (véase Møller *et al.*, 2006). Este aspecto también es muy útil de cara a la posible utilización y generalización de los resultados de la función discriminante.

Análisis genéticos

Para la obtención de ADN se obtuvieron muestras de sangre, plumas o tejidos (en el caso de especímenes de museo) de 96 individuos. En la tabla 1 se detalla la distribución de las muestras genéticas obtenidas de cada localidad. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena braquial y se conservó en etanol 70 %. Las muestras de plumas consistieron en un par de rectrices, normalmente el par tercero o cuarto, guardadas en sobres de papel. Del total de individuos caracterizados genéticamente, sólo se pudo utilizar en el análisis discriminante 20 *E. s. schoeniclus* y 23 *E. s. witherbyi*, de los cuales se dispusieron medidas biométricas completas. Los ejemplares provenientes de Finlandia se utilizaron como "control" para determinar qué individuos pertenecían a la subespecie nominal.

El ADN se extrajo usando el método estándar de fenol-cloroformo (sangre) o el método de lisis (Kvist *et al.*, 2003). Seis loci microsátelites, *Esc3*, *Esc4*, *Esc6* (Hanotte *et al.*, 1994), *Hru6* (Primmer *et al.*, 1995), *Pdo5* (Grif-

fith *et al.*, 1999) y *Poc6* (Bench *et al.*, 1997) fueron amplificados con el siguiente protocolo: un periodo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, fase de hibridación a temperaturas que oscilaron entre 45 - 53 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 30 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. La temperatura usada para la hibridación fue de 46 °C para *Esc6*, 48 °C en el caso de *Pdo5*, 53 °C para *Poc6*, y 45 °C para *Hru6*. Para *Esc3* y *Esc4* se usó un perfil de disminución de 50 °C a 45 °C. Se usaron iniciadores marcados fluorescentemente (“*dye primers*” NED, VIC, FAM y PET de Applied Biosystems). Los alelos microsatélites amplificados fueron analizados con ABI 3730 y los resultados se analizaron con el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems). El análisis de asignación se realizó usando el test implementado en el programa Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), que estima la probabilidad de asignación basándose en la metodología descrita por Patneau *et al.* (1997) and Waser and Strobeck (1998).

Análisis estadísticos

Una vez identificados y asignados los ejemplares a cada una de las dos subespecies por procedimientos moleculares, se aplicó un ANOVA de una vía para detectar diferencias biométricas entre las dos subespecies de las que se dispone de datos biométricos (*schoeniclus* y *witherbyi*). Posteriormente, mediante un análisis discriminante, paso a paso, se determinó cuáles eran las mejores medidas biométricas que podían identificar a los individuos de cada una de las subespecies. Para la validación del modelo, se utilizó el método de clasificación “dejando un caso fuera” (jackknife). Además, también se validó el modelo con dos grupos de individuos que no habían participado en su obtención, al no haberse determinado su subespecie por análisis moleculares. Primero con todos

los individuos capturados en época de cría en las lagunas del este peninsular y clasificados como escribano palustre iberoriental y, segundo, con todos los individuos capturados en invierno en el Parque Natural de la Marjal de Pego-Oliva y clasificados como escribano palustre de la subespecie nominal. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS (versión 15.0, SPSS Inc., Chicago).

RESULTADOS

El test de asignación emplazó a los individuos de forma correcta en la población de origen (aquella en la cual fueron muestreados), permitiendo establecer fácilmente dos grupos que se corresponderían con las subespecies *witherbyi* y *schoeniclus*.

Para los individuos de *E. s. schoeniclus* y *E. s. witherbyi* de los que se disponían datos biométricos y se confirmó su pertenencia a una de las subespecies mediante métodos moleculares, se encontraron diferencias significativas en cuatro medidas morfométricas (longitud pico-cráneo, altura del pico, anchura del pico y tarso) de los seis parámetros utilizados para separar las dos subespecies de escribano palustre (tabla 2). En todos los casos, dichos caracteres morfológicos eran mayores para *E. s. witherbyi*. El análisis discriminante paso a paso seleccionó la altura del pico (Palt) como el mejor carácter morfológico para distinguir las dos subespecies (correlación canónica 0.852). Se obtuvo la siguiente función discriminante (D) para la clasificación de los individuos:

$$D = -16.988 + 2.901 (\text{Palt})$$

donde Palt es la altura del pico. De esta forma, sería un *schoeniclus* si $D < 0$, y *witherbyi* si $D > 0$. Utilizando el método de validación “dejando un caso fuera” esta función discriminante clasificó correctamente el 95.3 % de los individuos cuya subespecie era conocida mediante análisis moleculares.

