

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Haemosporidios, diversidad y estructura genética  
poblacional en tres especies de aves (Passeriformes) del  
Altiplano Potosino”**

Tesis que presenta

**María Teresa Reinoso Pérez**

Para obtener el grado de

**Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectores de la Tesis:**

**Dr. Leonardo Chapa Vargas**

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**

San Luis Potosí, S.L.P, Septiembre de 2014



## Constancia de aprobación de la tesis

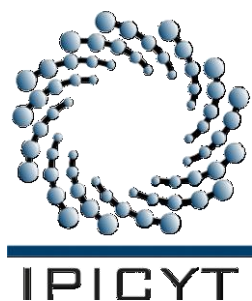
La tesis ***“Haemosporidios, diversidad y estructura genética poblacional en tres especies de aves (Passeriformes) del Altiplano Potosino”*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **María Teresa Reinoso Pérez** y aprobada el **veintiséis de septiembre del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**  
Codirector de la tesis

**Dr. Leonardo Chapa Vargas**  
Codirector de la tesis

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Julio Cesar Canales Delgadillo**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la División de Biología Molecular y en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo codirección de los doctores: Leonardo Chapa Vargas y Gerardo Rafael Argüello Astorga.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT-279118.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 122 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 26 días del mes de septiembre del año 2014, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Julio Cesar Canales Delgadillo</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>DUMAC</b>
<b>Dr. Leonardo Chapa Vargas</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**María Teresa Reinoso Pérez**

sobre la Tesis intitulada:

*Haemosporidios, diversidad y estructura genética poblacional en tres especies de aves (Passeriformes) del Altiplano Potosino*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**  
**Dr. Leonardo Chapa Vargas**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 17:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes de septiembre de 2014.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



Dedicado a todos aquellos que me ayudaron y formaron parte de este proceso de crecimiento personal y académico.

## **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Biotecnología de Plantas de la División de Biología Molecular y Ecología Microbiana de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Fue dirigido por los Drs. Leonardo Chapa y Gerardo Argüello a quienes agradezco por permitirme formar parte de sus equipos de trabajo y darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto multidisciplinario que involucró a dos divisiones de la Institución. Además de sus observaciones y sugerencias para para hacer de éste un mejor trabajo.

A mis asesores, la Dra. Lina Riego y el Dr. Julio César Canales por su valioso tiempo invertido en la revisión de este proyecto y por sus acertados comentarios. Al Dr. Julio también le agradezco por sus múltiples asesorías tanto en campo como en laboratorio, por su paciencia ante tantas preguntas y mi tendencia a no parar de hablar, aprendí muchas cosas nuevas además de recordar algunas que ya había olvidado, gracias Doctor.

A los Drs. de la División de Biología Molecular que compartieron conmigo sus conocimientos durante las clases impartidas durante el programa de maestría.

A toda mi familia y amigos, aunque algunos a la distancia, siempre estuvieron al pendiente y apoyándome de alguna forma. A mis nuevos amigos y compañeros que conocí en estos dos años en ambas divisiones, por compartir las tensiones de un posgrado, las pláticas en los pasillos y las diversiones en los ratos libres que nos tomamos.

Gracias a CONACYT por la beca otorgada.

Gracias a todos.

## Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Resumen	x
Abstract	xi
CAPITULO 1	1
CAPITULO 2	41
CAPITULO 1	1
Resumen	2
Abstract	3
Introducción	4
Materiales y métodos	8
Resultados	14
Discusión	17
Conclusión	22
Agradecimientos	23
Referencias	24
Acceso a datos	30
Contribuciones de los autores	30
Leyendas de tablas y figuras	31
Tablas y figuras	33
Material suplementario	38
CAPITULO 2	41
Resumen	42
Abstract	43
Introducción	43
Métodos	48

Resultados	55
Discusión	58
Conclusión	64
Conflicto de intereses	66
Contribuciones de los autores	66
Agradecimientos	66
Referencias	67
Figuras y tablas	73
Material suplementario	79



## Lista de tablas y figuras

### Capítulo 1

Leyendas de tablas y figuras	31
Tabla 1. Oligonucleótidos de los microsatélites de <i>H. meixicanus</i> (Hofi) y multiespecie (CAM)	33
Tabla 2. Diversidad genética de <i>Haemorrhous mexicanus</i> , <i>Melospiza fusca</i> y <i>Campylorhynchus brunneicapillus</i> en las tres localidades.	34
Tabla 3. Diferenciación genética e índice de endogamia global para las tres especies de aves.	34
Tabla 4. Comparación de los valores RST entre pares de localidades.	34
Tabla 5. Determinación de número de K por medio de los programas Structure y Geneland.	34
Figura 1. Mapa de la zona de estudio.	35
Figura 2. Análisis de autocorrelación espacial entre la distancia genética y la distancia geográfica entre pares de individuos por especie.	36
Figura 3. Comparación de los estimados de $H_o$ , $H_e$ y FIS cuando $K=1$ , $K=2$ y $K=3$ para cada una de las especies.	37

### Capítulo 2

Figuras y tablas	73
Figura. 1. Mapa de la zona de estudio.	73
Figura. 2. Eritrocitos infectados por <i>Haemoproteus</i> y <i>Plasmodium</i> .	74
Figura. 3. Carga parasitaria por especie	75
Figura. 4. Diversidad específica e intraespecífica de los parásitos haemosporidios detectados en el Altiplano	76
Figura. 5. Carga parasitaria en sitios con diferente calidad de hábitat.	77
Tabla 1. Diagnóstico y estimación de prevalencia de haemosporidios en tres especies de aves.	78

## Resumen

### “Haemosporidios, diversidad y estructura genética poblacional en tres especies de aves (Passeriformes) del Altiplano Potosino”

En esta tesis se incluyen los resultados de dos estudios en tres especies de aves residentes del Altiplano Potosino: el pinzón mexicano (*Haemorhous mexicanus*), el rascador pardo (*Melospiza fusca*) y la matraca del desierto (*Campylorhynchus brunneicapillus*). En la primera parte, se determinó por medio de marcadores microsatélite, la diversidad y la estructura genética poblacional de las tres especies de aves. Para *H. mexicanus* se encontraron altos niveles de endogamia y baja diversidad genética a diferencia de las otras dos especies, en las que estos estimados estuvieron cercanos a los niveles esperados para las poblaciones en equilibrio. En la escala espacial del estudio (40 km), ninguna de las especies mostró una estructura genética poblacional evidente.

En la segunda parte del estudio, se determinó la presencia de parásitos haemosporidios en las mismas especies aviares por medio de técnicas de microscopía óptica y amplificación molecular de un fragmento (480 pb) del gen del citocromo *b* de los parásitos. Se identificaron cuatro linajes de parásitos en estas aves con prevalencia cercana al 50%. Dos de las secuencias que se obtuvieron por la amplificación representan un linaje no reportado hasta ahora.

**Palabras clave:** Aves, genética de poblaciones, parasitismo

## Abstract

### **“Haemosporidian, diversity and population genetic structure on three species of birds (Passeriformes) in the Altiplano Potosino”**

This thesis include the results of two studies on three species of resident birds of the Highland Plateau of San Luis Potosí (Altiplano Potosino): the house finch (*Haemorhous mexicanus*), the canyon towhee (*Melospiza fusca*) and the cactus wren (*Campylorhynchus brunneicapillus*). In the first part of the study, the diversity and the population genetic structure of the three species of birds was determined by microsatellite markers. One of the species (*Haemorhous mexicanus*) showed high levels of inbreeding and low genetic diversity; the other two species (*Melospiza fusca* and *Campylorhynchus brunneicapillus*), showed expected levels for populations in equilibrium. In the spatial extent to which this study took place (diameter = 40 km), none of the species showed a clear genetic structure.

In the second part, it was determined the presence of haemosporidian parasites, through microscopy and PCR amplification of a fragment (480 bp) of haemosporidian's cytochrome *b*, in the same three species of birds. Four lineages of haemosporidians were identified in the study area with prevalence near to 50%. Two of the sequences obtained from parasite's cytochrome *b* represent a lineage that is reported for the first time.

**Key words:** Birds, population genetics, parasitism

## CAPITULO 1

# Diversidad y estructura genética poblacional de tres especies de aves residentes del Altiplano Potosino

M. T. Reinoso-Pérez<sup>1</sup> [maria.reinoso@ipicyt.edu.mx](mailto:maria.reinoso@ipicyt.edu.mx)  
J. C. Canales-Delgadillo<sup>1</sup> [julio.canales@ipicyt.edu.mx](mailto:julio.canales@ipicyt.edu.mx)  
L. Chapa Vargas<sup>1</sup> [lchapa@ipicyt.edu.mx](mailto:lchapa@ipicyt.edu.mx)  
G. R. Argüello Astorga<sup>1</sup> [grarguel@ipicyt.edu.mx](mailto:grarguel@ipicyt.edu.mx)  
L. Riego Ruiz<sup>1</sup> [lina@ipicyt.edu.mx](mailto:lina@ipicyt.edu.mx)

<sup>1</sup> Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica  
Camino a la Presa San José #2055  
Colonia Lomas 4<sup>a</sup>. Sección  
C.P. 78216 San Luis Potosí, S.L.P. México.

**Palabras clave:** Estructura poblacional, diversidad genética, marcadores microsatélites, aves.

Autor de correspondencia:

Running title: Diversidad genética en el Altiplano Potosino

## Resumen

Entender los procesos ecológicos y evolutivos por los que atraviesan las especies es fundamental para lograr su conservación. La genética de poblaciones permite entender los procesos involucrados en la permanencia o reducción de la diversidad genética. En comparación con otros marcadores moleculares, los microsatélites presentan alto grado de polimorfismo, y por lo tanto, permiten hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo.

Aunque los microsatélites en aves son menos abundantes que en otros taxa, se han aislado suficientes para estudios demográficos y de genética de poblaciones. Utilizando marcadores especie-específicos y multiespecie se determinó la diversidad y la estructura genética poblacional de tres especies de aves residentes del Altiplano Potosino encontrando para una de ellas (*Haemorhous mexicanus*) altos niveles de endogamia y baja diversidad genética. Mientras que para las otras dos (*Melospiza fusca* y *Campylorhynchus brunneicapillus*) los estimados de diversidad y endogamia estuvieron dentro de los niveles esperados para poblaciones en equilibrio. En la escala espacial a la que se llevó a cabo este estudio (diámetro = 40 Km), ninguna de las especies mostró una estructura genética poblacional evidente sugiriendo que los individuos de cada especie pertenecen a una sola población. Es necesario llevar a cabo estudios a mayores extensiones para realizar inferencias acerca de distancias y niveles de deterioro del hábitat que pudieran afectar la estructura de las poblaciones.

**Palabras clave:** Estructura poblacional, diversidad genética, marcadores microsatélites, aves.

## Abstract

Understanding of ecological and evolutionary processes that the species face is fundamental for sound conservation efforts. Population genetics is a tool that allows understanding of processes involved in the permanence or the decrease in genetic diversity. In comparison with other molecular markers, microsatellites possess high level of polymorphism, allowing comparative studies between species or genera within a group.

Although microsatellites in birds are less abundant than in other taxa, enough microsatellite markers have been isolated for demographic and population genetic studies. Using species-specific and multi-species markers, the diversity and genetic structure of three species of resident birds of the Highland Plateau of San Luis Potosí (Altiplano Potosino) was determined. One of the species (*Haemorhous mexicanus*) showed high levels of inbreeding and low genetic diversity. As for the other two (*Melospiza fusca* and *Campylorhynchus brunneicapillus*), estimates of diversity and inbreeding were within typical levels for populations in equilibrium. In the spatial extent to which this study took place (diameter = 40 km), none of the species showed a clear population genetic structure suggesting that individuals of each species belong to a single population, so it is necessary to conduct studies to larger areas to make inferences about distances and levels of habitat degradation that could affect population structure.

**Key words:** Population structure, genetic diversity, microsatellite markers, birds.

## Introducción

El estudio del origen y mantenimiento de la variación genética dentro y entre poblaciones ha sido muy valioso para poder entender los mecanismos de adaptación y especiación en la naturaleza. El estudio de la diversidad genética de las poblaciones naturales ha cobrado gran relevancia principalmente en estudios que involucran patrones demográficos a escalas espaciales gruesas; por ejemplo, en poblaciones de animales con distribución cosmopolita o con hábitos migratorios de gran distancia (Berube *et al.* 1998). Por otro lado, ha contribuido a entender la dinámica genética en poblaciones pequeñas y/o parcialmente aisladas, pero que se encuentran muy bien adaptadas a condiciones locales bastante específicas (Lowe *et al.* 2004). Entender estos procesos desde un punto de vista ecológico y evolutivo es fundamental para lograr la conservación de los ecosistemas y la biodiversidad que poseen. La integración de los métodos de conservación y manejo de especies con las técnicas moleculares ha dado lugar al surgimiento de la genética de la conservación (Bennet y Saunders, 2010; Amos *et al.* 2012).

Esta nueva disciplina, que se vale de técnicas de biología molecular para generar datos e integrarlos con características geográficas y ambientales, ha revolucionado la forma en la que se llevan a cabo las investigaciones en el campo de la ecología (Freeland, 2005; Bennet y Saunders, 2010; Amos *et al.* 2012). Aunque en el pasado, el estudio de las relaciones ecológicas a través de observaciones de campo y datos fenotípicos basados principalmente en la morfología, fisiología o comportamiento de los organismos, aportó información valiosa para entender los procesos poblacionales de las especies, este tipo de

datos tienen ciertas limitaciones para inferir adecuadamente la variación genética debido a que la plasticidad fenotípica puede provocar la sub-estimación de los niveles reales de variación (Freeland, 2005).

Para que un estudio de genética de poblaciones tenga implicaciones en la conservación de las especies, debe considerar la variación genética y demográfica tanto a escala temporal como espacial, particularmente para desarrollar programas de reintroducción de especies o cuando se argumenta una reducción en el tamaño de las poblaciones (Lowe *et al.* 2004; Freeland, 2005). Al comparar poblaciones a extensiones espaciales grandes se espera encontrar mayores niveles de diferenciación genética que al hacer comparaciones a extensiones espaciales pequeñas. Sin embargo, los patrones de estructura genética dependen de la interacción entre la distancia geográfica de las poblaciones y la vagilidad de las especies bajo estudio (Gaines *et al.* 1997). Para organismos como las aves en las que la capacidad de dispersión es variable, en general, se espera que especies con alta vagilidad exhiban niveles bajos de diferenciación poblacional como resultado de procesos históricos y demográficos ausentes en especies de distribución restringida o con ámbitos hogareños limitados (Crochet, 2000).

Existen varias técnicas moleculares que permiten estudiar la variación genética en las poblaciones naturales, sus características demográficas o el estado de salud en el que se encuentran. Los diferentes tipos de marcadores moleculares de ADN se distinguen por el grado de polimorfismo que presentan en loci únicos o múltiples (Parker *et al.*, 1998; Oyler-McCance y Leberg, 2005; Selkoe y Toonen, 2006 y Rentería, 2007). En estudios demográficos los microsatélites son ideales ya que son marcadores nucleares que se heredan en forma mendeliana y que no



están sujetos a selección (Freeland, 2005). Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son secuencias de ADN conformadas por dos a seis nucleótidos repetidos que se encuentran en regiones codificantes y no codificantes. Por lo regular, varían en el número de repeticiones que presentan, siendo típicamente de cinco a 40, aunque este número puede ser mayor (Parker *et al.* 1998 y Rentería, 2007). Se han identificado marcadores microsatélites de ADN nuclear en diferentes grupos de plantas y animales. Estos marcadores han sido usados para estudios de variación genética intra e interespecífica, lo que ha permitido resolver algunas preguntas evolutivas puntuales relacionadas con el flujo genético, análisis de parentesco, parámetros demográficos y estructura poblacional (Rentería, 2007).

Si bien los microsatélites son menos abundantes en aves que en otros taxa como mamíferos o peces, recientemente se han identificado marcadores SSR aislados de genomas aviáres para ser usados en un amplio rango de especies (Dawson *et al.* 2010; Dawson *et al.* 2013). Aunque los marcadores multiespecie tienden a presentar menor variación que los especie-específico (Selkoe y Toonen, 2006), se ha demostrado que pueden generar información útil para estudios poblacionales (Dawson *et al.* 2010). Para obtener una buena resolución y resultados con buen peso estadístico, es recomendable usar de 10 a 20 marcadores microsatélites (Luikart y Cornuet, 1998); sin embargo, la caracterización de este número de marcadores tiene un costo elevado cuando un estudio involucra más de una especie. La alternativa es el uso de marcadores multiespecie lo que puede representar un ahorro en tiempo y recursos (Dawson *et al.* 2010).

A pesar de que las zonas áridas son vulnerables a los cambios de uso de suelo y a la extracción de fauna, son pocos los estudios con enfoques genéticos hechos en estas regiones hasta ahora. La escasa información acerca de las características genéticas como la diversidad y estructura genética poblacional de las especies que habitan el Altiplano Potosino hace difícil desarrollar estrategias integrales y específicas de conservación y manejo para la avifauna de la región. Es necesario generar información genética que permita plantear estrategias adecuadas para la conservación de la biodiversidad en las zonas áridas y semiáridas de la región. De acuerdo a estas necesidades se planteó el objetivo de analizar y describir la diversidad y estructura genética poblacional en tres especies de aves residentes para los que se registró una tendencia a presentar diferentes niveles de fidelidad al territorio con base a la proporción de recapturas ( $P = 0.08$ ), el pinzón mexicano (*Haemorhous mexicanus*, porcentaje de recapturas = 3.06%,  $n = 163$ ), el rascador pardo (*Melospiza fusca*, porcentaje de recapturas = 10.35%,  $n = 58$ ) y la matraca del desierto (*Campylorhynchus brunneicapillus*, porcentaje de recapturas = 7.54%,  $n = 53$ ) así como determinar el flujo genético poblacional para cada especie en tres localidades.

