



Identificación y cuantificación de los efectos de los plaguicidas agrícolas en la perdiz roja en España

Informe correspondiente al primer periodo de ejecución Marzo 2010 – Marzo 2011



Ciudad Real, Abril 2011

CONTENIDOS

Datos sobre el proyecto	3
Antecedentes	4
Objetivos y justificación	8
Metodología	9
Resultados	20
Conclusión	31
Difusión de resultados y direcciones futuras	33
Referencias	34

DATOS SOBRE EL PROYECTO

Título del proyecto

Identificación y cuantificación de los efectos de los plaguicidas agrícolas en la perdiz roja en España

Institución ejecutora

Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM)

Financiación

Fundación para el Estudio y Defensa de la Caza (FEDENCA) y Oficina Nacional de la Caza, con la participación de la Fundación Biodiversidad.

Coordinación: José Luis Garrido Martín, Director General de FEDENCA

Investigador principal

Rafael Mateo Soria, Profesor Titular de Universidad

Investigadores participantes

François Mougeot, Científico Titular

Manuel Ortiz Santaliestra, Investigador Postdoctoral

Ana López-Antia, Becaria Predoctoral

ANTECEDENTES

Las aves de ambientes agrícolas han experimentado un declive pronunciado en Europa occidental desde hace ya varias décadas. Diversos estudios realizados en Reino Unido sobre una especie cinegética como es la perdiz pardilla (*Perdix perdix*) ya indicaban hace años que los cambios experimentados en la agricultura en la segunda mitad del siglo XX habían producido una disminución significativa de la abundancia de la especie. Tanto el número de aves cazadas cada año como los censos realizados en primavera mostraban idénticas tendencias (Sotherton, 1998; Greenwood, 2003). Esta misma tendencia ha sido observada en otras especies no cinegéticas que habitan ambientes agrícolas como la avefría (*Vanellus vanellus*), la alondra común (*Alauda arvensis*), la calandria (*Melanocorypha calandra*) o el sisón común (*Tetrax tetrax*) (Salamaolard & Moreau, 1999; Brickle *et al.* 2000; Sheldon *et al.*, 2004; EBCC, 2009). En el caso de la perdiz roja (*Alectoris rufa*), la tendencia de las poblaciones naturales es difícil de establecer debido a las numerosas sueltas de perdices de granja que dificultan la tarea de realizar seguimientos fiables de la evolución de los tamaños de población, pero la sensación generalizada es que cada vez son más escasas las perdices rojas salvajes en nuestros campos (Blanco-Aguilar *et al.*, 2003).

Estas tendencias negativas asociadas a las aves que viven en ambientes agrícolas contrastan con lo observado para otras especies de aves como por ejemplo las forestales, cuyas poblaciones en Europa se han mantenido relativamente estables durante las últimas décadas (Greenwood, 2003; SEO/BirdLife 2010). Así, dado que la intensificación agrícola es el nexo de unión de entre todas las especies cuyas poblaciones están en declive, todos los datos existentes indican que dicha intensificación estaría teniendo un impacto negativo en las especies de aves de medios agrícolas.

La transformación del medio es el principal impacto de la intensificación agrícola sobre las comunidades de aves; la modificación de los terrenos para su uso agrícola conlleva una reducción en la diversidad de hábitats (y en consecuencia, de la biodiversidad asociada a estos hábitats), disminución de los recursos alimenticios, pérdida de zonas de cría y refugios, etc. Sin embargo, uno de los impactos asociados a

la actividad agrícola cuya importancia a este nivel ha adquirido niveles considerables es el uso de productos fitosanitarios.

El efecto principal e inmediato del uso de fitosanitarios es debido a su capacidad para reducir la disponibilidad de alimentos para las aves o para sus presas. En este sentido, estudios llevados a cabo en el Reino Unido han demostrado que el control en la aplicación de plaguicidas sobre campos de cereal conllevaba un aumento significativo del éxito reproductor de la perdiz pardilla y la supervivencia de los pollos se incrementaba por encima de los valores mínimos que asegurarían el mantenimiento de la población. Por el contrario, en campos con un tratamiento convencional con fitosanitarios, el éxito reproductor y la supervivencia de los pollos serían demasiado bajos como para asegurar la estabilidad de las poblaciones (Rands, 1985).

Aparte de los efectos sobre la disponibilidad de alimento, los plaguicidas usados en la agricultura pueden producir efectos adversos en las aves actuando de diferentes maneras. Por ejemplo, los insecticidas organofosforados y carbamatos o los rodenticidas anticoagulantes presentan una elevada toxicidad aguda, causando efectos inmediatos tras periodos cortos de exposición. Por otra parte, los insecticidas organoclorados afectan de forma muy clara al éxito reproductor de las aves al alterar la formación de la cáscara de los huevos (Mateo *et al.* 2000; Mañosa *et al.* 2003). Hoy en día, aunque la mayoría de insecticidas organoclorados han sido prohibidos en España, existen otros muchos compuestos en uso de diversas familias químicas de los que se ha reconocido su actividad como disruptores endocrinos con efectos adversos sobre el sistema hormonal y alteradores de la capacidad reproductiva.

Una serie de productos fitosanitarios de diferentes tipos se utilizan para lo que se conoce como blindaje de semillas. El blindaje de semillas consiste en tratar las semillas de cereal antes de su siembra con compuestos químicos para evitar infecciones por hongos, parásitos y el ataque de los insectos del suelo. Muchas aves granívoras en determinados momentos del año pueden basar su alimentación en el consumo de semillas que, durante el proceso de siembra, no penetran lo suficiente en el suelo. En algunos casos, además, el consumo de semillas puede verse puntualmente estimulado por la falta de otros tipos de alimento. Un ejemplo lo encontramos en el caso de los gansos piquicorto (*Anser brachyrhynchus*) y común

(*Anser anser*) que invernan en Escocia y las semillas tratadas con carbofenotio. Los gansos no suelen acceder a estas semillas pero de 1971 a 1975 se registraron 1.492 muertes de estas especies por la ingestión de simiente tratada con el organofosforado. Factores como la escasez de su alimento habitual, el derrame de semillas que las hace más accesibles o la mayor humedad en el suelo que hace más fácil arrancar las semillas recién germinadas consiguieron que en pocos años desapareciera una parte significativa de la población mundial de estas especies (Stanley & Bunyan, 1979).

Tabla 1: Listado de productos fitosanitarios registrados por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino para el tratamiento de simiente de cereal (actualizado en Junio de 2010).

Producto o mezcla	Uso	Arroz	Avena	Cebada	Centen	Trigo	Sorgo	Maíz	Girasol
Acetato de guazatina	Fungicida	-	+	+	-	+	-	-	-
Carboxina	Fungicida	-	+	+	-	+	+	+	-
Carboxina + tiram	Fungicida	+	+	+	+	+	+	-	-
Difenoconazol	Fungicida	-	-	+	-	+	-	-	-
Fludioxonil	Fungicida	-	-	+	-	+	-	+	-
Fludioxonil + metalaxil	Fungicida	-	-	-	-	-	-	+	-
Flutriafol	Fungicida	-	-	+	-	+	-	-	-
Flutriafol + maneb	Fungicida	-	-	+	-	+	-	-	-
Himexazol	Fungicida	+	-	+	-	+	-	+	-
Mancozeb	Fungicida	-	+	+	+	+	+	-	-
Maneb	Fungicida	-	+	+	-	+	+	+	-
Metalaxil	Fungicida	-	-	-	-	-	-	-	+
Oxicloruro de cobre	Fungicida	-	+	+	-	+	-	-	-
Tebuconazol	Fungicida	-	+	+	+	+	-	-	-
Tiram	Fungicida	-	+	+	+	+	+	-	+
Triticonazol	Fungicida	-	-	+	-	+	-	-	-
Clotianidina	Insecticida	-	-	-	-	-	-	+	-

Fipronilo	Insecticida	-	-	-	-	-	-	+	+
Imidacloprid	Insecticida	-	+	+	+	+	+	+	-

En la actualidad, según el registro de productos fitosanitarios del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino se utilizan para el tratamiento de semilla de siembra de cereales un total de 19 compuestos diferentes de los cuales 16 son fungicidas y los tres restantes son insecticidas (Tabla 1). Durante el periodo de siembra del cereal, en otoño, las aves presentes en ambientes agrícolas consumen las semillas que, durante la siembra, no penetran lo suficiente en el suelo. Dada la escasez de grano y otros recursos alimenticios durante esa época del año, las semillas de siembra pueden constituir un porcentaje muy elevado de la dieta de estos animales. Hasta ahora, los efectos sobre las perdices y otras aves agrícolas que consumen semillas tratadas con fungicidas o insecticidas han permanecido casi desconocidos. La ingesta de estas semillas, dependiendo del tipo de compuesto y la dosis con que hayan sido tratadas así como de la cantidad ingerida, podría acarrear consecuencias graves, desde la pérdida de condición corporal, pasando por la alteración del metabolismo, la disrupción del sistema endocrino o la disminución de la eficacia de la respuesta inmunológica, hasta llegar a la reducción del éxito reproductor o incluso la muerte del individuo.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Con este proyecto queremos identificar experimentalmente los posibles efectos adversos de la ingestión de semillas tratadas con compuestos fitosanitarios sobre la salud de la perdiz roja (*Alectoris rufa*). Utilizaremos la misma vía de exposición que existe en el medio natural, es decir, los fitosanitarios serán aplicados sobre semillas de trigo que posteriormente se administrarán a las perdices como alimento. Con el fin de identificar los efectos de cada plaguicida individualmente, se utilizará grano tratado con un solo plaguicida, si bien en el campo pueden estar utilizándose mezclas de un fungicida y un insecticida y por lo tanto existir sinergias entre ellos.

