

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Estrés fisiológico y morfometría en poblaciones del Canario  
*María Setophaga petechia aureola* con distintos impactos  
antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos**

**Karen Mishell Pacheco Jiménez**

**Ingeniería en Biotecnología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 21 de diciembre de 2020

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Estrés fisiológico y morfometría en poblaciones del Canario María  
*Setophaga petechia aureola* con distintos impactos antropogénicos en San  
Cristóbal, Galápagos**

**Karen Mishell Pacheco Jiménez**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Diego Cisneros-Heredia, PhD**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Andrea Moentero, MSc**

Quito, 21 de diciembre de 2020

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Karen Mishell Pacheco Jiménez

Código: 00137343

Cédula de identidad: 1724554553

Lugar y fecha: Quito, 21 de diciembre de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

## RESUMEN

La interrupción humana y sus efectos sobre el medioambiente constituyen algunas de las principales amenazas para la conservación de la avifauna de Galápagos. Una de sus consecuencias es la elevación de los niveles de estrés, lo que a largo plazo puede afectar el bienestar del individuo e incluso la estabilidad de toda una población. El impacto antropogénico también se asocia con cambios morfométricos en aves. El canario María (*Setophaga petechia aureola*) es una subespecie endémica de Galápagos y la isla Cocos. Sin embargo, sufre amenazas constantes al ser la especie que más muere arrollada por vehículos en Santa Cruz, por lo que es clave evaluar sus niveles de estrés fisiológico en áreas impactadas. En el presente estudio se analizaron la morfometría y las concentraciones de corticosterona, la hormona del estrés en aves, en plumas individuos de *S. petechia aureola* en espacios urbanos, silvopastoriles y nativos en San Cristóbal, Galápagos entre mayo y julio de 2018 y 2019. Se observó que las poblaciones de *S. petechia aureola* en ambientes con mayor impacto antropogénico tienen diferencias morfométricas significativas al compararlas con poblaciones en hábitats menos impactados. Se registraron picos más grandes en ecosistemas nativos, y picos más pequeños en los espacios verdes urbanos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de estrés de los distintos ecosistemas evaluados en 2018, 2019, ni entre años. No obstante, existe una tendencia en la que los mayores niveles de estrés se concentran en zonas nativas y los menores en las áreas urbanas, de acuerdo con lo descrito para la morfometría. Estos resultados sugieren que los factores antropogénicos no constituyen una fuente adicional de estrés para *S. petechia aureola* en San Cristóbal, pese a que existe una asociación con cambios en la morfometría.

**Palabras clave:** aves, estrés fisiológico, Galápagos, impacto antropogénico, morfometría, *Setophaga petechia aureola*

## ABSTRACT

Human disturbance and its environmental effects are among the main threats to the conservation of the Galapagos' avifauna. One of its consequences is the increase of stress levels, which, in the long term, may affect individual wellbeing and even population stability. Anthropogenic impact is also associated with morphometric changes in birds. The Galapagos Yellow Warbler (*Setophaga petechia aureola*) is an endemic Galapagos' and Cocos Island subspecies. However, it is constantly threatened as it is the species that dies the most in vehicle collisions in Santa Cruz, hence it is crucial to evaluate its physiological stress levels in human-impacted areas. In this study, we analyzed morphometry and feather corticosterone, the stress hormone in birds, in *S. petechia aureola*'s populations in urban, silvopasture and native spaces in San Cristobal, Galapagos between May and July of 2018 and 2019. We observed that populations in environments with higher anthropogenic disturbance exhibit significant morphometric differences in comparison with populations in less impacted habitats. Bigger beaks were registered in native ecosystems, and smaller beaks in the green urban spaces. No statistically significant differences were found among the stress levels of the ecosystems evaluated in 2018, 2019 nor between years. Nonetheless, a tendency shows that the higher stress levels concentrate in the native ecosystems, and the lower levels in the urban areas, as we report for the morphometry. These results suggest that anthropogenic factors do not constitute an additional stress source for *S. petechia aureola* in San Cristóbal, even when there is an association with morphometric variability.

**Key words:** birds, physiological stress, Galapagos, anthropogenic impact, morphometry, *Setophaga petechia aureola*

## TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	10
2. Métodos .....	15
2.1. Sitios de muestreo .....	15
2.2. Captura de los sujetos de estudio, obtención de datos morfométricos y colección de plumas.....	15
2.3. Procesamiento de plumas y extracción de corticosterona.....	16
2.4. Evaluación de los niveles de estrés .....	17
2.4.1. Validación del ensayo.....	17
2.5. Análisis estadísticos .....	18
3. Resultados.....	20
3.1. Morfometría .....	20
3.1.1. Morfometría de los individuos capturados en 2018. ....	20
3.1.2. Morfometría de los individuos capturados en 2019. ....	20
3.1.3. Comparación de morfometría de 2018 y 2019. ....	21
3.2. Evaluación de los niveles de estrés .....	21
3.2.1. Validación del ensayo.....	21
3.2.2. Niveles de estrés de 2018. ....	22
3.2.3. Niveles de estrés de 2019. ....	22
3.2.4. Comparación entre niveles de estrés de 2018 y 2019.....	22
4. Discusión .....	24
5. Conclusiones.....	29
6. Tablas .....	30
7. Figuras .....	34
8. Referencias bibliográficas .....	39
Anexo A: Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo.....	48
Anexo B: Individuos capturados en cada ecosistema.....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Estadística descriptiva y valores p de medidas morfométricas y niveles de estrés de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distinto impacto antropogénico en San Cristóbal, Galápagos en 2018 y 2019. ....	30
<b>Tabla 2:</b> Estadística descriptiva de las medidas morfométricas de pico de 2018 y 2019 estadísticamente significativas de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distinto impacto antropogénico en San Cristóbal, Galápagos. ....	31
<b>Tabla 3:</b> Valores p de comparación entre medidas morfométricas y entre niveles de estrés de 2018 y 2019 de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distinto impacto antropogénico en San Cristóbal, Galápagos.....	32
<b>Tabla 4:</b> Análisis de validez del ensayo. Se observan los parámetros considerados para el análisis de validez del ensayo ELISA.....	32
<b>Tabla 5:</b> Estadística descriptiva de rangos de estrés de 2018 y 2019 de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distinto impacto antropogénico en San Cristóbal, Galápagos.. ....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa de la vegetación y usos de suelo de San Cristóbal con los puntos de muestreo del estudio.....	34
<b>Figura 2:</b> Longitud de pico de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos en 2018 ( $p=0,035$ ).....	35
<b>Figura 3:</b> Profundidad de pico de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos en 2018 ( $p=0,001$ ).....	35
<b>Figura 4:</b> Longitud de pico de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos en 2019 ( $p=0,024$ ).....	36
<b>Figura 5:</b> Profundidad de pico de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distintos impactos antropogénicos en 2019 ( $p=0,009$ ).....	36
<b>Figura 6:</b> Ancho de pico de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos en 2018 ( $p<0,0001$ ).....	37
<b>Figura 7:</b> Niveles de estrés de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distintos impactos antropogénico en San Cristóbal, Galápagos en 2018 ( $p=0,155$ ).....	37
<b>Figura 8:</b> Niveles de estrés de <i>S. petechia aureola</i> en sitios con distintos impactos antropogénico en San Cristóbal, Galápagos en 2019 ( $p=0,411$ ).....	38

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, varios investigadores han dedicado sus esfuerzos a comprender los efectos de la actividad humana en la vida salvaje y el ambiente debido al sostenido crecimiento de la población mundial y a los cambios paisajísticos que conlleva (Chalen, 2019; Dantzer et al., 2014; Gill, 2007; González-Pérez & Cubero-Pardo, 2010; Injaian et al., 2020). El impacto antropogénico es la irrupción en ambientes naturales causada por las actividades humanas desempeñadas en un área geográfica, generando una fragmentación de hábitats que puede inclusive desplazar a poblaciones animales y vegetales de sus lugares de origen (Herrera-Dueñas et al., 2017; Partecke, Schwabl, & Gwinner, 2006). Se ha evidenciado que la intervención humana provoca cambios ambientales en la temperatura, los índices de contaminación y la disponibilidad de recursos como alimento y espacio (Herrera-Dueñas et al., 2017; Isaksson, 2018; Seress & Liker, 2015; Sheriff et al., 2011).

Estas alteraciones representan un desafío para ciertas especies animales, cuando se interpretan como estresores, los cuales son estímulos que propician la desestabilización de la homeostasis al desencadenar respuestas fisiológicas que afectan el bienestar y la supervivencia en los individuos (Busch & Hayward, 2009; Chalen, 2019; Dantzer et al., 2014; Donihue & Lambert, 2015). Se ha demostrado que la exposición crónica a cambios antropogénicos incrementa los niveles de estrés para especies de mamíferos, reptiles, anfibios y aves; en tanto que otras especies no exhiben diferencias en los niveles de estrés frente a tales irrupciones (Busch & Hayward, 2009; Dantzer et al., 2014; Fokidis, Orchinik, & Deviche, 2009; Heiss, Clark, & McGowan, 2009; Ibáñez-Álamo et al., 2020; Rebolo-Ifran et al., 2015). La evaluación de estrés fisiológico permite comprender los efectos del impacto humano sobre los individuos y las poblaciones animales frente a escenarios tan variados entre especies (Meillère et al., 2015; Schlesinger, Manley, &

Holyoak, 2008). La importancia de realizar este tipo de estudios radica en la valoración del estado de salud de las poblaciones para la predicción de tasas de supervivencia en el diseño de estrategias de conservación *in-situ* para mantener poblaciones viables y estables (Busch & Hayward, 2009; Dantzer, Fletcher, Boonstra, & Sheriff, 2014).

El estrés fisiológico es una respuesta multidimensional a estímulos ambientales que representan una amenaza y alteran la homeostasis del organismo, por ello sus niveles se usan para determinar el estado de salud de los individuos (Galindo, 2016; Kersey & Dehnhard, 2014). Los estresores son señales ambientales interpretadas por el organismo como amenazas para la supervivencia y generan una disrupción homeostática (Boonstra, 2013; Galindo, 2016). Este tipo de señales requieren que el organismo reconozca su magnitud, basándose normalmente en respuestas innatas (Boonstra, 2013; Galindo, 2016; Kersey & Dehnhard, 2014; Russ et al., 2015). Una vez reconocida la amenaza se activa la respuesta hormonal regulada por el eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA) que, a través de una reacción en cascada, se encarga de estimular a la corteza adrenal para la secreción de hormonas glucocorticoides como la corticosterona (Romero Peñuela, Uribe-Velásquez, & Sánchez Valencia, 2011). A corto plazo, los glucocorticoides ayudan al individuo a sobrellevar situaciones amenazantes, mientras que a largo plazo, tienen un efecto perjudicial en el bienestar físico, fitness y supervivencia debido que las funciones inmunológicas, reproductivas, digestivas y de crecimiento se afectan de forma negativa (Galindo, 2016; Herrera-Dueñas et al., 2017). Precisamente, por este motivo los glucocorticoides son los biomarcadores de estrés más usados y confiables (Russ et al., 2015; Sheriff et al., 2011).

