

DISTRIBUCIÓN, RIQUEZA Y PREVALENCIA DE PARÁSITOS HAEMOSPORIDIOS DE AVES EN UN GRADIENTE LATITUDINAL Y ALTITUDINAL DE LA RED DE PARQUES NACIONALES

JUAN CARLOS ILLERA^{1*},
EDUARDO GONZÁLEZ-MELIÁN¹ & GUILLERMO LÓPEZ-ZAMORA²

RESUMEN

En un contexto de creciente preocupación por el efecto de las enfermedades infecciosas emergentes sobre las poblaciones silvestres de animales, planteamos el presente proyecto con los siguientes objetivos: 1) Detectar y cuantificar el grado de afección que padecen las poblaciones de aves silvestres en parásitos haemosporidios y viruela aviar; 2) Determinar los factores ecológicos (bióticos y abióticos) que determinarían la prevalencia y riqueza de estos parásitos en un gradiente altitudinal y en tres parques nacionales con marcadas diferencias latitudinales; y 3) proponer un método sencillo y eficaz de seguimiento a largo plazo de ambos grupos de parásitos en las poblaciones de aves de la Red de Parques Nacionales. El estudio lo desarrollamos en los parques nacionales de Picos de Europa, Sierra Nevada y la Caldera de Taburiente. Durante dos años de estudio (2012-2013) capturamos un total de 2.435 aves en 70 localidades dispuestas en los tres parques nacionales estudiados. Solo encontramos un caso de viruela aviar localizado en la Caldera de Taburiente. Los valores de prevalencia encontrados en el parque nacional canario estudiado fueron muy bajas (<5%), mientras que los valores detectados en Sierra Nevada fueron los más altos (>50%), finalmente en Picos de Europa no superó el 25% (con valores muy bajos en zonas de alta montaña). Similares resultados fueron los encontrados a nivel de riqueza de haemosporidios. El género más común fue *Leucocytozoon*, seguido por *Haemoproteus* y *Plasmodium*. Los factores que determinaron los valores de prevalencia y riqueza difirieron según el género. Así *Plasmodium* apareció ligado a medios abiertos de zonas bajas, *Haemoproteus* a zonas boscosas sin limitaciones altitudinales y *Leucocytozoon*, en un hábitat intermedio aunque su mayor restricción estuvo relacionada con el régimen pluviométrico. Con el presente proyecto hemos confirmado que no todos los parásitos responden igual a los condicionantes climáticos, de hábitat y de uso del territorio, y estas características en su conjunto deberían incorporarse a futuras predicciones de cambio global que se pretendan proyectar en el tiempo.

Palabras clave: Cambio climático, enfermedades infecciosas emergentes, interacción huésped-parásito, marcadores moleculares.

¹ Unidad Mixta de Investigación en Biodiversidad (UO-CSIC-PA), Universidad de Oviedo, España.

² Agencia Medio Ambiente & Agua de Andalucía, España

* Autor para correspondencia: Juan Carlos Illera. Unidad Mixta de Investigación en Biodiversidad, Universidad de Oviedo, Campus de Mieres, Edificio de Investigación, 5ª Planta, C/ Gonzalo Gutiérrez Quirós, s/n, 33600 Mieres, Asturias
Teléfono: 98 5458 132 - E-mail: illerajuan@uniovi.es / jcillera3@hotmail.com

SUMMARY

Nowadays, the national governments and the global scientific community are highly concerned about the negative impact of Emerging Infectious Diseases on wildlife communities. To detect and quantify parasite presence, and finding the appropriate variables determining variation in host susceptibility are critical aspects to understand and predict the evolution of parasite-host interactions. The objectives of this project are: 1) to determine presence, richness and prevalence of haemosporidian parasites and avian pox in birds inhabiting the National Parks of Picos de Europa (Northern Iberian Peninsula), Sierra Nevada (Southern Iberian Peninsula) and La Caldera de Taburiente (La Palma Island, the Canary Islands) in an altitudinal gradient distributed in different latitudes, 2) to provide the appropriate ecological factors explaining the presence, abundance and distribution of vector borne parasites, and 3) to propose an easy protocol to evaluate the health of avian communities inhabiting the National Park's network. During two years 2012-2013 we ringed 2,435 birds across 70 localities. We found only one bird with a lesion compatible with avian pox in La Palma Island. We found an extremely low haemosporidian prevalence (<5%) in La Palma. However, we detected high prevalence values in Sierra Nevada (>50%) and moderate values in Picos de Europa (<25%). We used Partial Least Squares regression to evaluate the relative importance of ecological factors. Climatic and landscape factors were related to prevalence and richness of haemosporidians. Importantly, the three genera of parasites showed different relationships (both in magnitude and direction) to the same ecological factors. *Plasmodium* is a genus related with open and low habitats, *Haemoproteus* is a forest genus without altitudinal limitation and *Leucocytozoon* prefers intermediate habitats being limited by rainfall.

Key words: Climatic change, Emerging Infectious Diseases, Host-parasite interaction, PCR.

INTRODUCCIÓN

El hombre lleva milenios manejando y modificando el entorno donde vive. El resultado de este proceso es una transformación del medio natural que se hace particularmente intenso a partir del nacimiento de las sociedades organizadas y sedentarias, desde donde se planifica, ejecuta y perfecciona de manera deliberada tal manejo (DIAMOND 2006). Gran parte del impacto provocado por las acciones humanas sobre los ecosistemas ha sido abordado en relación a los efectos que acarrea la destrucción o alteración del hábitat, o la introducción de especies exóticas (GROOM *et al.* 2005; PRIMACK 2009). Sin embargo, un elemento que solo recientemente ha sido objeto de honda preocupación es el problema de las enfermedades infecciosas emergentes (EIE), en especial por las posibles consecuencias negativas que puede ocasionar sobre las poblaciones humanas (ej. DAZAK *et al.* 2000; WEBSTER & WALKER 2003; SAÉZ *et al.* 2014). No obstante, los efectos de las EIE también pueden provocar grandes mortalida-

des sobre las poblaciones silvestres de animales (ej. LIPS *et al.* 2006; LADEAU *et al.* 2007; HOF *et al.* 2011). Si bien en medios continentales no se ha constatado la extinción de ninguna especie por efecto de los patógenos, en islas oceánicas, donde las poblaciones autóctonas son especialmente frágiles, sí existen evidencias que sugieren que los parásitos introducidos han sido los principales responsables de la extinción o reducción en el tamaño poblacional de más de 60 especies de aves (ej. VAN RIPER *et al.* 1986; SODHI *et al.* 2007). Esto se explicaría por el pequeño tamaño poblacional, la distribución restringida, la endogamia y la inestabilidad genética de las poblaciones de parásitos circulantes (FRANKHAM 1998; FALLON *et al.* 2004). De hecho, hoy en día existe una creciente inquietud sobre el efecto de las EIE en la conservación de las biotas endémicas insulares, incluidas las Islas Canarias (ILLERA *et al.* 2013). Por otro lado, las montañas son consideradas ejemplos de islas dentro del continente debido a sus especiales características físicas, a las biotas especializadas que allí viven, y al limitado intercambio genético entre poblaciones cercanas. Tales circunstancias

propician que sus comunidades sean tan frágiles y amenazadas como las insulares (NAGY & GRABHERR 2009). Un factor que en las últimas décadas ha irrumpido con gran fuerza, es el provocado por el cambio climático y el efecto negativo que podrían acarrear sobre las poblaciones autóctonas de aves (PEARCE-HIGGINS & GREEN 2014). Actualmente existe una progresiva preocupación por el efecto del calentamiento global del planeta y sus consecuencias sobre las historias vitales de las aves (WINKLER *et al.* 2002). Además, se ha puesto de manifiesto las consecuencias negativas que supondría un aumento de temperatura en los países de zonas templadas, al facilitar la llegada de patógenos hoy restringidas a zonas típicamente tropicales (GARAMSZEGI 2011). Sin embargo, hay todavía muchas interacciones huésped-parásito por comprender adecuadamente en un contexto de cambio climático. Así, sería posible dibujar un escenario en donde se combine la extinción de parásitos especialistas, junto a la expansión de otros patógenos más generalistas con las consecuencias negativas que podría acarrear para los nuevos huéspedes (ROHR *et al.* 2011). El problema, además, no tiene que estar sólo circunscrito a un desplazamiento latitudinal, sino también altitudinal. Así, es razonable predecir que tanto en medios insulares como en continentales de montaña, en donde la distribución de los patógenos estuviera relegada al piso basal, un aumento de las temperaturas podría producir un aumento en el rango de distribución altitudinal de los vectores (ATKINSON *et al.* 2014), ya que la temperatura aparece como un factor limitante para la presencia y abundancia de los invertebrados transmisores de los parásitos (GILIOLI & MARIANI 2011), pero también limita el desarrollo de los propios patógenos (LAPOINTE *et al.* 2010). En este sentido, cada vez hay más estudios señalando que el efecto del cambio climático sobre los organismos se debe a efectos indirectos del clima sobre las interacciones bióticas, incluidas las referidas a las interacciones huésped-parásito, y no tanto a los efectos directos de la variación en las condiciones climáticas (ej. MØLLER 2010), aunque en ocasiones las relaciones causa-efecto son más inferidas que demostradas (OSTFELD 2009; ROHR *et al.* 2011). Una consecuencia de la expansión altitudinal podría significar que poblaciones de aves alpinas, o insulares que estuvieran ocu-

pando hábitats de alta montaña como refugio libre de parásitos, pudieran verse afectadas negativamente en un futuro cercano por la llegada de los vectores (ej. FREED *et al.* 2005).