## **Materiales y métodos**

### *Área de estudio*

La zona de estudio se encuentra localizada entre los municipios de Charcas y Catorce, San Luis Potosí. Incluye tres localidades: La Cardoncita (LC), Presa de Santa Gertrudis (PSG) y Guadalupe Victoria (GV) (UTM: E271793.37 N2610708.64, E278059.47 N2599525.12, E276057.75 N2582923.98 Zona 14N) pertenecientes a un área conocida como la zona ixtlera (Figura 1). Cada una de estas localidades corresponde a las poblaciones *a priori* que se establecieron para llevar a cabo los análisis genéticos. La vegetación del área se caracteriza por la presencia de matorral micrófilo-rosetófilo subinerme dominado por *Yucca spp.* en el estrato arbóreo y por *Larrea tridentata* y *Flourensia cernua* en el arbustivo (Rzedowski, 1961) además de una alta diversidad de especies dentro de la familia Cactaceae. El área está conformada por zonas de lomerío suave y montañas de poca altura que permiten el escurrimiento de agua pluvial hacia las zonas bajas; con una altitud que va desde los 2000 a 2300 m, la precipitación promedio anual es de alrededor de 350 mm, con un rango de temperatura promedio anual que oscila de 10°C a 20°C (INEGI, 2009a, b).

### *Colecta de sangre y extracción de ADN*

Utilizando 20 redes ornitológicas (2.5 m x 12 m) distribuidas al azar dentro de cada uno de los sitios de muestreo se colectaron individuos de *H. mexicanus*, *M. fusca* y *C. brunneicapillus*. Las redes permanecieron abiertas desde el amanecer hasta la puesta del sol durante tres días en cada sitio. Las aves se capturaron en tres

periodos, el primero en la época no reproductiva (agosto-noviembre) del 2012, el segundo y el tercero en las épocas reproductiva (marzo-mayo) y no reproductiva (septiembre-noviembre) del 2013. De cada individuo capturado se tomó una muestra de sangre de aproximadamente 200 µl por medio de punción de la vena yugular (Canales-Delgadillo *et al.* 2012). Estas muestras fueron colocadas en tubos eppendorf preparados con 1 ml de buffer de preservación Longmire (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% SDS) que permite el almacenaje de muestras de sangre a temperatura ambiente sin que la integridad del ADN se vea comprometida (Longmire *et al.* 1988). En el laboratorio, las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento. De cada una de las muestras de sangre se extrajo el ADN utilizando el kit de extracción DNeasy blood & tissue (Qiagen, Venlo Netherlands) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para comprobar la integridad del ADN se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1% de cada extracción y también se cuantificó la concentración y pureza de cada muestra con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

#### *Amplificación por PCR*

Idealmente, un estudio de genética poblacional se debe hacer con marcadores altamente variables, ya sea especie específicos o multiespecie probados en diferentes taxa. Oh y Badyaev (2009) aislaron 17 secuencias de microsatélites altamente polimórficos para *H. mexicanus*, especie que es considerada como modelo en estudios de genética poblacional, selección sexual y epizootología de enfermedades. De este set de marcadores se eligieron los 15 que reportaron el

polimorfismo más alto para tratar las muestras de este estudio (Tabla 1). Por otro lado, Dawson *et al.* (2013) diseñaron 24 pares de oligonucleótidos denominados CAM (Microsatélites Aviares Conservados, por sus siglas en inglés) a partir del genoma de pollo (*Gallus gallus*) y pinzón cebrado (*Taeniopygia guttata*) y que han sido probados en 17 especies de aves passeriformes y cinco no passeriformes con resultados favorables. Debido a que hasta la fecha no existen marcadores especie-específico para *M. fusca* ni para *C. brunneicapillus*, se eligieron 11 de estos marcadores para caracterizar los genotipos de los individuos que se colectaron (Tabla 1).

Los fragmentos de ADN fueron amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para las tres especies se llevaron a cabo reacciones en un volumen de 25  $\mu$ l. En el caso de *H. mexicanus* cada reacción estuvo compuesta por 20-50 ng de DNA total, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 225  $\mu$ M de cada dNTP, 0.125  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, California) y 1x de buffer Green GoTaq (Promega, Inc). A las muestras de esta especie se les aplicó el siguiente tratamiento térmico: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 seg, alineación a 60°C / 63°C por 20 seg, extensión a 65°C por 45 seg, y un paso de extensión final a 65°C por 5 min. En el caso de *M. fusca* y *C. brunneicapillus* la composición de las reacciones fue la misma con la diferencia de que en estas reacciones se usó buffer sin colorante y que el oligonucleótido forward de cada par se marcó con un fluoróforo (HEX, 6FAM o NED; Applied Biosystems, Foster City, California). Las condiciones térmicas para la amplificación de los fragmentos fueron:

desnaturalización inicial de 94°C por 3 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineación a 55°C por 20 seg y extensión a 72°C por 45 seg, y un paso de extensión final a 72°C por 5 min. Todas las reacciones amplificadas en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Foster City, California) y en un MJMini (BioRad, Hercules, California).

### *Caracterización de genotipos*

Para la caracterización de los genotipos se utilizaron dos métodos diferentes. Los productos de PCR obtenidos a partir de las muestras de *H. mexicanus* fueron separados utilizando electroforesis en geles de agarosa Metaphor (MAGE) debido a que los oligonucleótidos no estaban marcados con fluoróforo. MAGE es un procedimiento que utiliza una agarosa especial para electroforesis de alta resolución que permite separar productos de ADN cuyos tamaños difieren en un rango de 2% y hace posible detectar alelos que van de 20 hasta 800 pb (Asif *et al.* 2008). Para estimar los tamaños alélicos se utilizaron geles al 2.5%, en los que se cargaron 5 µl de cada producto de PCR. A estos geles se les aplicó una corriente 80mV durante 3 horas después de lo cual fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio [10 mg/ml] para visualizarlos con un fotodocumentador con luz UV. De cada uno de los geles se tomó una fotografía para cuantificar el tamaño de los alelos con el software GelAnalyzer (Lazar, 2010) tomando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb.

Los productos de PCR obtenidos a partir de las muestras de *M. fusca* y *C. brunneicapillus* fueron separados por medio de electroforesis capilar en un secuenciador Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, Foster City, California)

y analizados con el software GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems, Foster City, California).

### *Diversidad genética y estructura poblacional*

Utilizando los genotipos obtenidos para cada especie se determinaron los niveles de heterocigocidad ( $H_o$ ), el número de alelos y el rango alélico por locus, además de las expectativas del Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). La partición de la varianza genética del conjunto de datos se determinó en diferentes niveles jerárquicos por medio de un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). Debido a que se ha demostrado que los loci microsatélites poseen una tasa de mutación mayor a la de otros marcadores, las distancias genéticas entre sitios de muestreo se determinaron a través del método de la suma de cuadrados de la diferencia de los tamaños o repeticiones del microsatélite o RST (Slatkin, 1995). La tasa de migración entre sitios o flujo genético se calculó como el número total de individuos intercambiados por generación entre cada par de sitios ( $N_{em}$ ). Todos estos análisis se llevaron a cabo utilizando Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Para determinar si el número de poblaciones establecidas *a priori* para cada especie, corresponde al número de clusters genéticos en los datos, de acuerdo a las frecuencias alélicas dadas por los genotipos, se utilizaron los programas Structure 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000) y Geneland 4.0.4 (Guillot *et al.* 2005). Ambos programas utilizan algoritmos bayesianos para estimar en forma probabilística el número de poblaciones genéticas en un conjunto de datos. Las poblaciones son determinadas a partir de las frecuencias alélicas de tal forma que los grupos que se obtienen estarán bajo los supuestos del HWE. Se examinó la correlación entre

la distancia genética y la distancia geográfica de cada una de las muestras de cada especie por medio de una prueba de Mantel para determinar si existe aislamiento por distancia (IBD), además se hizo un análisis de autocorrelación espacial utilizando las coordenadas geográficas de cada individuo capturado para determinar si existe una estructura poblacional relacionada a la distribución de los individuos en el área de estudio. Ambos análisis se llevaron a cabo en GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).



## Resultados

### *Diversidad genética*

Se caracterizaron los genotipos de 106 muestras de *H. mexicanus*, 40 de *M. fusca* y 16 de *C. brunneicapillus*. El número promedio de alelos por locus entre localidades para *H. mexicanus* fue 18.08 (s.d. = 4.14) con un rango de 9 a 69 alelos. *Melozone fusca* y *C. brunneicapillus* presentaron un promedio de alelos por locus de 6.51 (s.d. = 3.05) y 2.57 (s.d. = 1.39) respectivamente con un rango alélico de uno a 15 alelos para ambas especies. Los valores específicos de cada localidad se muestran en la tabla 2. En general, *H. mexicanus* presentó valores de  $H_o$  inferiores a 0.5, lo que representa una diversidad baja con respecto a los valores de heterocigocidad esperada ( $H_e$ ). *Melozone fusca* y *C. brunneicapillus* presentaron valores de  $H_o$  y  $H_e$  menos diferenciados entre sí, indicando niveles de diversidad aceptables (Tabla 2). Se encontraron desviaciones del HWE en alrededor del 50% de los loci utilizados para todas las especies. Todos los loci utilizados en *H. mexicanus* fueron polimórficos, para *M. fusca* y *C. brunneicapillus* tres de los marcadores resultaron monomórficos (CAM05, CAM17 y CAM19).

### *Estructura poblacional*

El AMOVA reveló que la mayor parte de la varianza para *H. mexicanus* se encuentra dentro de los individuos sin importar a qué población establecida *a priori* pertenecen (47.3%) y entre los individuos dentro de las poblaciones (46.91%); para *M. fusca* la mayor parte de la varianza (98.13%) se encontró dentro de las poblaciones mientras que para *C. brunneicapillus* (98.57%) se encontró dentro de

los individuos sin tomar en cuenta las poblaciones establecidas *a priori*, respectivamente. Los valores globales de RST fueron bajos para las tres especies (0.01 – 0.05) siendo estadísticamente significativo solo para *H. mexicanus* (0.057,  $P = 0.008$ ). Los valores globales del coeficiente de endogamia (FIS) fueron bajos para *M. fusca* y *C. brunneicapillus* en comparación con *H. mexicanus* donde se obtuvo un valor de 0.497 ( $P = <0.01$ ) (Tabla 3).

La comparación por pares de los valores de RST entre poblaciones mostró niveles de diferenciación genética bajos pero estadísticamente significativos entre los grupos de muestras de *H. mexicanus*; además, de valores de endogamia estadísticamente significativos dentro de cada localidad (Tabla 4). La diferenciación genética entre los grupos de *M. fusca* fue baja pero estadísticamente significativa solamente entre los grupos LC y PSG. Los niveles de endogamia para los grupos de esta especie fueron bajos mostrando valor estadísticamente significativo solamente para LC (Tabla 4). Las muestras de *C. brunneicapillus* provenientes de PSG presentaron una diferencia genética baja pero estadísticamente significativa con respecto al grupo de GV, ninguno de los valores de endogamia fue alto ni estadísticamente significativo para esta especie (Tabla 4).

Las tasa de flujo genético ( $N_{em}$ ) estimada para *H. mexicanus* fue de 5 a 9 individuos por generación entre sitios. La tasa de  $N_{em}$  estimada para *M. fusca* fue de 18 a 20 individuos por generación entre LC y los otros dos grupos, mientras que entre GV y PSG  $N_{em} = \infty$  lo que es indicativo de que estos grupos pueden considerarse como un solo clúster. En el caso de *C. brunneicapillus* la tasa de  $N_{em}$  fue de 4 a 16 individuos por generación entre los tres grupos.

El análisis de autocorrelación espacial entre la distancia genética y la distancia geográfica entre pares de individuos mostró que ninguna de las tres especies forma una población estructurada (Figura 2). La prueba de Mantel para *H. mexicanus* y *M. fusca* concuerda con estos resultados ( $R^2 = 0.0035$ ,  $P = 0.16$ ;  $R^2 = 0.0059$ ,  $P = 0.058$ ). Aunque para *C. brunneicapillus* se muestran indicios de IBD ( $R^2 = 0.056$ ,  $P = 0.045$ ), el análisis de autocorrelación no muestra una estructura de la población (Figura 2).

Al analizar los datos por medio de Geneland y Structure con  $2 \times 10^4$  iteraciones y 30 réplicas, el número estimado de grupos genéticos varió consistentemente entre  $K=1$  y  $K=2$  (Tabla 5). De acuerdo a estos resultados se generó un nuevo grupo de datos para cada especie de acuerdo a la asignación modal de los individuos en cada clúster genético y se reanalizaron en Arlequin 3.5. En el caso de *H. mexicanus*, los resultados mostraron que los valores de diversidad genética y endogamia, cuando  $K=1$ , fueron muy similares a los resultados cuando los datos fueron tratados como tres grupos diferentes ( $H_o = 0.545$  (s.d. = 0.111);  $H_e = 0.972$  (s.d. = 0.009);  $FIS = 0.51$ ,  $P < 0.001$ ). Al examinar los resultados de  $K=2$ , se observó que a pesar de este valor, todos los individuos fueron asignados al mismo grupo genético, por lo que no se analizaron los datos divididos en dos grupos. Los valores estimados de  $H_o$  y  $H_e$  para *M. fusca* fueron muy similares cuando  $K=1$  o  $K=3$ , solamente el valor de  $FIS$  cambió significativamente de 0.05 cuando  $K=1$  a 0.12 cuando  $K=2$ . Finalmente al reanalizar los datos de *C. brunneicapillus* con  $K=1$  se observó que los valores para  $H_o$ ,  $H_e$  y  $FIS$  permanecieron prácticamente sin cambio (Figura 3).

## Discusión

### *Diversidad genética*

En general, los marcadores utilizados en las tres especies mostraron un número de alelos dentro del rango reportado (Oh y Badyaev, 2009; Dawson *et al.* 2013) a excepción de dos marcadores CAM que presentaron sólo dos alelos y dos más que fueron monomórficos. Este resultado puede estar en función de la distancia filogenética entre las especies estudiadas y las especies a partir de las cuales fueron aislados estos marcadores (Selkoe y Toonen, 2006). Adicionalmente, el tamaño de muestra para las especies en las que se utilizaron los marcadores CAM podría haber influenciado este resultado ya que tamaños de muestra pequeños tienden a enmascarar la verdadera riqueza alélica que se puede obtener con marcadores microsatélites (Gaines *et al.* 1997).

Las desviaciones del HWE pueden presentarse debido a diferentes factores que ocurren en las poblaciones, por ejemplo, alteración de las frecuencias alélicas por inmigración o emigración, mutación, tamaños poblacionales pequeños o apareamiento no azaroso entre los miembros de la población (Freeland, 2005). A pesar de que el mayor número de muestras colectadas fueron de *H. mexicanus*, los valores de diversidad genética para esta especie resultaron bajos en comparación con los valores observados en las otras dos especies. Los valores bajos de diversidad genética se presentan en poblaciones de tamaños pequeños, que experimentan apareamiento selectivo, que se encuentran bajo alguna presión de selección natural o que son sobre explotadas. En el caso de *H. mexicanus*, un tamaño poblacional pequeño es la causa menos probable de los niveles de

diversidad genética obtenidos ya que esta es una especie ampliamente distribuida en muchas regiones de Norte América y el reporte de la tendencia poblacional indica un incremento debido a la colonización de nuevas áreas (Birdlife International, 2014). Se ha demostrado que algunas poblaciones de esta especie que han sido introducidas en áreas diferentes a las de su rango original presentan una riqueza alélica disminuida en comparación con aquellas que viven en los sitios nativos debido al efecto de cuello de botella que se genera en las poblaciones de tamaño reducido (Hawley *et al.* 2006). A pesar de que las muestras de este estudio fueron colectadas dentro del rango nativo de la especie, factores como sequías muy prolongadas o la falta de regulación en la captura de estas aves para su venta como mascotas (Iñigo-Elías y Enkerlin-Hoeflich, 2003; PROFEPA, coms. pers.) podrían ser las causas de un cuello de botella no detectado en esta zona. Por otro lado, niveles bajos de diversidad genética y desviaciones del HWE pueden ser debidos a la presencia de alelos nulos. Oh y Badyaev (2009) no reportan desviaciones del HWE ni ligación de loci para ninguno de los 15 marcadores que se utilizaron en este estudio; sin embargo, los datos obtenidos muestran que algunos loci estaban ligados y se encontró una frecuencia de alelos nulos de 0.07 a 0.23 lo que puede haber influido en los bajos niveles de diversidad observados en esta especie.