Las aves son utilizadas como modelo biológico para comprender las consecuencias de la irrupción ambiental causada por factores antropogénicos (Chalen, 2019; Seress & Liker, 2015). Se han establecido asociaciones entre el impacto humano,

la morfometría y el comportamiento para diversas especies de aves, por lo que son usados como indicadores de bienestar con frecuencia (Charmantier et al., 2017; Meillère et al., 2015). De igual forma, el estrés aviar se mide a través de las concentraciones de corticosterona, una hormona glucocorticoide. Las muestras que comúnmente se utilizan para evaluar la concentración de corticosterona son el plasma sanguíneo, heces o plumas (Aharon-Rotman et al., 2017; Chávez-Zichinelli et al., 2013; Möstl, Rettenbacher, & Palme, 2005). Las plumas se consideran indicadores objetivos de la respuesta fisiológica al estrés en aves puesto que la corticosterona se acumula dentro de las células queratinizadas de las plumas cuando el estresor ha estado presente durante el crecimiento del plumaje (Bortolotti et al., 2008; Carbajal et al., 2014; Freeman & Newman, 2018; Monclús et al., 2020). Las plumas también se prefieren como elementos de análisis por razones bioéticas debido a que su colección consiste en un procedimiento no invasivo, es decir, no es violento ni afecta la integridad física del ave (Aharon-Rotman et al., 2017; Möstl, Rettenbacher & Palme, 2005; Romero & Fairhurst, 2016).

La evaluación de estrés a través de la medición de corticosterona se lleva a cabo con diferentes técnicas. El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, o ELISA por sus siglas en inglés, es la técnica más usada en estudios relacionados con la cuantificación de glucocorticoides. Este tipo de inmunoanálisis se vale de reacciones de enzima-sustrato para marcar al anticuerpo en la detección cuantitativa de corticosterona (Díaz, Véliz & Wohlk, 2015). Específicamente, el ELISA competitivo se fundamenta en el principio de la unión competitiva entre el conjugado de la hormona y el cortisol presente en la muestra con los limitados sitios de unión en la placa cubierta de anticuerpos (Smit & Plettenburg, 2019). Esta técnica presenta varias ventajas como su capacidad de detectar bajas concentraciones gracias a la alta especificidad de la reacción inmunológica de unión entre

antígeno y anticuerpo; además de ser rápida, sencilla, reproducible y está disponible a nivel comercial (Díaz, Véliz & Wohllk, 2015).

El impacto antropogénico es un factor ampliamente distribuido en las Islas Galápagos desde su colonización en 1830 (Parque Nacional Galápagos, 2020). Los espacios urbanos ocupan 0,1% de la superficie terrestre del archipiélago (Laso et al., 2020). Las áreas agrícolas representan el 3,26% de las islas y se ubican en los distintos gradientes ambientales, incluyendo ecosistemas nativos (Laso et al., 2020; Rivas-Torres et al., 2018). Según un censo realizado en 2015, la Isla San Cristóbal es la segunda más poblada del archipiélago con 7199 habitantes en ese año y una proyección poblacional de 12958 habitantes para 2020 (INEC, 2015). Además, posee un flujo turístico constante y de crecimiento sostenido pues en 2019 recibió 76683 visitantes, lo que representa un aumento del 15% respecto al 2018 y se traduce en una ocupación del 0,3% del área de la isla por espacios urbanos (Parque Nacional Galápagos, 2020; Rivas-Torres et al., 2018). Las áreas agrícolas abarcan 2535 hectáreas de la superficie terrestre de San Cristóbal, con 5.24% de ocupación por pasturas y 6.44% por cultivos tanto transitorios como permanentes. La parte alta de la isla se encuentra fuera de la región protegida por el Parque Nacional Galápagos y compone el 15% de los espacios agrícolas. Además, los cambios antropogénicos en San Cristóbal se evidencian también a través del 10% de superficie cubierta por especies pioneras; las cuales colonizan ambientes naturales que han sufrido irrupciones recientes (Laso et al., 2020).

La disrupción humana y sus efectos sobre el medioambiente podrían erigirse algunas de las principales amenazas para la conservación de aves de Galápagos, como *Setophaga petechia aureola* (el canario María) (Jiménez-Uzcátegui et al., 2019). Esta es un ave no migratoria del orden Passeriformes, familia Parulidae, de aproximadamente 15 cm de largo, color amarillo brillante, hábitos insectívoros y una vida

media de 3,6 años (Chaves, Parker y Smith, 2012; Freile et al., 2019). Como especie habita en todo el continente americano y es catalogada como estable según la lista roja de la IUCN (Freile et al., 2019). No obstante, *Setophaga petechia aureola* es la subespecie endémica de Galápagos y la isla Cocos. Su principal distinción morfológica es la presencia de una corona de tonalidad rojiza en su cabeza. Los datos moleculares confirman que ha divergido de las poblaciones de continente y que proviene de la población de Centroamérica cuya colonización fue hace alrededor de 18 5000 o 30 000 años (Chaves, Parker y Smith, 2012). Es además la única especie de ave terrestre insectívora que está ampliamente distribuida en todas las condiciones ambientales de San Cristóbal (Velarde, 2018).

Sin embargo, el canario María sufre amenazas constantes pues, según reportes, este canario fue la especie que más murió arrollada por vehículos en Santa Cruz en 2018, representando el 67% cuerpos encontrados (García-Carrasco & Román, 2019). Asimismo, se ha evidenciado que las poblaciones de una subespecie emparentada (*Setophaga petechia aestiva*), que también se distribuye ampliamente en Norteamérica, se han reducido por la influencia de actividades humanas Taylor & Littlefield, 1986; Ohmart, 1994). Considerando lo antes expuesto, el objetivo de este proyecto es comparar los niveles de estrés y la morfometría de poblaciones de *S. petechia aureola* que habitan en ecosistemas con diferentes grados de impacto antropogénico en San Cristóbal, incluyendo áreas urbanas y silvopastoriles, y ecosistemas nativos como el Bosque Deciduo y el Bosque Siempreverde Estacional, para determinar si los factores antropogénicos influyen sobre la morfometría y bienestar de esta ave endémica de Galápagos.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Sitios de muestreo

El estudio fue conducido en el este de San Cristóbal, Galápagos. Se escogieron un total de 10 sitios de muestreo clasificados en cuatro categorías en base al tipo de ecosistema según los estudios de Rivas-Torres et al., 2018 y Laso et al., 2020 (Figura 1 y Anexo A). La categoría de Espacios Verdes Urbanos corresponde al área urbana periférica de Puerto Baquerizo Moreno, cuya vegetación es boscosa y arbustiva con especies tanto nativas como no-nativas (Rivas-Torres et al., 2018; Laso et al. 2020). La categoría silvopastoril incluye herbazales para ganado y plantas introducidas de los géneros *Psidium* y *Citrus*. Ambas categorías representan áreas intervenidas e impactadas por el ser humano que además se ubican fuera del Parque Nacional Galápagos (Rivas-Torres et al., 2018; Laso et al. 2020). Las categorías de Bosque Bajo Deciduo y Bosque Siempreverde Estacional Alto corresponden a ecosistemas naturales, caracterizados por la baja abundancia de especies vegetales introducidas y la ausencia de cambio antropogénico del uso de suelo; además de ser parte del Parque Nacional Galápagos (Rivas-Torres et al, 2018; Laso et al. 2020).

### 2.2. Captura de los sujetos de estudio, obtención de datos morfométricos y colección de plumas

La toma de muestras se realizó en dos periodos de tiempo. El primero inició en junio y concluyó en julio de 2018, mientras que el segundo empezó en mayo y finalizó en julio de 2019. En cada uno de los sitios se completaron seis muestreos durante tres días consecutivos, tres en la mañana entre las 6h00 y 9h00 y tres en la tarde entre las 15h00 y 18h00. Durante los muestreos se capturaron ejemplares de *Setophaga petechia aureola* y otras especies de aves terrestres, empleando tres redes de niebla, dos de seis metros y una de 12 metros. Estas redes se ubicaron en zonas de paso de aves. En los individuos

capturados se midió la longitud del tarso, longitud del ala, longitud del pico, ancho de pico y profundidad de pico siempre con la misma regla calibradora digital. Las medidas del pico se tomaron por triplicado. El pesaje se efectuó con una balanza Pesola. Después, se recolectó una pluma de la cola, se marcó a los individuos de forma no invasiva con el fin de identificar posibles recapturas y se procedió liberarlos. Las plumas se almacenaron a temperatura ambiente y oscuridad hasta su procesamiento.

Los datos morfométricos y plumas colectados en 2018 correspondieron a 21 individuos de *Setophaga petechia aureola*, cinco capturados en los puntos de muestreo correspondientes al Bosque Deciduo, seis al Bosque Siempreverde Estacional, seis a los espacios verdes urbanos y cuatro a los sitios silvopastoriles. Mientras que los datos morfométricos y plumas colectadas en 2019 correspondieron a 29 individuos de *Setophaga petechia aureola*, diez capturados en el punto de muestreo del Bosque Deciduo, siete al Bosque Siempreverde Estacional, seis a los Espacios Verdes Urbanos y seis a los Sitios Silvopastoriles (Anexo B).

### **2.3. Procesamiento de plumas y extracción de corticosterona**

Se siguió el protocolo propuesto por Bortolotti, Marchant, Blas y German en 2008. Se midió la longitud y el peso de las plumas. Se descartaron los cálamos y el estandarte fue recortado en fragmentos de área menor a  $5\text{mm}^2$ , los cuales fueron suspendidos en 5 ml de metanol. La mezcla fue sometida a un proceso de sonicación durante 30 minutos a temperatura ambiente para después incubarse a  $50^\circ\text{C}$  con agitación por 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se separaron los restos de las plumas del extracto de corticosterona disuelto en metanol utilizando un filtro con membrana PFTE con un poro de  $0,45\ \mu\text{m}$  de diámetro; transfiriendo así el contenido a un nuevo tubo Falcon. El primer tubo Falcon fue lavado con 2,5 ml metanol que también fueron transferidos al tubo que contenía el extracto de corticosterona filtrado. El total de 7,5 ml de extracto de

corticosterona disuelto en metanol fue evaporado en una incubadora a 50 °C, donde después se resuspendieron los residuos con 1,5 ml de PBS para ser almacenados en refrigeración a 4 °C hasta la realización de la prueba ELISA (Bortolotti et al., 2008).

