

UCH-FC
MAG-EDE
B 251
C.1

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE CRÍAS EXTRA-PAREJA EN
APHRASTURA SPINICAUDA (FURNARIIDAE), UN PASERIFORME
SOCIALMENTE MONÓGAMO.**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de:

**MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICA
CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

Facultad de Ciencias

por

MARÍA OLGA BARGSTED ARAVENA

OCTUBRE 2013

Director de tesis:

RODRIGO A. VÁSQUEZ SALFATE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

MARÍA OLGA BARGSTED ARAVENA

Ha sido por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 05 de septiembre 2013.

Director de tesis:

Dr. Rodrigo Vásquez

.....

Comisión de evaluación de la tesis

Dr. David Veliz

.....

Dr. Claudio Veloso

.....

Dr. Javier Simonetti

.....

Agradezco a los integrantes del laboratorio de Ecología Terrestre (Universidad de Chile) que colaboraron y me apoyaron tanto en el trabajo de campo, de laboratorio o en la logística: Cristóbal Venegas, Cristian Celis (hicieron los terrenos una experiencia inolvidable), Nasrim Butler, así como a todo el personal del Parque Omora en la isla Navarino. También al resto de compañeros del laboratorio que gracias a su apoyo, alegría y buena disposición, aprendí a ser mejor científica y persona. Al Dr. Elie Poulin y a los integrantes del laboratorio de Ecología Molecular (Universidad de Chile), quienes me guiaron con paciencia y entusiasmo, especialmente a Claudia Guerrero y Diego Yáñez por su participación en el trabajo de laboratorio. Al Dr. David Véliz por su disposición para enseñarme el uso del programa de análisis genético.

También agradecer de manera muy especial al grupo de trabajo en la biología del rayadito, encabezado por mi tutor, Dr. Rodrigo Vásquez, quien me ha guiado, ha confiado en mí y me ha apoyado tanto en los buenos momentos como en los más complejos durante estos 3 años. A Verónica Quirici y Gabriel Castaño, compañeros de terreno, guías en lo profesional y excelentes personas. Gracias por haber contribuido en que esta experiencia haya sido positiva, enriquecedora y muy entretenida.

Agradezco también al Instituto de Ecología y Biodiversidad (ICM-P05-002, PFB-23-CONICYT), al Proyecto FONDECYT 1090794 de Rodrigo Vásquez, y a Becas Conicyt para Magíster en Chile, que hicieron posible el financiamiento y por tanto, la realización de este proyecto de investigación.

Finalmente agradezco a mi familia: A mis padres, hermanos (de sangre y adquiridos), suegros, y a mis amigos. Les agradezco profundamente la paciencia, el apoyo, el cariño que me entregaron (y siguen entregando) en los momentos difíciles y por haber compartido conmigo todas las alegrías que este proceso me entregó. A mi marido, Gonzalo: La mitad de este logro es tuyo, estoy muy orgullosa e infinitamente agradecida por tu paciencia, ánimo, sabias palabras, retos, comprensión y amor. Gracias infinitas.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
<i>Aphrastura spinicauda</i>	17
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Área de estudio	20
Toma de muestras	20
Análisis genético	21
Análisis estadísticos	24
RESULTADOS.....	25
DISCUSION.....	33
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	43
Anexo 1	58
Anexo 2	61
Anexo 3	74
Anexo 4	75

RESUMEN

La proporción de aves que eran consideradas monógamas disminuyó considerablemente con la aparición de técnicas de genética molecular como los microsatélites, llevando a la distinción de la monogamia social de la genética, e incorporando un nuevo concepto, la paternidad extra-pareja (EPP). En esta tesis se evaluó la existencia de EPP en una población de rayaditos, *Aphrastura spinicauda*, un furnárido endémico, socialmente monógamo.

Se muestrearon 142 individuos de una población de la isla Navarino (Región de Magallanes) durante la época reproductiva del año 2010 (21 familias, es decir, madre, padre social y polluelos). A partir del ADN extraído, se sexaron los individuos mediante PCR y se identificaron 9 microsatélites para la especie. Para el análisis de parentesco y paternidad, se utilizaron 6 de los 9 microsatélites y se obtuvo un promedio de 9,5 alelos por locus. El parentesco se determinó a través del programa Kingroup v.2 y la paternidad con el programa Cervus 3.0.3. Además se corroboró la presencia de EPP a través de la reconstrucción de genotipos con el programa Gerud 2.0.

Al comparar las paternidades genéticas con las sociales, se determinó que de los 97 polluelos, 55% (53) fueron atribuidos a sus padres sociales, 44% (43) a paternidad extra-pareja y un 1% no fue determinado (1 polluelo no genotipificado). A nivel de nidada, se excluyó la información de 2 familias por falta de datos en la genotipificación del padre social. Las crías extra-pareja se distribuyeron en 16 de las 19 nidadas, observando una frecuencia de presentación de EPP del 84,3%. Los machos que tuvieron paternidad extra-pareja eran igual de propensos a perder paternidad dentro de la pareja, que el resto de los machos. Sin embargo, los machos con mayor cantidad de crías (“ganadores de paternidad”), aunque hayan tenido EPP al interior de sus nidos, engendraron más hijos de los posibles sólo al interior del nido propio (i.e., 4 padres con más de 6 hijos genéticos en total). Esta diferencia en las ganancias de paternidad entre los machos, implicaría un aumento del éxito reproductivo de algunos machos, a expensas de otros, por lo que la EPP sería un componente relevante de la selección sexual en esta especie.

Además, se identificó que machos con alas más cortas y rectrices de la cola más simétricas tuvieron una mayor cantidad de hijos genéticos. De la misma forma, hembras con rectrices de la cola asimétricas tuvieron más paternidad extra-pareja. Estos resultados permiten proponer a la simetría entre las rectrices de la cola, como un rasgo fenotípico atractivo para las hembras, mientras que la asimetría sería atractivo para los machos.

Al evaluar la relación entre presencia de EPP y el grado de parentesco dentro de la pareja y en comparación con los machos extra-pareja, si bien se encontró que en el 62,5% de los nidos con EPP, el parentesco de la hembra era mayor con el macho social que con el (o los) macho (s) extra-pareja y que en los tres nidos sin EPP, el parentesco dentro de la pareja social era menor a 0,5, estas diferencias reflejan sólo una tendencia y a nivel poblacional no implican diferencias significativas. No se encontraron machos no-territoriales (flotantes) en el área de estudio ni se observó evidencia de parasitismo intra-específico de nidos.