En general, *M. fusca* y *C. brunneicapillus* presentaron niveles altos de diversidad genética y solo en una de las localidades (LC) se observó un nivel bajo pero estadísticamente significativo de endogamia para *M. fusca*. La mayoría de los loci presentaron desviaciones significativas del HWE para las dos especies. Es probable que los resultados del HWE en estas especies estén relacionados al

tamaño de la muestra, ya que las capturas conseguidas muy probablemente no son una muestra representativa de la población en ninguna de las dos especies.

Por otro lado, la mayor parte de las capturas para las tres especies provienen de sitios poblados o sitios cercanos a los pueblos donde las aves encuentran una mayor cantidad de recursos (alimento, agua) y al menos en el caso de *H. mexicanus*, que no presenta comportamiento territorial, podrían haberse capturado individuos de los mismos grupos familiares lo que se ve reflejado en los bajos niveles de diversidad observados y en los altos valores de endogamia además de presentar altos niveles de flujo genético. Por ser menos gregarios, *M. fusca* y *C. brunneicapillus*, es posible que se haya muestreado individuos menos relacionados en estas dos especies y por lo tanto los valores de endogamia fueron menores. Otros factores como las modificaciones al hábitat pueden afectar los niveles de diversidad genética de las especies (Amos *et al.* 2012; Galindo-González, 2007); por ejemplo, los cambios de uso de suelo por las actividades económicas de la región (Sheldon, 1980; Garza-Hurtado, 2011) provocan la fragmentación del hábitat, pero sólo en estudios de diversidad genética a grandes escalas de tiempo se ha logrado identificar una reducción significativa en la variación genética de las poblaciones que hoy existen (Larsson *et al.* 2008; Segelbacher *et al.* 2008). Una de las especies que puede verse más afectada por las actividades que involucran el aprovechamiento del estrato arbóreo es *H. mexicanus* debido a que este estrato le sirve como sitio de anidación, cobertura y alimentación. *Melospiza fusca* y *C. brunneicapillus* podrían presentar mayor tolerancia a actividades antropogénicas ya que procesos tan importantes como la anidación la llevan a cabo en arbustos (*L. tridentata* y *Cylindropuntia sp.*) que

normalmente no son aprovechados por lo habitantes. Desafortunadamente no existe información genética previa de las poblaciones en el área del presente estudio que permita hacer este tipo de comparación, lo que evidencia la necesidad de llevar a cabo estudios con muestras colectadas a lo largo de extensos periodos que cubran escalas temporales y espaciales mayores a fin de determinar si factores como la agricultura, pastoreo, minería y la extracción de especies en la zona podrían estar afectando la riqueza genética de la avifauna regional.

### *Estructura poblacional*

Aunque se ha establecido de forma general que debido a la capacidad de movimiento de las aves, sus poblaciones exhiben niveles bajos de diferenciación genética, es importante estudiar los procesos demográficos de las poblaciones (Crochet, 2000; Freeland, 2005).

El análisis de los valores RST mostró que entre los grupos de las tres especies existen niveles bajos de diferenciación con significancia estadística en algunos pares de sitios. En general, esto indica que a pesar de existir algún grado de subdivisión y de que se observaron indicios de un aislamiento por distancia en el caso de *C. brunneicapillus*, el conjunto de muestras de cada especie representa una sola población, lo que es consistente con las estimaciones del número óptimo de poblaciones (K) dados por Geneland y Structure lo que puede ser debido a que el número de muestras en cada grupo resultó pequeño. De acuerdo a los resultados, los sitios menos diferenciados se encuentran en los extremos del área de estudio y el sitio con mayores diferencias genéticas es PSG, que se encuentra localizado en la parte media. Aunque las diferencias que presenta este

sitio con los otros dos son muy bajas ( $RST = 0.01 - 0.04$ , Tabla 4), a nivel estadístico son significativas. Esto sugiere que para poder determinar en forma apropiada la estructura genética de estas poblaciones, es necesario incrementar tanto el número de muestras como la escala espacial del estudio a fin de poder tomar en cuenta las diferencias en los niveles de vagilidad de cada una de las especies ya que este es un factor importante para determinar los patrones de estructuración poblacional (Gaines *et al.* 1997). Adicionalmente, el flujo genético entre las poblaciones establecidas *a priori* para cada una de las especies fue alto y determinado como infinito entre un par de sitios para *M. fusca*, lo que evidencia un flujo constante de genes que permite que la identidad genética de estos grupos se mantenga y evita su aislamiento, confirmando que los grupos de las tres especies pertenecen a una sola población al menos en la escala espacial a la que se llevó a cabo este estudio.



## Conclusión

Este es el primer reporte sobre niveles de diversidad genética y estructura poblacional para *H. mexicanus*, *M. fusca* y *C. brunneicapillus*, aves residentes del Altiplano Potosino. Los datos sugieren que las muestras colectadas en los tres sitios para cada especie constituyen una sola población con indicios de subdivisión poblacional principalmente para *H. mexicanus*. La escala espacial a la que se llevó a cabo el análisis no fue de tamaño suficiente para determinar de forma apropiada si los niveles de diversidad genética son representativos de la o las poblaciones que habitan en el área. Los niveles de endogamia para *H. mexicanus* sugieren que la colecta incluyó individuos altamente relacionados aunque estos resultados no significan necesariamente que la población esté sufriendo erosión genética.

Es necesario complementar el estudio con muestras colectadas a distancias mayores para asegurar la representatividad de las poblaciones, evaluar la diversidad y estructura genética de las mismas y para determinar con seguridad cuáles marcadores microsatélite multiespecie (CAM) son los adecuados para estas especies o si es necesario la caracterización de marcadores especie-específicos para *M. fusca* y *C. brunneicapillus*.

## **Agradecimientos**

Este trabajo forma parte del Proyecto de Investigación de Ciencia Básica de CONACYT con clave CB-2012-1-183377. MTR-P agradece a CONACYT por la beca otorgada para la realización de este estudio. Todos los autores agradecen la participación de Armando Carlos, Jachar Arreola y Karina Monzalvo que ayudaron en el trabajo de campo. La colecta de muestras se hizo con el permiso correspondiente otorgado por SEMARNAT con número FAUT-0157.

## Referencias

Amos JN, Bennet AF, MacNally R, Newell G, Pavlova A, Radford JQ, Thomson JR, White M, Sunnucks P (2012) Predicting landscape-genetic consequences of habitat loss, fragmentation and mobility for multiple species of woodland birds. *Plos One*, **7**(2), e30888.

Asif M, Mehboob-ur-Rahman, Mirza JI, Zafar Y (2008) High resolution metaphor agarose gel electrophoresis for genotyping with microsatellite markers. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, **45**(1), 75-79.

Bennet AF, Saunders DA (2010) Habitat Fragmentation and landscape change en Sodhi N, Ehrlich PR (Editores) *Conservation Biology for All*. Oxford University Press. Reino Unido.

Berube M, Aguilar A, Dendato D, Larsen F, Notarbartolo Di Sciara G, Sears R, Sigurjonsson J, Urban-R J, Palsboll PJ (1998) Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Ecology*, **7**, 585–599.

Birdlife International (2014) Species factsheet: *Carpodacus mexicanus*. <http://www.birdlife.org> on 05/08/2014.

Canales-Delgadillo JC, Scott-Morales L, Korb J (2012) The influence of habitat fragmentation on a genetic diversity of a rare bird species that commonly faces environmental fluctuations. *Journal of Avian Biology*, **43**, 168-176.

Crochet PA (2000) Genetic structure of avian populations – allozymes revisited. *Molecular Ecology*, **9**, 1463-1469.

Dawson DA, Horsburgh GJ, Küpper C, Stewart IRK, Ball AD, Durrant KL, Hansson B, Bacon B, Bird S, Klein A, Krupa AP, Lee JW, Martín-Galvez D, Simeoni M, Smith G, Spurgin LG, Burke T (2010) New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer set of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 475-494.

Dawson DA, Ball AD, Spurgin LG, Martín-Galvez D, Stewart IRK, Horsburgh GJ, Potter J, Molina-Morales M, Bicknell AWJ, Preston SAJ, Elknöm R, Slate J, Burke T (2013) High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, **14**, 176.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suit version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564-567.

Freeland JR (2005) *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons. Ltd. Ingleterra.

Gaines MS, Diffendorfer JE, Tamarin RH, Whittam TS (1997) The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *The Journal of Heredity*, **88**, 294-304.

Galindo-González J (2007) Efectos de la fragmentación del paisaje sobre las poblaciones de mamíferos, el caso de los murciélagos de Los Tuxtlas, Veracruz en *Tópicos de sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos*, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, 97-114.

Garza-Hurtado RF *Respuesta de la avifauna a los cambios en la estructura vegetal en un gradiente de degradación del altiplano potosino*. Tesis de maestría. IPICYT, 2011.

Guillot G, Mortier F, Stoup A (2005) Geneland 4.0.4: A computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 708-711.

Hawley DM, Hanley D, Dhondt AA, Lovette IJ (2006) Molecular evidence for a founder effect in invasive house finch (*Carpodacus mexicanus*) populations experiencing an emergent disease epidemic. *Molecular Ecology*, **15**, 263-275.

INEGI (2009a) Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Catorce, San Luis Potosí. <http://www3.inegi.org.mx>

INEGI (2009b) Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Charcas, San Luis Potosí. <http://www3.inegi.org.mx>

Íñigo-Elías E, Enkerlin\_Hoeflich EC (2003) Amenazas, estrategias e instrumentos para la conservación de las aves en Gomez de Silva H, Oliveras A (Editores) Conservación de aves, experiencias en México. CIPAMEX. México.

Larsson JK, Jansman HAH, Segelbacher G, Höglund J, Koelewijn HP (2008) Genetic impoverishment of the last blackgrouse (*Tetrao tetrix*) population in the Netherlands: detectable only with a reference from the past. *Molecular Ecology*, **17**, 1897-1904.

Longmire JL, Lewis AK, Brown NC, Buckingham JM, Clark LM, Jones MD, Meincke LJ, Meyne J, Ratliff RL, Ray FA, Wagner RP, Moyzis RK (1998) Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandem repeat in the family Falconidae. *Genomics*, **2**, 14-24.

Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) *Ecological Genetics. Design, analysis and applications*. Blackwell Publishing. EUA.

Oh KP, Badyaev AB (2009) Isolation and characterization of 17 microsatellite loci for house finch (*Carpodacus mexicanus*). *Permanent Genetic Resources Note*, 1029-1031

Oyler-McCance SL, Leberg PL (2005) Conservation genetics in wildlife management en Braun C.E (Editor) *Techniques for Wildlife Investigation and Management*. 6a. Edición. Bethesda The Wildlife Society Press.

Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Forest PA (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, **79**(2), 361-282.

Sheldon S (1980) Ethnobotany of *Agave lecheguilla* and *Yucca carnerosana* in Mexico's Zona Ixtlera. *Economic Botany*, **34**(4), 376-390.

Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539. Peakall R. and Smouse P.E. (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.

Rentería M. Breve revisión de los marcadores moleculares en Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (Compiladores). *Ecología Molecular* (2007) 1a. Edición. SEMARNAT, CONABIO, UNAM. México.

Rzedowski J *Vegetación del estado de San Luis Potosí*. PhD Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, 1961.

Segelbacher G, Manel S, Tomiuks J (2008) Temporal and spatial analyses disclose consequences of habitat fragmentation on the genetic diversity in capercaillie (*Tetrao urogallus*). *Molecular Ecology*, **17**, 2356-2367.

Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, **9**, 615-629.

Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.



### **Acceso a datos**

Números de acceso para oligonucleótidos Hofi FJ467625 – FJ467630, FJ467632 – FJ467636, FJ467638 – FJ467641; Secuencias microsatélite CAM Dawson *et al.* 2013, doi:10.1186/1471-2164-14-176.

### **Contribuciones de los autores**

LCV, MTR-P y JCC-D concibieron el estudio, MTR-P, JCC-D y LCV colectaron las muestras; MTR-P y JCC-D procesaron las muestras y generaron los datos moleculares; MTR-P y JCC-D analizaron los resultados, MTR-P y JCC-D elaboraron el manuscrito, todos los autores revisaron el manuscrito y aprobaron la versión final.

## Leyendas de tablas y figuras

**Tabla 1.** Oligonucleótidos de los microsatelites de *H. mexicanus* (Hofi) y multiespecie (CAM) utilizados para la diversidad en genética de poblaciones.

**Tabla 2.** Diversidad genética de *Haemorhous mexicanus*, *Melospiza fusca* y *Campylorhynchus brunneicapillus* en las tres localidades. Loc: Localidad, GV: Guadalupe Victoria, PSG: Presa Santa Gertrudis, LC: La Cardoncita, Na: número de alelos, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, d.e: desviación estándar.

**Tabla 3.** Diferenciación genética e índice de endogamia global para las tres especies de aves.

**Tabla 4.** Comparación de los valores RST entre pares de localidades. Bajo la diagonal se presentan los valores de RST, sobre la diagonal el valor de p correspondiente siendo significativos ( $p \leq 0.05$ ) los que se muestran en negritas. También se muestra el valor de FIS por localidad para cada especie, los asteriscos indican el nivel de significancia (\*  $\leq 0.05$ , \*\*\*  $\leq 0.001$ ).

**Tabla 5.** Determinación de número de K por medio de los programas Structure y Geneland.  $2 \times 10^4$  iteraciones y 30 réplicas.

**Figura 1.** Mapa de la zona de estudio. Localidades de muestreo en la zona ixtlera de San Luis Potosí.

**Figura 2.** Análisis de autocorrelación espacial entre la distancia genética y la distancia geográfica entre pares de individuos por especie. La línea sólida representa los estimados de correlación ( $r$ ) y las barras la variación de estos estimados en diferentes clases de distancia, la líneas punteadas representan los niveles superior e inferior (U y L) de los intervalos de confianza (95%, 9999 permutaciones). A: *H. mexicanus*, B: *M. fusca*, C: *C. brunneicapillus*.

**Figura 3.** Comparación de los estimados de  $H_o$ ,  $H_e$  y FIS cuando  $K=1$ ,  $K=2$  y  $K=3$  para cada una de las especies. Hmex: *H. mexicanus*, Mfus: *M. fusca* y Cbru: *C. brunneicapillus*.

## Tablas y figuras

Locus	Microsatélite	Oligonucleótido forward 5'-3'	Oligonucleótido reverse 5'-3'
<i>Hofi07</i>	(GT) <sub>19</sub>	CTGGAAGCACTGGGGTCACT	CTTGCCCTGACAGGGTGGTC
<i>Hofi10</i>	(GT) <sub>19</sub>	TTGGCCCAGATTTCTACCAC	CAGACCAGATTCCCCAAATC
<i>Hofi16</i>	(GT) <sub>28</sub>	AAGAGGAGCACTGGTATTTGC	TCATGAGGTGGGTTCCTACG
<i>Hofi19</i>	(GT) <sub>4</sub> AC(GT) <sub>23</sub>	TCAGGCAAGGTAGCAGGAC	TTTTAGATGACAGTTATGGCACTATC
<i>Hofi26</i>	(CA) <sub>23</sub>	GCTCAGACAGCTGGGACTG	GCTGGTGGGAAGAGCATC
<i>Hofi29</i>	(GT) <sub>27</sub>	AGCCAGGACAGAGCAGATCC	CATTTTCTCTGGGTGAGAAAGC
<i>Hofi35</i>	(GT) <sub>32</sub>	GCCCAGGGACACAGTAAATG	AACATCCCGTGGCAAAGTC
<i>Hofi39</i>	(GT) <sub>22</sub>	GCAGATGTGATCATGCTGAAG	GCAGCCACTCAAGATTTTGTGTC
<i>Hofi53</i>	(TA) <sub>3</sub> (GT) <sub>18</sub>	GTGGGTGTCTGCTAAGATGC	CTGGTTTTGGTACACGGTTG
<i>Hofi69</i>	(CA) <sub>21</sub>	CAACATGCTGTAATCCCAACTC	CCTTTTGGTCATTCCACTTCTATC
<i>Hofi70</i>	(CA) <sub>21</sub>	GCAGGCAACATCCATGAAG	CCGGATCGTTTTGTTTCATC
<i>HofiACAG07</i>	(GACA) <sub>11</sub>	AGAAGATGGGTTAGCAGCTGAG	CCAAGGGATCCTCCTGATG
<i>HofiACAG15</i>	(CTGT) <sub>8</sub> CC(GTCT) <sub>5</sub>	CACCTTTCCCCACCGAAG	AAGTGAGCTCCCGTCAAAGC
<i>HofiACAG18</i>	(CAGA) <sub>14</sub>	TTCATGAAGCCACGCTACAG	GCAGCCTCCTGGTAAAGAAG
<i>HofiACAG25</i>	(CTGT) <sub>11</sub>	GATTTTTGAACCCCAGACTC	TAGCTGCATCCAGCACCAGT
CAM01-F1	(CA) <sub>18</sub>	AAAGGCCAAGACCAGTATG	CTCTCATCCACCCTGTTAGC
CAM02-F2	(CA) <sub>16</sub>	GAATTAAGATAGCAGATGCAGG	AGCTGATGAAATGAGAATGCAG
CAM05-R1	(CA) <sub>17</sub>	TTACACAGACTGCAAACCGC	CTCTTGCTCTAGTAATGAGATCCTG
CAM06	(AT) <sub>8</sub>	GTGATGGTCCAGGTCTTGC	CAAGAGGAACAGATGAGGGTC
CAM13	(TA) <sub>12</sub>	TCCAAATACAGCAGCAGGCAG	TTCATTACCAAACAGCATCCAG
CAM17	(TG) <sub>12</sub>	CGGGTTGTAATCAAGAAGATGC	CTGCGGAGCAATTAACGC
CAM18	(TA) <sub>11</sub>	TTAAGAAGTTTACACCCAGCG	GCTAAATAACAGAGCCAGGAAG
CAM19-F1	(GT) <sub>9</sub>	TCTTGAGGCAGATAAGAAGTG	GAGCAAGCAAAGATCACAAGC
CAM20-F	(AT) <sub>11</sub>	TAACAGGCAGGAATGCAGG	TCAGCCAGTGTGGAGGTC
CAM23-R1	(TG) <sub>18</sub>	CTCCACTTAGCTTGTAATGCAC	CCAAGAAGTGCCTAGATGTC
CAM24	(CA) <sub>13</sub>	CCCCTTCAGTCTTCAGAGC	TGGAGTATTTGGGATTGGAG