## **2.4. Evaluación de los niveles de estrés**

Se realizó un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, según sus siglas en inglés) con el kit comercial para cortisol de Labor Diagnostika Nord LDN®. Se dispensaron por duplicado 20 µl de los extractos de corticosterona diluidos en PBS obtenidos de 50 muestras de plumas, los dos controles de reproducibilidad, el blanco (PBS) y los siete estándares de cortisol del kit (0, 20, 50, 100, 200, 400 y 800 ng/ml); siguiendo el protocolo y las indicaciones recomendadas en las instrucciones provistas por la casa de manufacturación. La distribución de pocillos fue diseñada de tal manera que las muestras analizadas en cada ensayo correspondían al total de muestras de cada ecosistema, cuyo orden fue aleatorizado.

Se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro para microplacas Thermo Scientific™ MultiSkan™. Este espectrofotómetro se configuró para generar una curva estándar de "Absorbancia a 450 nm vs. Concentración" a partir de los estándares de cortisol del kit. La curva estándar se ajustó por medio de una regresión logística de cuatro parámetros (4-LP), lo que permitió calcular las concentraciones de cortisol de los duplicados de cada muestra. Los resultados se corrigieron para el volumen de suspensión en PBS y el peso de cada pluma, por lo cual las concentraciones finales se presentan como ng cortisol/mg de pluma.

### **2.4.1. Validación del ensayo.**

#### **2.4.1.1. *Precisión y reproducibilidad.***

Los ensayos fueron validados siguiendo criterios de precisión, reproducibilidad y sensibilidad. Con ese fin se incluyeron controles de reproducibilidad que correspondían

a dos muestras designadas para evaluarse en todos los ensayos realizados. La precisión se analizó por medio del coeficiente de variabilidad intra-ensayo (CV intra-ensayo) que se calculó a partir de las lecturas de los niveles de cortisol obtenidos para los duplicados de cada muestra. Se estableció un 20% variabilidad intra-ensayo como el límite máximo aceptable (Abcam, 2018; Kelly & DeSilva, 2007; Lee et al., 2006; Lee & Hall, 2009; U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration, 2018). Adicionalmente, se hizo una prueba T de una muestra comparando los CV intra-ensayo de uno de controles de reproducibilidad con la lectura con menor variabilidad del mismo control. La reproducibilidad, por su parte, se validó con el cálculo de la variabilidad inter-ensayo de los controles de reproducibilidad. La sensibilidad fue calculada a partir de las lecturas más bajas obtenidas para el estándar cero de cortisol del kit en cada ensayo realizado.

#### **2.4.1.2. Detección de corticosterona.**

Se realizó un ensayo usando controles de corticosterona de 50, 100 y 200 ng/ml y se compararon las diferencias entre las lecturas obtenidas para estos controles con las de los estándares de cortisol del kit empleado con concentración equivalentes.

## **2.5. Análisis estadísticos**

Todos los análisis fueron realizados usando Minitab versión 19. En un análisis inicial se realizó la prueba de valores atípicos  $r_{22}$  de Dixon para todos los datos de medidas morfológicas y niveles de estrés, con el fin de remover valores atípicos. Una vez removidos los valores atípicos, se evaluó si los datos seguían una distribución normal y si mantenían igualdad de varianza. Cuando no seguían una distribución normal, se transformaron por el método CoxBox. Se definió  $\alpha=0,05$  como nivel de significancia.

Para determinar variaciones de medidas morfométricas (peso, longitud del tarso, longitud del ala, longitud del pico, ancho de pico, profundidad de pico) de *Setophaga*

*petechia aureola* en los cuatro ecosistemas evaluados en 2018 y 2019, se usó el análisis de varianza de un solo factor. El tipo de ecosistema se consideró como factor y las medidas morfométricas de ambos años como variable de respuesta. En caso de encontrarse datos estadísticamente significativos se realizó la prueba de comparación múltiple Tukey con 95% de confiabilidad como análisis post-ANOVA. Se realizaron pruebas T de Student para muestras independientes para identificar posibles diferencias en cuanto a medidas morfométricas entre años.

La comparación de los niveles de estrés de *Setophaga petechia aureola* en los cuatro ecosistemas evaluados se realizó por medio del análisis de varianza de un solo factor. Para los análisis de cada año, se consideró al tipo de ecosistema como factor y a los niveles de estrés como variable de respuesta. Se realizó una prueba T de Student para muestras independientes para identificar posibles diferencias de niveles de estrés entre años.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Morfometría

##### 3.1.1. Morfometría de los individuos capturados en 2018.

El peso, longitud de ala, longitud de tarso y ancho de pico registrados no difirieron entre poblaciones de *Setophaga petechia aureola* en ecosistemas con diferentes impactos antropogénicos ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1).

La longitud de pico presentó diferencias estadísticamente significativas entre los ecosistemas estudiados ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1 y Figura 2). Según la prueba de Tukey, el Bosque Deciduo fue estadísticamente diferente respecto a los otros ecosistemas pues allí se agrupan los picos más largos con una media de 0,905 cm, mientras que los picos más cortos se registraron en el Bosque Siempreverde Estacional con una media de 0,865 cm (Tabla 2). Igualmente, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la profundidad de pico entre los ecosistemas analizados ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1 y Figura 3). El Bosque Deciduo también fue estadísticamente diferente según la prueba de Tukey debido a que allí se encuentran los picos más profundos con una media de 0,336 cm. El resto de los ecosistemas fueron similares entre sí, aunque los picos menos profundos se concentran en los Espacios Verdes Urbanos con una media de 0,307 cm (Tabla 2).

##### 3.1.2. Morfometría de los individuos capturados en 2019.

El peso, longitud de ala y longitud de tarso descritos para 2019 no exhibieron diferencias entre poblaciones de *Setophaga petechia aureola* en ecosistemas con diferentes impactos antropogénicos en San Cristóbal ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1).

La longitud de pico exhibió diferencias estadísticamente significativas entre ecosistemas ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1 y Figura 4). Se observa que los picos más largos se agrupan en los Espacios Verdes Urbanos con una media de 0,914 cm y que los picos más cortos se ubican principalmente en el Bosque Siempreverde Estacional con una media de 0,878

cm (Tabla 2). Sin embargo, ninguno de estos sitios fue estadísticamente diferente según la prueba de Tukey. También se calcularon diferencias significativas en la profundidad de pico ( $p < 0,05$ ) al comparar esta medida entre las poblaciones de los ecosistemas estudiados (Tabla 1 y Figura 5). La prueba de Tukey mostró que los individuos con los picos menos profundos se localizan en los Espacios Verdes Urbanos con una media 0,290 cm. El resto de los ecosistemas son similares entre sí, pese a que se aprecia que los picos más profundos se encuentran en el Bosque Siempreverde Estacional, cuya media es de 0,317 cm (Tabla 2). Igualmente, el ancho de pico fue estadísticamente diferente entre las áreas de estudio ( $p < 0,005$ ) (Tabla 1 y Figura 6). La prueba de Tukey evidenció que los picos menos anchos se reúnen en los Espacios Verdes Urbanos con una media de 0,316 cm. El ancho de pico fue similar entre el resto de los ecosistemas, aunque los picos más anchos se concentran en el Bosque Siempreverde Estacional donde la media es de 0,368 cm (Tabla 2).

### **3.1.3. Comparación de morfometría de 2018 y 2019.**

Ninguna de las medidas morfológica evaluadas (peso, longitud de ala, longitud de tarso, longitud de pico, profundidad de pico, ancho de pico) fue estadísticamente diferente entre años ( $p > 0,05$ ) (Tabla 3).

## **3.2. Evaluación de los niveles de estrés**

### **3.2.1. Validación del ensayo.**

#### **3.2.1.1. *Precisión y reproducibilidad.***

Se comprobó la precisión de los ensayos ELISA al seleccionar 48 muestras que cumplieran tanto con los parámetros de precisión indicados por el kit como por definidos previamente (datos no mostrados). Esto fue respaldado una T de una muestra ( $p > 0,05$ ) que indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las lecturas que presentan una variación intra-ensayo menor a 20% (Tabla 4). Se mantuvo la

reproducibilidad entre ensayos debido a que se midió una variabilidad inter-ensayo de 22% y 27% para los dos controles analizados (Tabla 4).

#### **3.2.1.2. *Detección de corticosterona.***

Se obtuvieron lecturas confiables del control de corticosterona hasta la concentración de 50 ng corticosterona/ml. Se observó que a partir de los 100 ng corticosterona/ml se presentan inconsistencias en la detección de esta hormona por parte del kit ELISA de cortisol empleado pues las lecturas generadas para esta concentración y superiores son similares (Tabla 4).

#### **3.2.2. Niveles de estrés de 2018.**

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de estrés de 2019 de los ecosistemas estudiados ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1 y Figura 7). Sin embargo, se observa que los valores cuantificados fueron mayores en el Bosque Deciduo con una media de 13,841 ng cort/mg de pluma. En tanto que, los valores más bajos se ubican en el Bosque Siempreverde Estacional, donde la media fue de 8,743 ng cort/mg de pluma (Tabla 5).

#### **3.2.3. Niveles de estrés de 2019.**

Los niveles de estrés de 2019 no resultaron estadísticamente diferentes al compararse entre ecosistemas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1 y Figura 8). Los niveles de estrés más altos se agrupan en el Bosque Deciduo con una media de 12,465 ng cort/mg de pluma. Mientras que los valores más bajos se ubican en los Espacios Verdes Urbanos, donde la media fue de 10,025 ng cort/mg de pluma (Tabla 5).

#### **3.2.4. Comparación entre niveles de estrés de 2018 y 2019.**

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de estrés medidos entre años ( $p > 0,05$ ). Los niveles de estrés más altos se concentran en 2019

según la media de 11,463 ng cort/mg de pluma, exhibiéndose niveles más bajos en 2018 con una media de 11,070 ng cort/ mg de pluma (Tabla 3).

#### 4. DISCUSIÓN

El estudio de las variaciones en la morfometría y en los niveles de estrés fisiológico en aves son comúnmente utilizados para comprender los efectos del impacto antropogénico sobre la avifauna (Busch & Hayward, 2009; Chalen, 2019; Dantzer et al., 2014; Isaksson, 2018; Mena, 2020). Esto es especialmente relevante en Galápagos ya que la disrupción humana y sus efectos sobre el medioambiente son considerados como algunas de las principales amenazas para la conservación de sus aves (Jiménez-Uzcátegui et al., 2019).

Estudios postulan que la morfometría de las aves podría estar influenciadas por la intervención humana (Meillère et al., 2015). Por este motivo, se evaluó la morfometría de *S. petechia aureola* con relación a los distintos grados de impacto antropogénico presentes en San Cristóbal, Galápagos. Se determinó que la longitud, ancho y profundidad de pico fueron estadísticamente diferentes entre los ecosistemas evaluados. Si bien se obtuvieron medidas similares y comparables con las reportadas en estudios relacionados, este constituye el primer reporte sobre cambios en morfometría de pico para el canario María en San Cristóbal (Chaves et al., 2012; Velarde, 2018). Otras aves del archipiélago como el pinzón de Darwin de pico mediano (*Geospiza fortis*) y el pinzón terrestre pequeño (*Geospiza fuliginosa*), ambas especies granívoras, han evidenciado variaciones en el tamaño de pico en hábitats con distinto grado de impacto antropogénico en Santa Cruz y San Cristóbal (Chaves et al., 2012; Hendry et al., 2006; Mena, 2020). Igualmente, poblaciones de la subespecie *S. petechia xanthotera* en Costa Rica y de *S. petechia aestiva* en México también exhiben variaciones en la morfología del pico entre hábitats (Chavarria-Pizarro et al., 2019; Schweizer et al., 2012).