En definitiva, con este estudio se pudo determinar por primera vez, la presencia de EPP en una población de *A. spinicauda*, siendo, además, el primer estudio sobre EPP en una especie de la familia Furnariidae. Si bien el rayadito es un ave socialmente monógama, su sistema de apareamiento a nivel genético es más complejo que la monogamia, abriéndose un amplio campo de investigación sobre las posibles causas y mecanismos que modelan su aparición.

ABSTRACT

The proportion of birds considered monogamous has been declining since the appearance of molecular genetic techniques as multi-locus DNA fingerprint (microsatellites). Now, monogamy must be separated in social or genetic monogamy, adding a new concept, the extra-pair paternity (EPP). In this study, we evaluated the presence of EPP in a population of the Thorn-Tailed Rayadito (*Aphrastura spinicauda*), socially monogamous endemic furnariidae specie.

For this purpose, 142 individuals at the Navarino island (Magallanes Region) were sampled during the breeding season of 2010 (21 families, i.e., 21 mothers, 21 social fathers, and 97 offsprings). From extracted DNA, individuals were sexed by PCR and 9 microsatellites were identified for the specie. For the parentage and paternity analysis, 6 microsatellites were used with an average of 9.5 alleles per locus. Parentage was determined using Kingroup v.2 software and paternity was determined using Cervus 3.0.3 software. The presence of EPP was corroborated throughout genotypic reconstruction using Gerud 2.0 software.

When comparing genetic and social paternity (observed in the fieldwork), it was determined that of the 97 chicks, 55% (53) were attributed to their social parents, 44% (43) to extra-pair paternity and 1% was non-determined (one chick with insufficient genotyping data).

At the clutch level, data were excluded from 2 families due to lack of data on the social father genotype. Extra-pair offspring occurred in 16 out of 19 nests, observing an EPP frequency of 84.3%. Males who had extra-pair paternity were just as likely to lose paternity in the pair, as the other males. However, males with larger number of offspring (winners of paternity), even though they had EPP within their social nests, they fathered more offspring than what it were possible with only their social nest (4 parents with 6 or more genetic offspring). This difference in earning paternity between males involves an increased reproductive success for some, at the expense of others. Hence, EPP contributes to sexual

selection in this specie.

Furthermore, we identified that shorter wings and symmetrical rectrices of the tail are associated with a greater number of genetic offspring in males. Likewise, females with asymmetrical rectrices of the tail had more extra-pair paternity (i.e., infidelity). Therefore, females seems to be sexually attracted to symmetrical rectrices of the tail of males, and males seems to be sexually attracted to asymmetrical rectrices of the tail of females.

When assessing the relation between EPP and parentage (inside de pair compared to extra-pair males), it was possible to determine that in 62,5% of the nests with EPP, the parentage of the female was greater with the pair-male than with the extra pair-male. Besides, in the three nest without EPP, the parentage inside the social pair was lower than 0,5. However, these differences were not statistically significant.

There were no non-territorial males (i.e., floating males) in the study area nor was evidence of intraspecific nest parasitism.

This study allowed determining for the first time the presence of EPP in a population of *A. spinicauda* and it represents the first study of EPP in a species belonging to the Furnariidae family. The Thorned-Tailed Rayadito is a socially monogamous bird with a very complex mating system on a genetic level. The results obtained here open a wide field of research on the possible causes and mechanisms that shape the appearance of EPP.

INTRODUCCIÓN

Hace cuarenta años, más del 90% de las especies de aves eran clasificadas como monógamas (Lack, 1968) y no eran consideradas como un modelo atractivo para estudios de selección sexual. Por ejemplo, Mock (1985) lo describió de la siguiente forma: “Las aves monógamas no producen grandes leks, y ocasionalmente son aves ornamentadas. A simple vista, la monogamia ha generado machos mansos, uniformes, con un macho que copula frecuentemente con una misma hembra. La selección sexual no sólo aparenta ser débil, sino que todo el sistema aparenta ser soso”.

Sin embargo, con el descubrimiento y desarrollo de la genética molecular y las herramientas disponibles para el estudio de paternidad en especies silvestres, se descubrió que los padres sociales no eran necesariamente los padres genéticos de sus nidadas (Griffith *et al.*, 2002).

Actualmente, en la literatura se describen diversas estrategias reproductivas en aves, distinguiéndose, al interior de la monogamia, la monogamia genética, la monogamia reproductiva y la monogamia social (Gowaty, 1996). La monogamia genética describe la unión de por vida, que genera descendencia sólo dentro de la pareja (Southgate *et al.*, 1998). La monogamia sexual incluye cópulas solamente con la pareja estable mientras la asociación permanezca (e.g., durante una temporada reproductiva; Wickler & Seibt, 1983). La monogamia social en tanto, solamente hace referencia a la unión de un macho a una hembra durante la temporada reproductiva, en la que ambos participan del cuidado parental de la nidada (Reichard & Boesche, 2003; véase además, e.g., Moreno *et al.* 2007).

La monogamia genética se ha encontrado en alrededor del 20-25% de las especies socialmente monógamas (véase Griffith *et al.*, 2002). Por tanto, al estudiar hoy la biología reproductiva de aves, los investigadores deben hacer la distinción entre monogamia social, reproductiva y genética. Estos tipos de monogamia raramente coexisten en una misma especie, principalmente debido a que comúnmente ocurren encuentros sexuales entre machos y hembras que no pertenecen a una pareja estable, lo que se denomina “infidelidad”

sexual del macho y/o de la hembra. En especies con monogamia social, los ornitólogos se refieren a esta conducta de “infidelidad” de una pareja hacia la otra (o de ambas) como paternidad extra-pareja (EPP, del inglés *extra -pair paternity*), cuando produce descendencia viable (Griffith *et al.*, 2002).

La paternidad extra-pareja (EPP) significa que al menos un descendiente de la nidada, es engendrado por un macho (llamado macho extra-pareja) distinto de la pareja social de la hembra (Augustin, 2012). A los machos que no generan descendencia en la población, ya sea dentro de su nido o a través de EPP en otras nidadas, se les denomina machos perdedores de paternidad (“losers of paternity”; Lehtonen *et al.*, 2009). Mientras que a aquellos machos que son capaces de generar descendencia dentro y fuera de su nido, se les llama machos ganadores (“winners of paternity”), independientemente de si crían polluelos que genéticamente no son propios (Lehtonen *et al.*, 2009).