De entre el amplio espectro de parásitos que afectan a las aves, destacan por su virulencia los responsables de la malaria y la viruela aviar. La malaria aviar es una enfermedad provocada por protozoos del orden Haemosporida incluidos en los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* (PÉREZ-TRIS *et al.* 2005), aunque también se han constatado efectos negativos por la infección del género *Leucocytozoon* perteneciente al mismo Phylum Apicomplexa que los protozoos de la malaria. La presencia del parásito puede provocar un debilitamiento general del individuo, limitando el desarrollo normal de sus actividades habituales incluyendo la alimentación, lo cual puede provocar finalmente su muerte (ATKINSON *et al.* 2000). Sin embargo, no todos los individuos infectados por la malaria terminan muriendo, aunque cuando esto sucede la enfermedad se vuelve crónica. Recientemente, se ha demostrado que en aquellos individuos en donde la enfermedad se vuelve crónica (incluso expresada en bajos niveles), ésta tiene efectos negativos y muy significativos tanto en su esperanza de vida, como en el número y la calidad de la progenie que llegan sacar a lo largo de su vida (KNOWLES *et al.* 2010; ASGHAR *et al.* 2015).

Todas las variantes de viruela aviar se incluyen dentro del género *Avipoxvirus*. Aunque se han identificado hasta tres formas de expresión de la viruela aviar, la forma cutánea es la más frecuente o, al menos, la más fácilmente detectable ya que se desarrollan bultos de diferente tamaño en todas las partes no emplumadas como patas, ojos o pico (ej. SMITS *et al.* 2005). Ambos patógenos son transmitidos por la picadura de mosquitos, moscas de la familia Hippoboscidae y, en el caso de la viruela, también por contacto directo sobre heridas abiertas (VAN RIPER & FORRESTER 2007). Recientemente se han reportado brotes violentos de viruela aviar en aves autóctonas y endémicas de Canarias, que podrían acarrear serios problemas de conservación en las especies afectadas (ILLERA *et al.* 2013).

En los últimos años se ha generalizado el uso de marcadores y técnicas moleculares para la detección y cuantificación de endoparásitos, aunque con mucha diferencia destacan por su número aquellos trabajos dedicados a los haemosporidios (ej. PERKINS & SCHALL 2002; BENSCH *et al.* 2009; SANTIAGO-ALARCON *et al.* 2012; CLARK *et al.* 2014). Sin embargo, a pesar que cada vez hay más estudios que abordan la distribución geográfica de este grupo de parásitos (ej. CLARK *et al.* 2014; ISHTIAQ *et al.* 2008; JENKINS & OWENS 2011; SZÖLLÖSI *et al.* 2011) todavía existe una comprensión limitada sobre los factores ecológicos y evolutivos que determinan la presencia y distribución de los patógenos (HARRIGAN *et al.* 2014; PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.* 2013), y las consecuencias a corto y largo plazo que producen sobre sus huéspedes cuándo la enfermedad se vuelve crónica (KNOWLES *et al.* 2010; ASGHAR *et al.* 2015).

El objetivo principal de este estudio será entender cuáles son los factores que están determinando la presencia, riqueza y prevalencia de endoparásitos en las aves silvestres. El estudio a lo largo de un gradiente altitudinal y latitudinal natural permitiría identificar el grado de vulnerabilidad de las especies endémicas insulares y alpinas peninsulares a las enfermedades infecciosas emergentes. Muchas de estas especies tienen gran interés en términos de conservación en la Red de Parques Nacionales, por su distribución restringida y vulnerabilidad al cambio climático (STATTERS-FIELD & CAPPER 2000; HUNTLEY *et al.* 2007), y a menudo son especies emblemáticas de los Parques Nacionales como el gorrión alpino (*Montifringilla nivalis*), el acentor alpino (*Prunella collaris*) o el treparriscos (*Tichodroma muraria*).

En concreto el presente proyecto tiene los siguientes objetivos: 1) Detectar y cuantificar, usando marcadores moleculares, el grado de afectación que padecen las poblaciones de aves en dos de las enfermedades más letales que afectan a este grupo de vertebrados como son los haemosporidios (malaria) y la viruela aviar. Para ello el estudio se centrará en tres parques separados geográficamente por más de 700 km de distancia: Picos de Europa, Sierra Nevada y la Caldera de Taburiente. 2) Determinar los factores ecológicos (bióticos y abióticos)

que determinarían la prevalencia y riqueza de estos parásitos en un gradiente altitudinal. Y 3) Diseñar un método sencillo y eficaz de seguimiento a largo plazo de ambos grupos de parásitos en las poblaciones de aves de la Red de Parques Nacionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo de aves se realizó durante el período reproductor de 2012 y 2013 en los tres parques nacionales. Además, en el Parque Nacional de la Caldera de Taburiente realizamos un muestreo adicional post-reproductor durante los meses de agosto-septiembre de 2012 y 2013, para estudiar posibles diferencias de prevalencia entre períodos del mismo año. Esto solo fue posible en La Caldera de Taburiente ya que en esta isla las aves se consideran sedentarias todo el año (MARTÍN & LORENZO 2001) y, al menos, en los medios forestales se pueden realizar las capturas con un tamaño de muestra razonable. El muestreo se inició a principios de marzo, en la isla de La Palma (Caldera de Taburiente) abarcando los meses de marzo y abril. Una vez finalizado este, se continuó con el trabajo de campo en Sierra Nevada (finales de abril-junio), terminándose en Picos de Europa (finales de Mayo-Julio).

Cada parque nacional fue muestreado en 24 localidades por año repartidas a partes iguales en dos tipos generales de hábitat, definidos éstos como abiertos (i.e. nula o escasa presencia de cobertura arbórea) o forestales (i.e. con presencia mayoritaria de masas forestales). Además, estas localidades fueron situadas a lo largo de un gradiente altitudinal de cuatro niveles (1-4): Cota 1 (situada entre el nivel del mar y los 571 m); Cota 2 (entre 658 y 1.170 m); Cota 3 (entre 1.204 y 1.570 m) y Cota 4 (entre 1.835 y 2.113 m) (Tabla 1). Algunas de las localidades se situaron fuera de los límites de los parques nacionales por ser más adecuadas para el trampeo de aves, y para poder capturar adecuadamente el gradiente altitudinal.