Las medidas más grandes de longitud, ancho y profundidad de pico se concentran en ecosistemas nativos como el Bosque Deciduo y Bosque Siempreverde. La tendencia

de que las aves exhiban picos más grandes en ecosistemas nativos ha sido observada con anterioridad para el pinzón de tierra pequeño (*Geospiza fuliginosa*) en Galápagos (Hendry et al. 2006; Huber & Podos, 2006; Mena, 2020). Estos ecosistemas se asocian con la presencia de vegetación diversa, diferentes tipos de sustratos y profundidades, los cuales proveen sitios de refugio para los insectos. En consecuencia, las aves deben recurrir a estrategias de forrajeo intensivas para acceder a las presas; posiblemente por ello es que los picos más grandes se concentran en las zonas nativas (Chavarria-Pizarro et al., 2019).

Las medidas más bajas de longitud, ancho y profundidad de pico corresponden a individuos muestreados en los Espacios Verdes Urbanos. La ausencia de sustratos posibilita una mayor accesibilidad de insectos en los Espacios Verdes Urbanos. Esto explicaría que los picos más pequeños hayan sido registrados en esa zona (Chavarria-Pizarro et al., 2019). Otra posibilidad podría atribuirse a las alteraciones desencadenadas sobre la dieta insectívora de *S. petechia aureola* como consecuencia de los cambios antropogénicos de hábitat, los cuales alteran la distribución y riqueza tanto de insectos como de vegetación (Caicedo & Cruz-Bernate, 2014). La actividad humana es responsable de emisiones de gases contaminantes que afectan la composición química y el follaje de las plantas (Caicedo & Cruz-Bernate, 2014). Aquello provoca que el follaje difiera en zonas urbanas y rurales, alterando de ese modo la composición de insectos de un área y, por ende, la alimentación del ave (Caicedo & Cruz-Bernate, 2014). No obstante, la variación morfométrica en distintas poblaciones de aves en ecosistemas insulares también podría deberse a varios factores como la estacionalidad y el dimorfismo sexual que son factores que no se consideraron en este estudio (Tietze, 2018).

No se observaron variaciones en la morfometría de *S. petechia aureola* relacionada con el peso, tarso y ala. Los rangos obtenidos fueron similares a los publicados en investigaciones relacionadas Cristóbal (Chaves et al., 2012; Velarde,

2018). Chaves y colaboradores también reportaron esto para el canario María en San Cristóbal, Santa Cruz, Isabela y otras islas del archipiélago. Estos autores sugieren que *S. petechia aureola* no exhibe diferencias morfológicas por un sesgo taxonómico pues posiblemente el ancestro de la especie carecía de una capacidad intrínseca hacia la variación morfológica y por ello el ave aún presenta bajas tasas de diferenciación morfométrica en la actualidad. Otra posible explicación es que el elevado flujo génico entre islas y entre poblaciones de una misma isla limita la diferenciación morfológica marcada (Chaves et al., 2012).

El estudio de estrés fisiológico, por su parte, es uno de los estándares en el estudio de los efectos del impacto antropogénico en poblaciones aves (Aharon-Rotman et al., 2017; Chalen, 2019). La cuantificación de la respuesta endócrina se realiza frecuentemente mediante técnicas de inmunoanálisis, como el ELISA. Pese a que existen kits comerciales disponibles, las empresas de manufacturación recomiendan validar los ensayos realizados para comprobar la precisión y veracidad de los resultados. Por esta razón, se analizaron 48 muestras que cumplieron con los parámetros de precisión. Se verificó también la capacidad de detección de corticosterona a nivel experimental debido a que se utilizó un kit de cortisol. Se determinó que las lecturas obtenidas son más bajas en comparación con las concentraciones reales, lo que va de acuerdo la reactividad cruzada de 40% con corticosterona reportada por el kit (Smit & Plettenburg, 2019). Así, los niveles de estrés obtenidos son aproximaciones comparables de contenido de corticosterona. Adicionalmente, se observó que el kit exhibe problemas para detectar concentraciones mayores a 100 ng corticosterona/ml. Esto también se consideró para la selección de muestras, cuyas concentraciones fueron menores a 100 ng/ml.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de estrés estimados para los ecosistemas evaluados en 2018, 2019 ni al compararlos entre

años. Estos datos sugieren que el impacto antropogénico no constituye una fuente de estrés adicional para *S. petechia aureola* en San Cristóbal. Esto es respaldado por el rango de corticosterona detectado, el cual fue similar al descrito previamente para la línea base de corticosterona en sangre para *S. petechia aestiva*, una subespecie emparentada, en Manitoba, Canadá (Wilson & Holberton, 2007). Asimismo, estudios relacionados reportan los niveles de estrés de otros paseriformes no difieren entre lugares intervenidos y no intervenidos (Fokidis, Orchinik, & Deviche, 2009; Heiss, Clark, & McGowan, 2009; Ibáñez-Álamo et al., 2020; Rebolo-Ifran et al., 2015). Varios autores sugieren que la intervención humana y sus consecuencias no tienen afectan a la avifauna, es decir, las poblaciones de aves persisten frente a la urbanización (Dantzer et al., 2014; Ibáñez-Álamo et al., 2020; Isaksson, 2018; Rebolo-Ifran et al., 2015). Incluso se ha evidenciado que los factores antropogénicos pueden brindar oportunidades de proliferación para determinadas especies aviares (Chalen, 2019; Isaksson, 2018). Por consiguiente, es posible otras variables ambientales que son las que dirigen las variaciones en cuanto a niveles de estrés de *S. petechia aureola*.

Si bien no existen diferencias estadísticamente significativas, los datos de niveles de estrés de 2018 y 2019 siguen una tendencia que se adecúa a lo descrito para la morfometría de *S. petechia aureola*. Se observa que los niveles de estrés más altos tanto para 2018 como para 2019 se agrupan en el Bosque Deciduo. Fenómeno que podría atribuirse nuevamente a la ecología de alimentación del canario María, como un insectívoro, ya que la caza de insectos se dificulta en este ecosistema (Chavarria-Pizarro et al., 2019). Los niveles de estrés más bajos de 2018 se registran para los Espacios Verdes Urbanos, donde el acceso a insectos es más sencillo (Chavarria-Pizarro et al., 2019). Se observó que los sitios silvopastoriles también tienen niveles de estrés más altos, posiblemente por la cercanía de tales sitios de muestreo con los ecosistemas nativos

circundantes (Rivas-torres et al., 2018). Los bajos niveles de estrés en el ecosistema Siempreverde Estacional de 2019 pueden atribuirse a los altos índices de humedad de ese ecosistema, los cuales favorecen a las poblaciones de insectos para la alimentación del canario (Larrea & Di Carlo, 2011).

Pese a que no se vieron diferencias estadísticamente significativas entre 2018 y 2019, los niveles de estrés de 2018 son menores en comparación con los de 2019. Teniendo en cuenta que *S. petechia aureola* cambia de plumaje entre mayo y julio de cada año (Rimmer, 1988), las medidas de estrés en plumas obtenidas brindan información del año previo. La precipitación puede tener una fuerte influencia en los niveles de corticosterona en aves (Martin & Rubenstein, 2008). Por ende, es posible que los niveles de precipitación de 2017, cercanos a los normales, se reflejen en los niveles de estrés de 2018 (INAMHI, 2017; Secretaría de Gestión de Riesgos, 2017). Esto podría haber ocurrido puesto que la pluviometría favorece a las poblaciones de insectos para la alimentación del canario. Los niveles de precipitación menores a los normales medidos para el periodo comprendido entre mayo y julio de 2018, justificarían a su vez que los niveles de estrés de 2019 sean más altos (INAMHI, 2018).

Estos resultados sugieren que el impacto antropogénico de San Cristóbal no ejerce un efecto directo sobre el estrés fisiológico del canario María y que las tendencias observadas se deben más bien a factores ecológicos y ambientales. Estudios similares han demostrado que enfoque de análisis de concentraciones de corticosterona no suele ser informativo cuando el impacto humano no influye sobre los niveles de estrés (Ibáñez-Álamo, et al, 2020). Así, las explicaciones sugeridas deberían ser comprobadas a futuro para entender mejor las respuestas fisiológicas de estrés de *S. petechia aureola* en Galápagos.

## 5. CONCLUSIONES

En un contexto de conservación, es vital comprender si la disrupción humana se relaciona con variaciones en la morfometría y en los niveles de estrés fisiológico en las aves endémicas de Galápagos, como el canario María (*S. petechia aureola*). En el presente estudio, se observó que las poblaciones de *S. petechia aureola* expuestas a ambientes con mayor impacto antropogénico tienen diferencias morfométricas significativas al compararlas con poblaciones en hábitats menos intervenidos. Específicamente, se evidenció que aquellos canarios que habitan en los ecosistemas nativos de San Cristóbal presentan un tamaño de pico significativamente mayor respecto a las aves que habitan en ecosistemas silvopastoriles y urbanos. En contraste, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de estrés entre sitios con distinto impacto antropogénico en 2018, 2019, ni entre años. Sin embargo, se observaron tendencias de concentraciones de la hormona del estrés similares a lo obtenido para la morfometría. Estos resultados sugieren que los factores antropogénicos no constituyen una fuente adicional de estrés para *S. petechia aureola* en San Cristóbal, pese a que existe una asociación con cambios en la morfometría.

Se recomienda profundizar los análisis sobre estrés fisiológico en el canario María en San Cristóbal mediante la ampliación del tamaño de muestra, y la inclusión de variables como la estacionalidad y el dimorfismo sexual. Asimismo, se sugiere realizar otros estudios para esclarecer la relación del impacto antropogénico con el estado de estrés del ave. Esto debido a que se ha evidenciado que otros biomarcadores de estrés, como los análisis de expresión genética, estrés oxidativo y pigmentación de carotenoides en plumas, pueden ser informativos cuando la respuesta fisiológica no lo es.

## 6. TABLAS

**Tabla 1:** Estadística descriptiva y valores p de medidas morfométricas y niveles de estrés de *S. petechia aureola* en sitios con distinto impacto antropogénico en San Cristóbal, Galápagos en 2018 y 2019. Se exponen la media, desviación estándar y el intervalo de confianza de 95% de cada medida morfométrica. Se muestran los grados de libertad (GL) que hacen referencia al número de muestras evaluadas, así como los estadístico T y el valor p resultantes. El nivel de significancia considerado fue 0,05.