Dentro de los factores fisiológicos involucrados en la paternidad extra-pareja, se encuentran: (i) el momento de la fertilización en relación a la ovoposición por parte de otros machos, (ii) la capacidad de almacenamiento espermático de la hembra y, (iii) la capacidad de eliminar activamente esperma de machos no preferidos (Birkhead, 1998).

En cuanto a la (i) inseminación, el ciclo de la ovulación hasta la oviposición, dura en la mayoría de las aves, 24 horas. Ocurriendo la ovulación y oviposición alrededor del amanecer, momento en que las cópulas son más frecuentes. Cuando la inseminación ocurre cercana a la ovoposición (horas previas y posteriores) es improbable la fertilización, excepto cuando ocurre a menos de 60 minutos de la ovoposición. A este momento se le llama “ventana de inseminación”, siendo un momento altamente favorable para fertilizar el siguiente huevo (Birkhead, 1998).

Posteriormente a la inseminación, (ii) las hembras retienen un porcentaje de esperma cercano al 2%, que es almacenado en los túbulos de almacenamiento espermático. Este mecanismo podría ser manejado por las hembras, al eliminar (junto con las fecas) esperma de machos que ellas no prefieran (Birkhead, 1998).

Por otra parte, (iii) en muchos estudios experimentales sobre competencia espermática, se insemina a las hembras con concentraciones conocidas de espermatozoides de diferentes machos, los cuales se alternan en el orden de inseminación. Lo que se ha observado es que la mayoría de los huevos es fertilizado con la esperma del segundo macho y que la separación de tiempo entre las inseminaciones es relevante en cuanto a la probabilidad de fertilizar de cada macho (véase Birkhead & Moller, 1992).

Además, Vedder & Magrath (2012) observaron en *Cyanistes caeruleus* que la paternidad extra-pareja disminuye a medida que transcurre la postura, posiblemente debido a que la presencia de huevos induce el comportamiento de incubación, y se reduce la motivación por buscar encuentros con machos extra-pareja.

Para asegurar la paternidad, se describen dos mecanismos por parte del macho: (i) a través de cópulas frecuentes con la pareja social y (ii) vigilando la pareja desde cerca (Birkhead & Moller, 1992). En la mayoría de las especies el período fértil comienza aproximadamente 10 días antes de la fertilización del primer huevo y termina cuando el último huevo de la nidada es fertilizado. La vigilancia de la pareja generalmente comienza 5 días antes de la puesta del primer huevo. Esto sugiere que ese corresponde al periodo de mayor fertilidad por parte de la hembra y por tanto el riesgo de una fertilización por un macho extra-pareja sería mayor. Además, el hecho de que el macho sólo la proteja durante el periodo de mayor fertilidad, también sugiere que la vigilancia implica un alto costo para el macho (Birkhead, 1998).

A pesar de los más de treinta años de investigación sobre EPP, aún se sabe poco sobre las variables que influyen la aparición de esta conducta y sus consecuencias (Westneat & Stewart, 2003), si bien se tiene conocimiento en varias especies sobre la importante variación de presencia de EPP que puede existir entre poblaciones. Además existe variabilidad entre especies, tanto en frecuencia como en diversidad de conductas asociadas a EPP (Griffith *et al.*, 2002). El rango de ocurrencia de la EPP va desde 10% en la Pardela de Tasmania, *Puffinus tenuirostris* (Augustin & Pankin, 1996), hasta 95% en el paserino *Malurus cyaneus* (Mulder *et al.*, 1994). A nivel intra-específico, se ha observado

una alta variación en la proporción de EPP entre poblaciones de *Luscinia svecica*, así como entre diferentes años para una misma población (Johnsen & Lifjeld, 2003). También ha sido posible encontrar casos de EPP en nidadas de hembras que perdieron sus parejas en *Parus caeruleus*, (Charmantier *et al.*, 2004) y dentro de parejas que tienen más de una nidada por estación reproductiva con distintos valores de ocurrencia entre nidadas, en *Parus ater* (Dietrich *et al.*, 2004; Bouwman *et al.*, 2006).

Existen diversas hipótesis que intentan explicar la ocurrencia de la EPP, tanto a nivel intra-específico (Petrie *et al.*, 1998; Weatherhead & Yezerinac, 1998) como inter-específico (Griffith *et al.*, 2002), las cuales concuerdan globalmente en que la frecuencia de ocurrencia de EPP se debería a una combinación entre características ontogenéticas, patrones de cuidado parental y oportunidades de promiscuidad a nivel local. Sin embargo, no se ha podido establecer un patrón global de beneficio último al tener crías extra-pareja (EPO, del inglés extra-pair offspring) en relación a las crías dentro de la pareja (WPO, del inglés within-pair offspring) (Griffith *et al.* 2002). Según Arnold & Owens (2002), altos valores de “engaños” (es decir, encuentros con individuos fuera de la pareja estable) a la pareja socialmente estable estarían asociados a historias de vida aceleradas, es decir, en aquellas especies donde el ciclo de vida, crecimiento, desarrollo y envejecimiento ocurren rápido (e.g. *Coturnix japonica*, que vive hasta 3 años en vida silvestre; Ottinger, 2001), y se asociaría con una mayor mortalidad de los adultos, ya que se considera un buen predictor de la probabilidad de volver a unirse como pareja la siguiente temporada. También la EPO se asociaría con la reducción del cuidado parental, donde la hembra no arriesgaría su éxito reproductivo si el macho la abandona (Moller & Birkhead, 1993).

Griffith *et al.* (2002) estimaron que más de un 50% de la variabilidad inter-específica en EPP ocurre a nivel de familia y órdenes, sugiriendo que las diferencias entre especies han sido determinadas durante la historia evolutiva de los linajes de aves (e.g., en diferencias en estrategias reproductivas, tipo de cuidado parental y rasgos de la historia de vida entre los distintos linajes). Sin embargo, a nivel intra-específico, la presencia de EPP estaría determinada por factores genéticos y ecológicos contemporáneos. Johnsen & Lifjeld (2003) evaluaron la influencia de factores ecológicos en la presencia de cópulas extra

pareja en *Luscinia svecica* y encontraron que, en nidos donde habían crías extra-pareja, la ocurrencia de las cópulas extra pareja dependía de la temperatura al amanecer, momento en el que las cópulas ocurren. Esto sugiere una relación causal entre la temperatura ambiental y la frecuencia de EPP en esta especie, ya que al comienzo de la temporada reproductiva aún existen zonas que siguen cubiertas de nieve, forzando a las aves a dedicarle más tiempo a la regulación de la temperatura, limitando las actividades reproductivas.