Para el conjunto de los tres años de duración prevista del proyecto, pretendemos centrar el estudio en ocho compuestos utilizados para el tratamiento de simiente de cereales (avena, cebada, maíz y trigo). Del total de productos aprobados por el MMAMRM para este uso (Tabla 1) hemos seleccionado aquellos que son más susceptibles de causar efectos a nivel poblacional, bien al actuar como disruptores endocrinos, afectando por tanto a la reproducción, bien al deprimir el sistema inmune facilitando así el desarrollo de enfermedades que en última instancia puede desembocar en epidemias, o bien por ser de mayor toxicidad aguda y por lo tanto capaces de producir la muerte directa de las aves. No obstante, debemos señalar que el registro de productos fitosanitarios se actualiza regularmente, y que algunos compuestos que hoy están aprobados pueden ser prohibidos en un futuro próximo, del mismo modo que sustancias de nueva aparición pueden pasar a integrar la lista de compuestos aprobados para el tratamiento de semillas. Los cambios en el registro de productos fitosanitarios serán evidentemente tenidos en cuenta a la hora de diseñar los experimentos a desarrollar cada año.

METODOLOGÍA

Compuestos analizados

Hasta la fecha se han desarrollado dos experimentos, un primer ensayo correspondiente al periodo de reproducción y cría de la primavera-verano de 2010 (**Experimento 1**), y un segundo ensayo iniciado en el otoño de 2010 y que se prolongará hasta finales del verano de 2011 (**Experimento 2**).

En el experimento llevado a cabo durante la primavera y verano de 2010 se analizaron los efectos de tres compuestos: dos fungicidas (tiram y difenoconazol) y un insecticida (imidacloprid). En el experimento iniciado en otoño de 2010 se analizaron de nuevo el imidacloprid y el tiram, además de dos nuevos plaguicidas, un fungicida (maneb) y un insecticida (piretrinas naturales).

En cada caso se utilizó un preparado comercial basado en cada uno de los principios activos correspondientes.

Tabla 2: Concentraciones experimentales utilizadas en el experimento 1. Se especifica en cada caso la cantidad del correspondiente producto comercial que se aplicó por kg de semillas.

Compuesto	Concentración baja (100% dosis recomendada)	Concentración alta (200% dosis recomendada)
Tiram	350 cc Tiram 50% / Qm semillas (2,19 g Pormasol Forte / Kg semillas)	700 cc Tiram 50% / Qm semillas (4,38 g Pormasol Forte / Kg semillas)
Difenoconazol	200 ml Difenoconazol 3% / Qm semillas (240 µl Score / kg semillas)	400 ml Difenoconazol 3% / Qm semillas (480 µl Score / kg semillas)
Imidacloprid	200 cc Imidacloprid 35% / Qm semillas (3,5 ml Confidor / kg semillas)	400 cc Imidacloprid 35% / Qm semillas (7 ml Confidor / kg semillas)

Experimento 1

Se utilizaron los siguientes preparados comerciales:

- Pormasol Forte (Bayer CropScience): 80% tiram.

- Registro de Productos Fitosanitarios 12.005/11
- Score 25 EC (Syngenta Agro S.A.): 25% difenoconazol
Registro de Productos Fitosanitarios 18.767/13
- Confidor 20 LS (Baye CropScience): 20% imidacloprid
Registro de Productos Fitosanitarios 19.120/14

Para cada compuesto se utilizaron dos concentraciones distintas, una concentración baja, correspondiente a la dosis de aplicación recomendada, y una concentración alta, correspondiente al doble de la dosis de aplicación recomendada. Dichas concentraciones quedaron establecidas como se muestra en la Tabla 2.

Experimento 2

Los preparados comerciales utilizados fueron los siguientes:

- Pormasol Forte (Bayer CropScience): 80% tiram.
Registro de Productos Fitosanitarios 12.005/11
- Escocet (Bayer CropScience): 35% imidacloprid
Registro de Productos Fitosanitarios 19.188
- Sembral Maneb (Cequisa): 40% maneb.
Registro de Productos Fitosanitarios 15.476
- Granet-L (Comercial Química Massó) : 5% Piretrinas (extracto de pelitre)
Registro de Productos Fitosanitarios 16.194

En este caso, la concentración alta fue la correspondiente a la dosis de aplicación recomendada (100%), mientras que la concentración baja se estableció en un 20% de la dosis recomendada, en concordancia con los datos recopilados en la literatura sobre porcentaje de semillas en la dieta de la perdiz roja (Pérez y Pérez, 1980). Dichas concentraciones quedaron establecidas como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Concentraciones experimentales utilizadas en el estudio.

Compuesto	Concentración baja (20% dosis recomendada)	Concentración alta (100% dosis recomendada)
Tiram	70 cc Tiram 50% / Qm semillas	350 cc Tiram 50% / Qm semillas
Maneb	70 cc Maneb 40% / Qm semillas	350 cc Maneb 40% / Qm semillas
Imidacloprid	40 cc Imidacloprid 35% / Qm semillas	200 cc Imidacloprid 35% / Qm semillas
Piretrinas	20 g Granet / Qm semillas	100 g Granet / Qm semillas

Animales en estudio

Experimento 1

Se emplearon 42 parejas de perdices adultas, todas ellas de un año de edad, procedentes de la colonia ubicada en la Finca Dehesa de Galiana. La exposición de las perdices se llevó a cabo en las instalaciones existentes en la propia finca para la cría de esta especie (Fig. 1).

Todas las perdices se midieron (longitud del tarso) y pesaron antes de comenzar el experimento, y se les extrajo una muestra de sangre que fue centrifugada para separar el plasma de la fracción celular.



Figura 1: Parque para la cría de perdices en la finca Dehesa de Galiana.

Experimento 2

Se emplearon 144 parejas de perdices adultas, todas ellas de un año de edad, procedentes de la colonia ubicada en la granja de Chinchilla (Albacete) proporcionadas por la Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha. La exposición de las perdices se llevó a cabo en las mismas instalaciones que en el experimento 1. Todas las perdices se midieron (longitud del tarso) y pesaron antes de comenzar el experimento.

Exposición a los fitosanitarios

Experimento 1

Las 42 parejas se dividieron en siete grupos de seis parejas cada uno. Seis grupos se asignaron a los tratamientos experimentales: 1) tiram conc. baja, 2) tiram conc. alta, 3) difenoconazol conc. baja, 4) difenoconazol conc. alta, 5) imidacloprid conc. baja, y 6) imidacloprid conc. alta. El séptimo grupo se utilizó como control, siendo las perdices alimentadas con semillas que, en lugar de haber sido tratadas con las disoluciones detalladas en la Tabla 2, fueron tratadas únicamente con agua.

El periodo de exposición, consistente en la alimentación de las perdices con semillas tratadas, se prolongó durante 10 días en el mes de marzo. Para prevenir una pérdida excesiva de los plaguicidas con los que se habían tratado las semillas durante el periodo de exposición, al séptimo día de experimento se sustituyeron todas las semillas de los comederos, rellenándose éstos con nuevas semillas tratadas ese mismo día.

Trascurridos los diez días de exposición, se sustituyeron las semillas de todos los comederos por una mezcla de pienso y semillas libres de plaguicidas, similar para todas las parejas. Tanto al finalizar la exposición como 14 días después se extrajo un muestra de sangre de cada perdiz que fue centrifugada para separar el plasma de la fracción celular.

Experimento 2

Las 144 parejas se dividieron en nueve grupos de 16 parejas cada uno. Ocho grupos se asignaron a los tratamientos experimentales: 1) tiram conc. baja, 2) tiram conc. alta, 3) maneb conc. baja, 4) maneb conc. alta, 5) imidacloprid conc. baja, 6) imidacloprid conc. alta, 7) piretrinas conc. Baja y 8) piretrinas conc. alta. El noveno grupo se utilizó como control, siendo las perdices alimentadas con semillas que, en lugar de haber sido tratadas con las disoluciones detalladas en la Tabla 3, fueron tratadas únicamente con agua.