	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>	<b>GL</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Medidas morfométricas 2018</b>						
Peso [g]	12,405	1,193	(11,862;12,948)	3	1,52	0,245
Longitud ala [cm]	6,233	0,379	(6,061;6,406)	3	1,60	0,226
Long. tarso [cm]	2,098	0,116	(2,045;1,151)	3	1,03	0,405
Long. pico [cm]	0,877	0,044	(0,865;0,888)	3	3,07	0,035
Ancho pico [cm]	0,362	0,031	(0,355; 0,370)	3	1,62	0,195
Prof. pico [cm]	0,316	0,0209	(0,311;0,321)	3	6,44	<0,001
<b>Medidas morfométricas 2019</b>						
Peso [g]	12,459	1,637	(11,836; 13,081)	3	2,68	0,068
Longitud ala [cm]	6,268	0,344	(6,1340; 6,4010)	3	0,25	0,863
Long. tarso [cm]	2,106	0,127	(2,054; 2,159)	3	1,25	0,317
Long. pico [cm]	0,533	0,039	(0,881; 0,898)	3	3,31	0,024
Ancho pico [cm]	0,356	0,036	(0,349;0,364)	3	11,88	<0,001
Prof. pico [cm]	0,311	0,027	(0,305;0,316)	3	4,10	0,009
<b>Niveles de estrés</b>						
Estrés 2018	11,070	4,105	(9,199; 9,940)	20	1,980	0,155
Estrés 2019	11,463	2,808	(10,352; 12,574)	26	1,000	0,411

**Tabla 2** :Estadística descriptiva de las medidas morfométricas de pico de 2018 y 2019 estadísticamente significativas de *S. petechia aureola* en sitios con distinto impacto antropogénico en San Cristóbal, Galápagos. Se exponen la media, desviación estándar y el intervalo de confianza de 95% de cada medida morfométrica. La columna agrupación indica que ecosistema es estadísticamente diferente y respecto a qué ecosistema según la prueba de comparación múltiple Tukey con 95% de confiabilidad, mediante una representación letras, donde cada letra hace referencia a una agrupación. El nivel de significancia considerado fue 0,05.

	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>	<b>Agrupación</b>	
<b>Longitud de pico 2018 [cm] (p=0,035)</b>					
Bosque Deciduo	0,905	0,029	(0,883; 0,926)	A	
Sitios silvopastoriles	0,869	0,032	(0,845; 0,893)	A	B
Espacios Verdes Urbanos	0,869	0,056	(0,849; 0,889)	A	B
Bosque Siempreverde	0,865	0,038	(0,845; 0,885)		B
<b>Profundidad de pico 2018 [cm] (p=0,001)</b>					
Bosque Deciduo	0,336	0,021	(0,326; 0,346)	A	
Sitios silvopastoriles	0,316	0,022	(0,306; 0,327)		B
Bosque Siempreverde	0,310	0,014	(0,301; 0,319)		B
Espacios Verdes Urbanos	0,307	0,018	(0,299; 0,316)		B
<b>Longitud de pico 2019 [cm] (p=0,024)</b>					
Bosque Deciduo	0,914	0,041	(0,893; 0,934)	A	
Sitios silvopastoriles	0,900	0,036	(0,883; 0,918)	A	
Espacios Verdes Urbanos	0,881	0,041	(0,867; 0,895)	A	
Bosque Siempreverde	0,879	0,033	(0,865; 0,895)	A	
<b>Profundidad de pico 2019 [cm] (p=0,009)</b>					
Bosque Siempreverde	0,317	0,027	(0,306; 0,327)	A	
Bosque Deciduo	0,315	0,025	(0,306; 0,324)	A	
Sitios silvopastoriles	0,314	0,023	(0,302; 0,326)	A	
Espacios Verdes Urbanos	0,290	0,026	(0,277; 0,303)		B
<b>Ancho de pico 2019 [cm] (p&lt;0,0001)</b>					
Bosque Siempreverde	0,368	0,041	(0,356; 0,381)	A	
Bosque Deciduo	0,367	0,031	(0,355; 0,378)	A	
Sitios silvopastoriles	0,356	0,019	(0,342; 0,371)	A	
Espacios Verdes Urbanos	0,316	0,027	(0,299; 0,332)		B

**Tabla 3:** Valores p de comparación entre medidas morfométricas y entre niveles de estrés de 2018 y 2019 de *S. petechia aureola* en sitios con distinto impacto antropogénico en San Cristóbal, Galápagos. Se muestran los grados de libertad (GL) que hacen referencia al número de muestras evaluadas, así como los estadístico T y el valor p resultantes. El nivel de significancia considerado fue 0,05.

	<b>GL</b>	<b>T</b>	<b>p</b>
<b>Medidas morfométricas</b>			
Peso [g]	47	-0,13	0,894
Longitud de ala [cm]	40	-0,32	0,747
Longitud de tarso [cm]	43	-0,23	0,820
Longitud de pico [cm]	45	-1,91	0,059
Ancho de pico [cm]	44	1,11	0,270
Profundidad de pico [cm]	48	1,32	0,189
<b>Niveles de estrés</b>			
Rangos estrés 2018 vs. 2019	47	-0,37	0,710

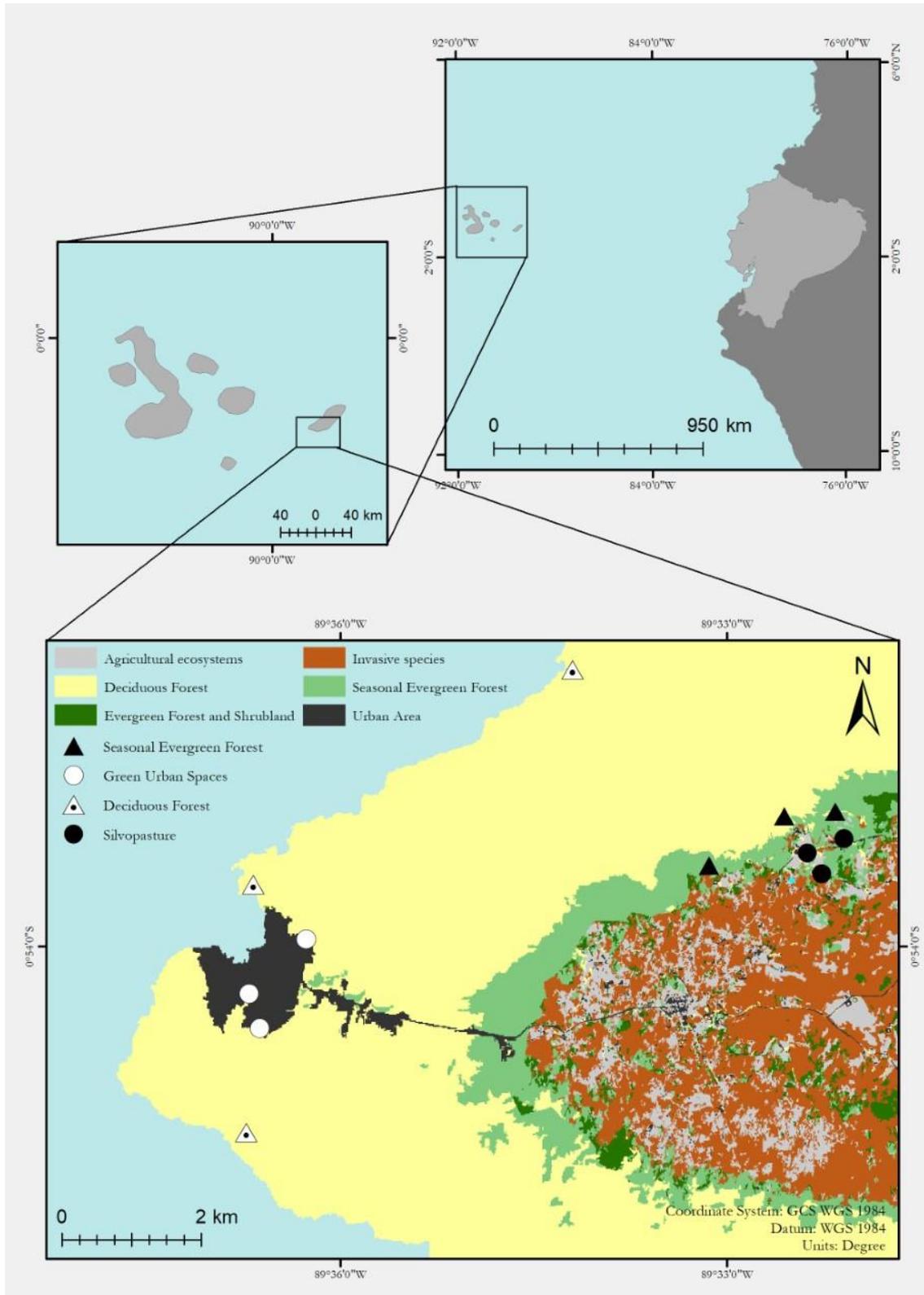
**Tabla 4:** Análisis de validez del ensayo. Se observan los parámetros considerados para el análisis de validez del ensayo ELISA. Para la precisión se muestra el valor p de la prueba T de una muestra realizada, donde se consideró un nivel de significancia fue 0,05. Para la reproducibilidad se muestran los coeficientes de variabilidad intra-ensayo. Para la verificación de la detección de corticosterona por parte del kit de cortisol utilizado se presentan las lecturas obtenidas para los controles de corticosterona con concentración conocida.

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
<b>Precisión</b>	
Prueba T de una muestra [p]	0,453
<b>Reproducibilidad</b>	
Control 1 [%CV]	27,263
Control 2 [%CV]	22,485
<b>Detección corticosterona</b>	
Control 50 ng corticosterona/ml [ng cortisol/ml]	37,935
Control 100 ng corticosterona/ml [ng cortisol/ml]	94,175
Control 200 ng corticosterona/ml [ng cortisol/ml]	93,815

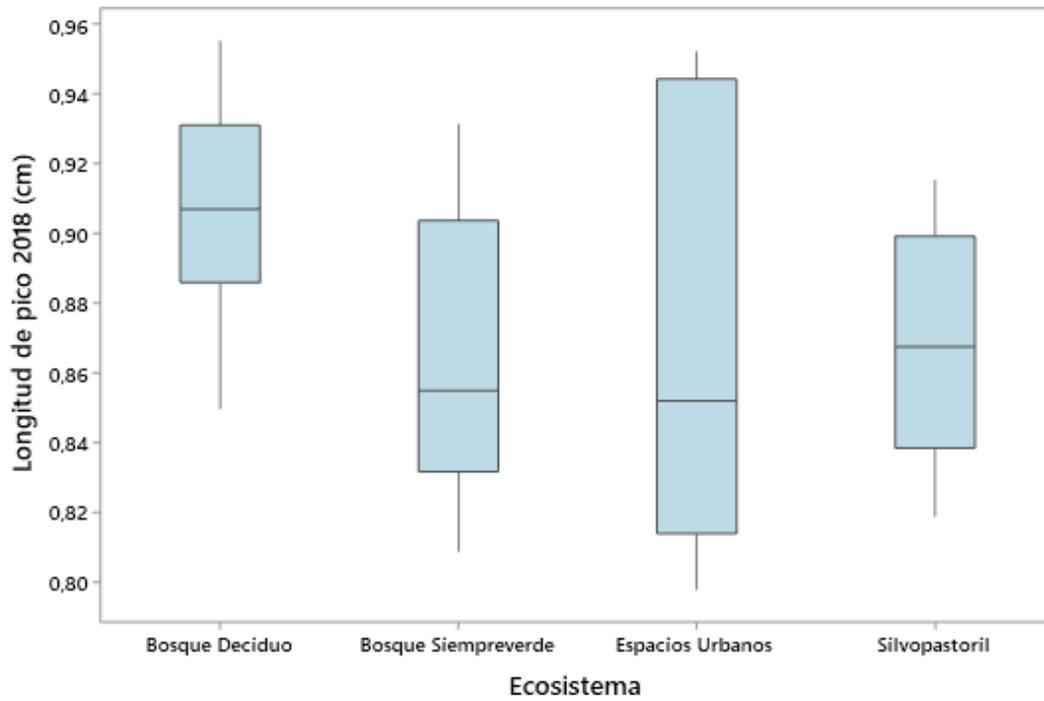
**Tabla 5:** Estadística descriptiva de rangos de estrés de 2018 y 2019 de *S. petechia aureola* en sitios con distinto impacto antropogénico en San Cristóbal, Galápagos. Se exponen la media, desviación estándar y el intervalo de confianza de 95% de cada los niveles de estrés de cada año.