Captura de aves

El trabajo de campo consistió en el muestreo de todas las aves paseriformes posibles en las localidades elegidas. El esfuerzo dedicado fue un día de

Localidades	Hábitat	Código	Altitud (m)
LA CALDERA DE TABURIENTE			
<i>San José</i>	Abierto	1.1	267
<i>La Salemera</i>	Abierto	1.2	188
<i>Mazo</i>	Abierto	1.3	359
<i>Tamanca</i>	Forestal	1.4	571
<i>Los Tilos</i>	Forestal	1.5	503
<i>Franceses</i>	Forestal	1.6	244
<i>El Paso</i>	Abierto	2.1	852
<i>Jedey</i>	Abierto	2.2	1092
<i>Jurado</i>	Abierto	2.3	658
<i>La Saucedá</i>	Forestal	2.4	771
<i>El Pilar</i>	Forestal	2.5	1148
<i>Túnel</i>	Forestal	2.6	827
<i>Km20</i>	Forestal	3.1	1504
<i>Cabrito</i>	Forestal	3.2	1435
<i>La Hilerá</i>	Forestal	3.3	1426
<i>Pared Vieja</i>	Forestal	3.4	1235
<i>El Riachuelo</i>	Forestal	3.5	1204
<i>Puntallana1</i>	Forestal	3.6	1337
<i>Roque1</i>	Abierto	4.1	2250
<i>Izcagua</i>	Abierto	4.2	2113
<i>Lucandia</i>	Abierto	4.3	2066
<i>Garafía</i>	Forestal	4.4	1913
<i>Pico Nieves</i>	Forestal	4.5	1934
<i>Puntallana2</i>	Forestal	4.6	1854
SIERRA NEVADA			
<i>Maro Forestal</i>	Forestal	1.10	107
<i>Aguacates</i>	Forestal	1.11	60
<i>Almuñecar</i>	Forestal	1.12	199
<i>Maro</i>	Abierto	1.7	149
<i>Maro2</i>	Abierto	1.8	58
<i>Miel</i>	Abierto	1.9	356
<i>Menchón</i>	Forestal	2.10	966
<i>Pinos Genil</i>	Forestal	2.11	760
<i>Guadix</i>	Forestal	2.12	961
<i>Lanjarón</i>	Abierto	2.7	885
<i>Cáñar</i>	Abierto	2.8	1170

Localidades	Hábitat	Código	Altitud (m)
SIERRA NEVADA (Continuación)			
<i>Padul</i>	Abierto	2.9	954
<i>Carneros</i>	Forestal	3.10	1423
<i>Busquistar</i>	Forestal	3.11	1340
<i>Jerez</i>	Forestal	3.12	1250
<i>Monachil1</i>	Abierto	3.7	1494
<i>Monachil2</i>	Abierto	3.8	1394
<i>Luna</i>	Abierto	3.9	1388
<i>Cañadillas</i>	Forestal	4.10	1911
<i>El Robledal</i>	Forestal	4.11	1835
<i>La Ragua</i>	Forestal	4.12	2048
<i>Cáñar2</i>	Abierto	4.7	1952
<i>Mirador</i>	Abierto	4.8	2090
<i>Camarate</i>	Abierto	4.9	1970
PICOS DE EUROPA			
<i>Pría</i>	Abierto	1.13	41
<i>Luanco</i>	Abierto	1.14	28
<i>Cabo Peñas</i>	Abierto	1.15	116
<i>Llames</i>	Forestal	1.16	42
<i>Covadonga</i>	Forestal	1.17	269
<i>Mirador del Fito</i>	Forestal	1.18	545
<i>Llano Enol</i>	Abierto	2.13	1070
<i>Vega de Sotres</i>	Abierto	2.14	1094
<i>Belbín</i>	Abierto	2.15	1082
<i>Collado Pandébano</i>	Forestal	2.16	1110
<i>Sotres</i>	Forestal	2.17	857
<i>Bosque Enol</i>	Forestal	2.18	1074
<i>Tresviso</i>	Abierto	3.13	1265
<i>Vega Llós</i>	Abierto	3.14	1570
<i>Puertos de Áliva</i>	Abierto	3.15	1561
<i>Pinar de Lillo</i>	Forestal	3.16	1620
<i>Pandetrave km 13</i>	Forestal	3.17	1485
<i>Puerto del Pontón</i>	Forestal	3.18	1292
<i>Vega Ario</i>	Abierto	3.19	1600
<i>Andara</i>	Abierto	4.13	1900
<i>Urriellu</i>	Abierto	4.14	2040
<i>Vega Huerta</i>	Abierto	4.15	2000

Tabla 1. Localidades muestreadas, y tipos generales de hábitat, en 2012 y 2013 en los tres parques nacionales estudiados: La Caldera de Taburiente, Sierra Nevada y Picos de Europa.

Table 1. Localities (and general habitat type) studied per National Park during 2012 and 2013. Abierto: Open habitats. Forestal: Woodland habitats.

trabajo por cada localidad. El trabajo de trapeo consistió en la colocación de redes japonesas y cepos malla. Para incrementar la probabilidad de captura, utilizamos de manera rutinaria el canto grabado de aquellas especies presentes en la zona, los cuales reproducíamos a pie de red gracias a un reproductor mp3 o mp4 y un pequeño altavoz. Todas las aves capturadas fueron anilladas con anillas de aluminio facilitadas por el Ministerio de

Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Además, todas las aves fueron cuidadosamente inspeccionadas en todas las partes no emplumadas, con el fin de detectar lesiones compatibles con viruela aviar (véase, ILLERA *et al.* 2008 para una metodología similar). En aquellas lesiones que fueron lo suficientemente grandes procedimos a retirarle un trozo de la lesión con ayuda de un escalpelo esterilizado y una metodología es-

tándar (ej. SMITS *et al.* 2005; ILLERA *et al.* 2008). Solo se utilizó un escalpelo por lesión y ave. Finalmente se tomaba una muestra de sangre ($\approx 20 \mu\text{l}$) por venopunción de la vena braquial o yugular, usando una jeringuilla esterilizada de insulina de 0,5 ml. Una vez terminado el proceso, las aves eran inmediatamente liberadas en los mismos lugares donde fueron capturadas. La sangre se almacenó en viales conteniendo etanol 100%, y fueron mantenidos a temperatura ambiente hasta su posterior análisis en el laboratorio.

Procedimientos de laboratorio

Para la extracción de ADN se utilizó el método del acetato de amonio (NICHOLLS *et al.* 2000), si bien en aquellos casos con poca muestra de sangre optamos por utilizar un kit de extracción (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Una vez extraído el ADN procedimos al sexado molecular de cada muestra utilizando los cebadores (P2 y P8) y las condiciones de amplificación establecidas por GRIFFITHS *et al.* (1998). A continuación procedimos a detectar la presencia de haemosporidios (*Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*) utilizando la reacción de amplificación anidada propuesta por HELLGREN *et al.* (2004). El objetivo final era amplificar un fragmento de unos 490 pares de bases, correspondientes al gen que codifica el citocromo b mitocondrial del protozoo. En cada reacción de amplificación usamos dos positivos y dos negativos para confirmar que la reacción de amplificación se realizó adecuadamente, y que no existió contaminación alguna. Las reacciones de amplificación fueron realizadas siguiendo las condiciones establecidas en ILLERA *et al.* (2015). Los productos de la amplificación se dispusieron en geles de agarosa (1,5-2%) teñidos con GelRed. Las muestras que salieron positivas a la infección por haemosporidios, fueron seguidamente amplificadas en una reacción de secuenciación usando el Perkin Elmer BigDye terminator (v. 3.1), y los cebadores HaemF, Haem R2 (para *Plasmodium* y *Haemoproteus*) y Haem R2L (para *Leucocytozoon*) en un volumen final de 10 μl , y con las condiciones establecidas en ILLERA *et al.* (2008). El producto final fue purificado y secuenciado en los servicios científico-técnicos de la Universidad de Oviedo usando un ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyze.

Las secuencias fueron alineadas manualmente usando los programas BioEdit (HALL 1997), y Chromas Lite versión 2.1.1.

(http://technelysium.com.au/?page_id=13). La diferenciación entre los géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium* se realizó a través de la opción "Blast" algoritmo implementado en el repositorio público del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI):

Las secuencias fueron consideradas como haplotipos distintos cuando hubo al menos un nucleótido de diferencia. Así, Riqueza de haemosporidios por localidad fue definida como el número de haplotipos distintos presentes en una localidad.

En el caso de tejido obtenido en lesiones que podrían ser compatibles con viruela aviar, se procedió a la extracción de ADN usando el kit de extracción de Qiagen siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Seguidamente se realizó una reacción de amplificación usando los cebadores P1 y P2 descritos en LEE & LEE (1997), los cuales amplifican un fragmento de unos 498 pares de bases del gen 4b. Las condiciones de la reacción de amplificación y secuenciación final fueron las mismas que las realizadas en ILLERA *et al.* (2008).

Análisis estadístico

Para evaluar los principales factores bióticos y abióticos que podrían estar determinando los patrones de prevalencia y riqueza de haemosporidios usamos un total de 29 variables predictoras. De éstas, 19 fueron climáticas obtenidas del repositorio público Bioclim (<http://www.worldclim.org/bioclim>) con una resolución de 1 km². Las variables topográficas fueron obtenidas del Instituto Geográfico Nacional y las variables de uso del territorio de los datos disponibles en CORINE 2000 *Land cover*. El área seleccionada para realizar las estimas topográficas y de uso del territorio fue de un radio de 500m alrededor del punto geográfico de la localidad estudiada. Además, usamos las variables latitud y longitud para controlar por la estructuración espacial de los datos.