La variedad conductual asociada a EPP es otro aspecto interesante. Se ha postulado que las hembras participan activamente en la decisión de tener cópulas extra pareja con diferentes machos (Griffith *et al.*, 2002; véase además Townsend *et al.*, 2010). Sin embargo, Yezerinac *et al.* (1995) describen que los patrones de selección de pareja asociada a la ocurrencia de cópulas extra pareja no dependen sólo de la hembra. En algunas especies, la hembra induciría la competencia entre machos (e.g., Hoi, 1997), mientras que en otros casos, la hembra sería forzada a copular con machos distintos a su pareja, sufriendo lesiones y heridas al resistirse (e.g., McKinney *et al.*, 1983). Otra conducta observada es la protección excesiva de la pareja, donde el macho sigue muy de cerca a la hembra durante su época fértil (Komdeur *et al.*, 1999). Como se mencionó previamente, la presencia de EPP pareciera explicar muchas conductas reproductivas encontradas en aves socialmente monógamas, tales como protección de la pareja y ocurrencia de un gran número de cópulas dentro de la pareja.

La infidelidad o EPP ocurre generalmente inducida por el macho, ya que éstos ganarían en número de descendencia sin tener que invertir en el cuidado parental de esa descendencia. Se han descrito tanto casos en que los machos fuerzan a las hembras a copular (e.g., patos y aves coloniales; Birkhead & Moller, 1992) como casos donde los machos dejan su propio territorio para copular con otras hembras (e.g., urraca; Buitron, 1983). Aunque se han encontrado casos en los que las hembras abandonan su territorio para buscar machos extra-pareja (e.g., tordo; Gray, 1997), en la mayoría de las especies, la hembra participa de cópulas extra-pareja sólo cuando su pareja está ausente, sugiriendo que la detección de la infidelidad conlleva altos costos para la hembra (Birkhead, 1998). Esto podría explicarse por una reducción en el cuidado parental por parte del macho en respuesta

a la búsqueda de cópulas extra-pareja por parte de la hembra (Dixon *et al.*, 1994; Matysiokova & Remes, 2012).

Desde el descubrimiento de la existencia de EPP, los beneficios para los machos que participan en las cópulas extra-pareja han sido obvios, ya que ellos pueden incrementar su éxito reproductivo drásticamente al producir crías que no le generan costo alguno de cuidado parental. Por tanto, la presencia de EPP resultaría de un balance entre los costos y beneficios para la hembra, el macho dentro de la pareja y el macho fuera de la pareja (Webster *et al.*, 2007). De la misma forma, Yezerinac *et al.* (1995) sugirieron que los beneficios directos para los machos que tienen descendencia en otros nidos, es superior a los costos de realizar cuidado parental sobre descendencia ajena.

La varianza en el éxito reproductivo de los machos se produce por diferencias entre (i) la cantidad de parejas sociales, (ii) la fecundidad de las parejas sociales, (iii) la habilidad para proteger el nido de machos extra-pareja y (iv) el éxito en obtener fertilizaciones extra-pareja (Webster *et al.*, 1995). Por tanto, aunque teóricamente se pensó que la selección sexual en aves monógamas era baja, empíricamente se ha visto que incluso valores bajos de EPP, aumentan la oportunidad de selección sexual, siendo ésta mayor cuando una pequeña proporción de los machos engendra la mayoría de los polluelos (Moller & Birkhead, 1994). Sin embargo, la selección sexual tendría muy poca oportunidad de actuar, si las ganancias de paternidad fuera de la pareja se contrarrestan a las pérdidas de paternidad al interior del nido (Dunn & Cockburn, 1999).

Actualmente, muchos investigadores concuerdan que las hembras juegan un papel activo en la búsqueda y/o participación de las cópulas extra-pareja, tal como ha sido observado en un amplio rango de especies (véase Augustin, 2012). Sin embargo, aunque el origen evolutivo y la mantención de esta conducta hayan sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas, aún no existe consenso en relación a la significancia adaptativa del EPP para las hembras (Schmoll, 2011). Ante esto, existen una serie de teorías que intentan explicar la ocurrencia de EPP, separando los beneficios para la madre en directos e indirectos. Así por ejemplo, en la hipótesis de los beneficios directos, se plantea que las

hembras ofrecerían la paternidad a un macho fuera de la pareja para conseguir un recurso puntual (véase Griffith *et al.*, 2002). Estos beneficios (no-genéticos) generarían directamente, un aumento en la adecuación biológica de las hembras, vía el aumento de la sobrevivencia de la madre o de su tasa de fecundidad (Kirkpatrick & Ryan, 1991). Existe evidencia empírica de beneficios directos en la adecuación de las madres a través de la obtención de suministro de alimento (Gonzalez-Solis *et al.*, 2001), defensa frente a predadores y/o protección del nido (Reynolds, 1996; Gray, 1997). Sin embargo, uno de los mecanismos más aceptados de beneficio inmediato o directo, sería asegurar el éxito reproductivo frente a la infertilidad de la pareja (Wetton & Parkin, 1991).

Por otro lado, en la línea de hipótesis sobre beneficios indirectos, la existencia a nivel intra-específico de la EPP, estaría dado por el mejoramiento de la calidad genética de la descendencia (Petrie *et al.*, 1998). Es decir, los beneficios serían para las crías, y la hembra se beneficiaría indirectamente. Aquí, la mayor adecuación biológica de una madre con crías extra pareja, en comparación con una hembra que no presenta EPP, estaría dada por los beneficios en la adecuación biológica de sus crías. La hipótesis de mejoramiento en calidad genética cuenta con un amplio apoyo empírico (véase Charmantier *et al.*, 2004). En esta hipótesis de beneficio genético se postulan tres predicciones principales (Neff & Pitcher, 2005): (i) los machos elegidos por hembras en la EPP deben ser distintos a las parejas socialmente estables, en al menos un rasgo que refleje calidad genética para la hembra, (ii) las crías extra-pareja (EPO) deberían tener mayor adecuación que sus medio-hermanos nacidos a partir de cópulas dentro de la pareja socialmente estable, y (iii) la presencia de EPP debería estar positivamente correlacionada con el grado de parentesco dentro de la pareja, particularmente si éste es alto.