	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
<b>Niveles de estrés 2018 [ng de corticosterona/mg de pluma] (p=0,243)</b>			
Bosque Deciduo	13,841	4,80	(10,110; 17,581)
Sitios silvopastoriles	11,422	3,88	(7,252; 15,602)
Espacios Verdes Urbanos	10,850	3,09	(7,443; 14,263)
Bosque Siempreverde	8,743	4,02	(5,330; 12,151)
<b>Niveles de estrés 2019 [ng de corticosterona/mg de pluma] (p=0,411)</b>			
Bosque Deciduo	12,465	2,68	(10,628; 14,302)
Sitios silvopastoriles	11,690	3,04	(9,32; 14,06)
Bosque Siempreverde	10,760	3,47	(8,392; 13,134)
Espacios Verdes Urbanos	10,025	1,62	(7,430; 12,621)

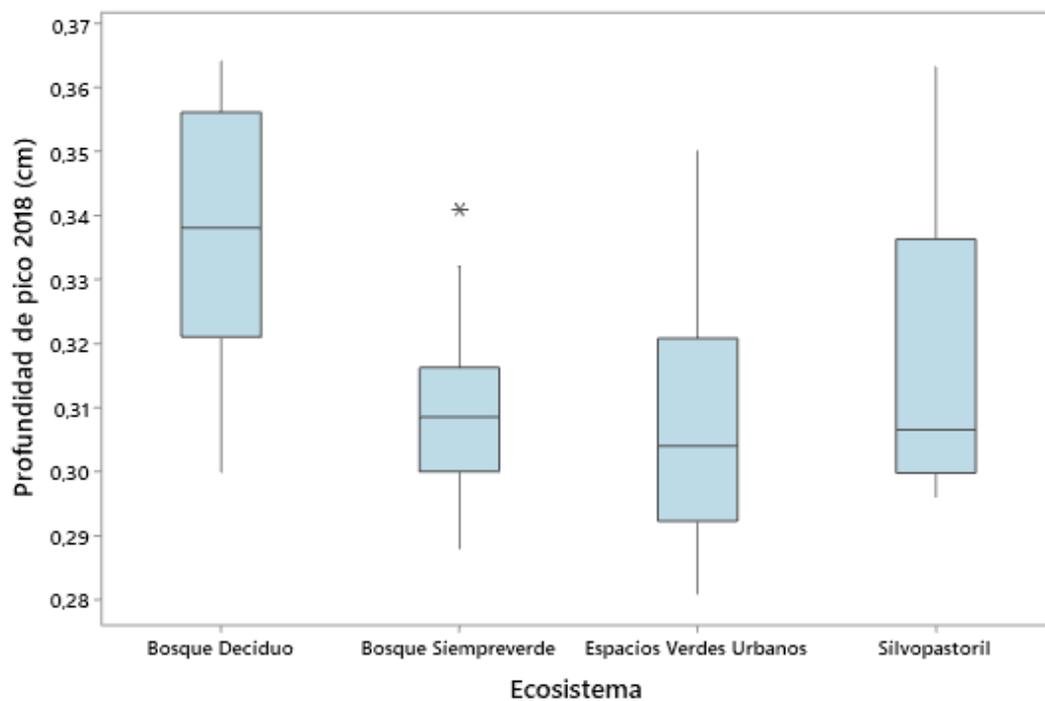
## 7. FIGURAS



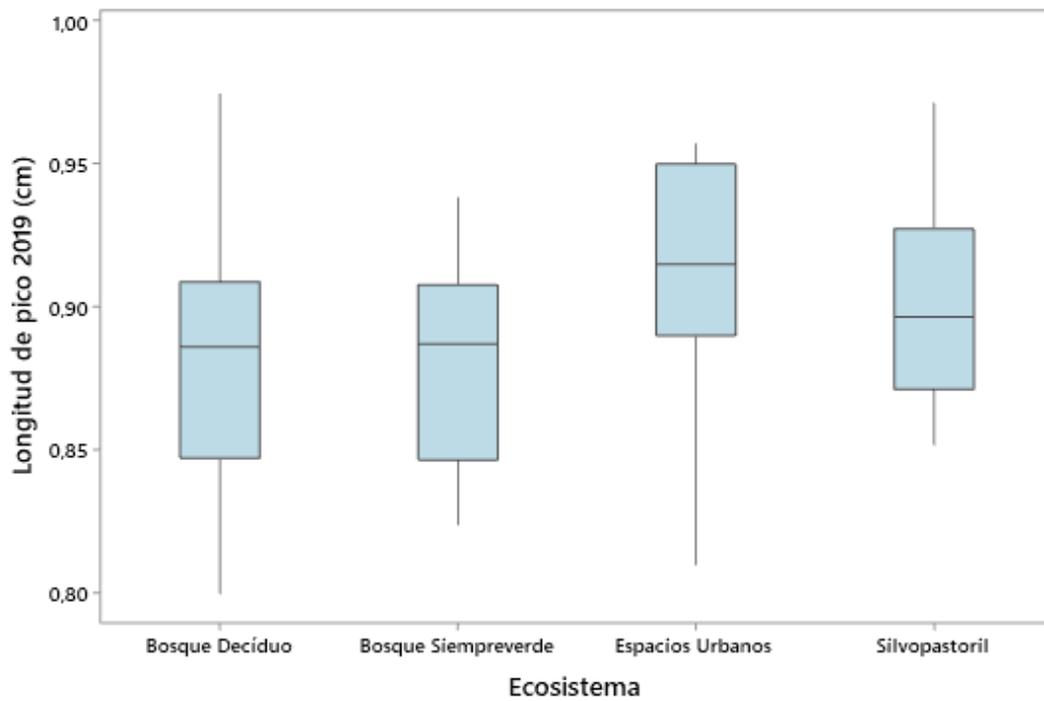
**Figura 1:** Mapa de la vegetación y usos de suelo de San Cristóbal con los puntos de muestreo del estudio. El mapa fue obtenido de Rivas-Torres et al., 2018 y Laso et al., 2020 y diseñado por el Laboratorio de Zoología Terrestre USFQ.



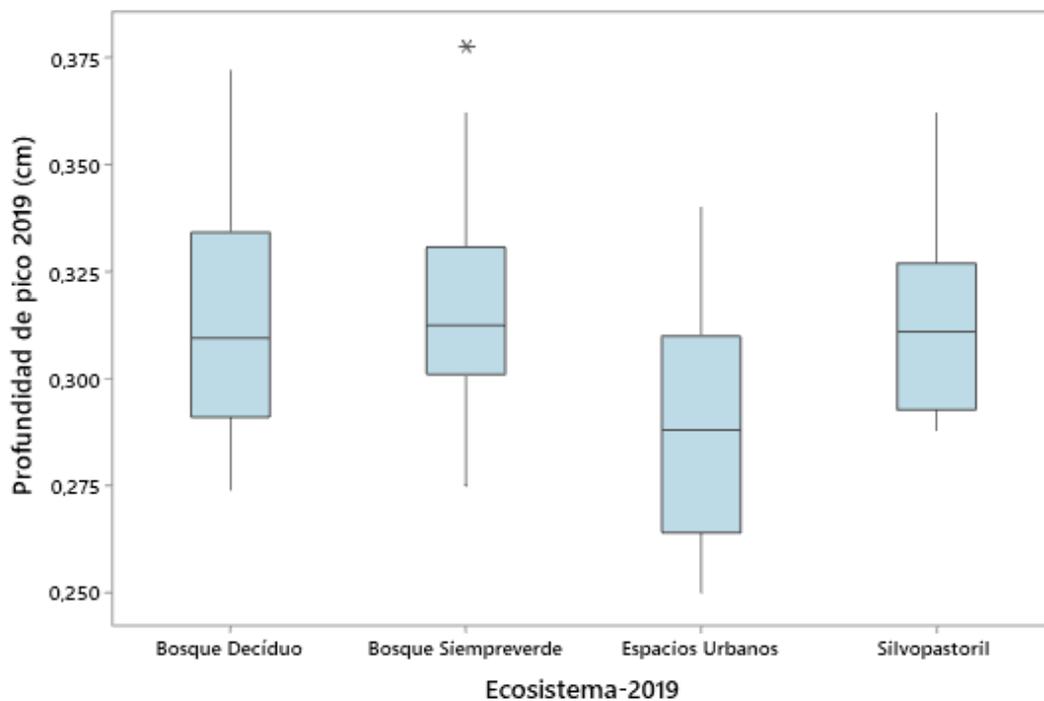
**Figura 2:** Longitud de pico de *S. petechia aureola* en sitios con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos en 2018 ( $p=0,035$ )