Se llevaron a cabo dos periodos de exposición; un primer periodo de 25 días de duración entre noviembre y diciembre, y un segundo periodo de 10 días en la primera mitad del mes de marzo. El resto del tiempo los animales fueron alimentados con una mezcla de pienso y semillas libres de plaguicidas, similar para todas las parejas.

Tras finalizar cada uno de los periodos de exposición, se extrajo un muestra de sangre de cada perdiz que fue centrifugada para separar el plasma de la fracción celular.

Toma de variables

1) Mortalidad

Se anotó el día exacto de la muerte y se practicó una necropsia a cada una de las perdices que murieron tanto durante los periodos de exposición, como durante los periodos posteriores.

2) Biometría

Uno de los primeros efectos subletales que aparecen como consecuencia de la exposición a un tóxico es la pérdida de peso, la cual puede venir motivada por dos razones no excluyentes; por un lado, los animales podrían perder el apetito y rechazar el alimento al sentirse enfermos; por otro lado, los procesos que se desencadenan en

el organismo para metabolizar y eliminar las sustancias tóxicas (lo que se conoce como detoxificación) requieren un gasto energético que, si no se compensa con una mayor ingesta de alimento, termina por reflejarse en una pérdida de peso. El balance energético es algo fundamental porque nos indica que la energía que el animal emplea en la detoxificación no puede ser empleada en otros procesos fundamentales como la reproducción o la respuesta inmune.

Además de la longitud del tarso y la masa corporal tomadas antes del inicio de la exposición, todas las perdices se pesaron nuevamente en el momento de finalizar cada periodo de exposición. En el experimento 1, además, se pesaron todas las perdices 14 días después de finalizada la exposición (24 días después del inicio de la exposición), una vez transcurrido un periodo que podría considerarse como de recuperación tras el tratamiento con plaguicidas. El índice de masa corporal se calculó en cada caso como el cociente entre la masa y el cuadrado de la longitud del tarso.

3) Ornamentación

Como cualquier coloración u ornamentación que depende de los carotenoides, la intensidad de la coloración del pico y el anillo ocular así como el porcentaje de pigmentación del anillo ocular, constituyen medidas indirectas de la condición del individuo. Se realizaron fotografías de la cabeza de los animales (Fig. 2), tanto antes de la exposición a los plaguicidas como una vez finalizada ésta, y se analizó cómo variaba tras el tratamiento la intensidad del color rojo del pico y el anillo del ojo. Para ello, las fotos se realizaron siempre utilizando un fondo de referencia y la intensidad de la coloración se obtuvo gracias al uso del correspondiente software de tratamiento de imágenes.

Los resultados correspondientes al **experimento 2** no han sido analizados en el momento de redacción del presente informe.



Figura 2: Fotografía tomada a un ejemplar para el análisis de la ornamentación.

4) Hematocrito

El hematocrito es la proporción de volumen sanguíneo ocupado por glóbulos rojos. Un hematocrito bajo es indicativo de anemia. El hematocrito se obtuvo centrifugando una pequeña cantidad de sangre para separar los glóbulos blancos del resto y midiendo el volumen que éstos ocupaban respecto del total de la muestra.

5) Metabolismo antioxidante

Un efecto muy común de un gran número de compuestos tóxicos a nivel fisiológico es el estrés oxidativo. Los procesos de detoxificación que se desencadenan cuando el compuesto entra en el organismo dan lugar a los llamados radicales libres, que son sustancias con una elevada capacidad de oxidación de las diferentes moléculas que forman parte del organismo. Este estrés o daño oxidativo puede cuantificarse mediante el uso de diferentes biomarcadores. En este estudio hemos utilizado cuatro marcadores de estrés oxidativo: TBARS, relación entre glutatión oxidado y reducido, y dos enzimas antioxidantes. Todos estos marcadores se midieron utilizando la fracción celular de las muestras de sangre obtenidas a lo largo del estudio.

TBARS (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico): mediante el análisis de TBARS se mide el grado de peroxidación de lípidos, proceso que consiste en que los radicales libres captan electrones de los lípidos que constituyen las membranas celulares, degradándolos y, en consecuencia, poniendo en peligro la integridad celular. La determinación de los TBARS se realizó mediante un protocolo que consiste en hacer reaccionar la muestra con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a malondialdehído, una sustancia con un color rosado que puede cuantificarse mediante espectrofotometría.

Relación entre glutatión oxidado y reducido: el glutatión (GSH) es un pequeño péptido que juega un papel fundamental al reaccionar con los radicales libres que se producen en el interior de la célula, transformándolos o integrándolos en moléculas incapaces de producir daño oxidativo. Como consecuencia de estas reacciones, el glutatión se transforma en disulfuro de glutatión (GSSG), que es su forma oxidada. La proporción entre glutatión oxidado y reducido siguiendo el modelo $GSSG / 2GSH$ es una medida de estrés oxidativo en el interior de las células. Tanto el GSH como el GSSG se analizaron mediante una valoración espectrofotométrica. La relación entre glutatión oxidado y reducido se calculó de acuerdo a la fórmula $GSSG / 2GSH$.

Enzimas antioxidantes: la enzima superóxido dismutasa (SOD) es la principal encargada de eliminar los radicales libres de oxígeno al incorporar los átomos de oxígeno a una molécula de agua para dar lugar a peróxido de hidrógeno (agua oxigenada). Este peróxido de hidrógeno puede ser eliminado de diferentes maneras, una de las cuales incluye la oxidación del glutatión reducido, dando lugar a glutatión oxidado. Esta reacción está catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GPx). Tanto la actividad SOD como la actividad de la GPx se analizaron mediante valoraciones espectrofotométricas, expresándose dicha actividad en función de la cantidad de proteínas totales presentes en el extracto de las células sanguíneas.

Las muestras correspondientes al **experimento 2** no han sido analizadas en el momento de redacción del presente informe.

6) Vitaminas y carotenoides

El plasma obtenido en cada sangrado se empleó para analizar el contenido de vitaminas (retinol, tocoferol y retinol palmitato) y carotenoides (luteína y zeaxantina). La extracción de estos compuestos de las muestras de plasma se llevó a cabo con hexano y su separación y cuantificación se realizó mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las muestras correspondientes al **experimento 2** no han sido analizadas en el momento de redacción del presente informe.

7) Respuesta inmune específica

La respuesta inmune específica es la que tiene lugar en el organismo como respuesta a la presencia de un antígeno determinado (bacteria, virus, etc...). La respuesta inmune específica depende de la acción de unas células conocidas como linfocitos, y puede ser de dos tipos dependiendo del tipo de antígeno:

Respuesta inmune celular: llamada así porque son las propias células (linfocitos) las encargadas de destruir al antígeno. Esta respuesta depende de los linfocitos T, los cuales son atraídos hacia el lugar donde aparece el antígeno gracias a la acción de una sustancia llamadas citoquinas que producen una inflamación localizada en la zona de infección. Mediante la aplicación intencionada de un antígeno, esta inflamación puede cuantificarse y conocer así la capacidad del organismo de desarrollar una respuesta inmune celular. Adicionalmente, ante una segunda exposición a un determinado antígeno, la respuesta inmune específica se produce de una manera más rápida y más intensa que tras el primer contacto con el antígeno, lo cual es debido a que los linfocitos T guardan memoria de sus encuentros anteriores con los antígenos. Por este motivo, puede resultar muy interesante el análisis de la respuesta celular secundaria (tras un segundo contacto con el mismo antígeno).

Respuesta inmune humoral: llamada así porque en este caso, los linfocitos no son los responsables directos de la destrucción del antígeno, sino que son unas proteínas, conocidas como inmunoglobulinas o anticuerpos, sintetizadas por los propios linfocitos y que aparecen en el exterior de la célula. Esta respuesta depende de los linfocitos B, y la cantidad de anticuerpos sintetizados por estos linfocitos B tras una

inoculación intencionada de un antígeno puede cuantificarse incubando de dicho antígeno junto a una muestra de plasma obtenido del organismo que fue inoculado.

Para el análisis de la respuesta inmune celular, utilizamos la prueba de la fitohemaglutinina (PHA), que consiste en la inyección de 100 µl de una dilución 1:10 de esta proteína de origen vegetal en el patagio de una de las alas. La PHA actúa como un antígeno, desencadenando una respuesta inmune celular que se manifiesta externamente en una inflamación del área en la que se inyectó la PHA. Utilizando un calibre de espesor, se midió el grosor del patagio antes de la inyección; 24 horas después (cuando se supone que la inflamación ha alcanzado su máximo nivel), se volvió a medir la misma zona, anotándose el grado de inflamación. La inyección de la PHA se llevó a cabo el mismo día en que concluyó la exposición a los plaguicidas. Para el análisis de la respuesta secundaria, se repitió el mismo protocolo descrito para la respuesta primaria, inyectándose la PHA 13 días después de finalizada la exposición (23 días desde el inicio del experimento).