A nivel más específico, las hipótesis de beneficios indirectos se han clasificado en tres: (i) los genes buenos; (ii) compatibilidad genética; y (iii) diversidad genética (véase Griffith *et al.*, 2002; Akçay & Roughgarden, 2007; Kempenaers, 2007). En el caso de (i) la hipótesis de los genes buenos, la descendencia obtendría rasgos favorables para su adecuación biológica. La hipótesis predice que las hembras eligen tener cópulas extra-pareja con machos que presentan características de mejor calidad (Weatherhead &

Yezerinac, 1998). Los machos muestran su calidad genética a través de sus rasgos morfológicos (e.g., coloración, tamaño del plumaje, tamaño corporal) y/o despliegues conductuales, tales como largo y composición del canto, formación de nidos y cuidado parental, entre otros. Incluso la edad se considera un reflejo de buena calidad genética, ya que demuestra directamente la viabilidad del individuo (Augustin, 2012). La edad se ha correlacionado positivamente con la presencia de crías extra pareja en diversas especies (Trivers, 1972; Manning, 1985; Kokko & Lindström, 1996). Por otra parte, como no todas las hembras tienen acceso a los machos genéticamente superiores, solamente algunas hembras se beneficiarían de las cópulas extra pareja (Cohas *et al.*, 2006).

En el caso (ii) de la hipótesis de la compatibilidad genética, cada hembra tiene sus propias preferencias y el beneficio genético para la descendencia estaría dado por la interacción entre las contribuciones genómicas maternas y paternas (Zeh & Zeh, 1997). Si bien no existe mucha evidencia empírica en aves, en roedores se ha demostrado experimentalmente que, tanto machos como hembras, tienen distintas preferencias al momento de escoger pareja para reproducirse (Ryan & Altmann, 2001), y que emparejarse (y copular) con la pareja de preferencia, genera efectos positivos en la adecuación biológica de la descendencia, en comparación con la descendencia de parejas en las cuales el macho o la hembra no eran de la preferencia del otro (Gowaty *et al.*, 2003; Drickamer *et al.*, 2003).

Finalmente, en (iii) la hipótesis de la diversidad genética se postula que individuos con mayor grado de heterocigosidad tienen menor probabilidad de presentar alelos deletorios y mayor probabilidad de presentar rasgos ventajosos producto de la variabilidad genética (e.g., en genes del complejo mayor de histocompatibilidad MHC, véase Landry *et al.*, 2001), por lo que se considera el porcentaje de heterocigosidad como un buen indicador de adecuación biológica. En aves, la heterocigosidad individual ha sido asociada positivamente con la sobrevivencia de las EPO, el éxito reproductivo y con rasgos de selección sexual (Foerster *et al.*, 2003; Hansson *et al.*, 2001; Seddon *et al.*, 2004; Marshall *et al.*, 2003).

Por lo tanto, la ocurrencia de EPP estaría asociada con la similitud genética de la

hembra y su pareja social. Esto se ha observado en el “maluro espléndido” *Malurus splendens* (Tarvin *et al.*, 2005), en el “frailecillo blanco” *Charadrius alexandrinus*, el “correlimos de Alaska”, *Calidris mauri* y el “andarríos chico” *Actitis hypoleucos* (Blomqvist *et al.*, 2002). Sin embargo, Schmoll *et al.* (2005) propusieron que esta hipótesis no explicaría la selección sexual en muchas especies, y que, por el contrario, se restringe a un grupo acotado de taxa (e.g., Charadriiformes).

Si bien los rasgos usados por las hembras para categorizar la calidad genética de los machos son diversos y en muchos casos desconocidos, es posible encontrar asociaciones con rasgos morfológicos que parecieran ser importantes para la hembra en la elección de la pareja social (Slagsvold *et al.*, 2001). Rasgos sexuales como el plumaje, tamaño corporal, y señales de cortejo, han evolucionado a través de la selección sexual. En muchas aves socialmente monógamas se encuentran estos rasgos y la presencia de EPP explicaría el fenómeno, ya que si las cópulas fuera de la pareja son frecuentes, existiría un mayor diferencial de éxito reproductivo entre los machos, generando una selección sexual más intensa que con la monogamia reproductiva (Macedo *et al.*, 2008).

Además, algunas especies monomórficas parecen haber experimentado eventos de selección sexual recíproca en ambos sexos, debido a que presentan rasgos conspicuos que no cumplirían otras funciones si no de atracción sexual, a pesar de ser ambos sexos fenotípicamente similares. En el caso del cisne *Cygnus atratus*, la presencia de plumas rizadas usadas en despliegues sociales de dominancia, se correlaciona intensa y positivamente con el éxito reproductivo y, por tanto, correspondería a una señal confiable de calidad genética para la elección de pareja para ambos sexos (Kraijeveld *et al.*, 2004).

Lehtonen *et al.* (2009) evaluaron la presencia de EPP en relación con la coloración del plumaje y la edad del macho en una población de *Ficedula hypoleuca*. El 100% de padres (machos) extra-pareja tenía al menos 2 años y la probabilidad de criar hijos genéticamente no propios se relacionaba positivamente con la decoloración UV del parche blanco en el ala. Además, encontraron que 11 de los 12 padres extra-pareja identificados, residían a menos de 200 metros del padre social “engañado”. Por lo mismo, eventualmente

los efectos de los rasgos morfológicos (e.g., coloración del plumaje) de los machos no se relacionarían con EPP del total de los machos de la población, sino en relación con los machos vecinos.

En conclusión, existen múltiples factores que podrían influenciar cuándo y con qué macho las hembras tendrían cópulas extra-pareja. Además, los rasgos de los machos que influyen a la hembra a buscar una pareja externa, no necesariamente son los mismos rasgos usados por la hembra para elegir al macho extra-pareja.