TABLA 2

Valores medios (mm \pm desviación típica, $n_{Esw} = 23$, $n_{Ess} = 20$) de cada una de las variables biométricas obtenidas para los individuos de cada subespecie (Esw = *E. schoeniclus witherbyi*; Ess = *E. schoeniclus schoeniclus*). Se muestran las diferencias entre cada subespecie (ANOVA de una vía) y el valor de la Lambda de Wilks. Pc = longitud del Pico-Craneo, Palt = altura del pico, Pan = anchura del pico, A = longitud alar, P8 = longitud de la octava primaria, T = longitud del tarso. Se presentan también los valores encontrados para el *E. s. witherbyi* y para poblaciones invernales en España de *E. schoeniclus schoeniclus* en la literatura.

[Mean values (mm \pm standard deviation, $n_{Esw} = 23$, $n_{Ess} = 20$) of the different morphological characters measured in each subspecies (Esw = *E. schoeniclus witherbyi*; Ess = *E. schoeniclus schoeniclus*). Pc = bill length, Palt = bill height, Pan = bill width, A = will length; P8 = length of the third primary feather; T = Tarsus.]

Variable	subespecie	Media	d.t.	CV	Lambda de Wilks	F _{1,41}	P	Byers et al. 1995	Copete et al. 1999
Pc	Esw	13.42	0.89	6.6	0.742	14.28	0.001	12 - 14.5	
	Ess	12.30	1.06	8.6					
	Total	12.90	1.12						
Palt	Esw	6.37	0.37	5.8	0.275	108.14	< 0.001	6.9 - 7.8	
	Ess	5.27	0.31	5.9					
	Total	5.86	0.65						
Pan	Esw	5.80	0.53	9.1	0.690	18.39	< 0.001		
	Ess	5.23	0.29	9.5					
	Total	5.54	0.51						
A	Esw	76.43	2.74	3.6	0.996	0.15	0.704	79 - 82	74.5 \pm 2.6
	Ess	76.10	3.00	3.9					76.07 \pm 2.8
	Total	76.28	2.84						
P8	Esw	58.74	2.31	3.9	0.999	0.04	0.849		55.56 \pm 2.4
	Ess	58.87	2.34	4.0					58.33 \pm 2.3
	Total	58.80	2.29						
T	Esw	20.46	0.63	3.1	0.815	9.29	0.004		
	Ess	19.87	0.62	3.1					
	Total	20.19	0.69						

Posteriormente también se probó la función discriminante con todos los escribanos capturados en época de cría, y el 100 % de los 22 individuos fueron clasificados como pertenecientes a la subespecie *witherbyi*. Cuando se utilizó la función con los escribanos capturados en invierno, el 98.8 % de los individuos fueron clasificados como de la subespecie *schoenichus*.

DISCUSIÓN

La función discriminante obtenida a partir de variables morfológicas de individuos de escribano palustre identificados a nivel de subespecie (i.e., *witherbyi* o *schoenichus*) mediante técnicas moleculares, puede ser utilizada de forma fiable para la identificación de estas dos subespecies. En función de los resultados, un individuo pertenecerá a la subespecie *witherbyi* si su pico mide más de 5.9 mm de altura. Esta función fue validada con datos externos resultando en una elevada precisión en la determinación de ambas subespecies. En concreto, el 100 % de los individuos pertenecientes a la subespecie *witherbyi* y el 99 % de los individuos pertenecientes a la subespecie *schoenichus* fueron correctamente clasificados. Además, estos resultados confirman que es fiable determinar la subespecie en los individuos capturados durante la época de reproducción. Respecto a los ejemplares capturados en otoño e invierno, es aconsejable emplear la función discriminante descrita en este trabajo para confirmar la pertenencia a una u otra subespecie.

En el campo de la ecología animal, el uso de análisis discriminantes en combinación con el uso de técnicas moleculares ha demostrado ser muy útil en aquellos estudios en los que se hace necesario la distinción entre grupos, por ejemplo en la diferenciación entre sexos en especies con dimorfismo sexual (Balbontín *et al.*, 2001; Sarasola and Negro 2004; Figuerola *et al.*, 2006; Hermosell *et al.*, 2007;

Vogeli *et al.*, 2007), o como en este caso para la clasificación taxonómica.