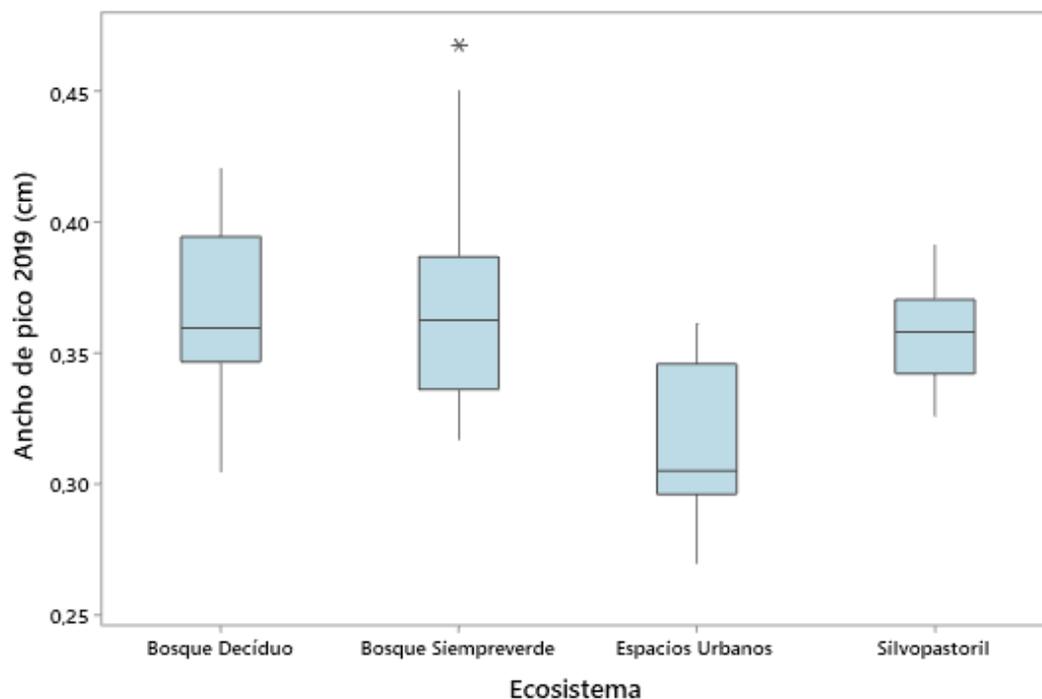
**Figura 3:** Profundidad de pico de *S. petechia aureola* en sitios con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos en 2018 ( $p=0,001$ )



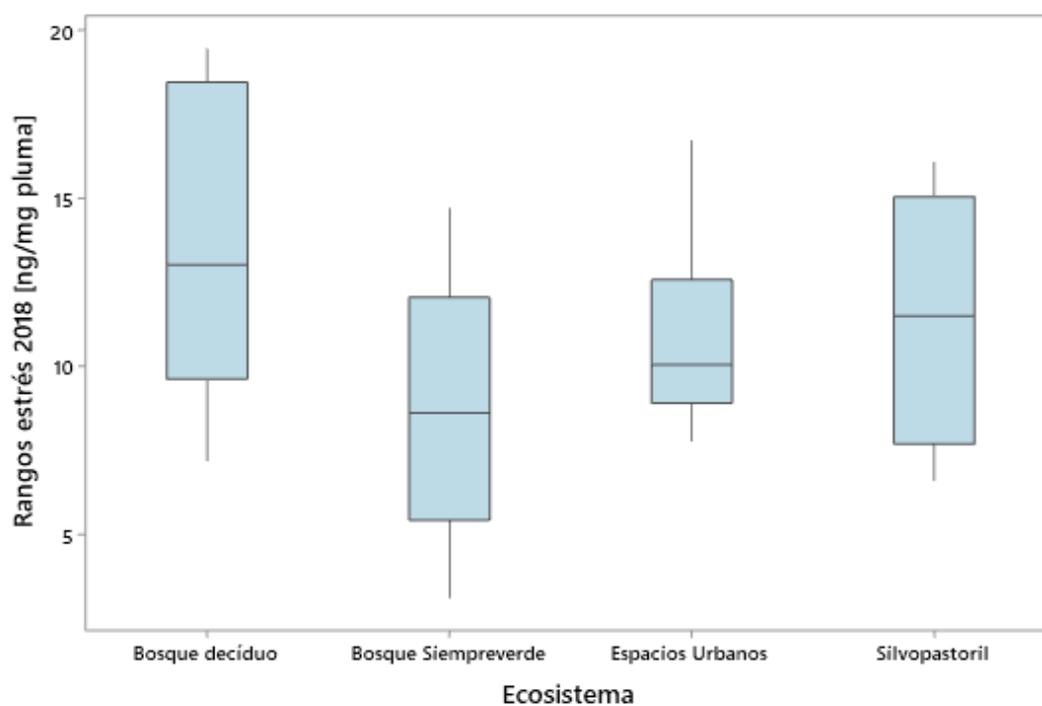
**Figura 4:** Longitud de pico de *S. petechia aureola* en sitios con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos en 2019 ( $p=0,024$ )



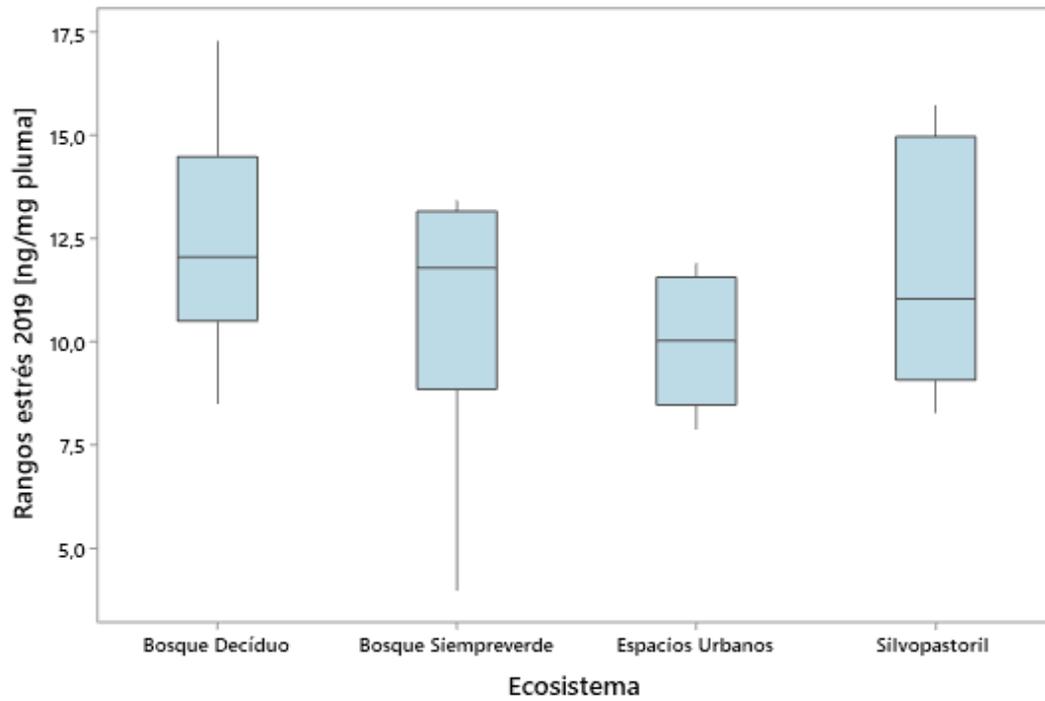
**Figura 5:** Profundidad de pico de *S. petechia aureola* en sitios con distintos impactos antropogénicos en 2019 ( $p=0,009$ )



**Figura 6:** Ancho de pico de *S. petechia aureola* en sitios con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos en 2018 ( $p < 0,0001$ )



**Figura 7:** Niveles de estrés de *S. petechia aureola* en sitios con distintos impactos antropogénico en San Cristóbal, Galápagos en 2018 ( $p = 0,155$ )



**Figura 8:** Niveles de estrés de *S. petechia aureola* en sitios con distintos impactos antropogénico en San Cristóbal, Galápagos en 2019 ( $p=0,411$ )

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abcam. (2018). ELISA guide. *ELISA Guide: Everything You Need to Perform Your ELISA Experiments*, 30. <https://www.abcam.com/protocols/the-complete-elisa-guide>
- Aharon-Rotman, Y., Buchanan, K. L., Klaassen, M., & Buttemer, W. A. (2017). An experimental examination of interindividual variation in feather corticosterone content in the house sparrow, *Passer domesticus* in southeast Australia. *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.12.010>
- Boonstra, R. (2013). Reality as the leading cause of stress: Rethinking the impact of chronic stress in nature. *Functional Ecology*. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12008>
- Bortolotti, G. R., Marchant, T. A., Blas, J., & German, T. (2008). Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology*, 22(3), 494–500. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01387.x>
- Busch, D. S., & Hayward, L. S. (2009). Stress in a conservation context: A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. *Biological Conservation*, 142(12), 2844–2853. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.08.013>
- Carbajal, A., Tallo-Parra, O., Sabes-Alsina, M., Mular, I., & Lopez-Bejar, M. (2014). Feather corticosterone evaluated by ELISA in broilers: A potential tool to evaluate broiler welfare. *Poultry Science*, 93(11), 2884–2886. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04092>
- Chalen, I. (2019). *Physiological stress on Rufous-collared Sparrow *Zonotrichia capensis* on an urban-rural matrix in the high tropical Andes*. Universidad San Francisco de

Quito.

- Charmantier, A., Demeyrier, V., Lambrechts, M., Perret, S., & Grégoire, A. (2017). Urbanization is associated with divergence in pace-of-life in great tits. *Frontiers in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00053>
- Chavarría-Pizarro, T., Gómez, J. P., Ungvári-Martin, J., Bay, R., Miyamoto, M. M., & Kimball, R. (2019). Strong phenotypic divergence in spite of low genetic structure in the endemic Mangrove Warbler subspecies (*Setophaga petechia xanthotera*) of Costa Rica. *Ecology and Evolution*, 9(24), 13902–13918. <https://doi.org/10.1002/ece3.5826>
- Chávez-Zichinelli, C. A., Macgregor-Fors, I., Quesada, J., Rohana, P. T., Romano, M. C., Valdéz, R., & Schondube, J. E. (2013). How stressed are birds in an urbanizing landscape? Relationships between the physiology of birds and three levels of habitat alteration. *Condor*. <https://doi.org/10.1525/cond.2013.110201>
- Dantzer, B., Fletcher, Q. E., Boonstra, R., & Sheriff, M. J. (2014). Measures of physiological stress: A transparent or opaque window into the status, management and conservation of species? *Conservation Physiology*, 2(1), 1–18. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou023>
- Donihue, C. M., & Lambert, M. R. (2015). Adaptive evolution in urban ecosystems. *Ambio*. <https://doi.org/10.1007/s13280-014-0547-2>
- Fokidis, H. B., Orchinik, M., & Deviche, P. (2009). Corticosterone and corticosteroid binding globulin in birds: Relation to urbanization in a desert city. *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.12.005>
- Freeman, N. E., & Newman, A. E. M. (2018). Quantifying corticosterone in feathers: Validations for an emerging technique. *Conservation Physiology*, 6(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1093/conphys/coy051>

Freile, J. F., Santander, T., Jiménez-Uzcátegui, G., Carrasco, L., Cisneros-Heredia, D., Guevara, E., Sánchez-Nivicela, M., & Tinoco, B. (2019). *Lista Roja De Las Aves del Ecuador*. Quito: Ministerio del Ambiente, Aves y Conservación, Comité Ecuatoriano de Registros Ornitológicos, Universidad del Azuay, Red Aves Ecuador y Universidad San Francisco de Quito.