Para identificar la presencia de paternidad extra-pareja al interior de una población, o especie, es necesario comparar las paternidades genéticas con la paternidad social observada en terreno. Los recientes avances en técnicas genéticas han ayudado a evaluar la biología de poblaciones silvestres terrestres y marinas de muy diversos taxa. La aparición de la huella genética del ADN en la década de los 80' llevó a un incremento en los análisis de paternidad (Dawson *et al.*, 1997), a través de la identificación de marcadores genéticos.

Los marcadores genéticos que poseen alta variación intra-específica, son herramientas muy útiles para conocer la biología reproductiva y social de una determinada población. Queller *et al.* (1993) describieron al marcador ideal como uno que presente loci distinguibles, con alelos co-dominantes permitiendo diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, que no se identifique ambiguamente y que la información, logísticamente, sea fácil de obtener. Los marcadores moleculares de ADN denominados microsatélites, cumplirían con estos criterios (Dawson *et al.*, 1997), ya que son regiones del genoma en las que una secuencia corta, 2-6 pares de bases, se repite un cierto número de veces, donde cada *locus* microsatélite tiene alelos con distinto número de repeticiones, lo cual se evidencia en bandas de distinto tamaño mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Espinoza *et al.*, 2007). Además, los microsatélites presentan altas tasas de mutación, lo que permite obtener un alto número de alelos en las poblaciones, base para diferenciar individuos estrechamente emparentados (Zhang, 2004).

Existen diversos métodos para la determinación de paternidad. Jones & Ardren

(2003) clasificaron 4 técnicas: (i) exclusión, (ii) atribución categórica o asignación parental, (iii) atribución parcial y (iv) reconstrucción parental. Donde (i) el método de la exclusión se basa en las leyes de herencia mendeliana y, compara el genotipo del padre candidato con un hijo en particular, usando las incompatibilidades genéticas para rechazar una particular hipótesis de asignación de paternidad (Jones *et al.*, 2010). (ii) La atribución categórica o también llamada asignación parental, puede ser usada para elegir entre los padres candidatos no-excluidos. Aquí, toda la descendencia es asignada al padre con la mayor probabilidad de ser el padre genético (Jones *et al.*, 2010). (iii) En el caso de la asignación o atribución fraccionada, funciona de manera similar al anterior, pero aquí se asigna un determinado número de crías parcialmente a cada candidato no-excluido basándose en las probabilidades relativas (Devlin *et al.*, 1988). Por último, (iv) la reconstrucción parental utiliza los genotipos de los hermanos (y medios-hermanos) para reconstruir el genotipo de los padres, compartiendo al menos un padre (Jones & Avise, 1997).

Aphrastura spinicauda

El rayadito *Aphrastura spinicauda*, es un furnárido de pequeño tamaño (11g en promedio), insectívoro abundante de bosques templados meridionales de Chile y Argentina (Moreno *et al.*, 2005; Cornelius, 2008). Se distribuye desde Chile central (31°S) hasta Tierra del fuego y Cabo de hornos (56°S), tanto en la cordillera de los Andes como en la costa. Durante la época reproductiva es territorial (Ippi *et al.*, 2011), y en la época no-reproductiva viajan en bandadas mixtas (Ippi & Trejo, 2003).

A. spinicauda es socialmente monógamo y ambos padres comparten el cuidado de las crías. Presentan diferencias en la biología reproductiva que los distinguen de aves que anidan en cavidades naturales de bosques templados en el hemisferio norte. Estas diferencias se dan en cuanto a que presenta asincronía reproductiva, postura de huevos en días alternados, nidadas pequeñas, huevos de gran tamaño y largos periodos de tiempo de dependencia parental (Moreno *et al.*, 2005; véase además Quilodrán *et al.*, 2012). Los rayaditos construyen sus nidos utilizando rizomas, hierbas y pelo de mamíferos, durante al menos una semana. Muestran gran asincronía a nivel poblacional (septiembre a diciembre) en el inicio de la puesta, la cual es de 3 a 6 huevos, puestos en días alternos. Los polluelos permanecen en el nido por 3 semanas, momento en el cual alcanzan el tamaño adulto en relación a la longitud del tarso, pero su plumaje es menos desarrollado y pesan más que los adultos (Moreno *et al.*, 2007).

Dentro de lo que se conoce de la biología reproductiva del rayadito, si bien no presenta dimorfismo sexual evidente, posee rasgos que sugieren selección sexual en ambos sexos. Moreno *et al.* (2007) encontraron que los machos eran entre un 2% a un 10% más grandes en masa, largo del tarso y largo del ala. Machos más pesados se apareaban con hembras más pesadas, y machos de color más suave, se apareaban con hembras de color más suave. Además, el rayadito posee una cola larga y espinosa, que no tiene función aparente para forrajeo o soporte, y podría ser utilizada como un rasgo indicador de calidad genética, sexualmente atractivo en ambos sexos (Moreno *et al.*, 2007). Este fenómeno se ha descrito en varios grupos de aves, incluyendo furnáridos, donde existe un costo

aerodinámico de colas más largas y su presencia se explicaría a través de selección como indicador de calidad (Johnstone, 1995).

Los rasgos conductuales de cuidado parental compartido y los rasgos morfológicos que demuestran selección de pareja no azarosa, en conjunto con rasgos morfológicos sin una función aparente (e.g., cola larga), sugieren que el sistema de apareamiento sería monogamia social, pero no reproductiva. Se espera, por tanto, encontrar presencia de paternidad extra-pareja, donde las nidadas estén compuestas por crías de más de un macho. También es esperable que haya diferencias en el éxito reproductivo de los machos muestreados, generándose una diferencia entre machos ganadores y machos perdedores de paternidad. Por último, es esperable encontrar mayores niveles de infidelidad en nidadas donde la pareja social presente altos valores de parentesco.

El presente trabajo es el primer estudio orientado a identificar la presencia (o ausencia) de crías extra-pareja en una población de rayadito ubicada en la isla Navarino, Región de Magallanes. Aún más, este es el primer trabajo de investigación dedicado a analizar el sistema de apareamiento de una especie de la familia Furnariidae, una familia que contiene más de 210 especies en el Neotrópico (Remsen, 2003).