Para evaluar los efectos de las variables seleccionadas sobre la riqueza y prevalencia de haemosporidios usamos regresiones parciales de mínimos cuadrados (PLS). Los análisis de PLS fueron realizados con el paquete estadístico STATISTICA versión 8.0 (StatSoft, 2007).

RESULTADOS

Captura de aves

En total en los dos años de estudio capturamos un total de 2.435 aves en 70 localidades dispuestas en los tres parques nacionales estudiados. Para los análisis excluimos aquellos individuos no reproductores en las localidades estudiadas ($n = 22$).

En cuanto al número de especies de aves capturadas, éste fue muy homogéneo durante los dos años. El menor número de especies fue alcanzado en La Palma, lo cual era un resultado esperable por su condición de isla oceánica, seguido por Picos de Europa y, finalmente, por Sierra Nevada (Figura 1).

Viruela aviar

De las 2.435 aves capturadas y examinadas cuidadosamente en busca de lesiones que pudieran ser compatibles con viruela aviar, solo detectamos un caso en 2013. El ave afectada fue un pinzón común (*Fringilla coelebs palmae*) capturado en la isla de La Palma. Tras amplificar un fragmento del gen que codifica la proteína 4b del virus de la

viruela aviar, pudimos confirmar que era viruela aviar con una secuencia idéntica a otras ya conocidas encontradas en aves de corral.

Haemosporidios

Prevalencia

Entre los dos años analizamos un total de 2.435 muestras. Los resultados globales muestran que el parque nacional con mayor prevalencia fue el de Sierra Nevada (con más del 50%) en los dos años estudiados, seguido por Picos de Europa y de la Caldera de Taburiente (Figura 2). Es especialmente reseñable la baja prevalencia de malaria aviar presente en La Caldera de Taburiente (menos del 5%). Debido a este resultado tan bajo, unido a su condición de isla oceánica, decidimos excluir este parque nacional de los análisis conjuntos.

No existieron diferencias significativas en los valores de prevalencia obtenidos en las localidades analizadas entre 2012 y 2013, ni en Sierra Nevada ($t < 1$, $p > 0,10$), ni en Picos de Europa ($t > 0,2$, $p > 0,2$). Este resultado nos permitió juntar los dos resultados obtenidos en los dos años de muestreo en los análisis posteriores.

Los análisis por cota altitudinal ofrecen datos dispares. Así, mientras que en Picos de Europa las prevalencias quedan fuera de las cotas más altas, en Sierra Nevada sí se alcanzaron valores elevados (cerca del 40%). La isla de La Palma fue un caso particular por la baja prevalencia que presenta (Figura 3).

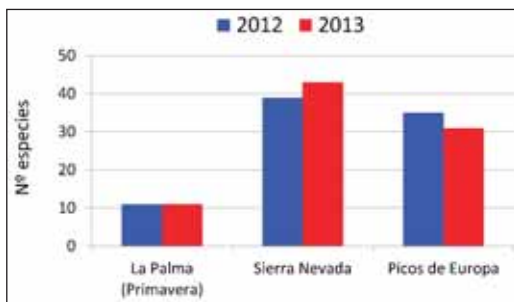


Figura 1. Número de aves capturadas en cada parque nacional en 2012 y 2013.

Figure 1. Number of birds ringed per National Park during 2012 and 2013.

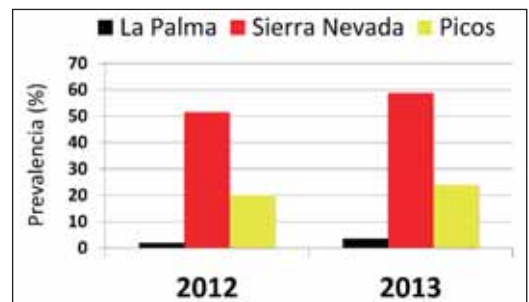


Figura 2. Prevalencias de haemosporidios en los tres parques nacionales durante 2012 y 2013.

Figure 2. Haemosporidian prevalence during 2012 and 2013 in the three National Parks.

El mayor número de especies analizadas e infectadas en los dos años estudiados correspondió con Sierra Nevada, seguido por Picos de Europa, y a una considerable distancia (comprensible por su situación insular) la Caldera de Taburiente. En general, hubo una tendencia a obtener niveles más altos de prevalencia en medios forestales que en relación a los medios abiertos, y tal circunstancia se vio reflejada en la prevalencia obtenida para cada especie. Así, la mayor prevalencia en medios forestales vendría marcada por la combinación de los altos valores de prevalencia de malaria aviar obtenidos en pinzón común (*Fringilla coelebs*), mirlo común (*Turdus merula*), verdecillo (*Serinus serinus*) y el gremio de páridos fundamentalmente por parte del carbonero común *Parus major*, herrerillo común *Cyanistes caeruleus* y carbonero garrapinos *Periparus ater*. La combinación de la prevalencia de estas especies puede llegar a suponer más de 50% de la malaria aviar presente en un parque nacional, como por ejemplo ocurrió en Picos de Europa durante el 2013 (Tabla 2). En contrapartida encontramos valores de prevalencia muy bajos en especies de alta montaña y zonas abiertas como el bisbita alpino (*Anthus spi-*

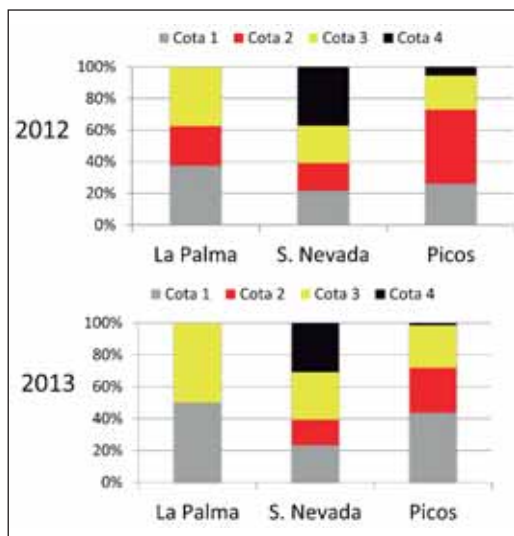


Figura 3. Distribución en porcentaje del número de aves infectadas por malaria aviar a lo largo de un gradiente altitudinal. Cota 1 (0-571 m); Cota 2 (658-1.170 m); Cota 3 (1.204-1.570 m); Cota 4 (1.835-2.113 m). El caso de La Palma es particular debido al escaso número de aves infectadas.

Figure 3. Haemosporidian prevalence across the altitudinal gradient studied. Height 1 (0-571 m); Height 2 (658-1,170 m); Height 3 (1,204-1,570 m); Height 4 (1,835-2,113 m).

ESPECIE	PARQUE NACIONAL					
	Taburiente		Sierra Nevada		Picos de Europa	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013
<i>Cyanistes caeruleus</i>			14	17	2	3
<i>Cyaniste teneriffae</i>	1	1				
<i>Emberiza cia</i>			2	5		
<i>Emberiza cirulus</i>				20		
<i>Erithacus rubecula</i>	2		3	5	3	2
<i>Fringilla coelebs</i>	1	1	15	10	23	15
<i>Garrulus glandarius</i>				3		
<i>Hippolais polyglotta</i>			3			5
<i>Periparus ater</i>			6	14	9	6
<i>Lophophanes cristatus</i>			1	2	3	
<i>Parus major</i>			13	18	7	5
<i>Phylloscopus canariensis</i>	1					
<i>Prunella collaris</i>					6	
<i>Saxicola torquata</i>			4	1	3	
<i>Serinus canaria</i>	1					
<i>Serinus serinus</i>			12	13	1	3
<i>Sylvia atricapilla</i>			5	9	10	3
<i>Sylvia cantillans</i>			4			
<i>Sylvia hortensis</i>			3			
<i>Sylvia conspicillata</i>			2	4		
<i>Sylvia melanocephala</i>	1		1	16		
<i>Troglodytes troglodytes</i>				2	2	
<i>Turdus merula</i>	2	5	5	11	7	9

Tabla 2. Resumen del número de aves detectadas con presencia de haemosporidios en los tres parques nacionales durante 2012 y 2013. Solo se muestran las especies con mayor número de casos, excepto en Caldera de Taburiente que se muestran todas las especies debido al bajo número de casos encontrado.

Table 2. Summary of infected bird species per National Park during 2012 and 2013. Only taxa with higher prevalence are shown, except in La Palma where all species are shown due to the low number of species infected.

noletta), la collalba gris (*Oenanthae oenanthae*), el colirrojo tizón (*Phoenicurus ochruros*), o el gorrión alpino (*Montifringilla nivalis*).