Galindo, J. (2016). *Evaluación del nivel de estrés en leoncillos (Cebuella pygmaea) mediante la medición de cortisol en heces*. Universidad San Francisco de Quito.

García-Carrasco, J., & Román, A. (2019). Avifauna de galápagos : una amenaza sobre ruedas. *VII Congreso Ibérico y XXIV Español de Ornitología, November*.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29321.26722>

González-Pérez, F., & Cubero-Pardo, P. (2010). Efecto de actividades turísticas sobre el comportamiento de fauna representativa de las Islas Galápagos, Ecuador. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 38(3), 493–500.  
<https://doi.org/10.3856/vol38-issue3-fulltext-13>

Heiss, R. S., Clark, A. B., & McGowan, K. J. (2009). Growth and nutritional state of American Crow nestlings vary between urban and rural habitats. *Ecological Applications*. <https://doi.org/10.1890/08-0140.1>

Hendry, A. P., Grant, P. R., Grant, B. R., Ford, H. A., Brewer, M. J., & Podos, J. (2006). Possible human impacts on adaptive radiation: Beak size bimodality in Darwin's finches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1596), 1887–1894. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3534>

Herrera-Dueñas, A., Pineda-Pampliega, J., Antonio-García, M. T., & Aguirre, J. I. (2017). The influence of urban environments on oxidative stress balance: A case study on

- the house sparrow in the Iberian Peninsula. *Frontiers in Ecology and Evolution*.  
<https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00106>
- Huber, S. K., & Podos, J. (2006). Beak morphology and song features covary in a population of Darwin's finches (*Geospiza fortis*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 88(3), 489–498. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2006.00638.x>
- Ibáñez-Álamo, J. D., Jimeno, B., Gil, D., Thomson, R. L., Aguirre, J. I., Díez-Fernández, A., Faivre, B., Tieleman, B. I., & Figuerola, J. (2020). Physiological stress does not increase with urbanization in European blackbirds: Evidence from hormonal, immunological and cellular indicators. *Science of the Total Environment*, 721, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137332>
- INAMHI. (2017). *Boletín Meteorológico Año XLI N° 508 - Junio 2017*.
- INAMHI. (2018). *Boletín Meteorológico Año XLII N° 519 - Mayo 2018*.
- INEC. (2015). *Análisis de resultados definitivos Censo de Población y Vivienda Galápagos 2015*. INEC.
- Injaian, A. S., Francis, C. D., Ouyang, J. Q., Dominoni, D. M., Donald, J. W., Fuxjager, M. J., Goymann, W., Hau, M., Husak, J. F., Johnson, M. A., Kircher, B. K., Knapp, R., Martin, L. B., Miller, E. T., Schoenle, L. A., Williams, T. D., & Vitousek, M. N. (2020). Baseline and stress-induced corticosterone levels across birds and reptiles do not reflect urbanization levels. *Conservation Physiology*, 8(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coz110>
- Isaksson, C. (2018). Impact of Urbanization on Birds. In D. T. Tietze (Ed.), *Bird Species: How They Arise, Modify and Vanish* (pp. 235–257). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91689-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91689-7_13)
- Jiménez-Uzcátegui, G., Wiedenfeld, D., Valle, C. A., Vargas, H., Piedrahita, P., Muñoz-

- Abril, L. J., & Alava, J. J. (2019). Threats and Vision for the Conservation of Galápagos Birds. *The Open Ornithology Journal*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.2174/1874453201912010001>
- Kelly, M., & DeSilva, B. (2007). Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules. *AAPS Journal*. <https://doi.org/10.1208/aapsj0902017>
- Kersey, D. C., & Dehnhard, M. (2014). The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.022>
- Larrea, I., & Di Carlo, G. (2011). Climate Change Vulnerability Assessment of the Galápagos Islands. In *Technical Report based on an International Expert Workshop*. WWF and Conservation International.
- Laso, F. J., Benítez, F. L., Rivas-Torres, G., Sampedro, C., & Arce-Nazario, J. (2020). Land cover classification of complex agroecosystems in the non-protected highlands of the Galapagos Islands. *Remote Sensing*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/RS12010065>
- Lee, J. W., Devanarayan, V., Barrett, Y. C., Weiner, R., Allinson, J., Fountain, S., Keller, S., Weinryb, I., Green, M., Duan, L., Rogers, J. A., Millham, R., O'Brien, P. J., Sailstad, J., Khan, M., Ray, C., & Wagner, J. A. (2006). Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-9045-3>
- Lee, J. W., & Hall, M. (2009). Method validation of protein biomarkers in support of drug development or clinical diagnosis/prognosis. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(13), 1259–1271. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.11.022>

- Martin, L. B., & Rubenstein, D. R. (2008). Stress hormones in tropical birds: Patterns and future directions. *Ornitología Neotropical*, 19(SUPPL.), 207–218.
- Meillère, A., Brischoux, F., Parenteau, C., & Angelier, F. (2015). Influence of urbanization on body size, condition, and physiology in an urban exploiter: A multi-component approach. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135685>
- Mena, A. (2020). *Evaluación de la morfología y estrés en Pinzones de Tierra Pequeños expuestos a distintos grados de cambios de hábitat en San Cristóbal, Galápagos*. Universidad San Francisco de Quito.
- Monclús, L., Tallo-Parra, O., Carbajal, A., Quevedo, M. A., & Lopez-Bejar, M. (2020). Feather corticosterone in Northern Bald Ibis *Geronticus eremita*: a stable matrix over time able to predict reproductive success. *Journal of Ornithology*, 161(2), 557–567. <https://doi.org/10.1007/s10336-019-01741-z>
- Möstl, E., Rettenbacher, S., & Palme, R. (2005). Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.004>
- Ohmart, R. D. (1994). The effects of human-induced changes on the avifauna of western riparian habitats. In *A century of avifaunal change in western North America*. *Studies in Avian Biology* 15.
- Parque Nacional Galápagos. (2020). *Informe anual de visitantes 2019*. Galápagos: Parque Nacional Galápagos.
- Partecke, J., Schwabl, I., & Gwinner, E. (2006). Stress and the city: Urbanization and its effects on the stress physiology in European Blackbirds. *Ecology*, 87(8), 1945–1952. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[1945:SATCUA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1945:SATCUA]2.0.CO;2)
- Rebolo-Ifran, N., Carrete, M., Sanz-Aguilar, A., Rodriguez-Martinez, S., Cabezas, S.,

- Marchant, T. A., Bortolotti, G. R., & Tella, J. L. (2015). Links between fear of humans, stress and survival support a non-random distribution of birds among urban and rural habitats. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep13723>
- René, D., Véliz, J., & Wohllk, N. (2015). LABORATORIO DE HORMONAS: ASPECTOS PRÁCTICOS. *Revista Médica Clínica Las Condes*. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.006>
- Rimmer, C. C. (1988). Timing of the Definitive Prebasic Molt in Yellow Warblers at James Bay, Ontario. *The Condor*, 90(1), 141–156. <https://doi.org/10.2307/1368443>
- Rivas-Torres, G. F., Benítez, F. L., Rueda, D., Sevilla, C., & Mena, C. F. (2018). A methodology for mapping native and invasive vegetation coverage in archipelagos: An example from the Galápagos Islands. *Progress in Physical Geography*, 42(1), 83–111. <https://doi.org/10.1177/0309133317752278>
- Romero, L. M., & Fairhurst, G. D. (2016). Measuring corticosterone in feathers: Strengths, limitations, and suggestions for the future. In *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.002>
- Romero Peñuela, M. H., Uribe-Velásquez, L. F., & Sánchez Valencia, J. A. (2011). Biomarcadores d estrés como indicadores de bienestar animal en Ganado de carne: stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming. *Biosalud*.
- Russ, A., Reitemeier, S., Weissmann, A., Gottschalk, J., Einspanier, A., & Klenke, R. (2015). Seasonal and urban effects on the endocrinology of a wild passerine. *Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1002/ece3.1820>
- Schlesinger, M. D., Manley, P. N., & Holyoak, M. (2008). Distinguishing stressors acting on land bird communities in an urbanizing environment. *Ecology*.

<https://doi.org/10.1890/07-0256.1>

Schweizer, C. (2012). *Biometric variation among two Mangrove Warbler *Setophaga petechia* populations of Northwestern Mexico*. West Virginia University.

Secretaría de Gestión de Riesgos. (2017). *Informe de Situación Época lluviosa en Ecuador - 15/05/2017*. Quito: Secretaría de Gestión de Riesgos.

Seress, G., & Liker, A. (2015). Habitat urbanization and its effects on birds. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*.  
<https://doi.org/10.17109/AZH.61.4.373.2015>

Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, *166*(4), 869–887. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y>

Smit, G., & Plettenburg, D. H. (2019). *Cortisol ELISA: Instructions for use* (p. 15). Nordhorn: LDN.

Taylor, D. M., & Littlefield, C. D. (1986). Willow Flycatcher and Yellow Warbler response to cattle grazing. *American Birds*, *40*(5), 1169–1173.

Tietze, D. (2018). Bird Species: How They Arise, Modify and Vanish. In D. Tietze (Ed.), *Springer International Publishing*. Springer International Publishing.  
<https://doi.org/10.2307/j.ctvpb3vwx.12>

U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration. (2018). *Bioanalytical method validation guidance for industry*.,  
<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf>. May.  
<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf>

Velarde, D. A. (2018). *Effect of land-use change on the community assemblage of the landbirds of San Cristobal, Galapagos*. Universidad San Francisco de Quito.

Wilson, C. M., & Holberton, R. L. (2007). Are nestlings the cue for reduction of the adrenocortical response to stress in male yellow warblers breeding at high latitude? *Condor*, *109*(3), 675–679. <https://doi.org/10.1650/8228.1>

**ANEXO A: COORDENADAS GEOGRÁFICAS DE LOS SITIOS DE  
MUESTREO**

<b>Clasificación</b>	<b>Coordenadas</b>
Sitios silvopastoriles	-0° 53' 15,216", -89°32'21,87"
	-0° 53' 21,66", -89°32'14,46"
Bosque Siempreverde Estacional	-0° 52' 56,496", -89°32'34,296"
	-0° 53' 19,392", -89°33'14,112"
Bosque Deciduo	-0° 53' 30,624", -89°36'39,672"
	-0° 55' 24,744", -89°36'52,164"
	-0° 51' 51,12", -89°34'10,2"
Espacios Verdes Urbanos	-0° 53' 57,9732", -89°36'14,6448"
	-0° 54' 21,312", -89°36'43,0668"
	-0° 55' 29,8656", -89°36'44,65"

**ANEXO B: INDIVIDUOS CAPTURADOS EN CADA ECOSISTEMA**

<b>Ecosistema</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
Bosque Deciduo	5	10
Bosque Siempreverde Estacional	6	7
Espacios Verdes Urbanos	6	6
Sitios Silvopastoriles	4	6
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>29</b>