Hasta donde se sabe, los resultados del presente trabajo pueden considerarse como la descripción de la biometría del escribano palustre iberoriental más detallada que existe. Esto es importante, ya que se trata de una subespecie casi endémica de la península Ibérica, con un área de distribución muy reducida y fragmentada, y que en España está considerada “en peligro de extinción”. Los resultados señalan diferencias con respecto a anteriores trabajos. Byers *et al.* (1995) realizan una revisión del género *Emberiza* y señalan la presencia de cerca de 30 subespecies de *Emberiza schoenichus*, describiendo la subespecie *witherbyi* como un escribano palustre de tamaño grande y pico grande. Las medidas de longitud de ala que dan para esta subespecie son de 79 - 82 mm para los machos. No dan medidas de pico, pero señalan que es similar a la subespecie *intermedia* cuyas medidas son de 6.9 - 7.8 mm de altura de pico. En contraste, nuestros resultados sugieren que tanto la longitud alar como la altura de pico de esta especie es algo menor (véase tabla 2), aunque el hecho de que el estudio de Byers *et al.* (1995) esté basado en pieles de museos puede explicar esta diferencia. El rango de medidas obtenidas en este estudio para la altura de pico oscila entre 5.6 - 7.2 mm, es decir, ligeramente menor que las medidas sugeridas por Byers *et al.* (1995).

Copete *et al.* (1999) señalan que el escribano palustre iberoriental presenta un tamaño de ala menor que la subespecie nominal invernante en el delta del Ebro. Los resultados obtenidos en el presente estudio difieren de esta conclusión, no encontrando diferencias en la longitud alar entre subespecies, siendo las medidas obtenidas similares a las medidas de la población invernante en el delta del Ebro considerada como perteneciente a la subespecie *schoenichus* (véase tabla 2). Hemos de tener en cuenta que en este estudio se analizan datos de diferentes poblaciones de *witherbyi*. Además, en el presente caso, la asignación a cada subes-

pecie en el análisis discriminante ha sido realizada y confirmada por técnicas moleculares. Este no es el caso del trabajo de Copete *et al.* (1999), en el que se basan sólo en caracteres morfológicos y fenológicos. Esto puede dar lugar a equivocaciones en la determinación de subespecies y explicar las diferencias entre su estudio y el presente trabajo.

Desde un punto de vista evolutivo, las diferencias en la forma y tamaño del pico encontradas entre estas dos subespecies posiblemente indican diferentes adaptaciones en los hábitos alimenticios (p.e., Boag and Grant, 1984; Carrascal *et al.*, 1990; Grant and Grant, 1995). Incluso las diferencias en el tamaño de tarso pueden asociarse también a una adaptación relacionada con la búsqueda del alimento (Moreno and Carrascal, 1993). Isenmann (1990) sugiere que el pico del escribano palustre iberoriental puede ser una adaptación a un tipo de alimentación particular, extrayendo larvas de insectos del interior del carrizo, el cual lo rompe gracias al pico que posee.

El escribano palustre está entre las diez especies de aves más anilladas en España para el periodo 1973 - 2005 (Frias *et al.*, 2006), aunque en muy contados casos se ha determinado la subespecie. Por tanto, la función discriminante presentada en este estudio resultará muy útil desde el punto de vista de gestión ya que puede permitir la identificación clara de estas dos subespecies a partir de una medida directa y fácil de obtener. Esta medida vendría apoyada por la época de captura del individuo. Se puede afirmar que todos los ejemplares capturados en primavera-verano en el sudeste de la península Ibérica pertenecen a la subespecie *witherbyi*, y los capturados en el noroeste de la Península a *lusitanica*, lo que permitiría aprovechar información recogida en los datos de anillamiento, incluso si estos no han reflejado la subespecie. Respecto a la determinación de la subespecie en otoño - invierno, sólo basándose en la época de captura puede conducir a errores, ya que aunque mayoritariamente serán *schoeniclus*, existe la posibilidad de

error, aunque esta sea muy pequeña, y en este caso es cuando el uso de la función discriminante descrita en este trabajo será más útil. Esta circunstancia es especialmente interesante porque el escribano palustre iberoriental es una subespecie considerada “en peligro de extinción”, de la que se sabe muy poco sobre su biología. Por tanto, este trabajo es una contribución a facilitar el estudio y gestión de esta especie amenazada.

AGRADECIMIENTOS.—Queremos agradecer a la dirección del Parque Nacional de la Tablas de Daimiel, Parque Natural Marjal Pego-Oliva, Parque Natural del delta del Ebro, Parque Natural S'Albufera de Mallorca, Servicio de Conservación de la Diversidad (Gobierno de Navarra), Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Rural (Castilla - La Mancha) y Reserva Natural d'Utxesa por las autorizaciones para trabajar en las diferentes áreas. También agradecemos a Nacho Encabo, Marcial Marín, Pepe Greño, Pablo Vera, Alex Rodríguez (alias Ángel), Vicente Urios, David Bigas, Pere Vicens, Manolo Suárez, José L. Martínez, Maties Rebassa, José Luis Hernández, José Manuel Hernández y Pascual Alcázar su ayuda en la obtención de datos. Emilio Barba revisó una primera versión del manuscrito y nos aportó valiosas sugerencias y comentarios. Este trabajo ha sido financiado y es una contribución del proyecto CGL2005-02041/BOS del Ministerio de Educación y Ciencia. Este proyecto esta cofinanciado con fondos FEDER.