La especie de parásito haemosporidio más prevalente fue *Leucocytozoon*, seguido por *Haemoproteus* y, a una distancia considerable, *Plasmodium* (Figura 4).

Finalmente, hay que reseñar que las comparaciones obtenidas en La Caldera de Taburiente entre los períodos primavera y verano, no arrojaron diferencias significativas en 2012 ($\chi^2 = 0,47$, $P > 0,05$), o en 2013 ($\chi^2 = 2,4$, $P > 0,05$), con valores parecidos de escasa prevalencia, aunque siempre fue mayor durante el período primaveral.

Riqueza de haplotipos

Durante los dos años de estudio obtuvimos un total de 553 secuencias de haemosporidios, a saber, 281 secuencias de *Leucocytozoon*, 217 de *Haemoproteus* y 55 de *Plasmodium*. A este dato habría que añadir además la secuencia de viruela aviar obtenida en la isla de La Palma. El mayor número de haplotipos distintos (una vez descartadas las posiciones ambiguas) fue obtenido en Sierra Nevada con un total de 112, seguido por Picos de Europa ($n = 73$) y, finalmente, por La Palma ($n = 7$).

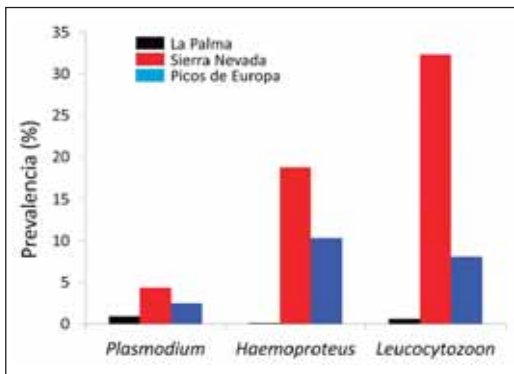


Figura 4. Prevalencias obtenidas por cada género de haemosporidio (*Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*) en los tres parques nacionales estudiados durante 2012 y 2013.

Figure 4. Haemosporidian prevalence per genus (*Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon*) and National Park.

Regresiones parciales de mínimos cuadrados

Los resultados obtenidos en las regresiones parciales de mínimos cuadrados revelan un diferente porcentaje de la varianza explicada según cada género de haemosporidio, pero también una respuesta diferente a las variables predictoras utilizadas. Los resultados obtenidos fueron, en general, similares tanto para prevalencia como para riqueza en los tres géneros (Figura 5). Sin embargo, no existió una homogeneidad en cuanto a las variables predictoras y el porcentaje de la varianza explicada en los tres géneros.

Las regresiones parciales de mínimos cuadrados produjeron un solo factor multivariante para cada variable respuesta (aunque éste no fue significativo), tanto para *Plasmodium* como para *Haemoproteus*. El porcentaje de la varianza explicada obtenida para ambos géneros fue similar con valores que se mantuvieron en general, alrededor del 20% tanto para prevalencia como para riqueza (Figura 5). En cambio, las regresiones parciales de mínimos cuadrados con *Leucocytozoon* originaron dos factores (el primero siendo significativo), pero alcanzando una varianza explicada conjunta mucho mayor (49,33% y 59,01%, para prevalencia y riqueza, respectivamente). En general, *Plasmodium* y *Haemoproteus* estarían condicionados por la temperatura y el paisaje, mien-

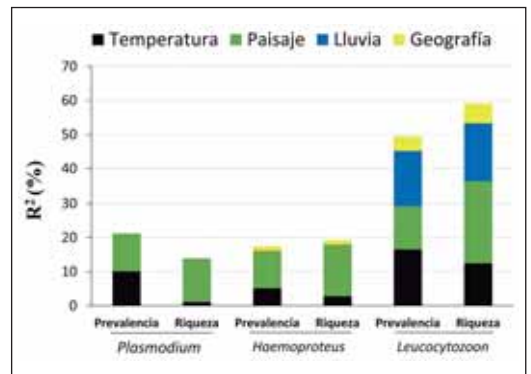


Figure 5. Varianza explicada (R2) para prevalencia y riqueza por las variables predictoras para los tres géneros de haemosporidios.

Figure 5. Variance decomposition (R2) for prevalence and richness according to the predictor variables used for haemosporidian parasites.

tras que *Leucocytozoon* lo estaría además por la precipitación y, en menor medida, por los efectos geográficos (Figura 5).

Si analizamos pormenorizadamente los resultados obtenidos con las variables predictoras, se puede observar como la prevalencia (y riqueza) del género *Plasmodium* está positivamente influida por los valores de temperatura, la presencia de medios agrícolas y por la orientación sur. En cambio está negativamente determinada por la altitud, su alejamiento de los núcleos urbanos y por la presencia de masas forestales. El género *Haemoproteus* presenta efectos de las variables predictoras, en general, similares pero de signo contrario a las detectadas en *Plasmodium*. Así los valores de prevalencia y riqueza están determinados positivamente por los efectos de la longitud y altitud, por los valores extremos de las temperaturas y por la presencia de masas forestales (lo contrario que ocurría con *Plasmodium*). Sin embargo, la presencia de *Haemoproteus* estaría negativamente determinado por la orientación sur y por la cobertura de suelo.

Como ya hemos comentado, los resultados obtenidos con *Leucocytozoon* explican un mayor porcentaje de la varianza, aunque a través de dos factores multivariantes. Las variables predictoras que contribuyeron significativamente a explicar los valores de prevalencia y riqueza obtenidas con este género, fueron la longitud y las temperaturas medias de los períodos cálidos o secos como variables positivas en el primer factor, y la presencia de masas forestales y la precipitación del mes más caluroso en el segundo factor. En cambio, como variables negativas en el primer factor se significaron la latitud, en general la mayor parte de los valores de precipitación y la cobertura de suelo, y en cuanto al segundo factor solo destacó la temperatura mínima del mes más frío.

DISCUSIÓN

A pesar de la profunda preocupación actual por el impacto negativo de las EIE sobre las especies de aves autóctonas y endémicas, y también por los efectos nefastos que pueden acarrear a deter-

minadas actividades socioeconómicas y a la salud humana (ej. DASZAK *et al.* 2000; VANDER WAL *et al.* 2014), el conocimiento que tenemos sobre las causas que favorecen su propagación, prevalencia, diversidad y persistencia es ciertamente limitado (SEHGAL *et al.* 2011; ZAMORA-VILCHIS *et al.* 2012; HARRIGAN *et al.* 2014; GONZALEZ-QUEVEDO *et al.* 2014). Sin embargo, tal información se hace imprescindible no solo para poder evaluar cambios en las tasas de infección con el tiempo (ej. ATKINSON *et al.* 2014), o para proyectar predicciones sobre distribuciones potenciales (BALLS *et al.* 2004; SEHGAL *et al.* 2011), sino también para poder predecir los cambios en la distribución de los patógenos en diferentes escenarios de cambio global (ej. PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.* 2014). Los objetivos que nos marcamos con el desarrollo de este proyecto eran tres, a saber: 1) conocer el grado de infección por haemosporidios y viruela de las especies de paseriformes que habitan en tres parques nacionales con un marcado gradiente altitudinal, 2) comprender los factores bióticos y abióticos que mejor pueden explicar dichos resultados y, finalmente, 3) proponer una metodología que sirva para monitorizar periódicamente la salubridad de las especies de aves que viven en la red de parques nacionales, a través del seguimiento de los haemosporidios aviares y de la viruela aviar. Para este fin, estudiamos durante dos años consecutivos la comunidad de paseriformes en tres parques nacionales: dos continentales (Picos de Europa y Sierra Nevada), situados en el extremo norte y sur de la Península Ibérica, respectivamente, y uno insular situado en el archipiélago canario.