**Tabla 1.**

Espece	Loc.	Na ± s.d.	Ho ± s.d.	He ± s.d.
<i>H. mexicanus</i>	GV	12.73 ± 2.25	0.466 ± 0.18	0.948 ± 0.020
	PSG	20.66 ± 3.15	0.425 ± 0.110	0.963 ± 0.013
	LC	47.26 ± 9.8	0.459 ± 0.115	0.971 ± 0.009
<i>M. fusca</i>	GV	7.70 ± 3.59	0.633 ± 0.229	0.775 ± 0.131
	PSG	6.18 ± 2.44	0.643 ± 0.246	0.706 ± 0.232
	LC	6.27 ± 2.76	0.681 ± 0.223	0.722 ± 0.206
<i>C. brunneicapillus</i>	GV	3.87 ± 1.88	0.642 ± 0.296	0.623 ± 0.225
	PSG	2.33 ± 0.707	0.666 ± 0.353	0.666 ± 0.166
	LC	3.12 ± 0.99	0.550 ± 0.256	0.566 ± 0.198

**Tabla 2.**

Espece	RST	P	FIS	P
<i>H. mexicanus</i>	0.057	0.008	0.497	<0.01
<i>M. fusca</i>	0.017	0.570	0.042	0.208
<i>C. brunneicapillus</i>	0.054	0.462	-0.042	0.741

**Tabla 3.**

	<i>H. mexicanus</i>				<i>M. fusca</i>				<i>C. brunneicapillus</i>			
	GV	PSG	LC	FIS	GV	PSG	LC	FIS	GV	PSG	LC	FIS
GV	*	<b>0.018</b>	<b>0.010</b>	0.339***	*	0.486	0.081	0.098	*	<b>0.045</b>	0.162	-0.069
PSG	0.089	*	<b>0.015</b>	0.549***	-	*	<b>0.036</b>	-0.214	0.045	*	0.234	0.091
LC	0.089	0.051	*	0.509***	0.004	0.024	*	0.102*	0.162	0.234	*	-0.026

**Tabla 4.**

	K	
Espece	Structure	Geneland
<i>H. mexicanus</i>	2	1
<i>M. fusca</i>	2	1
<i>C. brunneicapillus</i>	1	-

**Tabla 5.**

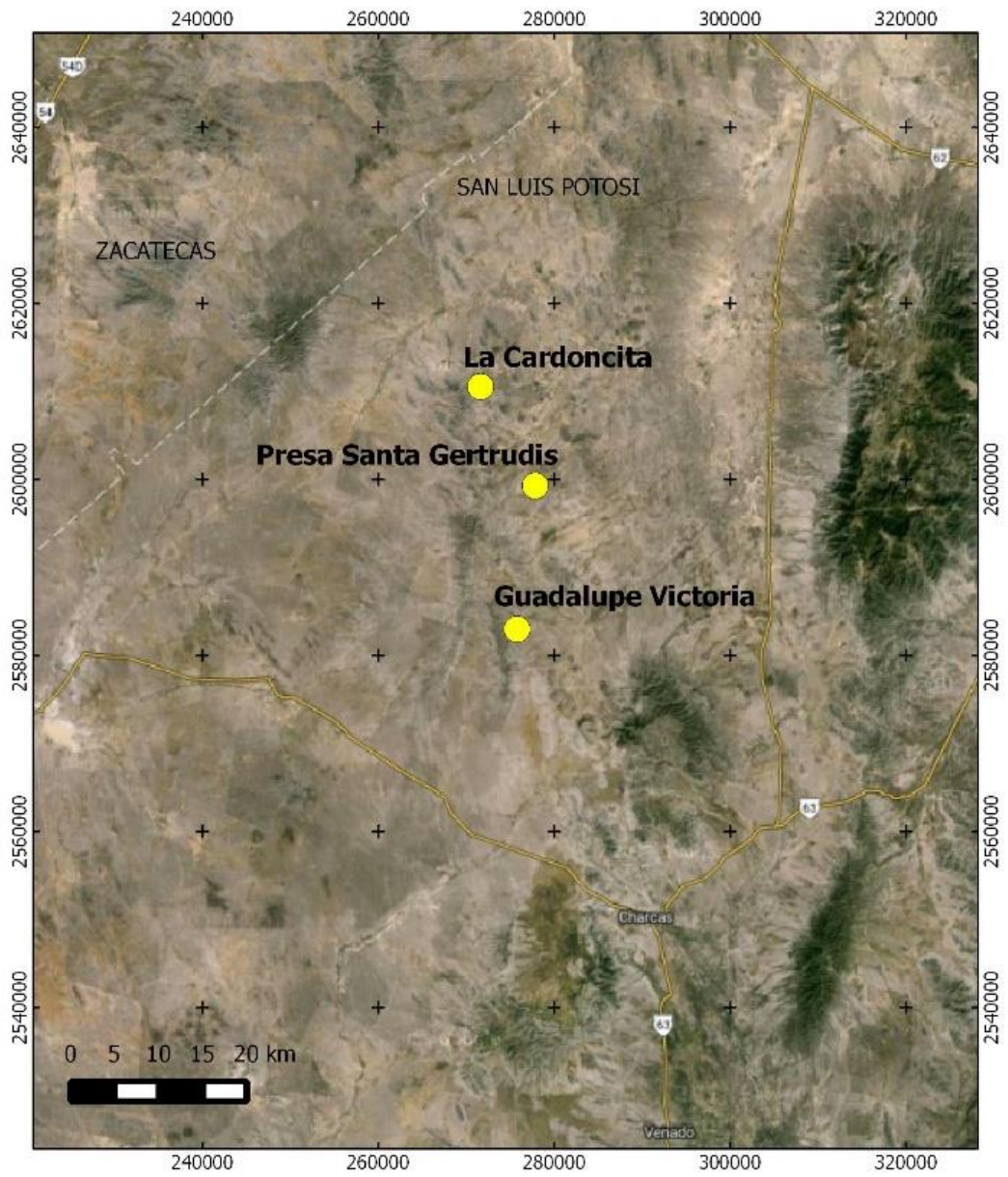


Figura 1.

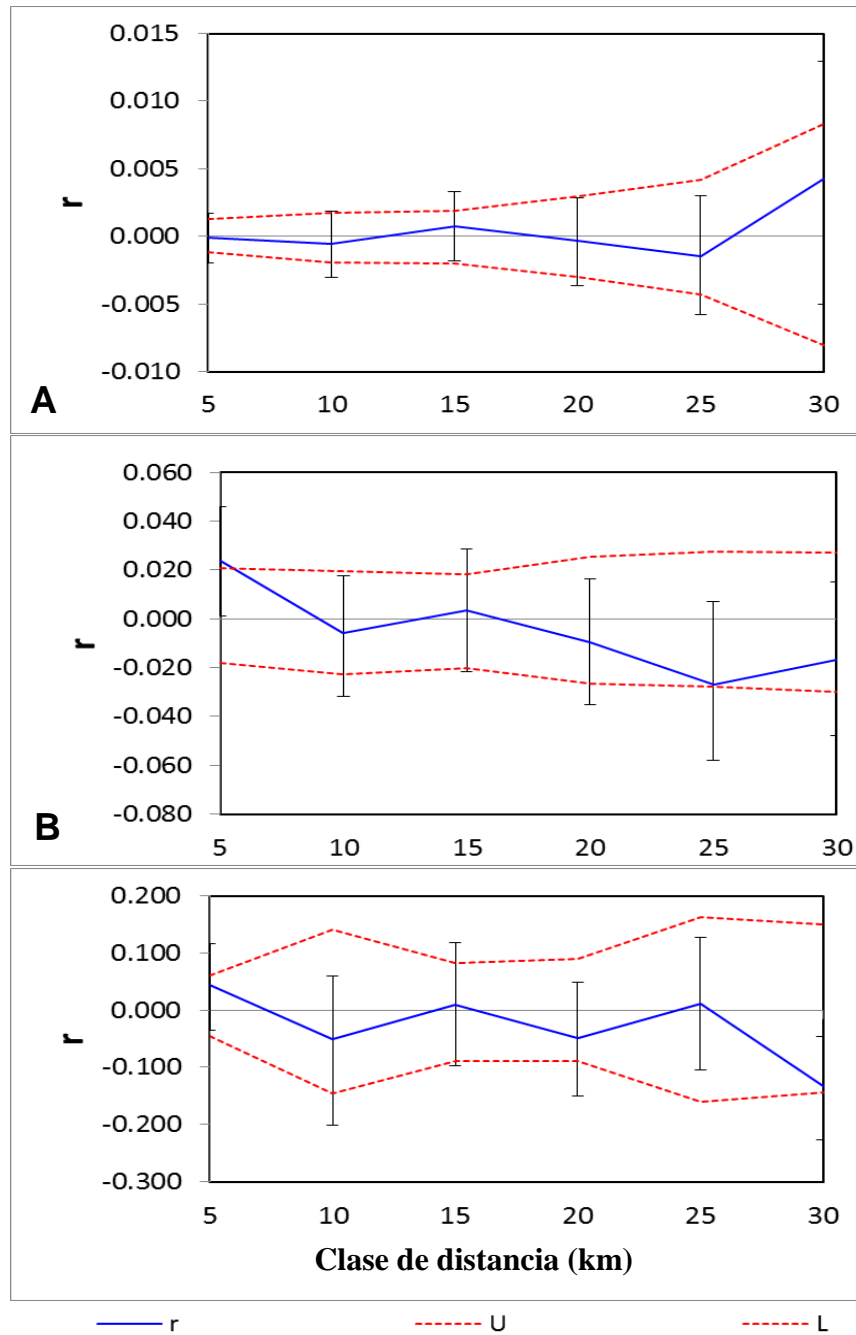
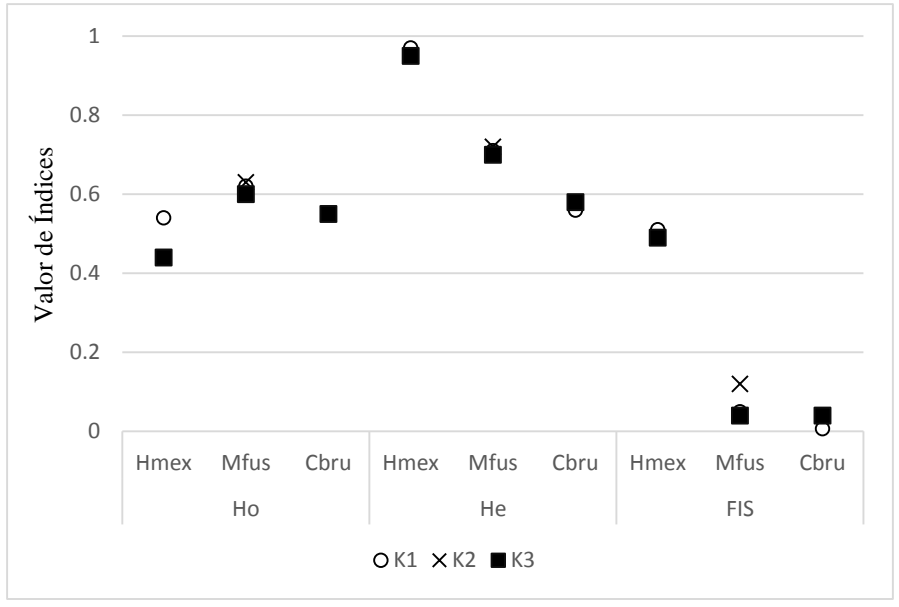


Figura 2.



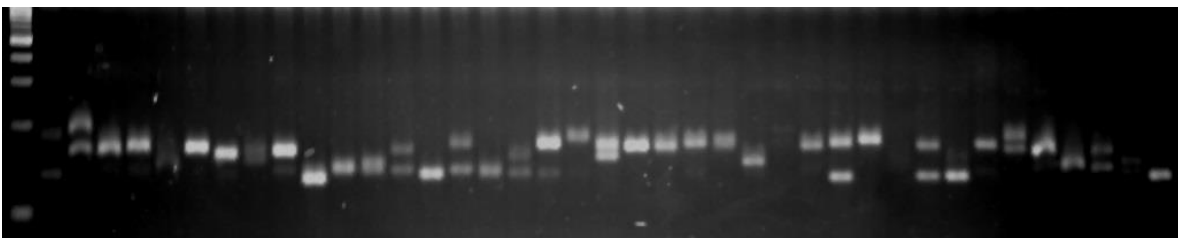
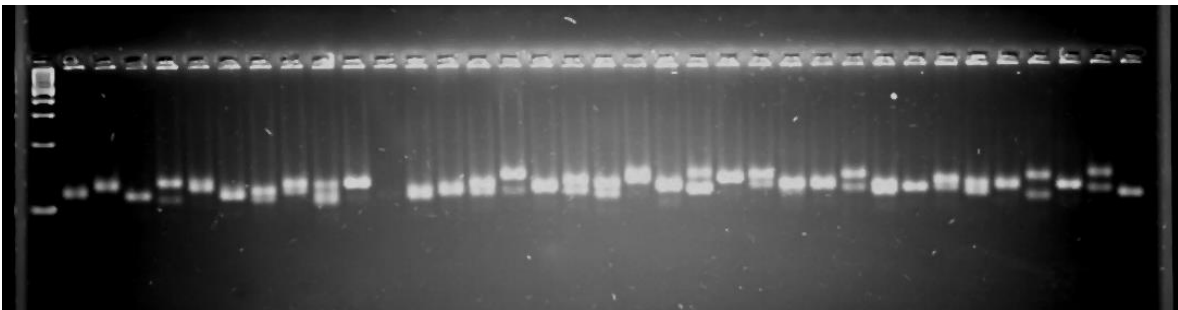
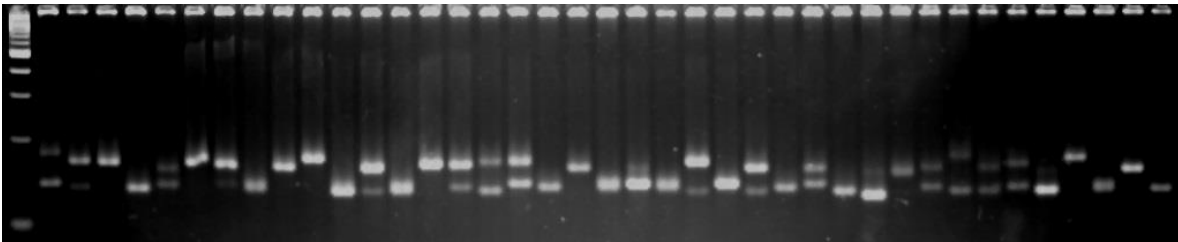
**Figura 3.**



## Material suplementario

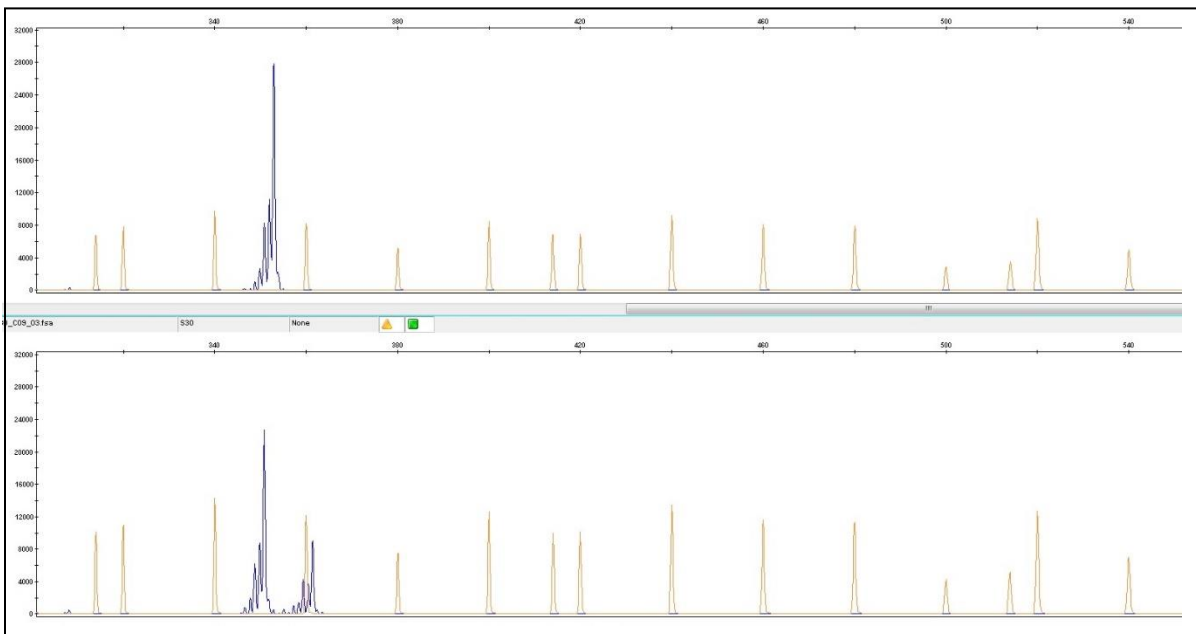
### *Genotipificación por medio de electroforesis en gel.*

Ejemplo de imágenes que se obtuvieron de electroforesis en gel de agarosa Metaphor. Cada carril corresponde a la amplificación de un marcador Hofi a partir de ADN de individuos diferentes de *Haemorrhous mexicanus*. Todos lo geles se corrieron con un marcador de tamaño molecular 100 pb (primer carril, extremo izquierdo). Las muestras con una banda corresponden a los individuos homocigotos para ese microsatélite, mientras que las que presentan dos bandas, son los heterocigotos para ese marcador.