BIBLIOGRAFÍA

- ATIENZA, J. C. 2006. *El Escribano Palustre en España: I Censo Nacional 2005*. SEO/BirdLife. Madrid.
- BALBONTIN, J., FERRER, M., y CASADO, E. 2001. Sex determination in Booted Eagles (*Hieraaetus pennatus*) using molecular procedures and discriminant function analysis. *Journal of Raptor Research*, 35: 20-23.
- BENSCH, S. HELBI, A. J., SALOMON, M. y SEIBOLD, I. 2002. Amplified fragment length polymorphism

- analysis identifies hybrids between two subspecies of warblers. *Molecular Ecology*, 11: 473-481.
- BENSCH, S., PRICE, T. y KOHN, J. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci in a *Phylloscopus* warbler. *Molecular Ecology*, 6: 91-92.
- BYERS, C., OLSSON, U. y CURSON, I. 1995. *Buntings and Sparrows: a Guide to the Buntings and North American Sparrows*. Pica Press. Mountfield.
- BOAG, P. T. y GRANT, P. R. 1984. The classical case of character release: Darwin's finches (Geospiza) on Isla Daphne Major, Galápagos. *Biological Journal of the Linnean Society*, 22: 243-287.
- CARRASCAL, L. M., MORENO, E. y TELLERÍA, J. L. 1990. Ecomorphological relationships in a group of insectivorous birds of temperate forests in winter. *Holarctic Ecology*, 13: 105-111.
- COPETE, J. L., MARINÉ, R., BIGAS, D. y MARTÍNEZ-VILALTA, A. 1999. Differences in wing shape between sedentary and migratory Reed Buntings *Emberiza schoeniclus*. *Bird Study*, 46: 100-103.
- CRAMP, S. y PERRINS, C. M. (Eds.). 1994. *The Birds of the Western Palearctic, Vol. IX*. Oxford University Press. Oxford.
- DE LA HERA, I., PÉREZ-TRIS, J. y TELLERÍA, J. L. 2007. Testing the validity of discriminant function analyses based on bird morphology: the case of migratory and sedentary blackcaps *Sylvia atricapilla* wintering in southern Iberia. *Ardeola*, 54: 81-91.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. y SCHNEIDER S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- FIGUEROLA, J. GARCÍA, L., GREEN, A. J., IBAÑEZ, F., MAÑEZ, M., DEL VALLE, J. L., GARRIDO, H., ARROYO, J. L. y RODRÍGUEZ, R. 2006. Sex determination in glossy ibis chicks based on morphological characters. *Ardeola*, 53: 229-235.
- FRÍAS, O., ESCUDERO, E. y SERRADILLA, A. I. 2006. Informe de actividades de la central de anillamiento de aves Icona. Año 2005. *Ecología*, 20: 259-342.
- GRANT, P. R. y GRANT, B. R. 1995. Predicting microevolutionary responses to directional selection on heritable variation. *Evolution*, 49: 241-251.
- GRIFFITHS, S. C., STEWART, I. R. K., DAWSON, D. A., OWENS, I. P. F. y BURKE, T. 1999. Contrasting levels of extra-pair paternity in mainland and island populations of the house sparrow (*Passer domesticus*): is there an 'island effect'? *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 303-316.
- GRIFFITHS, R., DOUBLE, M. C., ORR, K. y DAWSON, R. J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7: 1071-1075.
- HANOTTE, O., ZANON, C., PUGH, A., GREIG, C., DIXON, A. y BURKE, T. 1994. Isolation and characterization of microsatellite loci in a passerine bird: the reed bunting *Emberiza schoeniclus*. *Molecular Ecology*, 3: 529-530.
- HERMOSELL, I. G., BALBONTÍN, J., MARZAL, A., REVIRIEGO, M. y DE LOPE, F. 2007. Sex determination in barn swallows *Hirundo rustica* by means of discriminant analysis in two European populations. *Ardeola*, 54: 93-100.
- HOBSON, K.A., BOWEN, G. J., WASSENAAR, L. I., FERRAND, Y. y LORMEE, H. 2004. Using stable hydrogen and oxygen isotope measurements of feathers to infer geographical origin of migrating European birds. *Oecologia*, 141: 477-488.
- ISENMANN, P. 1990. Comportement alimentaire original chez le Bruant des roseaux, *Emberiza schoeniclus whitherbyi*, sur l'île de Majorque. *Nos Oiseaux*, 419: 308.
- KVIST, L., BROGGI, J., ILLERA, J. C. y KOIVULA, K. 2005. Colonisation and diversification of the blue tits (*Parus caeruleus teneriffae*-group) in the Canary Islands. *Molecular, Phylogenetics and Evolution*, 34: 501-511.
- KVIST, L., MARTENS, J., HIGUCHI, H., NAZARENKO, A. A., VALCHUK, O. P. y ORELL, M. 2003. Evolution and genetic structure of the great tit (*Parus major*) complex *Proceedings of the Royal Society Series B Biological Sciences*, 270: 1447-1454.
- MADROÑO, A., GONZÁLEZ, C. y ATIENZA, J. C. (Eds.) 2004. *Libro Rojo de las Aves de España*. Dirección General para la Biodiversidad-SEO/BirdLife. Madrid.
- MILÁ, B., MCCORMACK, J. E., CASTAÑEDA, G., WAYNE, R. K. y SMITH, T. B. 2007. Recent post-glacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus *Junco*. *Proceedings of the Royal Society Series B Biological Sciences*, 274: 2653-2660.
- MORENO, E. y CARRASCAL, L. M. 1993. Leg morphology and feeding postures in four *Parus* species: an ecomorphological approach. *Ecology*, 74: 2037-2044.