Los resultados obtenidos con la viruela aviar arrojaron datos muy positivos sobre la tasa de infección en los tres parques, ya que solo encontramos un caso de viruela aviar tras la minuciosa inspección de casi 2.500 aves. Este resultado, es además especialmente bueno en el caso de Canarias, ya que en estudios previos sí se habían detectado prevalencias muy altas en algunas islas del archipiélago (ILLERA *et al.* 2008, 2015; SPURGIN *et al.* 2012). El segundo aspecto positivo, fue la sorprendente baja prevalencia de malaria aviar obtenida en la isla de La Palma (menos del 5%). Este dato confirma, sin ningún

género de dudas, que ambas enfermedades tienen una presencia marginal en la isla de La Palma y, por ende, en el Parque Nacional de La Caldera de Taburiente. Los motivos para explicar estas prevalencias tan bajas en La Palma son elusivos hasta el momento, pero están en consonancia con los resultados obtenidos con otras especies de aves en esta isla (ILLERA *et al.* 2008, 2015; SPURGIN *et al.* 2012; PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.* 2013). Sin embargo, contrastan enormemente con las prevalencias altas (superiores al 50%) encontradas en otras islas para alguna de las especies estudiadas en Canarias hasta el momento como el bisbita caminero (*Anthus berthelotii*) o la curruca tomillera (*Sylvia conspicillata*) (ILLERA *et al.* 2008, 2015; SPURGIN *et al.* 2012; GONZÁLEZ-QUEVEDO *et al.* 2014). Una explicación podría formularse en relación con algún tipo de incompatibilidad que pudiera existir entre los parásitos y los vectores (dípteros) que transmiten los protozoos a las aves, o quizás una baja abundancia de potenciales vectores. Una futura comparativa entre los vectores que están presentes en cada una de las islas canarias (las cuales además presentan diferentes niveles de prevalencia), pero también un estudio profundo sobre las historias vitales tanto del parásito como del vector se hace ahora necesario en aras de comprender adecuadamente los valores tan bajos de prevalencia reportados en La Palma, y con el objetivo último de poder predecir mejor la evolución de estos parásitos en Canarias.

Los resultados obtenidos en la Península sí ofrecen, en cambio, una información más resolutive a la hora de comprender los patrones y procesos involucrados en la prevalencia y riqueza de los tres géneros de haemosporidios estudiados. De manera general, se puede afirmar que el género *Leucocytozoon* es el parásito más común en los parques nacionales peninsulares aquí estudiados, y que los valores de prevalencia y riqueza en los tres géneros de haemosporidios fueron más altos en Sierra Nevada que en Picos de Europa. De hecho, en Picos de Europa se observó que las prevalencias de haemosporidios fueron prácticamente inexistentes en las cotas más altas (Figura 3). Sin embargo, lejos de ofrecer una fotografía homogénea para los tres géneros, los resultados

obtenidos presentan diferencias significativas entre ellos que merecen ser discutidos e interpretados. Por el contrario, sí obtuvimos resultados muy similares usando prevalencia y riqueza como variables dependientes en relación a la importancia de las variables predictoras.

En el caso de *Plasmodium* existió una relación significativa, pero inversa, entre altitud y temperatura. Así, fue claro que este género mostró una clara preferencia positiva por ambientes más cálidos, mientras que su presencia disminuía a medida que se incrementaba la cota altitudinal. Además, este género prefiere sin lugar a dudas hábitats abiertos como lo demuestran los valores negativos y significativos obtenidos con la cobertura de masas forestales, pero a su vez la relación positiva que se logra con los medios agrícolas. Finalmente, se detectó una relación positiva por su cercanía a zonas urbanas, lo cual podría reflejar que la mayor alteración de hábitats que se produce a medida que nos acercamos a los núcleos urbanos, facilitaría la presencia de este grupo de parásitos, probablemente a través de la creación de hábitats propicios para completar el ciclo reproductor de sus vectores invertebrados, como por ejemplo la existencia de puntos de agua (BALLS *et al.* 2004; REITER & LAPOINTE 2007). En definitiva, *Plasmodium* en base a nuestros resultados puede definirse como un género de hábitats abiertos, pero evitando zonas altas y frías.

Haemoproteus en cambio, sí es un género que tiende a lograr sus mejores requerimientos ecológicos en zonas forestales, sin verse mermado por el gradiente altitudinal. De hecho, parece ser todo lo contrario, el ascenso altitudinal parece beneficiar a este grupo de patógenos. Es posible que el hecho de estar asociado a medios forestales, los cuales pueden ofrecer a los vectores una mayor protección ante cambios térmicos bruscos que los medios abiertos, pueda estar beneficiando su presencia en cotas altitudinales altas. Por tanto, *Haemoproteus* y *Plasmodium* al ser los géneros de haemosporidios más próximos filogenéticamente (PÉREZ-TRIS *et al.* 2005), parece que tienden a elegir hábitats divergentes, reduciendo así las probabilidades de competir por el huésped en similares condiciones ecológicas.

Finalmente, *Leucocytozoon* fue el género que mayor porcentaje de la varianza explicada produjo ($\approx 50\%$ en prevalencia, y $\approx 60\%$ en riqueza). En este caso, la situación geográfica de las localidades peninsulares condicionó significativamente la probabilidad de estar infectado por este grupo de patógenos, un resultado claramente relacionado por los altos valores obtenidos en Sierra Nevada. Sin embargo, es interesante resaltar que con respecto a las variables fisonómicas de hábitat, *Leucocytozoon* pareció ocupar un tipo de hábitat intermedio al reportado para los otros dos géneros, es decir, no parece ser una especie muy ligada a medios abiertos, pero tampoco a medios estrictamente forestales. Sin embargo, si muestra una tendencia positiva hacia los núcleos urbanos al igual que *Plasmodium*, y esto se puede interpretar de igual manera cómo que los hábitats a medida que se acercan a los núcleos urbanos alcanzan los requerimientos óptimos no solo para el parásito sino también muy especialmente para el vector invertebrado (REITER & LAPOINTE 2007). Es, asimismo, destacable cómo las variables relacionadas con la precipitación se asociaron negativamente a este género, sugiriendo que la probabilidad de infectarse con este grupo disminuye en tanto en cuanto el régimen pluviométrico aumenta. Sin embargo, ya que, teniendo en cuenta que la precipitación per se no puede estar afectando directamente a estos parásitos, parece razonable asumir que este resultado debe relacionarse con las dificultades que pueden encontrar los vectores invertebrados en asentarse en este tipo de nicho ecológico (CORNUAULT *et al.* 2013).

CONCLUSIÓN

En conjunto, podríamos concluir que las variables climáticas no serían las únicas que estarían determinando la presencia, prevalencia y riqueza de haemosporidios en los parques nacionales continentales aquí estudiados, sino que también son importantes otras variables bióticas como puede ser el tipo de hábitat, u otras propiciadas por el uso del territorio como sería la proximidad a los núcleos urbanos, los paisajes agrícolas o la fragmentación del hábitat (BALLS *et al.* 2000; REITER & LAPOINTE 2007; GONZALEZ-QUEVEDO *et al.* 2014). Además,

el hecho de estudiar un número mayor de huéspedes que los trabajos hasta ahora publicados, nos ha permitido obtener una fotografía mucho más precisa de los factores que están afectando a la presencia, prevalencia y riqueza de haemosporidios en el conjunto de passeriformes peninsulares aquí estudiados. Asimismo, también se ha puesto de manifiesto que no todos los parásitos responden igual a los condicionantes climáticos, de hábitat y de uso del territorio, y estas características en su conjunto deberían incorporarse a futuras predicciones de cambio global que se pretendan proyectar en el tiempo. De hecho, en el futuro sería muy interesante poder precisar con más detalle algunas de las variables empleadas, como por ejemplo tipo de bosque, o más características de los medios abiertos, que en este proyecto nos fue del todo imposible debido a la dificultad logística (y presupuestaria) de estudiar más localidades.

¿Y cuáles serían los siguientes pasos a dar? Sin duda alguna, ahora se hace necesario incorporar más información en especial de zonas intermedias a las dos estudiadas, como sería la zona centro y las áreas orientales y occidentales de la Península, para poder tener una fotografía más precisa de los patrones y procesos que están condicionando la prevalencia y riqueza de parásitos haemosporidios en la Península Ibérica. Pero tampoco, habría que olvidar a los vectores (o huéspedes primarios) de los parásitos. Tal información facilitaría la comprensión de las relaciones complejas de especificidad que se pueden establecer entre parásito e invertebrado, y que podrían a su vez condicionar los patrones de prevalencia y riqueza encontrados en las aves (MARTÍNEZ-DE LA PUENTE *et al.* 2011). Además, sería muy interesante poder realizar predicciones sobre las distribuciones de los parásitos y sus vectores invertebrados tanto en el espacio como en el tiempo en un contexto de cambio global (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.* 2014). Tal información facilitaría posibles actuaciones de manejo y conservación sobre poblaciones de aves especialmente sensibles, como aquellas ligadas a hábitats alpinos o las insulares endémicas, ya que podría llegar a predecirse cambios de los grupos más letales como, por ejemplo, *Plasmodium*, o de cualquier haplotipo virulento de otro género.