Para el análisis de la respuesta inmune humoral, se tomó una muestra de sangre de una de las ovejas estabuladas en la Finca Dehesa de Galiana. Tras obtener el hematocrito de dicha muestra, se preparó una dilución al 20% de glóbulos rojos utilizando PBS como disolvente. La sangre de la oveja actuó como antígeno, desencadenando la respuesta inmune humoral, esto es, la producción de anticuerpos. Dos días después de concluida la exposición a los plaguicidas (una vez realizada la prueba de la PHA), se inyectó intraperitonealmente un volumen de 100 µl de esta solución a cada una de las perdices. Diez días después, se extrajo una muestra de sangre de cada una de las perdices, separándose el plasma. De cada muestra se prepararon diluciones seriadas de plasma (desde la dilución más concentrada plasma:disolvente 1:1 hasta la más diluida 1:1024), las cuales se incubaron con una dilución al 0,5% de glóbulos rojos de sangre de la misma oveja utilizada para inyectar en las perdices. Con la incubación permitimos que los anticuerpos sintetizados por las perdices, presentes en el plasma, reaccionaran con el antígeno para el cual habían sido sintetizados (la sangre de la oveja). Tras la incubación, se observó cuál era la dilución de plasma más baja a la que se había producido una reacción anticuerpo-

antígeno, lo cual promocionaría una medida de la cantidad de anticuerpos sintetizados. Dicha dilución se expresó en forma de “título” (\log_2 de la concentración de plasma).

En el **experimento 2**, la única prueba relacionada con la respuesta inmune específica ha sido el análisis de la respuesta inmune celular primaria, la cual se llevó a cabo 34 días después de concluida la primera exposición.

8) Hormonas sexuales

En las muestras de plasma obtenidas se realizó una cuantificación de las hormonas esteroideas (testosterona y estradiol) con el fin de detectar posibles casos de disrupción endocrina. Dicha cuantificación se llevó a cabo mediante ensayos por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISAs) mediante kits comerciales preparados a tal efecto.

Las muestras correspondientes al **experimento 2** no han sido analizadas en el momento de redacción del presente informe.

9) Reproducción

Los huevos se recogieron diariamente y se fueron introduciendo en incubadoras por tandas cada 15 días, manteniéndose en una cámara fría mientras esperaban a entrar en la incubadora. Tras tres semanas de incubación, se realizaba una prueba de luz con el fin de observar si el feto había crecido en el interior del huevo. En el caso de que así fuera, el huevo era introducido en una jaula individual convenientemente etiquetada la cual, a su vez, pasaba a una cámara de nacimientos. Los pollos se midieron y pesaron en el momento de su eclosión, así como a los 8, 16, 24 y 32 días de vida. Todos los huevos que no pasaron la prueba de la luz o que aun habiéndola pasado no llegaron a eclosionar fueron abiertos con el fin de comprobar si estaban fecundados y para tomar las preceptivas medidas sobre el grosor de la cáscara. Los efectos de los plaguicidas administrados a las perdices adultas sobre su reproducción y el crecimiento de sus pollos (que, recordemos, nunca fueron expuestos directamente a

los plaguicidas) se analizaron mediante una serie de variables que relacionamos a continuación:

- Fertilidad: porcentaje de hembras que pusieron algún huevo y tamaño medio de puesta por hembra.
- Tasas de fecundación de los huevos: para calcular dichas tasas, aquellos huevos en los que el embrión no se desarrolló fueron abiertos para comprobar la presencia o no de disco germinal, indicador del carácter fecundado del huevo.
- Tamaño de los huevos, considerándose la longitud o distancia máxima en el plano meridiano y la anchura o distancia máxima en el plano ecuatorial. Cada una de estas medidas se tomo por duplicado para minimizar en lo posible los errores de medición. Debemos notar que en el artículo publicado hace unos meses ya se presentaban algunos datos relativos a estas variables, si bien los resultados mostrados ahora son de carácter definitivo ya que en ellos se incluyen todos los huevos que pudieron ser medidos.
- Grosor de la cáscara. Se tomaron tres piezas de la zona ecuatorial del huevo; tras eliminar la membrana se midió el espesor de cada una de las piezas por triplicado. El grosor de la cáscara se calculó como el valor medio de todas las mediciones.
- Tasa de eclosión de los huevos relativa al número de huevos fecundados.
- Tasas de supervivencia de pollos tras 8, 16, 24 y 32 días después de la eclosión.
- Crecimiento de los pollos. En el momento de la eclosión, así como tras 8, 16, 24 y 32 días, se tomó la longitud del tarso y se pesó a cada pollo, calculándose así mismo la condición corporal.

Análisis de datos

En ambos experimentos, las tasas de mortalidad se compararon entre tratamientos mediante una prueba no paramétrica utilizando el estadístico de chi-cuadrado como estadígrafo de contraste. El resto de las variables en el experimento 1 se transformaron logarítmicamente y se analizaron mediante modelos lineales generales introduciendo la concentración de cada plaguicida y el tiempo de la toma de

cada variable (pre-exposición, post-exposición o 14 días post-exposición) como factores fijos.

En el experimento 2, se empleo un análisis de la varianza para cada variable utilizando la concentración de plaguicida administrada como factor fijo.

RESULTADOS

1) Mortalidad

En el **experimento 1** encontramos una mortalidad considerable entre las perdices expuestas tanto al tiram como especialmente al imidacloprid (Tabla 4). Llama la atención el sesgo en los sexos en cuanto a incidencia de mortalidad. Entre las bajas ocasionadas por la exposición a tiram, la mayoría fueron machos, al contrario de lo que sucedió entre los animales que murieron como consecuencia de la exposición a imidacloprid. Las necropsias revelaron claros síntomas de anorexia en la mayoría de los animales muertos.

Tabla 4: Tasas de mortalidad por tratamiento en ambos experimentos

Tratamiento	Dosis ^a	Experimento 1	Experimento 2
Control		0.0	6.9
Difenoconazol	100%	0.0	
	200%	0.0	
Maneb	20%		20.0
	100%		19.4
Tiram	20%		10.3
	100%	0.0	17.2
	200%	41.7*	
Imidacloprid	20%		18.8
	100%	8.3	100.0*
	200%	58.3*	
Piretrinas	20%		9.4
	100%		19.4

^a Valores en % de la dosis recomendada.

La repetición de la exposición a tiram e imidacloprid en el **experimento 2** confirmó el efecto letal del segundo sobre las perdices. La totalidad de los animales alimentados con una dosis de imidacloprid similar a la recomendada para el tratamiento de semillas murieron antes de concluir el primer periodo de exposición. Ni el resto de

los plaguicidas analizados en este experimento, ni la concentración más baja de imidacloprid produjeron efectos letales significativos (Tabla 4).

2) Biometría

Tanto la masa corporal como el índice de masa corporal (masa corregida en función de la longitud), se comportaron de la misma manera. En el **experimento 1**, se observó una pérdida de peso significativa durante el periodo de exposición al imidacloprid y al tirad (Fig. 3). Cuando se pesaron las perdicés 15 después de haber finalizado la exposición se observó como las diferencias del control habían desaparecido; dos razones no excluyentes pueden explicar este hecho; por un lado, los animales más bajos de peso no lograron recuperarse y siguieron muriendo durante algunos días después de haber cesado la exposición, por otro lado, el cese de la exposición motivó una recuperación de los animales que habían sufrido la pérdida de peso en menor medida, los cuales volvieron a alimentarse normalmente y a recuperar así su masa normal.