- MØLLER, A. P., CHABI, Y., CUERVO, J. J., DE LOPE, F., KILPIMAA, J., KOSE, M., MATYJASIAK, P., PAP, P. L., SAINO, N., SAKRAOUI, R., SCHIFFERLI, L. y HIRSCHHEYDT, J. 2006. An analysis of continent-wide patterns of sexual selection in a Passerine bird. *Evolution*, 60: 856-868.
- PAETKAU, D., WAITS, L. P., CLARKSON, P. L., CRAIGHEAD, L. y STROBECK, C. 1997. An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (*Ursidae*) populations. *Genetics*, 147: 1943-1957.
- PÉREZ-TRIS, J., CARBONELL, R. y TELLERÍA, J. L. 1999. A method for differentiating between sedentary and migratory blackcaps *Sylvia atricapilla* in wintering areas of southern Iberia. *Bird Study*, 46: 299-304.
- POULIN B., LEFEBVRE G. y MAUCHAMP, A. 2002. Habitat requirements of passerines and reedbed management in southern France. *Biological Conservation*, 107: 315-325.
- PRIMMER, C. R., MØLLER, A. P. y ELLEGREN, H. 1995. Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molecular Ecology*, 4: 493-498.
- SARASOLA, J. H. y NEGRO, J. J. 2004. Gender determination in the Swainson's Hawk (*Buteo swainsoni*) using molecular procedures and discriminant function analysis. *Journal of Raptor Research*, 38: 357-361.
- SVENSSON, L. 1996. *Guía para la identificación de los passeriformes europeos*. SEO/BirdLife. Madrid.
- TUCKER G. M. y HEATH M. F. (Eds.). 1994. Birds in Europe-their conservation status. Conservation Series 3. BirdLife International. Cambridge.
- VÖGELLI, M., SERRANO, D., TELLA, J. L., MÉNDEZ, M. y GODOY, J. A. 2007. Sex determination of Dupont's lark *Chersophilus duponti* using molecular sexing and discriminant functions. *Ardeola*, 54: 69-79.
- WASER, P. M. y STROBECK, C. 1998. Genetic signatures of interpopulation dispersal. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 43-44.

[Recibido: 23-10-2008]

[Aceptado: 13-05-2009]

Juan S. Monrós es profesor titular de Ecología e investigador permanente del Instituto "Cavanilles" de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universidad de Valencia. Su trabajo se centra, principalmente y de forma general, en cuestiones de ecología de poblaciones de paseriformes. **Laura Kvist** es docente en Ecología y Evolución en la Universidad de Oulu, Finlandia, y **Suvi Ponnikas** es un estudiante de doctorado que actualmente centra sus actividades en estudios de genética poblacional, principalmente en estudios de filogeografía y conservación. **Carlos Torralvo** dirige su actividad científica al anillamiento y seguimiento de aves. Finalmente, **Eduardo J. Belda** trabaja en temas de ecología evolutiva y en estudios de conservación y gestión de aves, en particular de palustres y marinas.