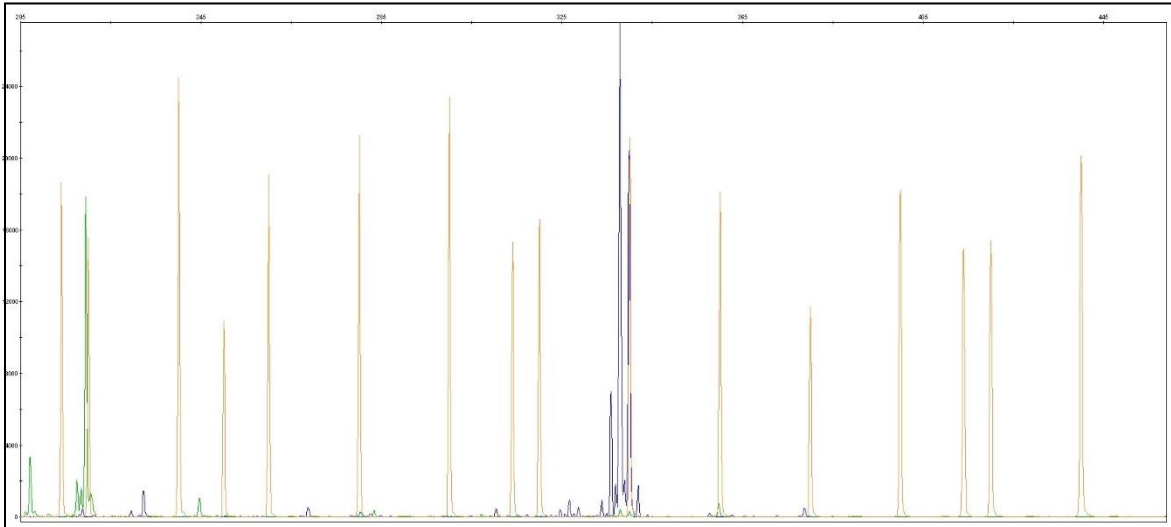


*Genotipificación por medio de electroforesis en capilar.*

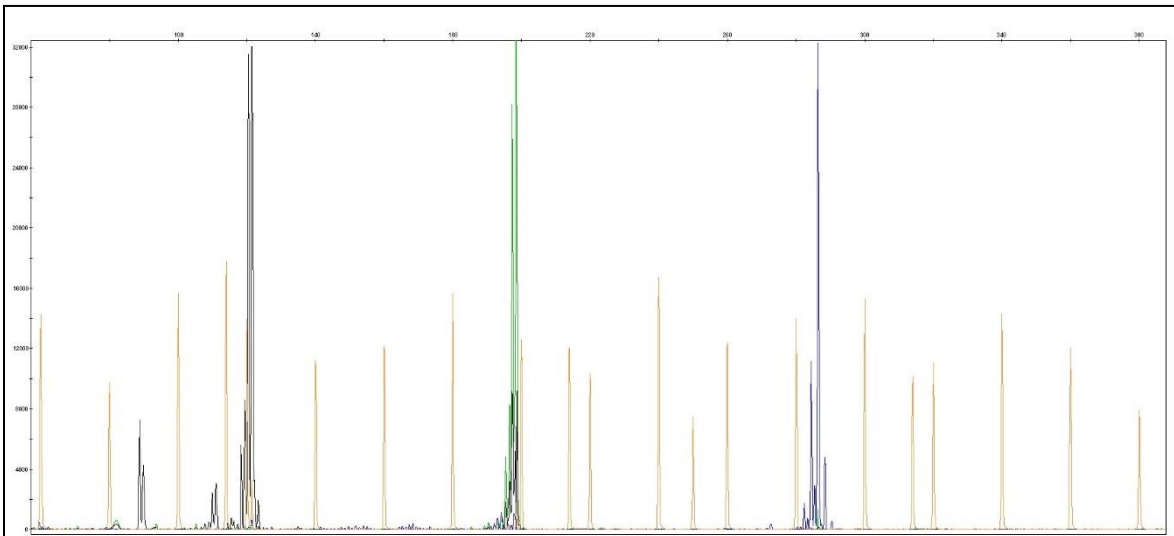
Ejemplo de imágenes que se obtuvieron de electroforesis en capilar en un secuenciador Genetic Analyzer 3500 para la genotipificación de los individuos de *Melozone fusca* y *Campylorrhynchus brunneicapillus* con microsatélites CAM.



Muestra la señal de un marcador CAM amplificado a partir de dos individuos diferentes. La señal de arriba corresponde a un homocigoto y la de abajo a un heterocigoto donde se presentan dos picos en color azul. Los picos en color naranja corresponden a la señal del marcador de tamaño (Size standard Liz 600).



Muestra la señal de dos marcadores CAM diferentes amplificados a partir de ADN de un individuo. Cada color corresponde a un microsatélite (verde y azul). Los picos en color naranja corresponden a la señal del marcador de tamaño (Size standard Liz 600).



Muestra la señal de tres marcadores CAM diferentes amplificados a partir de ADN de un individuo. Cada color corresponde a un microsatélite (negro, verde y azul). Los picos en color naranja corresponden a la señal del marcador de tamaño (Size standard Liz 600).

## CAPITULO 2

# Prevalencia y diversidad de parásitos haemosporidios en aves del Altiplano Potosino

María Teresa Reinoso-Pérez<sup>1</sup> [maria.reinoso@ipicyt.edu.mx](mailto:maria.reinoso@ipicyt.edu.mx)

Julio César Canales-Delgadillo<sup>1</sup> [julio.canales@ipicyt.edu.mx](mailto:julio.canales@ipicyt.edu.mx)

Leonardo Chapa Vargas<sup>1</sup> [lchapa@ipicyt.edu.mx](mailto:lchapa@ipicyt.edu.mx)

Gerardo Rafael Argüello Astorga<sup>1</sup> [grarguel@ipicyt.edu.mx](mailto:grarguel@ipicyt.edu.mx)

Lina Riego Ruiz<sup>1</sup> [lina@ipicyt.edu.mx](mailto:lina@ipicyt.edu.mx)

<sup>1</sup> Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica  
Camino a la Presa San José #2055  
Colonia Lomas 4<sup>a</sup>. Sección  
C.P. 78216 San Luis Potosí, S.L.P. México.

Autor de correspondencia:

## Resumen

Debido al auge que los trabajos sobre ecología, biología evolutiva y biología de la conservación han tenido en las últimas cuatro décadas, el estudio de los haemosporidios aviares ha surgido como una herramienta para entender cómo estos parásitos afectan a las poblaciones naturales y si su presencia está relacionada a la pérdida y la fragmentación del hábitat y el cambio climático. Dado que el Altiplano Potosino forma parte de la ruta migratoria de muchas aves de Norteamérica es importante llevar a cabo estudios en esta zona que nos permitan conocer la riqueza específica de estos parásitos y las relaciones que tienen con las aves nativas y residentes. Se determinó la presencia de haemosporidios en tres especies de aves residentes del Altiplano Potosino por medio de microscopía óptica y amplificación molecular de un fragmento del gen de citocromo *b* de los parásitos. Se estimó la prevalencia de infección en cada especie aviar y se investigaron las posibles relaciones que ésta tiene con el deterioro al hábitat por el pastoreo y extracción de especies arbóreas así como con la distancia a cuerpos de agua. Se detectó una alta carga parasitaria en dos de las tres especies bajo estudio. Se identificaron cuatro linajes de haemosporidios presentes en la zona con prevalencia en general cercana al 50%. En los sitios con degradación baja y moderada la carga parasitaria fue mayor que en aquellos con alta calidad de hábitat. No se encontró una relación entre distancia a cuerpos de agua y carga parasitaria. Dos de las secuencias obtenidas del fragmento del citocromo *b* de los parásitos representan un linaje que no ha sido reportado hasta ahora.

**Palabras clave:** aves, haemosporidios, zonas áridas, modificación del hábitat.

## Abstract

Due to the growing interest in ecology, evolutionary and conservation biology in the last four decades, studies on avian haemosporidians have become a tool to understand how these parasites affect wild bird populations and if their presence is related to habitat loss, habitat fragmentation and climate change. Considering that the Highland Plateau of San Luis Potosí (Altiplano Potosino) is part of the North American birds' migratory route, it is important to carry out studies in this area in order to know the haemosporidian's species richness and their relationships with native and resident birds. The current study investigated the presence of avian haemosporidians in three resident birds through microscopy and PCR amplification of a fragment of haemosporidian's cytochrome *b*. The infection prevalence was estimated on each species; the possible relationship between prevalence and habitat modifications due to grazing or water bodies was assessed. High levels of parasitemia were recorded in two of the three bird species included in this study. Four lineages of haemosporidians were identified in the study area with prevalence near to 50%. Areas with low and moderate habitat quality showed higher parasitemia levels than areas with high habitat quality, a relationship between intensity of parasitemia and distance from water bodies was not found. There was no significant difference in prevalence and intensity of parasitemia between the two bird species infected with the parasites. Two of the sequences obtained from parasite's cytochrome *b* represent a lineage that is reported for the first time.

**Key words:** haemosporidian, birds, arid zones, habitat modifications.

## Introducción

Los parásitos del orden Haemosporida afectan a vertebrados terrestres: anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Son transmitidos por insectos hematófagos del orden Diptera. Los haemosporidios aviares tienen una distribución casi cosmopolita, a excepción de la Antártica, y se han descrito alrededor de 200 especies clasificadas en cuatro géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* y *Fallisia* los cuales son transmitidos por 17 géneros de dípteros hematófagos [1,2]. Estos parásitos han sido objeto de gran interés y fueron considerados como modelos en estudios enfocados en temas de salud pública debido a su estrecha relación filogenética con los parásitos causales de malaria en humanos. Los estudios acerca de la biología de estos organismos se intensificaron después de que MacCallum observó haemosporidios en estadios sexuales en muestras provenientes de aves infectadas y después de que el ciclo de transmisión fuera completamente descrito por Ross en 1897 [2,3]. Sin embargo, el desarrollo de técnicas para el estudio directo de estos parásitos en los humanos disminuyó el interés sobre los parásitos aviares como tema de salud pública [1].

Tradicionalmente el diagnóstico de infección por haemosporidios se realizaba observando frotis sanguíneos al microscopio. En la actualidad, se han desarrollado métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permiten un diagnóstico más rápido a través de la amplificación de una región del gen que codifica el citocromo *b* de los parásitos [4,5]. Estos métodos, además de detectar la presencia de los parásitos, permiten la identificación molecular de los y la determinación de las relaciones filogenéticas entre ellos. Sin embargo, es recomendable que se trate de integrar la información generada por técnicas moleculares con la que se obtiene a través de microscopía. Esto permite detectar

co-infecciones que pueden estar enmascaradas por amplificación preferencial en las técnicas moleculares [2,6] además de que la identificación de las especies de estos parásitos es hasta el momento, a través de la observación de sus caracteres morfológicos debido a que su taxonomía es en base a estos caracteres.

Debido al auge que los trabajos sobre ecología, biología evolutiva y biología de la conservación han tenido en las últimas cuatro décadas, el estudio de los haemosporidios aviáres ha surgido como una herramienta para entender la forma en que la pérdida y la fragmentación del hábitat y el cambio climático afectan a las poblaciones naturales de aves [7]. Los parásitos producen cambios fisiológicos en los hospederos y reducen su vigor, disminuyendo de ese modo el éxito reproductivo o incrementando el costo energético en la crianza, lo que representa una fuerza selectiva importante sobre las poblaciones [8]. Es por esto que los haemosporidios se han convertido en un modelo de estudio de las relaciones parásito-hospedero en ecología, conservación y manejo de vertebrados [2,7].

Se ha demostrado que la prevalencia de infección y la riqueza específica de parásitos en una comunidad resulta de las interacciones entre factores bióticos y abióticos [9-11]. Además se han hecho comparaciones entre diferentes tipos de hábitat, así como entre ecosistemas con y sin alteraciones inducidas por los humanos, y se ha encontrado que el tipo de hábitat y sus condiciones influyen sobre la distribución y el comportamiento de los vectores de estos parásitos [9,12,13] y por lo tanto, en el modo y dinámica de dispersión de los haemosporidios.

Aunque la mayor parte de los trabajos sobre haemosporidios se han hecho en zonas tropicales, existen algunos estudios sobre la diversidad de estos



organismos en zonas templadas [14,15] y áridas [10,16]. Deviche *et al.* [16] compararon los niveles de prevalencia de haemosporidios entre diferentes especies de aves en Arizona. A diferencia de otros estudios en passerinas tropicales, no se detectaron infecciones causadas por *Plasmodium* o *Leucocytozoon* pero si por *Haemoproteus*. Los autores atribuyeron estos resultados a la posible resistencia a estos parásitos, a la presencia de barreras ecológicas o a la ausencia de los vectores de *Plasmodium* y *Leucocytozoon*, lo que está directamente relacionado con condiciones ambientales; por ejemplo, la disponibilidad de agua, que puede dificultar o impedir el establecimiento de poblaciones de los vectores. Adicionalmente, los autores encontraron una relación entre la prevalencia de haemosporidios y la altura a la que las especies ponen sus nidos, lo que indica que el comportamiento reproductivo de las especies y la estructura de la vegetación pueden ser factores determinantes en las tasas de infección. Por otro lado, Belo *et al.* [10], encontraron una alta prevalencia y una alta diversidad específica de haemosporidios (siete linajes del género *Plasmodium* y 10 del género *Haemoproteus*) en zonas áridas de Venezuela con diferentes condiciones de humedad y temperatura, señalando que estos factores son determinantes en la distribución y abundancia de la mayoría de los vectores en esa zona.

Los mecanismos de dispersión de los haemosporidios están bien establecidos y se sabe que la transmisión de estos parásitos es mucho más alta en sitios que pertenecen a rutas migratorias de aves [1]. Dado que el Altiplano Potosino forma parte de la ruta migratoria de muchas aves de Norteamérica, es importante llevar a cabo estudios en esta zona que nos permitan conocer la riqueza específica de

parásitos haemosporidios y las relaciones que estos tienen con las aves nativas y residentes. Además existe evidencia de que las modificaciones al hábitat y el aumento en la temperatura global están facilitando la expansión del rango de distribución de los parásitos, debido a la creación de nichos ecológicos que facilitan el establecimiento de nuevas poblaciones de los vectores [9]. En el Altiplano Potosino, por ejemplo, la construcción de bordos para la captación y almacenamiento de agua pluvial es una práctica recurrente. De acuerdo a lo anterior, se establecieron y evaluaron las hipótesis de que en el Altiplano Potosino existen parásitos haemosporidios de diferentes géneros y que la presencia de bordos para el almacenamiento de agua podría jugar un papel positivo en la presencia y niveles de prevalencia de los parásitos. Además se determinó si existen niveles diferenciales de infección y de carga parasitaria en aves residentes de la zona. En este documento se presentan los resultados de la estimación de prevalencia de haemosporidios en tres especies de aves residentes del Altiplano Potosino, la determinación de la riqueza específica de parásitos en la zona y la relación que estos factores tienen con las prácticas de modificaciones al hábitat en el área de estudio. Los resultados de este estudio representan los primeros registros de este tipo de parásitos en poblaciones aviares del Altiplano Mexicano, y por lo tanto pueden servir como base para futuros estudios parasitológicos en aves de la región.