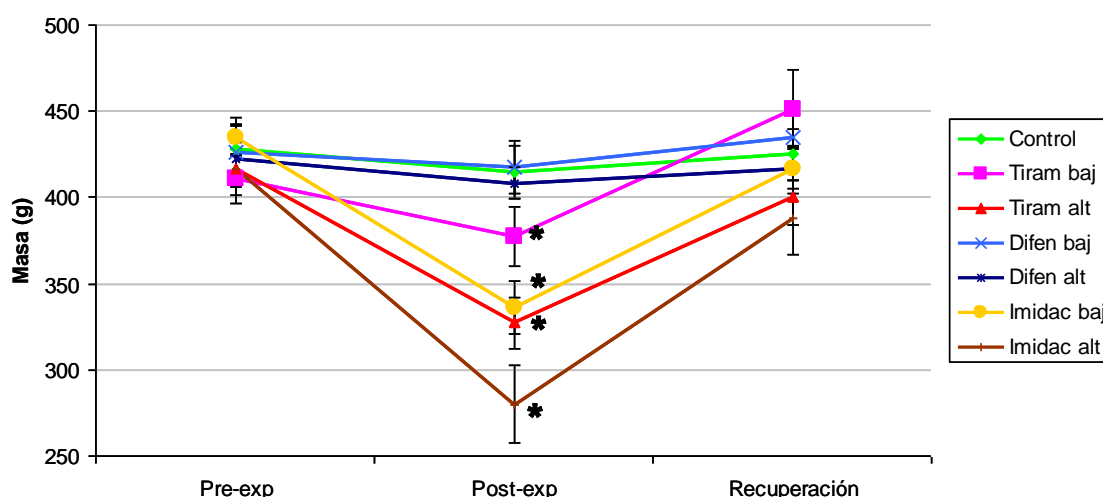


Figura 3: Masas promedio registradas por tratamiento en el experimento 1. Los asteriscos indican los valores significativamente diferentes a los controles al nivel del 5%. El análisis del índice de masa corporal arrojó idénticos resultados, por lo que no se muestra la figura.

En el **experimento 2**, tanto la concentración más baja de imidacloprid como la más alta de maneb, correspondiente en este caso a la dosis de aplicación recomendada para simiente de cereal, causaron una reducción significativa de la masa de las perdicés tras los 25 días del primer periodo de exposición (Fig. 4).

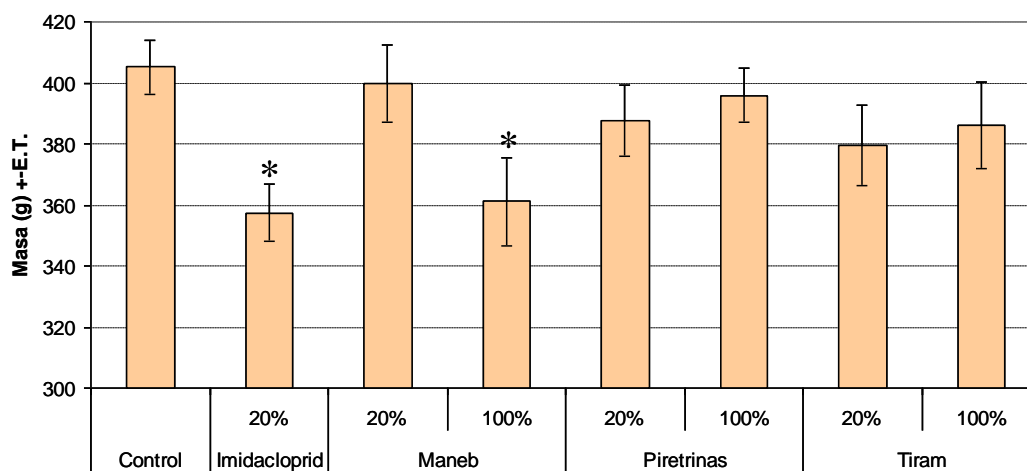


Figura 4: Masa corporal (en g) por tratamiento al término de la exposición en el experimento 2. Los asteriscos indican los tratamientos para los que se detectó una masa estadísticamente inferior a la de los controles. No se muestran resultados para el tratamiento con Imidacloprid 100% porque no hubo supervivientes.

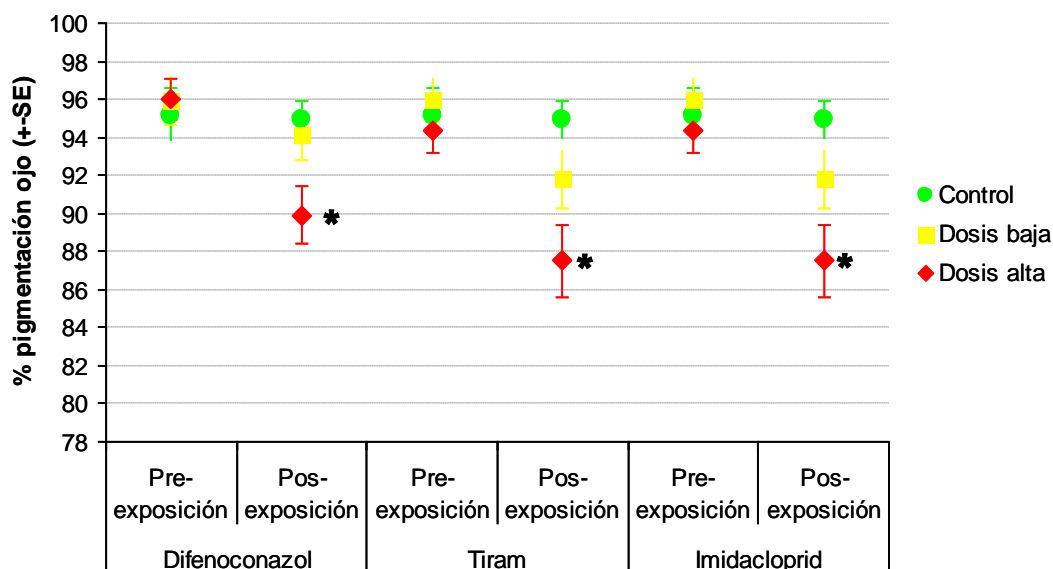


Figura 5: Porcentaje de pigmentación del anillo ocular en perdices antes y después de la exposición a tres fitosanitarios correspondientes al experimento 1. Los asteriscos indican los tratamientos para los que se detectó un nivel estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al de los controles.

3) Ornamentación

De las tres variables relacionadas con la ornamentación analizadas, el porcentaje de pigmentación del anillo ocular fue la única que se mostró afectada por la administración de semillas blindadas. Los tres plaguicidas analizados, siempre a la concentración mayor, produjeron una reducción significativa del porcentaje de pigmentación del anillo del ojo (Fig. 5).

4) Hematocrito

No se han hallado efectos significativos de ninguno de los plaguicidas sobre esta variable.

5) Metabolismo antioxidante

Pese a que un gran número de compuestos fitosanitarios se han mostrado susceptibles de generar estrés oxidativo en los organismos expuestos, únicamente hemos hallado un parámetro indicador de este tipo de estrés relacionado con la exposición a uno de los plaguicidas, en concreto un incremento del porcentaje de glutatión oxidado como consecuencia de la exposición a cualquiera de las dos concentraciones de tiram (Fig. 6).

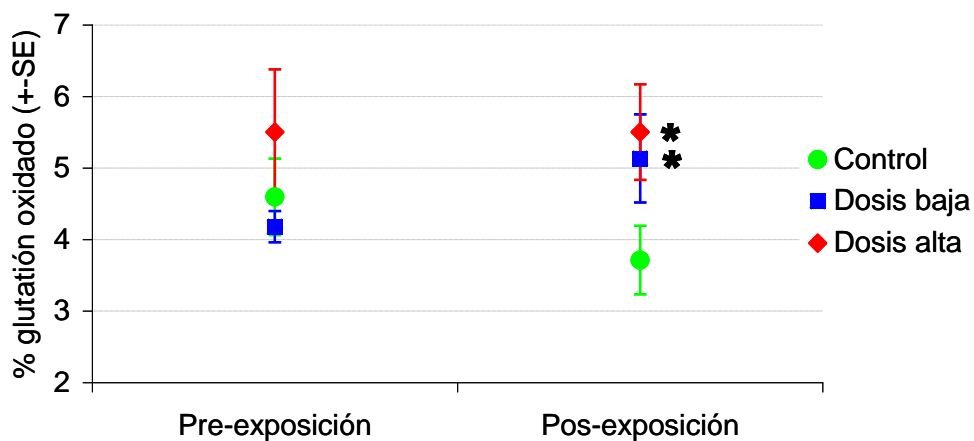


Figura 6: Porcentaje de glutatión oxidado respecto del total en perdiscos antes y después de la exposición a tiram durante el experimento 1. Los asteriscos indican los tratamientos para los que se detectó un nivel estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al de los controles.

6) Vitaminas y carotenoides

La concentración de retinol en plasma se vio significativamente reducida tras la administración de imidacloprid a la mayor de las dos concentraciones utilizadas (Fig. 7).