HIPÓTESIS

El rayadito es una especie socialmente monógama con rasgos fenotípicos indicadores de selección sexual y diferencias en el éxito reproductivo de los distintos individuos, por lo cual existiría paternidad extra-pareja en las nidadas, relacionada con el grado de parentesco dentro de la pareja social.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la ocurrencia de crías extra-pareja en una población de rayadito (*Aphrastura spinicauda*) durante una estación reproductiva.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la presencia de paternidad extra-pareja en *A. spinicauda*.
 - a. Determinar el sexo de todos los individuos.
 - b. Genotipificar a los individuos a través del uso de microsatélites para la especie.
 - c. Identificar la paternidad en las crías de cada nidada y comparar los resultados de paternidad genética con la paternidad social.
2. Evaluar las diferencias en el éxito reproductivo de los machos en relación con la presencia de paternidad extra-pareja.
3. Realizar análisis de parentesco entre las parejas sociales e identificar su relación con la presencia de paternidad extra-pareja.
4. Identificar relaciones entre rasgos morfológicos de los padres (machos y hembras) y la presencia de paternidad extra-pareja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Entre los meses de octubre y diciembre 2010 se evaluó una población de *Aphrastura spinicauda* ubicada en la Isla Navarino (54°55'S y 76°40'O), Región de Magallanes, Chile (Figura 1).

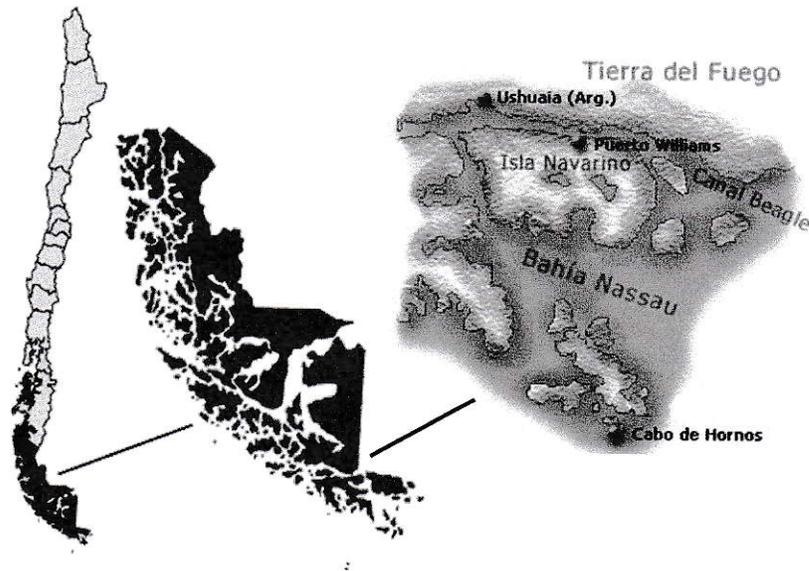


Figura 1. Ubicación geográfica de la isla Navarino, Chile.

Toma de muestras

Para la revisión de la biología reproductiva del *A. spinicauda* se usaron los protocolos utilizados previamente por Moreno *et al.* (2005). Se dispusieron 180 cajas-nido en distintos parches del bosque. Se revisaron las cajas nido a contar de mediados de septiembre para registrar los días de postura y eclosión. Los adultos se capturaron mediante trampas nido, aproximadamente al día 13 desde la eclosión (14 días de edad de los polluelos) (Moreno *et al.*, 2007). Debido al corto período de tiempo durante el cual los adultos son separados de sus crías (30 min), solo efectos a corto plazo pueden observarse en

los pichones (reducciones de cuidado parental y peso de los pichones), siendo improbables efectos a largo plazo en la sobrevivencia de los pichones (van Dongen *et al.*, 2009). Se marcaron todos los individuos capturados, con un anillo de aluminio numerado en la pata derecha. Se registró el peso (Pesola Baar, Suiza, rango 0,1 gr.), largo del tarso, del pico, del ala y de ambas rectrices de la cola (calliper digital con rango 0,1 mm). Los polluelos también fueron capturados desde la caja nido el día 13, y se les puso un anillo de aluminio enumerado en la pata derecha, se registró su peso, largo de tarso, pico y ala. También se utilizaron redes ubicadas cerca de las cajas nido, para capturar la mayor cantidad de individuos de la población. De cada individuo de *A. spinicauda* capturado, tanto juveniles como adultos, se les extrajo una muestra de sangre (30µl) por punción de la vena braquial con un capilar de microhematocrito (véase Moreno *et al.*, 2007). Luego de las mediciones y extracción de sangre, todos los individuos fueron liberados en el mismo lugar de captura. De la sangre extraída, se depositó el total del volumen en tarjetas FTA®, diseñadas para almacenar y conservar el ADN para los análisis moleculares posteriores.

Análisis genético

1. Sexado

a) Extracción de ADN: Se realizó la extracción del ADN de la sangre colectada, usando digestión con proteinasa K y precipitación con etanol a través del kit de extracción “UltraClean DNA BloodSpin Kit” (MoBioLaboratories, Carlsbad, California, E.E.U.U.).

b) PCR: Mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR), se identificó el sexo de los individuos utilizando los productos sexo-dependientes CHD-W (exclusivo hembra) y CHD-Z (exclusivo macho) los cuales son posible de visualizar en gel de agarosa al 3%. Para obtener estas bandas sexo-dependientes se realizaron PCR en 20 µl de volumen final usando 0,5 U TaqPolymesare (Biotools, Madrid, España), 200 µl dNTP's, 1mM Taq Buffer con MgCl₂ y 10 pmol de partidores 2550F y 2718R los cuales amplifican la secuencia CHD1 (proteína ligadora de ADN cromo-helicasa) presente en los cromosomas W y Z de aves (Moreno *et al.*, 2007). Los productos del PCR se separaron mediante

electroforesis a 90V en gel de agarosa en Buffer TAE (trishidroximetilaminometano-acetato). Los productos amplificados corresponden a CHD1W de 450 pares de bases y CHD1Z de 600 pares de bases. Los individuos fueron sexados como hembras (heterogaméticas, WZ) cuando ambos fragmentos eran amplificados y como machos (homogaméticos, ZZ) cuando sólo se visualizaba una banda de 600 pares de bases (véase Moreno *et al.*, 2007).