## Métodos

### Área de estudio

La zona de estudio se encuentra localizada entre los municipios de Charcas y Catorce, San Luis Potosí. Incluye tres localidades (UTM: E271793.37 N2610708.64, E278059.47 N2599525.12, E276057.75 N2582923.98 Zona 14N) pertenecientes a un área conocida como la zona ixtlera (Figura 1). La vegetación del área se caracteriza por la presencia de matorral micrófilo-rosetófilo subinmerme dominado por *Yucca spp.* en el estrato arbóreo y *Larrea tridentata* y *Flourensia cernua* en el arbustivo [17] además de una gran diversidad de especies dentro de la familia Cactaceae. El área está conformada por zonas de lomerío suave y montañas de poca altura que permiten el escurrimiento de agua pluvial hacia las zonas bajas; con una altitud que va desde los 2000 a 2300 m, la precipitación promedio anual es de alrededor de 350 mm y con una temperatura promedio anual que oscila de 10°C a 20°C [18,19]. En cada una de las localidades se establecieron tres sitios de muestreo con diferente grado de perturbación siguiendo las categorías de calidad de hábitat establecidas por Garza-Hurtado [20] en las que los sitios se diferencian principalmente por la variación que presentan en parámetros como cobertura, diversidad, riqueza y estructura vegetal, y densidad de *Yucca spp.* Los sitios con mala calidad de hábitat corresponden a pueblos pequeños donde la vegetación natural ha sido completamente removida; los sitios con calidad moderada de hábitat son áreas dominadas por arbustos de la especie *L. tridentata*, e incluye pequeños parches agrícolas localizados a una distancia aproximada de dos kilómetros de los pueblos que son comúnmente

utilizados para el pastoreo de cabras. Los sitios con buena calidad de hábitat son áreas de izotal, dominadas por *Yucca spp.* donde la densidad promedio es de 35 yucas por Ha y los disturbios debido a la presencia del ganado bovino y caprino son menores [20].

### **Colecta de muestras**

Utilizando 20 redes ornitológicas (2.5x12m) distribuidas al azar dentro de cada uno de los sitios de muestreo, se colectaron individuos de tres especies de aves (*Haemorhous mexicanus*, *Melospiza fusca* y *Campylorhynchus brunneicapillus*). Las redes permanecieron abiertas por 12 horas (desde el amanecer hasta la puesta del sol) durante tres días en cada sitio. Las aves se capturaron en tres periodos, el primero en la época no reproductiva (agosto-noviembre) del 2012, el segundo y el tercero en las épocas reproductiva (marzo-mayo) y no reproductiva (septiembre-noviembre) del 2013. De cada individuo capturado se tomó una muestra de sangre de aproximadamente 200 µl por medio de punción de la vena yugular [21]. Estas muestras fueron colocadas en tubos eppendorf preparados con 1 ml de buffer de preservación Longmire (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% SDS) que permite el almacenaje de muestras de sangre a temperatura ambiente sin que la integridad del ADN se vea comprometida [22]. Adicionalmente se tomaron medidas biométricas de todos los individuos capturados de acuerdo con Ralph *et al.* [23].

## **Microscopía y frotis sanguíneos**

Se utilizó una gota de sangre de cada muestra para preparar frotis sanguíneos. Los frotis fueron secados al aire y fijados con metanol en el sitio de colecta. En el laboratorio, se tiñeron por inmersión en una solución compuesta por 10 ml de tinción de Giemsa diluidos en 100 ml de buffer de fosfatos pH 7.2; después de 60 minutos, los frotis se retiraron de la solución y se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de tinción [1]. Las laminillas fueron examinadas con un microscopio óptico Motic BA400 con el objetivo de 100x. La densidad parasitaria fue cuantificada después de la observación de 100 campos al azar en cada frotis (aproximadamente 150 eritrocitos / campo = 15 000 eritrocitos totales) en los cuales se registró el número de células infectadas identificándolas según las características descritas por Valkiūnas [1] específicamente examinando el estado de desarrollo de micro y macrogametocitos y la presencia de gránulos de pigmento.

## **Extracción de ADN**

De cada una de las muestras colectadas se extrajo ADN genómico utilizando el kit de extracción DNeasy blood & tissue (Qiagen, Venlo Netherlands) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para comprobar la integridad del ADN, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% de cada extracción y se cuantificó la concentración y pureza de cada muestra con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

## Diagnóstico Molecular por medio de PCR

La determinación de presencia/ausencia de haemosporidios se llevó a cabo a través de la amplificación de fragmentos de aproximadamente 480 pb del citocromo-*b* de los parásitos utilizando los oligonucleótidos HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') y HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') [4]. Se llevaron a cabo reacciones PCR en un volumen de 25 µl; cada reacción contenía 20-50 ng de DNA total, 1x PCR buffer II (100mM Tris-HCL, pH8.3, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.125 mM de cada dNTP, 0.6 µM de cada oligonucleótido y 0.6 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, California). Siguiendo el protocolo desarrollado por Bensch *et al.* [4], las reacciones fueron hechas de la siguiente forma: desnaturalización inicial de 94°C por 3 mins, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, renaturalización a 50°C por 30 seg y extensión a 72°C por 45 seg, y un paso de extensión final de 72°C por 10 mins. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 2720 (ABI, Foster, California) o en uno MJMini (BioRad, Hercules, California). Los productos de PCR se examinaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y los productos de PCR con el tamaño esperado fueron purificados para secuenciación. La prevalencia de parásitos haemosporidios se estimó utilizando el paquete de R "Prevalence" [24] que utiliza parámetros como la sensibilidad (probabilidad de que un individuo verdaderamente infectado dé resultado positivo) y especificidad (probabilidad de que un individuo verdaderamente no infectado dé resultado negativo) de la prueba de diagnóstico, lo que permite corregir el sesgo producido por posibles falsos positivos y falsos negativos [25], obteniendo una mejor estimación de los niveles

reales de prevalencia de la infección a través de inferencia bayesiana utilizando la siguiente ecuación:

$$\pi = P(D=1) = (TP + FN) / (TP + FP + FN + TN)$$

donde:  $\pi$  es la prevalencia verdadera, D es el estatus de infección, TP es verdadero positivo, FN es falso negativo, FP es falso positivo, TN es verdadero negativo.

### **Análisis de secuencias**

La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Foster City, California) en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA-IPICYT). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias depositadas en bases de datos públicas como NCBI y MalAvi [7] a fin de identificar las especies o géneros de los organismos causantes de la infección en las muestras. Siguiendo los criterios de trabajos anteriores [15], los linajes se diferenciaron cuando entre las secuencias se encontraron 2 o más nucleótidos de diferencia. Las relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas y secuencias previamente conocidas se determinaron a través de un análisis por Neighbor Joining (NJ). Las distancias evolutivas entre secuencias se calcularon utilizando el modelo de tres parámetros de Tamura, especificando una tasa de variación entre sitios con distribución  $\gamma=0.263$ . Para construir el cladograma se utilizaron 1000 réplicas en una prueba de bootstrap para calcular el porcentaje de asociación entre los taxa. Todos estos análisis se llevaron a cabo en MEGA versión 6 [26].

### **Análisis hidrológico**

A través del análisis de una imagen satelital de la zona, se ubicaron y georeferenciaron cada uno de los cuerpos de agua presentes en el área de estudio tanto permanentes como temporales. Utilizando el software QGIS 2.0.1 Dufour [27] se digitalizaron para calcular la superficie total cubierta por agua. Para evaluar el área de influencia de los vectores en el área, se sobrepusieron áreas circulares concéntricas a cada uno de los cuerpos de agua detectados con radios de uno, dos y tres Km de acuerdo al ámbito hogareño reportado para los vectores [28]. Para conocer el número de cuerpos de agua en cada una de las localidades de muestreo, se sobrepuso un área circular con un radio de seis km a partir de las zonas pobladas el cual incluyó cada uno de los tres sitios de muestreo ubicados en cada localidad.

### **Análisis estadístico**

Para determinar si existe diferencia estadística en la prevalencia estimada entre las especies de aves se utilizó una prueba de Chi cuadrada. La intensidad de parasitemia se examinó a través de una prueba de  $t$  para muestras independientes para conocer si este parámetro difiere entre los taxa.

Se determinó si hay una diferencia estadística en la carga parasitaria entre los individuos de cada especie en los tres diferentes sitios de colecta por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Para determinar si existe alguna relación entre la intensidad de infección y las condiciones ambientales y/o la condición corporal de las aves se utilizaron modelos lineales generalizados (MLG's) con distribución binomial negativa. Las variables ambientales incluyeron



las categorías de calidad de hábitat para la zona de acuerdo a Garza-Hurtado [20], además de la distancia de los sitios de captura al cuerpo de agua más cercano. Las distancias se determinaron a través de un análisis de proximidad llevado a cabo en QGIS 2.0.1 Dufour [27]. La condición corporal de los individuos se determinó a través de un índice escalado de masa de acuerdo a Peig y Green [29], que se basa en la relación que existe entre el peso corporal y una medida lineal de longitud (por ejemplo, la longitud del ala) de cada individuo. Los modelos fueron corridos y analizados en R-3.0.2 [30].

## Resultados

Al final del periodo de muestreo se colectaron 106 muestras de *H. mexicanus*, 40 de *M. fusca* y 16 de *C. brunneicapillus*.

### Pruebas de diagnóstico

El análisis de microscopía reveló la presencia de parásitos haemosporidios en dos de las tres especies estudiadas (*H. mexicanus* y *M. fusca*), mientras que en *C. brunneicapillus* sólo se observaron eritrocitos normales. Como es característico del ciclo de vida de los haemosporidios, se observaron los estadios asexuales de estos parásitos (gametocitos) dentro de los eritrocitos de las aves infectadas (Figura 2). La carga parasitaria fue alta [1] para las dos especies con casos positivos (Tabla 1).

En general, los resultados del diagnóstico molecular coincidieron con los resultados de microscopía; sin embargo, el método de amplificación por PCR dio algunos falsos negativos debido a la baja carga parasitaria de esas muestras. Adicionalmente, con la amplificación y secuenciación de los fragmentos de ADN de los parásitos no se detectaron casos de co-infección, pero éstos fueron evidentes durante el análisis de microscopía. La prevalencia estimada de infección no varió entre las especies con casos positivos ( $\chi^2 = 0.001$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.974$ ). Aunque la intensidad de parasitemia tampoco varió significativamente entre especies, se detectó una tendencia en *H. mexicanus* a presentar una mayor carga parasitaria ( $t = 1.915$ ,  $df = 55.408$ ,  $P = 0.0606$ , Figura 3). Los valores estimados de estos parámetros se muestran en la tabla 1.

### **Análisis de secuencias**

La secuenciación de los amplicones reveló que en el área de estudio *H. mexicanus* y *M. fusca* son infectados por al menos tres linajes diferentes del género *Haemoproteus*, además de un linaje del género *Plasmodium* que sólo fue detectado en una muestra de cada especie. A partir de dos muestras de *M. fusca* se obtuvieron secuencias de haemosporidios, que por el número de diferencias en las bases con respecto a las secuencias de referencia (ocho nucleótidos) y siguiendo el criterio de delimitación de linajes de Bensch *et al.* [4,15], representan un linaje no reportado hasta ahora y se encuentran en un clado independiente en base a la similitud entre secuencias (Figura 4).

### **Análisis hidrológico**

El análisis de la imagen satelital del área reveló que existe un total de 54 depósitos de agua con una superficie promedio de  $1.2 \pm 1.5$  Ha. La superficie cubierta por agua cuando todos los depósitos están llenos es de alrededor de 0.55 km<sup>2</sup>. El número de cuerpos de agua registrados dentro de un radio de seis km para la localidad de Guadalupe Victoria fue de 20 (18.77 Ha), para Presa de Santa Gertrudis fue de cinco (8.36 Ha) y para La Cardoncita se registraron cuatro (8.55 Ha).

### **Efecto de las variables ambientales en la carga parasitaria**

A pesar de que no se encontró diferencia estadística en la carga parasitaria entre sitios con diferente calidad de hábitat en *H. mexicanus* ( $F_2 = 1.17$ ,  $P = 0.31$ ) y *M. fusca* ( $F_2 = 1.3$ ,  $P = 0.30$ ) (Figura 5), al analizar los efectos de variables

ambientales y la condición corporal de las aves, se encontró que conforme la calidad de hábitat es menor, la intensidad de parasitemia aumenta (GLM Parasitemia ~ H\_qL  $F = -4.272$ ;  $P = 0.04$ ) y que a medida que la condición corporal de las aves disminuye, la carga parasitaria es mayor (GLM Parasitemia ~ SMI  $F = -0.174$ ;  $p < 0.001$ ) . De forma similar la interacción entre la calidad del hábitat y la condición corporal de las aves mostró un efecto altamente significativo (GLM Parasitemia ~ H\_q : SMI  $F = 0.166, 0.146$ ;  $P = 0.006, 0.04$ ; para calidad de hábitat baja y moderada respectivamente). La desviación residual de este modelo no fue significativa a nivel de 0.05 ( $dr = 126.48, df = 138, P = 0.749$ ).

## Discusión

Los resultados muestran niveles de prevalencia de parásitos haemosporidios en dos especies de aves residentes del Altiplano Potosino, que son equiparables con los detectados en estudios realizados en zonas tropicales así como los que se reportan por Belo *et al.* en zonas áridas de Venezuela [10]. En estudios llevados a cabo en Arizona, Deviche *et al.* [16], hacen énfasis en la ausencia del género *Plasmodium* en las muestras que analizaron lo que representa una diferencia importante con los resultados del presente estudio. Los autores atribuyen la ausencia de este parásito a la falta de condiciones, específicamente la disponibilidad de agua para el establecimiento de poblaciones de los vectores particulares de este género de parásitos haemosporidios. Aunque no hay estudios específicos para el Altiplano Potosino sobre la diversidad o presencia de dípteros, se tienen registros para México de las tres familias (Ceratopogonidae, Hippobosidae y Culicidae) de vectores de parásitos del género *Haemoproteus* y *Plasmodium* [31-33] y la detección de estos parásitos en la zona hace evidente la presencia de los vectores en la zona. Algunos autores han enfatizado el papel que juega la interacción de los factores bióticos y abióticos, así como los cambios ambientales naturales o inducidos, en la composición específica de la comunidad de vectores y parásitos así como en su distribución [9-13]. Por ejemplo, el cambio de uso de suelo; los asentamientos humanos, el desarrollo comercial, la construcción de caminos, sistemas de control de agua (presas, canales, reservorios, sistemas de irrigación) y el clima, genera hábitats adecuados para los parásitos y sus vectores, lo que se acompaña de un incremento global en la

morbilidad y mortalidad de enfermedades causadas por organismos como los hamosporidios [12]. Se ha demostrado que en los humanos, el riesgo de contraer malaria incrementa a medida que la distancia de residencia de los habitantes de un lugar a un cuerpo de agua es menor [34], mecanismo que podría estar actuando de forma similar en otros vertebrados como son las aves, ya que los reservorios de agua proveen las condiciones adecuadas para la reproducción de los vectores de parásitos.

En el Altiplano Potosino existen dos factores que pueden promover una diversidad específica mayor de estos parásitos; por un lado, es un área en la que prevalecen los climas áridos y está considerado dentro de la región xerófila mexicana que forma parte del Desierto Chihuahuense, el cual se caracteriza por escasas precipitaciones (<350 mm anuales) lo que obliga a los habitantes a modificar el hábitat para satisfacer necesidades básicas. Estas modificaciones incluyen la construcción de bordos para la captación y almacenamiento de agua pluvial que se utiliza principalmente para ganadería y agricultura de temporal (obs. no publicadas). De acuerdo a los registros publicados por el INEGI [18,19] en la zona de estudio existen nueve cuerpos de agua permanentes pero no existe un registro acerca del número de bordos que almacenan agua de forma temporal ni de sus dimensiones. Los datos que recabamos muestran que existe un total de 29 depósitos de agua dentro de un radio de seis kilómetros teniendo como centro cada una de las localidades. Por otro lado, el análisis del área completa reveló que en total existen 54 depósitos de agua, la mayoría de los cuales son efímeros pero con la capacidad de retener el agua de uno a tres meses (obs. no publicadas), tiempo suficiente para el desarrollo de dos a seis generaciones tanto de parásitos

como de vectores [1,28]. La superficie total de estos cuerpos de agua es de 0.55 Km<sup>2</sup>, un valor que resulta muy alto en comparación con la superficie de agua reportada para todo el municipio de Charcas que es de 0.84 Km<sup>2</sup> [35] lo que representa, al menos potencialmente, un nicho disponible para los parásitos y sus vectores. Además se ha reportado que el incremento de la temperatura global en el orden de 1°C aumenta la tasa de incidencia de infección por parásitos haemosporidios en aves ya que se acelera la tasa de reproducción de los vectores y se prolonga la estación reproductiva de los parásitos [36]. De acuerdo a la Estrategia Nacional de Cambio Climático (NCCS por sus siglas en inglés) [37], México ha sufrido un incremento de temperatura del orden de 0.5°C a 1°C en el periodo de 1981 a 2012 lo que significa que en muchas zonas del país podrían estar presentándose las condiciones adecuadas para el establecimiento de poblaciones de haemosporidios y sus vectores. Por otro lado, el Altiplano Potosino es un área que recibe un número importante de especies migratorias provenientes de diferentes latitudes y longitudes geográficas, que involucran no sólo otras zonas áridas, sino también una amplia variedad de hábitats como humedales y bosques en los que hay una alta incidencia de parásitos haemosporidios [16,38,39]. Algunos autores han argumentado que el fenómeno de la migración ha contribuido de forma importante a la distribución y establecimiento de parásitos haemosporidios en diferentes partes del mundo [1], y su ocurrencia en el Altiplano Potosino, sumado al cambio climático y a las modificaciones al hábitat, podrían favorecer el establecimiento de poblaciones de vectores que dispersan la enfermedad y que contribuyen a los niveles de prevalencia detectados en este

estudio. Este es un tema que debe estudiarse a detalle en zonas del Altiplano Mexicano que reciban frecuentemente poblaciones de aves migratorias.