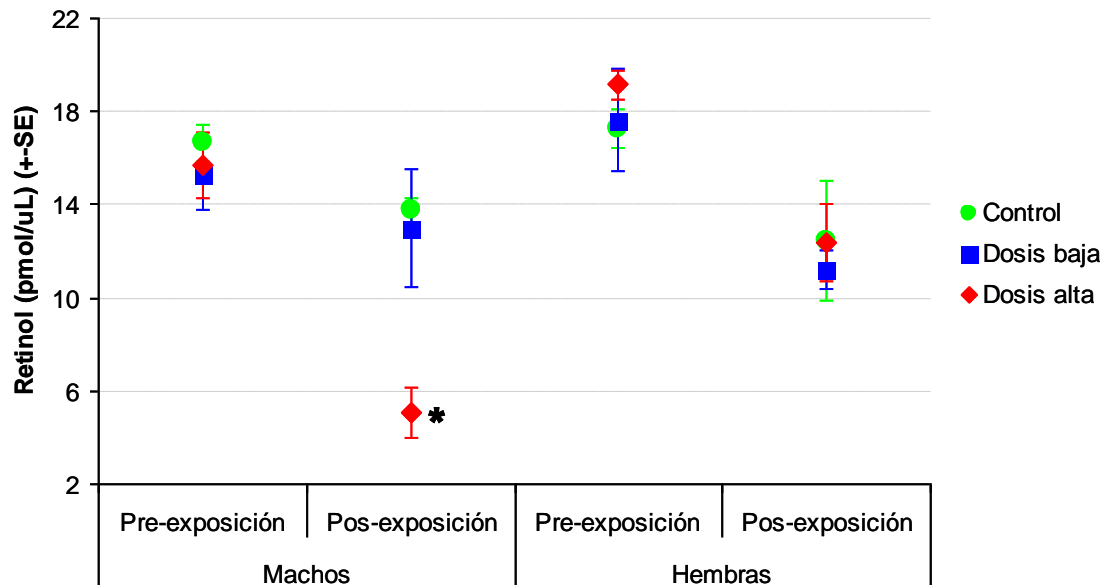


Figura 7: Niveles de retinol en plasma antes y después de la exposición a imidacloprid durante el experimento 1. Los asteriscos indican los tratamientos para los que se detectó un nivel estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al de los controles.

7) Respuesta inmune específica.

La capacidad de desarrollar una respuesta inmune celular se vio afectada por la exposición a la concentración más alta de imidacloprid y tiram según los datos obtenidos en el **experimento 1**, y por el maneb según lo observado en el **experimento 2** (Fig. 8). Resulta especialmente interesante que fueran únicamente los machos los que sufrieran el efecto inmunosupresor de los mencionados plaguicidas, tal vez relacionado con el mayor esfuerzo realizado por los machos durante las semanas previas a la reproducción, periodo en el que sus reservas energéticas se dirijan preferentemente al desarrollo de exhibiciones nupciales, comprometiendo así otras funciones vitales. El hecho de que el tiram e imidacloprid no afectaran a la respuesta inmune celular primaria en el experimento 2 es razonable dado que la dosis correspondiente al doble de la cantidad recomendada de aplicación, que produjo los efectos inmunodepresores en los individuos expuestos en el experimento 1, no fue utilizada en el experimento 2.

En el experimento 1, además, se midió la respuesta secundaria, la cual no se vio afectada por la exposición a los plaguicidas. En este efecto podría intervenir el hecho de que dicha respuesta se midiera 14 días después de concluida la exposición, y que por tanto los individuos ya estuvieran recuperados parcialmente del efecto tóxico del insecticida. No obstante, la respuesta inmune humoral tampoco se vio afectada por la exposición a ninguno de los fitosanitarios analizados, por lo que entra dentro de lo esperable el que algunos individuos mantengan la funcionalidad de su sistema inmune.

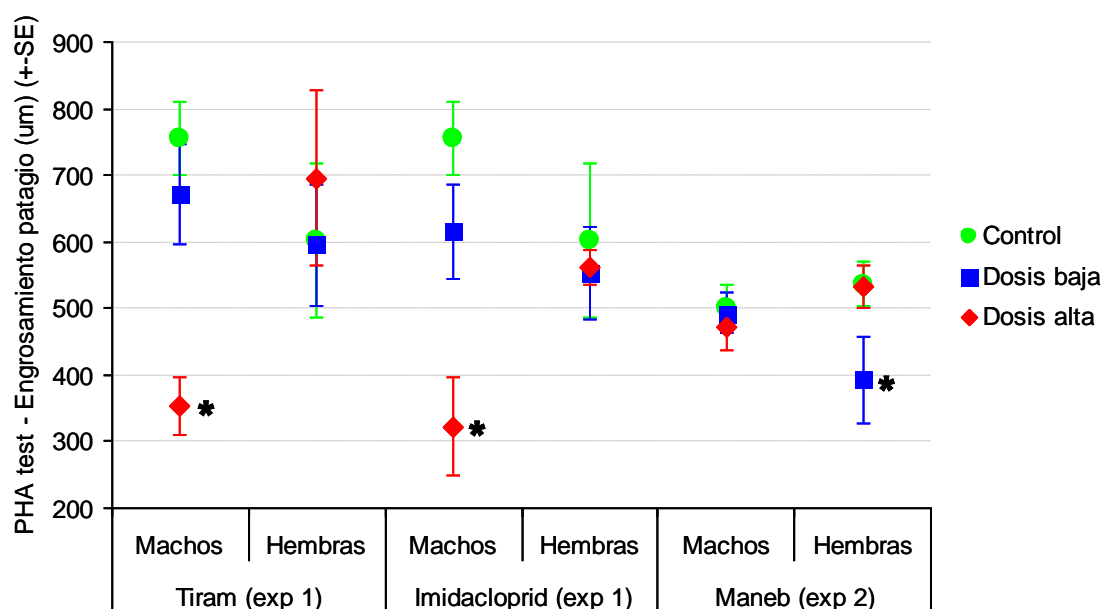


Figura 8: Resultados de la prueba de la fitohemaglutinina (PHA) para evaluar la intensidad de la respuesta inmune celular primaria en perdiges expuestas a tres fitosanitarios. Los resultados se muestran por sexos. Los asteriscos indican los tratamientos para los que se detectó un nivel estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al de los controles.

8) Hormonas sexuales

No se han hallado efectos significativos de ninguno de los plaguicidas sobre esta variable.

9) Reproducción

Tanto el porcentaje de parejas que pusieron huevos en cada tratamiento como el número medio de huevos por hembra mostraron una gran variabilidad. El tamaño de puesta por hembra varió entre uno y 27 huevos. Al analizar los resultados por tratamiento se observa que es la concentración más elevada de tiram la que produce una reducción más clara en esta variable. Sin embargo, los resultados estadísticos no revelaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos para ninguno de los tres plaguicidas (Fig. 9).

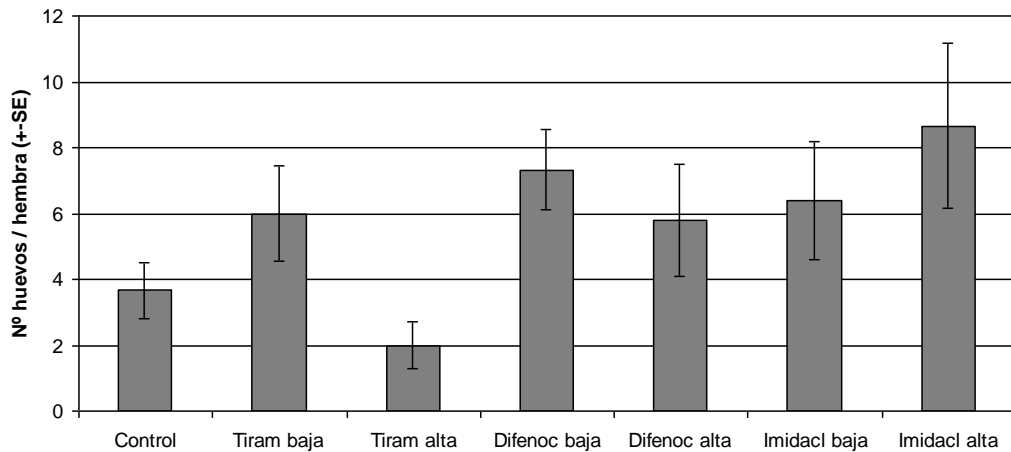


Figura 9: Tamaño medio de puesta por tratamiento obtenido en el experimento 1.

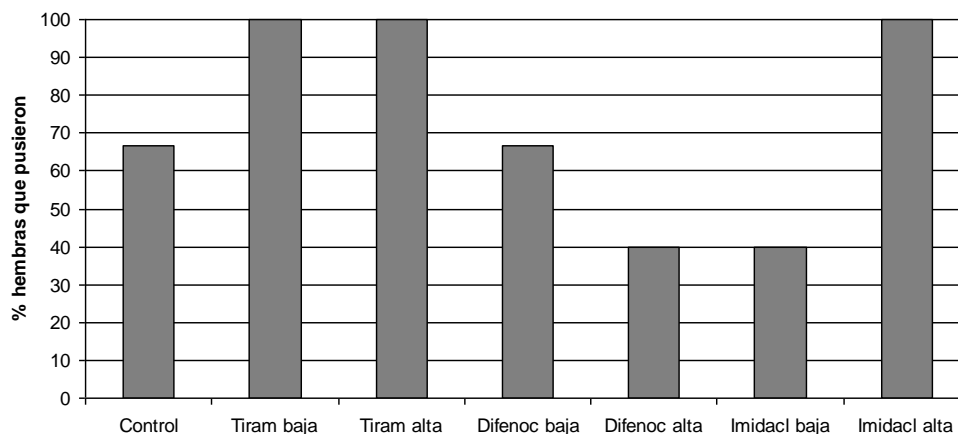


Figura 10: Porcentaje de parejas por tratamiento que pusieron algún huevo durante el experimento 1.