Protocolo de seguimiento

El objetivo final de este proyecto era plantear un mecanismo de seguimiento de ambos grupos de parásitos en las poblaciones de aves silvestres en los parques nacionales. Hoy en día está demostrado que si bien contar muchas aves de cualquier especie es positivo, en absoluto es garantía de un buen estado de conservación, si buena parte de éstas están enfermas (CARRETE *et al.* 2009). Es más, recientemente se ha demostrado que incluso cuando la malaria se hace crónica (cosa probable para la mayor parte de aves capturadas en este estudio), esta enfermedad tiene efectos muy negativos no solo para la supervivencia del individuo sino también de su progenie (ASGHAR *et al.* 2015). En este escenario, y en base a los resultados obtenidos en este proyecto, planteamos hacer muestreos de seguimiento periódicos en determinadas localidades en cada uno de los tres parques analizados. Este monitoreo debería realizarse anualmente, como mínimo a nivel de prevalencia, en aquellas localidades dónde el número de anillamientos por día de trabajo hayan sido altos. También sería conveniente hacer un seguimiento más intenso, de todas las localidades, cada 10 años (o antes en el caso que se detectaran cambios significativos en los valores de prevalencia). De igual manera, recomendamos cuantificar la riqueza de hemosporidios cada 5 años, ya que así se podría detectar la llegada de haplotipos poco comunes, pero con potencialidad de ser virulentos. Este protocolo sería perfectamente extrapolable a cualquiera de los parques que componen la red de parques nacionales.

El trabajo de campo consistirá en dedicar un día de anillamiento en tres localidades situadas dentro de los límites del parque, o en los alrededores de los parques nacionales. La metodología de trabajo deberá ser la misma que la aplicada en este estudio, es decir, se recogerán muestras de sangre de todas las aves capturadas y anilladas (mínimo 10 individuos por localidad), dedicando un día completo durante el período reproductor. Para incrementar las tasas de captura recomendamos usar el canto grabado de las potenciales especies a ser muestreadas, el cual se puede situar debajo de las redes de anillamiento. En el caso de que se capturaran menos de 10 aves recomendamos invertir un día más hasta lograr un mínimo de 10 individuos por localidad. Todos los

individuos deberán ser examinados en sus partes no emplumadas con el objetivo de detectar posibles lesiones compatibles con viruela aviar. Si se detectara algún individuo con bultos sospechosos de ser producidos por viruela aviar se procedería a retirar un pequeño fragmento del tejido dañado, el cual se preservaría en un vial de 1,5 ml con etanol puro. En el caso de los hemosporidios, además de preservar cada muestra en tubos de 1,5 ml en etanol puro, sería conveniente realizar un frotis sanguíneo por cada ave muestreada, de tal manera que exista la posibilidad de llevar a cabo una inspección posterior del frotis en un microscopio con el fin de detectar la presencia de los parásitos. Esta técnica podría ser o complementaria al análisis molecular, o plantearse como alternativa. Las localidades (ver también Tabla 1) que se sugieren para realizar muestreos periódicos anuales serían los siguientes:

La Caldera de Taburiente: Los Tilos (código 1.5); La Saucedá (código 2.4) y El Riachuelo (código 3.5).

Sierra Nevada: Cañadillas (código 4.10); La Ragua (código 4.12) y Camarate (código 4.9).

Picos de Europa: Vega de Enol (código 2.13); Collado Pandébano (código 2.16) y Vega Huerta (código 4.15).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer la inestimable ayuda en la colecta de muestras durante los dos años de trabajo de campo a Eduardo Rodríguez Expósito, Leandro Meléndez y Paola Laiolo. La ayuda de Laura García Padilla fue fundamental en el manejo de las muestras en el laboratorio. Giulia Bastianelli también nos ayudó a procesar algunas muestras de Asturias. Ángel Moreno nos facilitó las variables climáticas y topográficas. El Cabildo de La Palma nos proporcionó alojamiento en las dependencias de los Tilos, siendo Félix Manuel Medina (“Feluco”) clave en la consecución de los permisos pertinentes. Los tres Parques Nacionales involucrados en este proyecto, así como las Consejerías de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, Junta de Castilla y León, y el Principado de Asturias proporcionaron los permisos pertinentes para el anillamiento y toma de muestras de sangre. Paola Laiolo, Manuel Nogales y José Luis Tella me apoyaron durante la solicitud de este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASGHAR, M., HASSELQUIST, D., HANSSON, B., ZEHTINDJIEV, P. & BENSCH, S. 2015. Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science* 347: 436-438.
- ATKINSON, C.T., DUSEK, R.J., WOODS, K.L. & IKO, W.M. 2000. Pathogenicity of avian malaria in experimentally infected Hawaii amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* 36: 197-204.
- ATKINSON, C.T., UTZURRUM, R.B., LAPOINTE, D.A., CAMP, R.J., CRAMPTON, L.H., FOSTER, J.T. & GIAMBELLUCA, T.W. 2014. Changing climate and the altitudinal range of avian malaria in the Hawaiian Islands – an ongoing conservation crisis on the island of Kaua'i. *Global Change Biology* 20: 2426-2436.
- BALLS, M.J., BØDKER, R., THOMAS, C.J., KISINZA, W., MSANGENI, H.A. & LINDSAY, S.W. 2004. Effect of topography on the risk of malaria infection in the Usambara Mountains, Tanzania. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 400-408.
- BENSCH, S., HELLGREN, O. & PEREZ-TRIS, J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9: 1353-1358.
- CARRETE, M., SERRANO, D., ILLERA, J.C., LÓPEZ, G., VÖGELI, M., DELGADO, A. & TELLA, J.L. 2009. Goats, birds and emergent diseases: apparent and hidden effects of an exotic species in an island environment. *Ecological Applications* 19: 840-853.
- CLARK, N.J., CLEGG, S.M. & LIMA, M.R. 2014. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporidia): new insights from molecular data. *International Journal for Parasitology* 44: 329-338.
- CORNUAULT, J., KHIMOUN, A., HARRIGAN, R.J., BOURGEOIS, Y.X.C., MILÁ, B., THÉBAUD, C. & HEEB, P. 2013. The role of ecology in the geographical separation of blood parasites infecting an insular bird. *Journal of Biogeography* 40: 1313-1323.
- DASZAK, P., CUNNINGHAM, A.A. & HYATT, A.D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.
- DIAMOND, J. 2006. Armas, gérmenes y acero: breve historia de la humanidad en los últimos trece mil años. Editorial Debate.
- FALLON, S.M., RICKLEFS, R.E., LATTA, S.C. & BERMINGHAM, E. 2004. Temporal stability of insular avian malaria parasite communities. *Proceedings of the Royal Society B* 271: 493-500.
- FRANKHAM, R. 1998. Inbreeding and extinction: Island populations. *Conservation Biology* 12: 665-675.
- FREED, L.A., CANN, R.L., GOFF, M.L., KUNTZ, W.A. & BODNER, G.R. 2005. Increase in avian malaria at upper elevation in Hawaii. *Condor* 107: 753-764.
- GARAMSZEGI, L.Z. 2011. Climate change increases the risk of malaria in birds. *Global Change Biology* 17: 1751-1759.
- GILIOLI, G. & MARIANI, L. 2011. Sensitivity of *Anopheles gambiae* population dynamics to meteorological variability: a mechanistic approach. *Malaria Journal* 10: 294.
- GONZALEZ-QUEVEDO, C., DAVIES, R.G. & RICHARDSON, D.S. 2014. Predictors of malaria infection in a wild bird population: landscape-level analyses reveal climatic and anthropogenic factors. *Journal of Animal Ecology* 83: 1091-1102.
- GRIFFITHS, R., DOUBLE, M.C., ORR, K. & DAWSON, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- GROOM, M.J., MEFFE, G.K. & CARROL, C.R. 2005. Principles of Conservation Biology. Sinauer Associates, Inc.
- 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.