A pesar de que no se detectó una diferencia estadística en la carga parasitaria entre los sitios con diferente calidad de hábitat para ninguna de las dos especies con casos positivos de infección (Figura 5), se encontró por medio de MLG's, que la calidad de hábitat es un factor con un efecto importante sobre la carga parasitaria de las aves infectadas. Aunque estadísticamente no fue posible detectar este efecto debido a que los datos presentan una alta variación por tratarse de sistemas naturales, la diferencia biológica que se presenta entre los sitios con calidad de hábitat moderada y baja con respecto a los sitios con calidad de hábitat alta es evidente. En los primeros las aves infectadas presentan en promedio cargas parasitarias mayores a 25 células infectadas / 100 campos mientras que en los últimos, la carga parasitaria promedio no pasa las 12 células infectadas / 100 campos en ambas especies. Esta diferencia biológica debido a la calidad de hábitat puede estar relacionada al hecho de que en los sitios con alta calidad de hábitat son los que presentan menos modificaciones, lo que indica que al menos en estos sitios existe menor disponibilidad de nicho para los vectores [9,12] y por lo tanto, las aves en los izotales presentan una menor probabilidad de interactuar con los vectores y el riesgo de infección se reduce, mecanismo análogo a lo reportado para otros vertebrados [9,12,34]. Es necesario evaluar sitios dentro del Altiplano Mexicano en los que no existan cuerpos de agua o en los que su abundancia sea menor.

La diversidad específica de parásitos encontrada en este estudio es similar a la reportada en otras zonas áridas [10,16]. La presencia de las diferentes especies



depende de las necesidades ambientales de cada una de ellas; por ejemplo, el género *Leucocytozoon* requiere la existencia de corrientes de agua bien oxigenadas para el desarrollo exitoso de la fase larval de su vector [40], razón por la que este género no está presente en zonas áridas. De acuerdo al diagnóstico molecular, en el sitio de estudio de este trabajo están presentes los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*. A pesar de que la técnica molecular es muy sensible a la presencia de ADN de los parásitos y de que se pudieron identificar cuatro linajes diferentes, fue necesario complementar estos datos con microscopía tradicional a fin de corroborar estos resultados por medio de caracteres morfológicos y para descartar el hecho de pasar por alto infecciones múltiples y casos de falsos negativos. La identificación taxonómica precisa de las especies requiere un examen morfológico minucioso que provee información imposible de obtener a través del método molecular [2,6].

El análisis de similitud mostró que dos de las secuencias obtenidas presentaron una diferencia de ocho nucleótidos con respecto a la secuencia de linaje más similar (*Parahaemoproteus* ICTLEU01), y diferencias mayores con respecto a los linajes de *Plasmodium* y *Haemoproteus*. Esto sugiere la presencia de un linaje que no ha sido reportado hasta ahora de acuerdo al criterio de delimitación de linajes de Bensch et al. [4,15], lo que contribuye al conocimiento de la diversidad intraespecífica de estos parásitos.

La ausencia de casos positivos de infección para *C. brunneicapillus* podría estar relacionado a sus patrones de comportamiento y uso del hábitat como ha sido observado en otras especies [16]. Por un lado, es una especie menos antrópica que otras especies presentes en la zona, que aunque tolera cierto grado de

perturbación, tiende a establecerse lejos de asentamientos humanos y es menos dependiente de sitios con agua disponible que especies como *H. mexicanus* [38]. Se ha comprobado que los hábitos de comportamiento de algunas especies de aves de zonas templadas son importantes en la protección de las crías contra insectos hematófagos. Por ejemplo, *Parus caeruleus* utiliza diferentes especies de plantas aromáticas como repelente contra mosquitos del género *Culex* para proteger el nido [41]. El comportamiento de *C. brunneicapillus* incluye estrategias de uso de hábitat para evitar el estrés térmico, específicamente la búsqueda de microhábitats con temperaturas inferiores respecto a la temperatura ambiente del sitio y el decremento de su actividad conforme la temperatura ambiente alcanza niveles críticos de estrés. Por otro lado, sus adaptaciones fisiológicas le permiten obtener agua del alimento que ingiere para mantener el balance hídrico aún en condiciones de temperaturas extremas [42]. Esto podría representar factores importantes en la posible resistencia de esta especie a la infección por haemosporidios, aunque esta hipótesis debe ser probada experimentalmente incluyendo estudios fisiológicos en esta especie que podrían estar involucrados si es que se determina esa resistencia a fin de comprender tal adaptación de esta especie de ave contra este tipo de parásitos.

## **Conclusión**

Este estudio es el primero en reportar presencia de parásitos haemosporidios aviares en la región del Altiplano Potosino. Existen las condiciones para la presencia de parásitos haemosporidios en la zona, y están dadas por las modificaciones al hábitat que proveen el nicho idóneo para el establecimiento de poblaciones de vectores y el aumento en la temperatura registrado en México en el periodo de 1981-2012 que pudiera estar acelerando las tasa de reproducción tanto de los parásitos como de los vectores. Es necesario llevar a cabo estudios sobre la abundancia y la densidad de vectores en la zona para establecer si los niveles de prevalencia encontrados pueden ser debidos a las prácticas agropecuarias, específicamente a la construcción de depósitos de agua, además de realizar pruebas de diagnóstico en especies de aves migratorias para conocer si estas especies contribuyen a incrementar los niveles de transmisión de parásitos haemosporidios en la zona.

En el Altiplano Potosino, la diversidad observada de parásitos haemosporidios incluye cuatro linajes pertenecientes a dos géneros, además de dos secuencias que representan un linaje de haemosporidios no reportado hasta ahora, lo que contribuye al conocimiento de la diversidad y biogeografía de estos parásitos. Al parecer, la presencia/ausencia de parásitos haemosporidios está relacionada a los patrones de comportamiento de las aves expuestas a los vectores de estos organismos y es necesario hacer estudios específicos sobre el comportamiento de las especies que presentan prevalencias bajas o nulas para conocer los mecanismos que usan contra las infecciones.

El conocimiento y monitoreo de patógenos de vida silvestre es relevante para la conservación de especies de importancia ecológica, especialmente en una región como el Altiplano Potosino que funciona como sitio de paso de invierno para numerosas especies migratorias y que además alberga especies endémicas. La generación de este tipo de conocimiento es esencial para la prevención de brotes epidémicos que puedan afectar además especies de importancia económica.

## **Conflicto de intereses**

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## **Contribuciones de los autores**

LCV, MTR-P y JCC-D concibieron el estudio, MTR-P, JCC-D y LCV colectaron las muestras; MTR-P y JCC-D procesaron las muestras y generaron los datos moleculares y de secuenciación; MTR-P y JCC-D alinearon y analizaron las secuencias; MTR-P y JCC-D procesaron y analizaron los frotis sanguíneos; MTR-P y JCC-D analizaron los resultados, MTR-P y JCC-D elaboraron el manuscrito, todos los autores revisaron el manuscrito y aprobaron la versión final.

## **Agradecimientos**

Este trabajo forma parte del Proyecto de Investigación de Ciencia Básica de CONACYT con clave CB-2012-1-183377. MTR-P agradece a CONACYT por la beca otorgada para la realización de este estudio. Todos los autores agradecen la participación de Armando Carlos, Jachar Arreola y Karina Monzalvo que ayudaron en el trabajo de campo. La colecta de muestras se hizo con el permiso correspondiente otorgado por SEMARNAT con número FAUT-0157.

## Referencias

1. Valkiūnas G: Avian malaria parasites and other haemosporidia. Florida: CRC Press; 2005.
2. Braga EM, Silveira P, Belo NO, Valkiūnas G: **Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium spp* in Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2011, **106**(Suppl. 1): 3-11.
3. Cox FEG: **History of the discovery of the malaria parasites and their vectors.** Parasites & Vectors 2010, **3**: 5.
4. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Östman Ö, Hansson B, Wasterdahl H, Torres Pinheiro R: **Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds.** Proc. R. Soc. Lond. B 2000, **267**:1583-1589.
5. Hellgren O, Waldeström J, Bensch S: **A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium and Haemoproteus from avian blood.** J. Parasitol. 2004, **90**(4): 797-802.
6. Valkiūnas G, Lezhova TA, Krizanauskiene A, Palinauskas V, Sehgal RNM, Bensch S: **A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites.** J. Parasitol. 2008, **94**(6): 1395-1401.
7. Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris J: **MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on**

- mitochondrial cytochrome *b* lineages.** Mol. Ecol. Resour. 2009, **9**: 1353-1358.
8. Lefèvre T, Roche B, Poulin R, Hurd H, Renaud F, Thomas F: **Exploiting host compensatory responses: the ‘must’ of manipulation?** Trends Parasitol. 2008, **24**: 435-439.
  9. Belo NO, Pinheiro RT, Reis ES, Ricklefs RE, Braga EM: **Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidian from three distinct Cerrado habitats in Brazil.** PlosONE 2011, **6**(3): e17654.
  10. Belo NO, Rodríguez-Ferraro A, Braga EM, Ricklefs RE: **Diversity of avian haemosporidians in arid zones of Northern of Venezuela.** Parasitology 2012, **139**: 1021-1028.
  11. Lacorte GA, Félix GMF, Pinheiro RRB, Chaves AV, Almeida-Neto G, Neves FS, Leite LO, Santos FR y Braga EM: **Exploring the diversity and distribution of Neotropical avian malaria parasite- A molecular survey from Southern Brazil.** PlosONE 2013, **8**(3): e57770.
  12. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY: **Effects of environmental change on emerging parasitic diseases.** Int. J. Parasitol. 2000, **30**: 1395-1405.
  13. Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Sanchez-Lozano W, Pinedo-Cancino V, Patz JA: **The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006, **74**(1): 3-11.

14. Ricklefs RE, Swanson BL, Fallon SM, Martínez-Abraín A, Scheuerlein A, Gray J, Latta SC: **Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri.** *Ecological Monographs* 2005, **74**(5): 543-559.
15. Durrant KL, Beadell JS, Ishtiaq F, Graves GR, Olson SL, Gering E, Peirce MA, Milensky CM, Schmidt BK, Gebhard C, Fleischer RC: **Avian hematozoa in south America: A comparison of temperate and tropical zones.** *Ornithological Monographs* 2006, **60**: 98-111.
16. Deviche P, McGraw K, Greiner EC: **Interspecific differences in hematozoan infection in Sonoran desert *Aimophila* sparrows.** *Journal of wildlife diseases.* 2005, **41**(3): 532-541.
17. Rzedowski J: **Vegetación del estado de San Luis Potosí.** *PhD Tesis.* Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, 1961.
18. INEGI, 2009: **Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Catorce, San Luis Potosí.**  
[<http://www3.inegi.org.mx>]
19. INEGI, 2009: **Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Charcas, San Luis Potosí.**  
[<http://www3.inegi.org.mx>]
20. Garza-Hurtado RF: **Respuesta de la avifauna a los cambios en la estructura vegetal en un gradiente de degradación del altiplano potosino.** *Master thesis.* Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Ciencias Ambientales, 2011.
21. Canales-Delgadillo JC, Scott-Morales L, Korb J: **The influence of habitat fragmentation on genetic diversity of a rare bird species that**

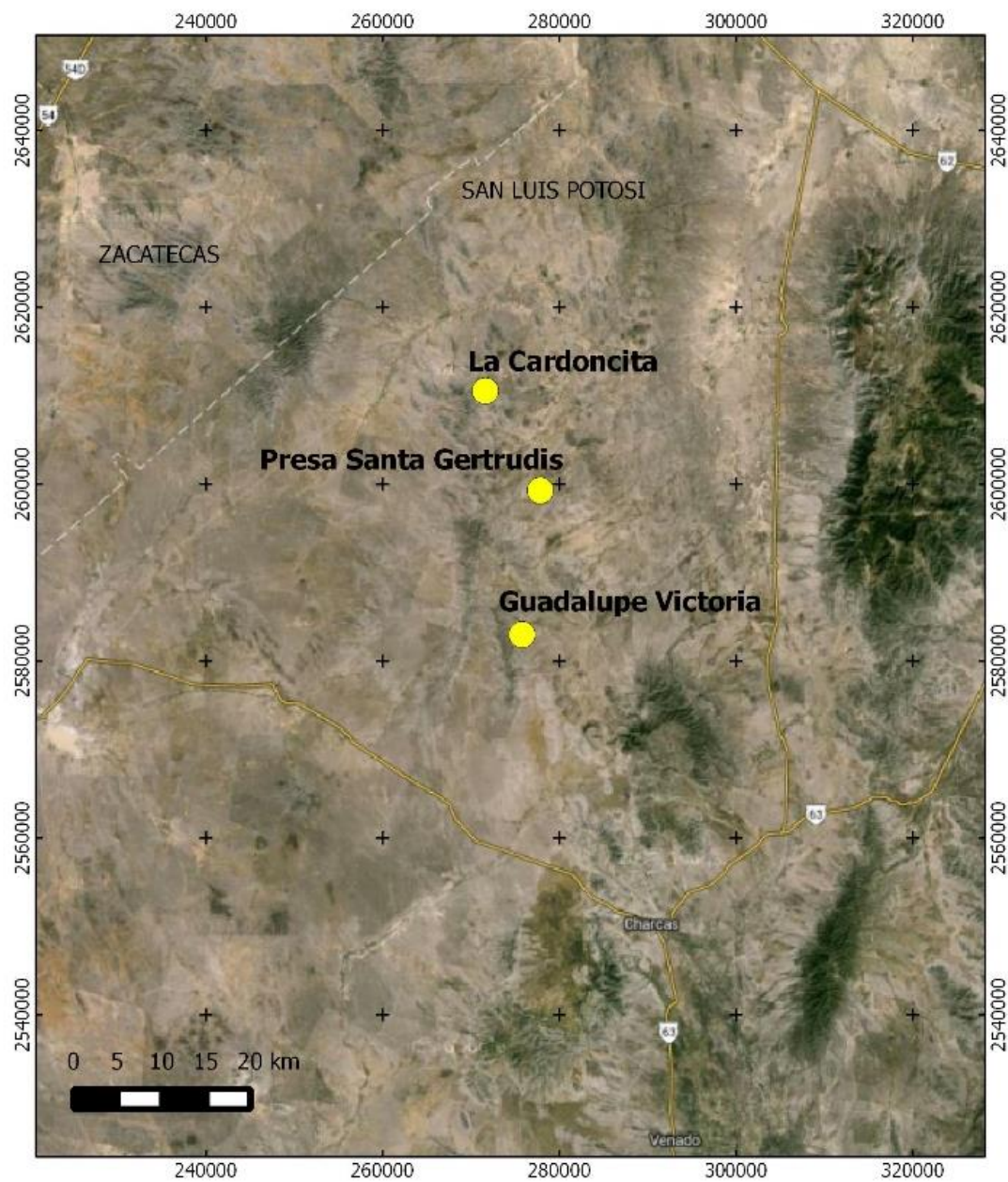


- commonly faces environmental fluctuation.** Journal of Avian Biology 2012, **43**: 168-176.
22. Longmire JL, Lewis AK, Brown NC, Buckingham JM, Clark LM, Jones MD, Meincke LJ, Meyne J, Ratliff RL, Ray FA, Wagner RP, Moyzis RK: **Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandem repeat in the family Falconidae.** Genomics 1988, **2**: 14-24.
23. Ralph CJ, Geupel GR, Payle P, Martin TE, DeSante DF: **Handbook of field methods for monitoring land birds.** Gen. Tech. Rep. 1993, PSW-GTR-144-www, US Dept. of Agriculture, CA, USA.
24. Devleesschauwer B, Torgerson P, Charlier J, Levecke B, Praet N, Dorny P, Berkvens D, Speybroeck N (2013): **Prevalence: Tools for prevalence assessment studies.** R package version 0.1.0.  
[<http://cran.r-project.org/package=prevalence>]
25. Speybroeck N, Devleesschauwer B, Joseph L, Berkvens D (2012): **Misclassification errors in prevalence estimation: Bayesian handling with care.** International Journal of Public Health. doi: 10.1007/s00038-012-0439-9.
26. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S: **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** Molecular Biology and Evolution 2013, **30**: 2725-2729
27. QGIS Development Team, 2013: **QGIS Geographic Information System.** Open Source Geospatial Foundation Project. [<http://qgis.osgeo.org>]
28. AMCA. **American Mosquito Control Association.**  
[<http://www.mosquito.org/life-cycle>]

29. Peig J, Green AJ: **New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method.** *Oikos* 2009, **118**: 1883-1891
30. R Core Team, 2013: **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [<http://www.R-project.org/>]
31. Ibañez-Bernal S, Hernández-Ortiz V, Miranda-Martín del Campo L: **Catálogo de autoridad taxonómica Orden Diptera (Insecta) en México. Parte 1. Suborden Nematocera.** 2006. Instituto de Ecología, A.C. Informe final SNIB-CONABIO. Proyecto CS004 México.
32. Graciolli G, Barros de Carvalho C: **Hippoboscidae (Diptera, Hippoboscidea) no Estado de Paraná Brasil: Cheves de identificação, hospedeiros e distribuição geográfica.** *Revista Brasileira de Zoologia*, 2003, **20**(4): 667-674
33. Santos-Murgas A, López-Chong O.G, Miller M.J: **Hippoboscidae (Insecta:Diptera). Ectoparásitos en aves de Panamá, Claves, identificación, hospederos y distribución.** *Scientia(Panamá)*, 2014, **14**(1):49-68.
34. Van Der Hoek W, Konradsen F, Amerasinghe PH, Perera D, Piyaratne MK, Amerasinghe FP: **Towards a risk map of malaria for Sri Lanka: the importance of house location relative to vector breeding sites.** *Int J Epidemiol* 2003, **32**: 280–285
35. INEGI, 2014: **Uso de suelo y vegetación.** [<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mapatematico/Default.aspx>]