Tampoco hemos detectado ningún patrón claro por el que se manifiesten los efectos tóxicos de los fitosanitarios analizados sobre el porcentaje de parejas que pusieron algún huevo. Es incluso destacable que, en algunos casos, los animales expuestos a los compuestos más tóxicos (tiram e imidacloprid) hayan mostrado una mejor respuesta que los controles en lo que se refiere a estas variables (por ejemplo, el 100% de las parejas expuestas a tiram que llegaron vivas al inicio del periodo de puestas pusieron huevos, mientras que esta proporción se quedó en el 67% de los controles) (Fig. 10). Esto puede ser achacable al hecho de que las parejas que sobrevivieron a la exposición lograron recuperarse aparentemente de los daños causados por los plaguicidas.

No obstante, los tres plaguicidas afectaron al esfuerzo reproductor de algún modo ya que, si bien el tamaño de puesta por hembra no se redujo con respecto a los controles, el tamaño de los huevos, y específicamente la longitud de los mismos, si fue inferior entre los individuos expuestos a estas dos sustancias al compararlos con los huevos puestos por las hembras control (Fig. 11). Del mismo modo, el grosor de cáscara, tradicionalmente utilizado como indicador de la exposición a compuestos organoclorados, resultó ser significativamente inferior en los huevos puestos por hembras expuestas a la concentración alta de tiram y a la concentración baja de imidacloprid que en los huevos puestos por hembras control (Fig. 11). El porcentaje de reducción del grosor de cáscara respecto de los controles fue del 11% en el caso del

tirad y del 7% en el caso del imidacloprid; estudios previos llevados a cabo con compuestos organoclorados (especialmente DDT, DDE y DDD) (e.g. Pyle *et al.* 1990) han puesto de manifiesto que estas reducciones en el grosor de cáscara estarían relacionadas con una disminución de las probabilidades de eclosión, ya que aumentan el riesgo de rotura de los huevos y consiguiente muerte del embrión.

Las probabilidades de supervivencia de los pollos durante sus primeros días de vida se vieron claramente afectadas por la exposición de sus padres a las semillas tratadas con plaguicidas. La supervivencia entre los pollos control se mantuvo por encima del 60% hasta el día 32 post-eclosión, momento en el que se dio por concluido el seguimiento, mientras que para los pollos nacidos de parejas expuestas a cualquiera de los plaguicidas las tasas de supervivencia fueron claramente inferiores (Fig. 12). Al igual que había sucedido para las perdices adultas, el imidacloprid resultó ser el compuesto más peligroso para la supervivencia de los pollos; las tasas de supervivencia de los pollos nacidos de parejas expuestas al insecticida se vieron reducidas de manera significativa respecto de los controles desde el día 8 post-eclosión ($\chi^2 = 6,461$, 2 gl, $p = 0,040$), con tasas de supervivencia en ese momento inferiores al 60%. Al finalizar el periodo de seguimiento post-eclosión, los pollos del tratamiento imidacloprid acumulaban una mortalidad en torno al 70%.

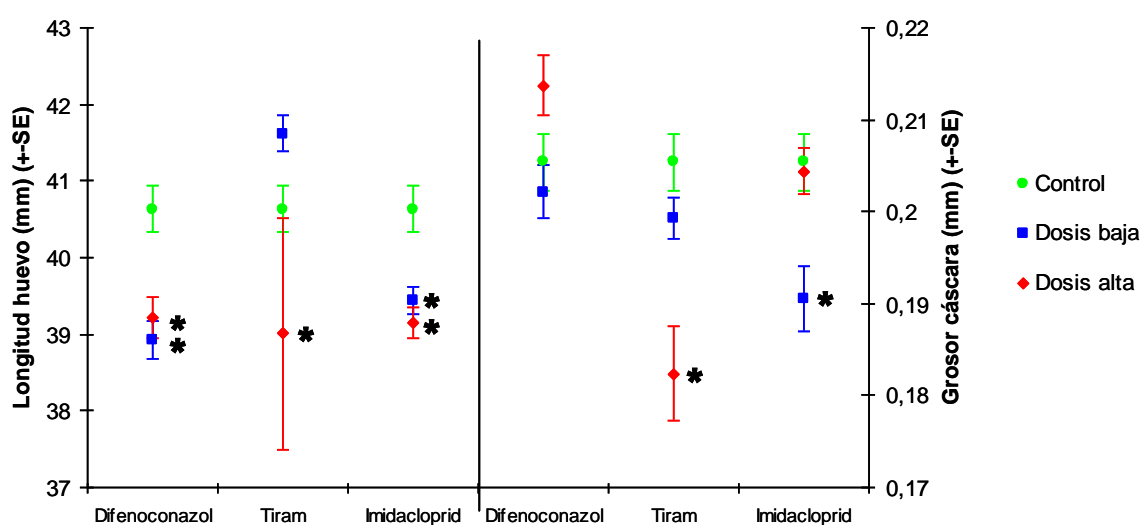


Figura 11: Longitud media de los huevos y grosor de cáscara por tratamiento en huevos de perdices expuestas a tres fitosanitarios durante el experimento 1. Los asteriscos indican los tratamientos para los que se detectó un nivel estadísticamente diferente ($p < 0,05$) al de los controles.

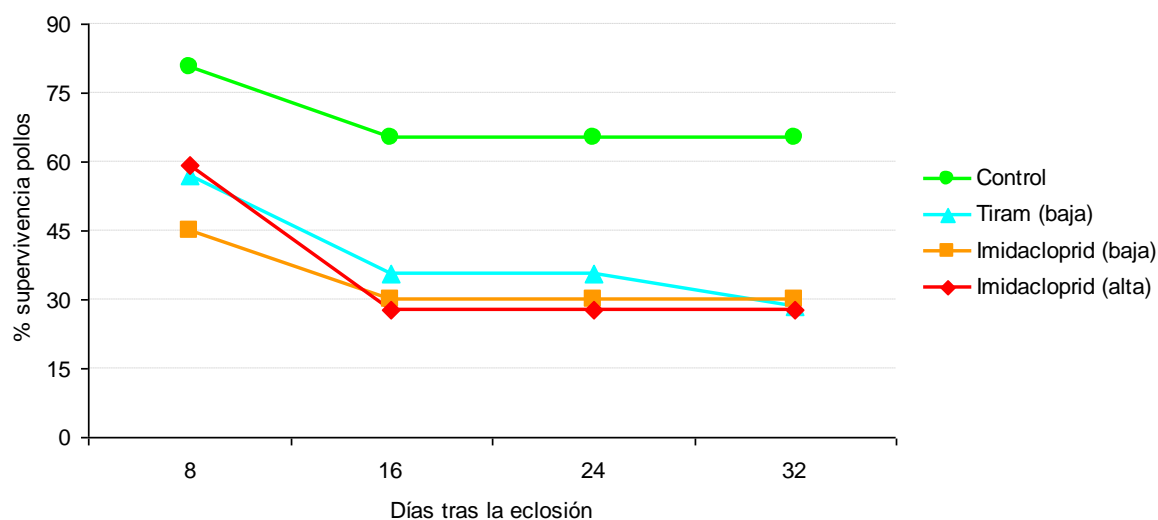


Figura 12: Evolución por tratamiento del porcentaje de supervivencia de pollos procedentes de huevos puestos por perdices expuestas a dos fitosanitarios desde su eclosión hasta 32 días después, correspondientes al experimento 1. En todos los tratamientos el porcentaje de supervivencia resultó estadísticamente inferior al de los controles ($p < 0.05$).

El tiram también redujo de manera significativa las probabilidades de supervivencia de los pollos, los cuales mostraron una tasa de supervivencia del 30% cuando procedían de hembras tratadas con la concentración baja del fungicida, siendo ésta significativamente inferior a la de los controles ($\chi^2 = 3,945$, 1 gl, $p = 0,026$). En cuanto a la concentración alta, la ausencia de efectos significativos sobre la supervivencia de los pollos está seguramente relacionada con el bajo tamaño de muestra, ya que sólo cuatro individuos en este tratamiento lograron eclosionar.