- HELLGREN, O., WALDENSTRÖM, J. & BENSCH, S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium* and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 797-802.
- HOF, C., ARAÚJO, M.B., JETZ, W. & RAHBK, C. 2011. Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature* 480: 516-519.
- HARRIGAN, R.J., SEDANO, R., CHASAR, A.C., CHAVES, J.A., NGUYEN, J.T., WHITAKER, A. & SMITH, T.B. 2014. New host and lineage diversity of avian haemosporidia in the northern Andes. *Evolutionary Applications* 7: 799-811.
- HUNTLEY, B., GREEN, R.E., COLLINGHAM, Y. & WILLIS, S.G. 2007. A climatic atlas of European breeding birds. Durham, Sandy and Barcelona: Durham University, RSPB and Lynx Edicions.
- ILLERA, J.C., CARRETE, M., SERRANO, D. & TELLA, J.L. 2013. Enfermedades parasitarias de aves de Canarias: un problema olvidado en conservación. *Quercus* 324: 16-24.
- ILLERA, J.C., EMERSON, B.C. & RICHARDSON, D.S. 2008. Genetic characterization, distribution and prevalence of avian pox and avian malaria in the Berthelot's pipit (*Anthus berthelotii*) in Macaronesia. *Parasitology Research* 103: 1435-1443.
- ILLERA, J.C., FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A., HERNÁNDEZ-FLORES, C.F. & FORONDA, P. 2015. Unforeseen biogeographical patterns in a multiple parasite system in Macaronesia. *Journal of Biogeography*, 42: 1858-1870.
- ISHTIAQ, F., GUILLAUMOT, L., CLEGG, S.M., PHILLIMORE, A.B., BLACK, R.A., OWENS, I.P.F., MUNDY, N.I. & SHELDON, B.C. 2008. Avian haematzoan parasites and their associations with mosquitoes across Southwest Pacific Islands. *Molecular Ecology* 17: 4545-4555.
- JENKINS, T. & OWENS, I.P.F. 2011. Biogeography of avian blood parasites (*Leucocytozoon* spp.) in two resident hosts across Europe: phylogeographic structuring or the abundance-occupancy relationship? *Molecular Ecology* 20: 3910-3920.
- KNOWLES, S.C.L., PALINAUSKAS, V. & SHELDON, B.C. 2010. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 557-569.
- LADEAU, S.L., KILPATRICK, A.M. & MARRA, P.P. 2007. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* 447: 710-713.
- LAPOINTE, D.A., GOFF, M.L. & ATKINSON, C.T. 2010. Thermal constraints to the sporogonic development and altitude distribution of avian malaria *Plasmodium relictum* in Hawaii. *Journal of Parasitology* 96: 318-324.
- LEE, L.H., & LEE, K.H. 1997. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *Journal of Virological Methods* 63: 113-119.
- LIPS, K.R., BREM, F., BRENES, R., REEVE, J.D., ALFORD, R.A., VOYLES, J., CAREY, C., LIVO, L., PESSIER, A.P. & COLLINS, J.P. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 3165-3170.
- MARTÍN, A. & LORENZO, J.A. 2001. Aves del Archipiélago Canario. Lemus Editor, La Laguna.
- MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J., MARTÍNEZ, J., RIVERO-DE AGUILAR, J., HERRERO, J. & MERINO, S. 2011. On the specificity of avian blood parasites: revealing specific and generalist relationships between haemosporidians and biting midges. *Molecular Ecology* 20: 3275-3287.
- MØLLER, A.P. 2010. Host-parasite interactions and vectors in the barn swallow in relation to climate change. *Global Change Biology* 16: 1158-1170.
- NAGY, L. & GRABHERR, G. 2009. The biology of alpine habitats. Oxford University Press.
- NICHOLLS, J.A., DOUBLE, M.C., ROWELL, D.M. & MAGRATH, R.D. 2000. The evolution of cooperative and pair breeding in thornbills *Acanthiza* (Pardalotidae). *Journal of Avian Biology* 31: 165-176.
- OSTFELD, R.S. 2009. Climate change and the distribution and intensity of infectious diseases. *Ecology* 90: 903-905.

- PEARCE-HIGGINS, J.W. & GREEN, R.E. 2014. Birds and climate change. Impacts and conservation responses. Cambridge University Press.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, A., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, S., DE LA HERA, I. & PÉREZ-TRIS, J. 2013. Finding the appropriate variables to model the distribution of vector-borne parasites with different environmental preferences: climate is not enough. *Global Change Biology* 19: 3245-3253.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, A., DE LA HERA, I., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, S. & PÉREZ-TRIS, J. 2014. Global warming will reshuffle the areas of high prevalence and richness of three genera of avian blood parasites. *Global Change Biology* 20: 2406-2416.
- PÉREZ-TRIS, J., HASSELQUIST, D., HELLGREN, O., KRIZANAUSKIENE, A., WALDENSTRÖM, J. & BENSCH, S. 2005. What are malaria parasites? *Trends in Parasitology* 21: 209-211.
- PERKINS, S.L. & SCHALL, J.J. 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology* 88: 972-978.
- PRIMACK, R.B. 2009. *Essentials of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc.
- REITER, M.E. & LAPOINTE, D.A. 2007. Landscape factors influencing the spatial distribution and abundance of mosquito vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in a mixed residential-agricultural community in Hawai'i. *Journal of Medical Entomology* 44: 861-868.
- ROHR, J., DOBSON, A.P., JOHNSON, P.T.J., KILPATRICK, A.M., PAULL, S.H., RAFFEL, T.R., RUIZ-MORENO, D. & THOMAS, M.B. 2011. Frontiers in climate change-disease research. *Trends in Ecology and Evolution* 26: 270-277.
- SAÉZ, A.M. WEISS, S., NOWAK, K., LAPEYRE, V., *et al.* 2015. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Molecular Medicine* 7: 17-23.
- SANTIAGO-ALARCON, D., PALINAUSKAS, V. & SCHAEFER, H.M. 2012. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews* 87: 928-964.
- SEHGAL, R.N.M., BUERMANN, W., HARRIGAN, R.J., BONNEAUD, C., LOISEAU, C., CHASAR, A., SEPIL, I., VALKIUNAS, G., IEZHOVA, T., SAATCHI, S. & SMITH, T.B. 2011. Spatially explicit predictions of blood parasites in a widely distributed African rainforest bird. *Proceedings of the Royal Society B* 278: 1025-1033.
- SEHGAL, R.N.M., JONES, H.I. & SMITH, T.B. 2001. Host specificity and incidence of Trypanosoma in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology* 10: 2319-2327.
- SODHI, N.S., BROOK, B.W. & BRADSHAW, C.J.A. 2007. *Tropical conservation biology*. Blackwell Publishing, Malden, USA.
- STATSOFT, INC. 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- STATTERSFIELD, J. & CAPPER, D.R. (eds.). 2000. *Threatened Birds of the World*. BirdLife International. Linx Edicions, Barcelona.
- SPURGIN, L.G., ILLERA, J.C., PADILLA, D.P. & RICHARDSON, D.S. 2012. Mapping pathogenic infection across spatio-temporal scales: a case study on island populations of Berthelot's pipit (*Anthus berthelotii*). *Oecologia* 168: 691-701.
- SMITS, J., TELLA, J.L., CARRETE, M., SERRANO, D., LÓPEZ, G. 2005. An epizootic of avian pox in endemic short-toed larks (*Calandrella rufescens*) and Berthelot's pipits (*Anthus berthelotii*) in the Canary Islands, Spain. *Veterinary Pathology* 42: 59-65.
- SZÖLLÖSI, E., CICHÓN, M., EENS, M., HASSELQUIST, D., KEMPENAERS, B., MERINO, S., NILSSON, J.-Å., ROSIVALL, B., RYTKÖNEN, S., TÖRÖK, J., WOOD, M.J. & GARAMSZEGLI, L.Z. 2011. Determinants of distribution and prevalence of avian malaria in blue tit populations across Europe: separating host and parasite effects. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 2014-2024.
- VANDER WAL, E., GARANT, D., CALMÉ, S., CHAPMAN, C.A., FESTA-BIANCHET, M., MILLIEN, V., RIOUX-PAQUETTE, S. & PELLETIER, F. 2014. Applying evolutionary concepts to wildlife disease ecology and management. *Evolutionary Applications* 7: 856-868.

- VAN RIPER, C. & FORRESTER, D.J. 2007. Avian pox. In: Thomas N, Hunter B, and Atkinson CT (eds) Infectious and parasitic diseases of wild birds. Blackwell, Ames, pp 131-176.
- VAN RIPER, C., VAN RIPER, S.G., GOFF, M.L. & LAIRD, M. 1986. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian (USA) land birds. *Ecological Monographs* 56: 327-344.
- WEBSTER, R.G. & WALKER, E.J. 2003. The world is teetering on the edge of a pandemic that could kill a large fraction of the human population. *American Scientist* 91: 122.
- WINKLER, D.W., DUNN, P.O. & MCCULLOCH, C.E. 2002. Predicting the effects of climate change on avian life-history traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13595-13599.
- ZAMORA-VILCHIS, I., WILLIAMS, S.E. & JOHNSON, C.N. 2012. Environmental Temperature Affects Prevalence of Blood Parasites of Birds on an Elevation Gradient: Implications for Disease in a Warming Climate. *PLoS ONE* 7: e39208.