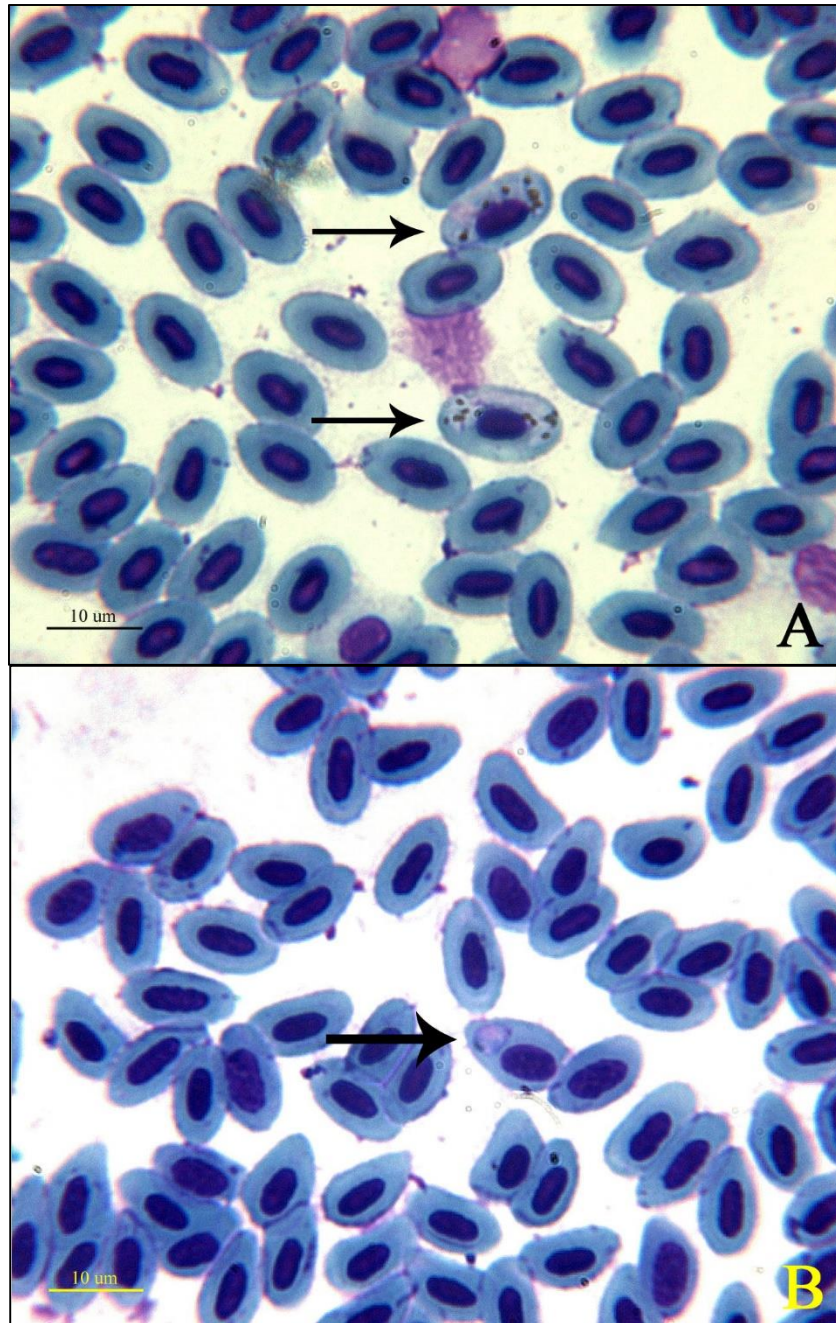
36. Garamszegi LZ: **Climate change increases the risk of malaria in birds.**  
Global Change Biology 2011, **17**: 1751-1759.
37. NCCS: **National Climate Change Strategy. 10-20-40 Vision.** Mexico:  
Federal Government of Mexico; 2013.
38. Fokidis HB, Greiner S, Deviche P: **Interspecific variation in avian blood parasites and hematology associated with urbanization in a desert habitat.** Journal of Avian Biology 2008, **39**: 300-310.
39. Yohannes E, Krizanauskiene A, Valcu M, Bensch S, Kempenaers B: **Prevalence of malaria and related haemosporidian parasites in two shorebirds species with different winter habitat distribution.** Journal of Ornithology 2009, **150**: 287-291.
40. Butler JF, Hogsette JA, 1998: **Black flies, *Simulium spp.* (Insecta: Diptera: Simuliidae).** Entomology and Nematology Department, University of Florida [www.edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN15700.pdf]
41. Lafuma L, Lambrechts MM, Raymond M: **Aromatic plants in bird nest as a protection against blood-sucking flying insects?** Behavioural Processes 2001, **56**: 113-120
42. Ricklefs RE, Hainsworth FR: **Temperature dependent behaviour of the Cactus Wren.** Ecology 1968, **49**(2): 227-233.

## Figuras y tablas



**Fig. 1. Mapa de la zona de estudio.**

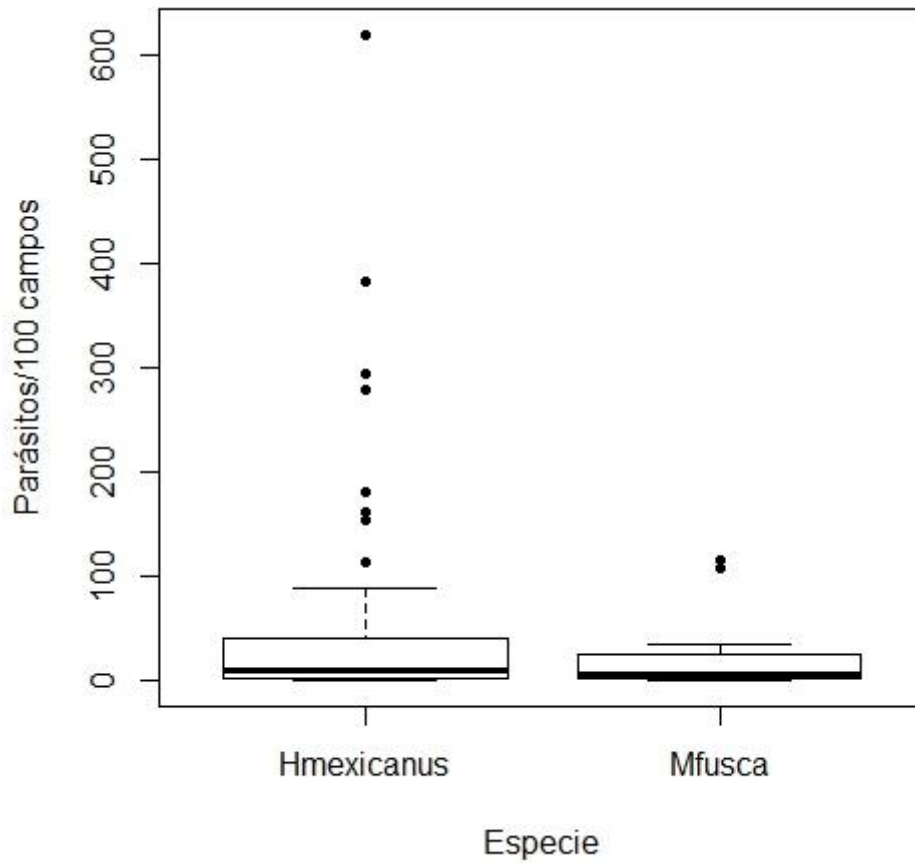
[Localidades de muestreo en la zona ixtlera de San Luis Potosí.]



**Fig. 2. Eritrocitos infectados por *Haemoproteus* y *Plasmodium*.**

[Frotis sanguíneos de **A**) *M. fusca* y **C**) *H. mexicanus*, con células infectadas por *Haemoproteus* y *Plasmodium* respectivamente. Las flechas señalan células infectadas por parásitos hemosporidios en la etapa de gametocito. Aumento 100x].

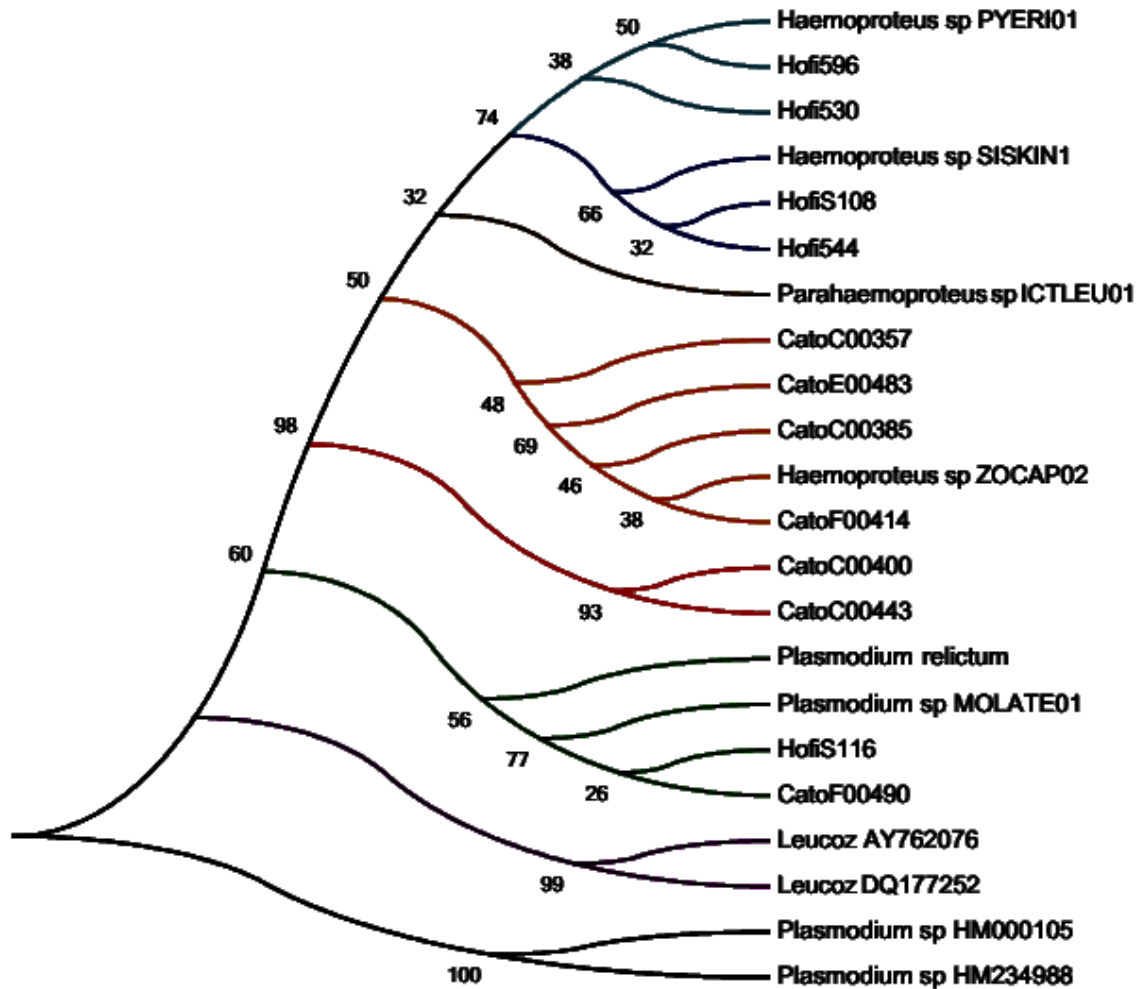
Foto MTR-P



**Fig. 3. Carga parasitaria por especie.**

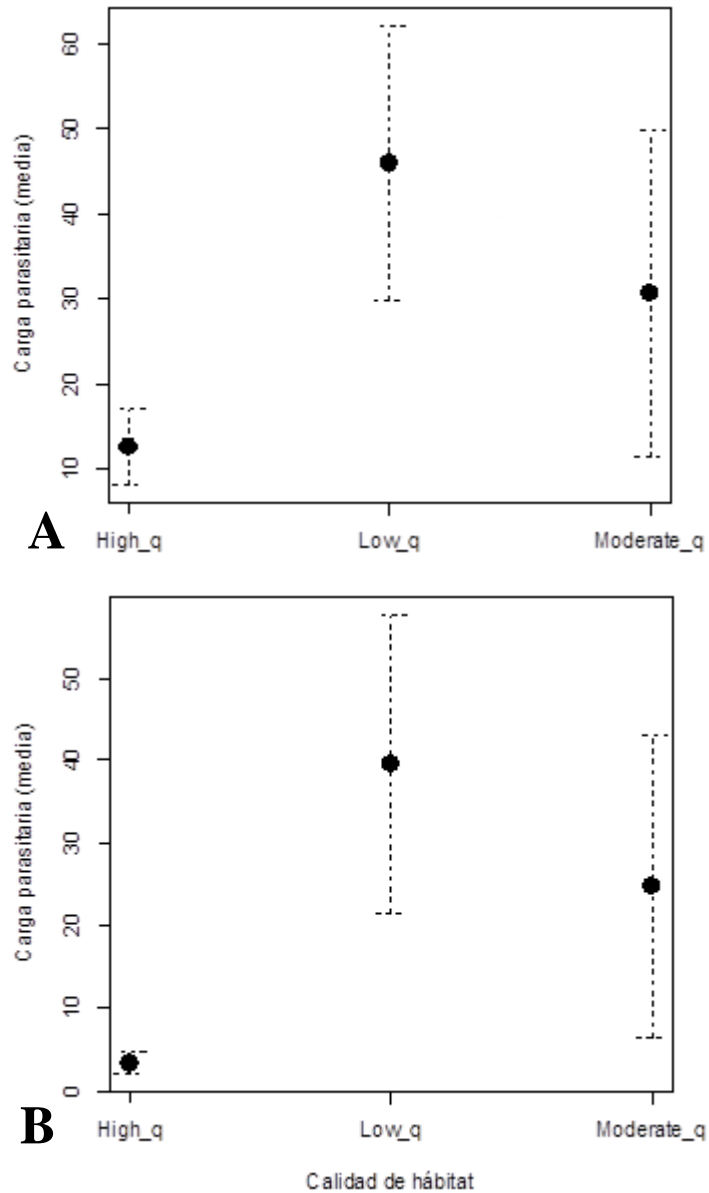
[Se muestra la distribución del número de parásitos/100 campos en cada especie. Los puntos negros representan individuos que registraron más de 100 células infectadas por parásitos haemosporidios.  $t = 1.915$ ,  $df = 55.408$ ,  $P = 0.0606$ ]





**Fig. 4. Diversidad específica e intraespecífica de los parásitos haemosporidios detectados en el Altiplano**

[Se muestra el cladograma NJ de las secuencias obtenidas a partir de muestras positivas para *H. mexicanus* (Hofi) y *M.fusca* (Cato). Las secuencias muestran similitudes con el género *Plasmodium* y los subgéneros *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus*. CatoC00400 y CatoC00443 corresponden a secuencias que sugieren el descubrimiento de un linaje no reportado hasta ahora. Los valores de bootstrap se muestran sobre los nodos.]



**Fig. 5. Carga parasitaria en sitios con diferente calidad de hábitat.**

[Se muestra la carga parasitaria promedio en aves infectadas por haemosporidios en las tres categorías de calidad de hábitat: calidad alta (High\_q), calidad media (Moderate\_q) y calidad baja (Low\_q). Para ninguna de las dos especies se encontraron diferencias significativas en la carga parasitaria entre categorías de hábitat. **A** *H. mexicanus*  $F_2 = 1.173$ ,  $P = 0.316$ . **B** *M. fusca*  $F_2 = 1.309$ ,  $P = 0.303$ . Las barras representan los intervalos de confianza al 95%]



**Tabla 1. Diagnóstico y estimación de prevalencia de haemosporidios en tres especies de aves.** Se presentan los datos obtenidos a través de amplificación por PCR, el número de falsos negativos detectados, la estimación de prevalencia y la cuantificación de los parásitos observados en 100 campos (100x) a través de microscopía para cada especie. M: Microscopía.

Especie	n	Positivos		Prevalencia (%)	$\bar{x}$ parásitos/100 campos
		PCR	M		
<i>C.brunneicapillus</i>	16	0	0	NA	0
<i>M. fusca</i>	40	16	18	47.5	23
<i>H. mexicanus</i>	106	43	46	44.3	63

## Material suplementario

### *Diagnóstico molecular de parásitos haemosporidios.*

Ejemplo de los geles que se obtuvieron para el diagnóstico molecular de parásitos haemosporidios. Se muestran las amplificaciones de un fragmento del Citocromo *b* de los parásitos a partir del ADN de 12 individuos diferentes. Las muestras que presentan banda corresponden a los individuos parasitados, las muestras que no presentan banda corresponden a los casos negativos de infección. Los carriles 2 y 3 corresponden a los controles positivos y el carril 16 es el control negativo. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb.