Tabla 5: Resultados de los análisis estadísticos (GLM) para analizar los efectos del difenoconazol e imidacloprid en la evolución de la condición corporal de los pollos durante sus primeros 32 días de vida durante el experimento 1

Plaguicida	Fuente de variación	g.l.	F	p
Difenoconazol	Intercepto	1	7583.313	<0.001
	Tratamiento	2	5.063	0.015
	Error	23		
Imidacloprid	Intercepto	1	6339.636	<0.001

	Tratamiento	2	5.268	0.014
	Error	22		

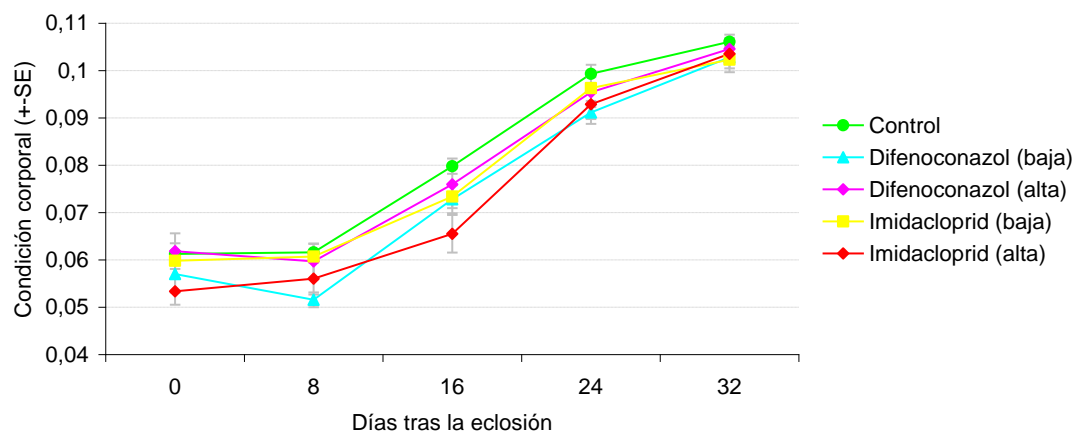


Figura 13: Evolución de la condición corporal de los pollos por tratamiento durante los primeros 32 días post eclosión correspondientes al experimento 1.

Por último, la condición corporal de los pollos también se vio afectada por la exposición al imidacloprid y al difenoconazol (Tabla 5). Aunque la tasa de crecimiento no se vio afectada significativamente, pudimos apreciar como los pollos cuyos padres habían comido semillas tratadas con estos dos plaguicidas mostraban menor masa y peor condición corporal que los controles durante sus primeros 32 días de vida (Fig. 13).

CONCLUSIÓN

Imidacloprid

Se trata de un insecticida que, administrado en las dosis recomendadas para el tratamiento de semillas, pone en riesgo la supervivencia de los individuos. En los casos en los que existen individuos supervivientes, éstos muestran síntomas de anorexia y una serie de efectos a nivel fisiológico que podrían indirectamente comprometer su supervivencia. Finalmente, el éxito reproductor de las perdices se ve claramente afectado por el imidacloprid, que en las concentraciones recomendadas para su aplicación sobre semillas reduce las probabilidades de supervivencia de los pollos aunque éstos no entren en contacto con el insecticida.

Tiram

El tiram sólo causa efectos letales en las perdices al ser administrado en concentraciones superiores a las recomendadas para el tratamiento de semillas. Sin embargo, la exposición a concentraciones aplicables a las semillas puede reducir la masa y condición corporal de los individuos. El tiram parece presentar un efecto repelente, lo que supone que los individuos podrían estar rechazando intencionadamente el grano tratado con este fungicida, y ser ésta y no su toxicidad directa la causa de los efectos observados sobre la masa y condición corporal de los animales.

A la lista de efectos subletales del tiram hay que añadir la depresión de determinados componentes de la respuesta inmune en machos, el estrés oxidativo y, al igual que sucede con el imidacloprid, un efecto indirecto sobre la reproducción al reducir tanto el grosor de la cáscara de los huevos como las probabilidades de supervivencia de los pollos.

Maneb

Analizado únicamente en el experimento 2, los datos sobre sus efectos son todavía poco concluyentes, pero resulta significativo el que se haya detectado un efecto inmunodepresor del fungicida sobre las hembras. Por otra parte se puede concluir que el fungicida no presenta efectos letales significativos.

Difenoconazol

Parece ser el fungicida menos tóxico de los tres analizados, y en consecuencia se presenta como una alternativa razonable al uso de tiram para el tratamiento de semillas. No obstante, es preciso reseñar sus efectos negativos sobre el tamaño de los huevos y sobre algunos indicadores de la ornamentación de los animales.

Piretrinas

Al igual que sucede con el maneb, el análisis de sus efectos es todavía muy preliminar al haber sido testadas únicamente en el experimento 2. No obstante, no se han detectado efectos letales de este compuesto, y en consecuencia podría resultar una alternativa al uso del imidacloprid para la protección de las semillas ante determinados tipos de insectos.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y DIRECCIONES FUTURAS

El proyecto continúa desarrollándose con normalidad. A lo largo de la primavera y verano de 2011 se analizarán los efectos de los cuatro compuestos testados en el experimento 2 sobre la reproducción y sobre aquellos parámetros fisiológicos que hayan resultado más significativos en los análisis realizados durante el primer año de proyecto.

En el otoño de 2011 se prevé comenzar con el experimento 3, que incluirá la última batería de plaguicidas.

Los resultados del experimento 1 se presentarán en dos comunicaciones, ya aceptadas, al congreso europeo de la Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) que se celebrará en Milán, y en otras dos comunicaciones que han sido sometidas al congreso de la International Union of Game Biologists a celebrar el próximo mes de Septiembre en Barcelona.

Por otra parte, los datos obtenidos hasta la fecha serán presentados por Ana López-Antia como trabajo para la obtención del título de Máster dentro del Máster Universitario en Investigación Básica y Aplicada en Recursos Cinegéticos, desarrollado por el IREC. Los resultados presentados serán además sometidos para su publicación en revistas científicas especializadas en cuanto se concluya su redacción.

REFERENCIAS

- Blanco Aguiar, J., Virgós, E., Villafuerte, R. 2003. Perdiz Roja *Alectoris rufa*. En Martí, R., Del Moral, J.C. (Eds), Atlas de las Aves Reproductoras de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza - Sociedad Española de Ornitología, Madrid, pp. 212-213.
- Brickle, N.W., Harper, D.G., Aebischer, N.J., Cockayne, S.H., 2000. Effects of agricultural intensification on the breeding success of corn buntings *Miliaria calandra*. *Journal of Applied Ecology* 37, 742-755.
- EBCC, 2009. Trends of Common Birds in Europe, 2009 Update. European Bird Census Council. <http://www.ebcc.info/>
- Greenwood, J.J.D., 2003. The monitoring of British breeding birds: a success story for conservation science? *Science of the Total Environment* 310, 221-230.
- Mañosa S., Mateo R., Freixa C., Guitart R., 2003. Persistent organochlorine contaminants in eggs of northern goshawk and Eurasian buzzard from northeastern Spain: temporal trends related to changes in the diet. *Environmental Pollution* 122, 351-359.
- Mateo, R., Carrillo, J., Guitart, R., 2000. p,p'-DDE residues in eggs of European kestrel *Falco tinnunculus* from Tenerife (Canary Islands, Spain). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65, 780-785.
- Pyle, P., Sydeman, W.J., McLaren, E., 1990. Organochlorine concentrations, eggshell thickness, and hatchability in seabirds off central California. *Waterbirds* 22, 376-381.
- Rands, M.R.W., 1985. Pesticide use on cereals and the survival of grey partridge chicks: A field experiment. *Journal of Applied Ecology* 22, 49-54.
- Pérez y Pérez, F., 1981. La Perdiz Roja Española. Ed. Científico-médica, Barcelona, 504 p.
- Salamolard, M., Moreau, C., 1999. Habitat selection by little bustard *Tetrax tetrax* in a cultivated area of France. *Bird Study* 46, 25-33.
- SEO/BirdLife, 2010. Estado de Conservación de las Aves en España en 2010. SEO/BirdLife, Madrid.

- Sheldon, R., Bolton, M., Gillings, S., Wilson, A., 2004. Conservation management of lapwing *Vanellus vanellus* on lowland arable farmland in the UK. *Ibis* 146, 41-49.
- Sotherton, N.W., 1998. Land use changes and the decline of farmland wildlife: an appraisal of the set-aside approach. *Biological Conservation* 83, 259-268.
- Stanley, P.I., Bunyan, P.J., 1979. Hazards to wintering geese and other wildlife from the use of dieldrin, chlorfenvinphos and carbophenothion as wheat seed treatments. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences* 205, 31-45.

Coordinación Proyecto: **Fundación FEDENCA (RFEC)**: Diciembre 2011