2. Microsatélites

Se genotificaron 10 loci de Rayadito. El clonamiento y aislamiento de los microsatélites se realizó en Craig Newton ATG genetics (Canadá). Cada reacción de PCR de un volumen total de 12 ul contuvo 1,2 ul de PCR Buffer 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 uM de cada partidor, 200 uM de cada DNTp, 0,05 unidades de TaqPlatinum (invitrogen) y 10 ng de DNA genómico diluido. Las condiciones del termociclador fueron de 3m a 95°C, 35 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 90s y para finalizar 72°C por 5m. Para visualizar la amplificación del fragmento deseado se analizaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio como agente intercalante.

Para realizar la genotipificación de los individuos en un secuenciador automático de DNA (ABI 3730), el partidor reverse fue marcado con un fluoróforo excitable. Se utilizó el servicio GeneScan ofrecido por la empresa norteamericana UIUC Core Sequencing Facility, E.E.U.U. (<https://unicorn.biotech.illinois.edu/>). Para el análisis de los resultados entregados se utilizó el programa de análisis de fragmentos de DNA GeneMarker (SoftGenetics Inc.).

Se utilizó el programa Microchecker v.2.2.3 para evaluar posibles tartamudeo (stuttering) en el tamaño de bandas, amplificación predominante de alelos pequeños (dropout), ausencia de bandas en el gel (alelos nulos) y eliminar los posibles errores de excesos en la identificación de homocigotos (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Luego, el número de alelos, la heterocigocidad esperada y observada para cada locus se estimó

mediante la utilización de GenePop V.4 (Raymond & Rousset, 1995) y comparada con los datos obtenidos en Cervus 3.0.3.

3. Paternidad

El análisis de paternidad se realizó con el programa Cervus 3.0.3 (Field Genetics Ltd. UK), que mediante el uso de loci codominantes, permite la comparación genética de varios posibles padres con varios polluelos e incluye los genotipos de las madres para ofrecer mejores probabilidades de asignación a cada padre. Se estima un rango de probabilidades (LOD) para cada candidato, con un predeterminado nivel de confianza, asignado la paternidad de cada polluelo al candidato más probable (Marshall *et al.*, 1998). Una de las ventajas de este programa sobre otros (e.g. Kinship) es que utiliza las diferencias entre los valores de LOD del macho más probable y el segundo macho más probable como su línea de corte (su propia prueba estadística). Además, es capaz de asignar rangos de confianza estadística a la asignación de pares padre-hijo entregados, reportar valores de confianza esperada y calcular las probabilidades de exclusión (Lehtonen *et al.* 2009).

Para confirmar los valores obtenidos y darle robustez al análisis de paternidad, se utilizó el programa Gerud 2.0 de reconstrucción de genotipos parentales a partir de los datos multi-locus de la descendencia (Jones, 2001).

4. Parentesco

Se realizó con el programa Kingroup v.2, que permite reconstruir el árbol genealógico y determinar parentesco mediante la estimación de la probabilidad de obtener un alelo por herencia (Konovalov *et al.*, 2004). Esta etapa se desarrolló en el Laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Ciencias Ecológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con la supervisión del Dr. Elie Poulin.

Análisis estadísticos

Para evaluar las diferencias en el éxito reproductivo de los machos se realizó una prueba de Chi cuadrado (χ^2), mientras que para estudiar las relaciones entre parentesco, rasgos morfológicos y la presencia de paternidad extra-pareja, se realizaron análisis de regresión lineal múltiple utilizando el programa computacional IBM SSPS Statistics v.18.

RESULTADOS

Un total de 142 muestras de sangre fueron recolectadas para el estudio, correspondientes a adultos ($n = 42$) y polluelos ($n=100$) provenientes de 21 familias (nidos). El sexado se realizó a través de técnicas moleculares basadas en detección de ADN (veáse en Griffith, 2002). Como se observa en la Figura 2, los productos amplificados del gen CHD en el cromosoma W es de 450 pares de bases (pb) de longitud aprox. (exclusivo hembra) y de 600 pares de bases en el cromosoma Z (exclusivo macho). En el gel de agarosa al 3% fue posible visualizarlos como una banda única en el macho (ZZ), mientras que en las hembras se obtienen 2 bandas de distinto tamaño, correspondientes a los productos de las amplificaciones de los genes CHD-Z y CHD-W. En la Tabla 1 (Anexo 1) se observan los individuos muestreados en cada nido, clasificando madres, padres sociales y los polluelos sexados por nido. Se encontraron $4,76 \pm 0,21$ crías por nido (moda = 5), con una proporción de $2,5 \pm 0,20$ de hembras por nido (media \pm EE, $n=100$).

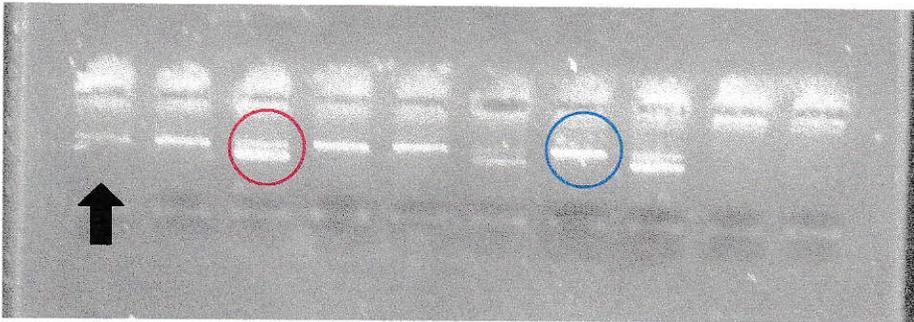


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 3% para la identificación de sexo en los individuos muestreados. Los machos se identifican por la presencia de una sola banda proveniente del producto de amplificación de los cromosomas ZZ (como se observa en el círculo azul), mientras que las hembras muestran 2 bandas correspondientes a los cromosomas W y Z (círculo rojo). La primera columna indicada con la flecha negra, corresponde al marcador de peso control. Cada una de las siguientes columnas corresponde a un individuo distinto.

Se genotipificaron 9 nuevos loci microsatellite de Rayadito (Tabla 2) los cuales presentaron buen bandeo. Otros loci no amplificaron por lo que fueron dejados fuera del estudio poblacional.

Tabla 2. Lista de los microsatélites identificados para *Aphrastura spinicauda*. Se detalla cada motivo repetido entre paréntesis y su número de repeticiones, el tamaño del alelo (en pares de bases) y el color utilizado para su visualización.

<u>Nombre del Locus</u>	<u>Motivo Repetido</u>	<u>Tamaño del alelo (pb)</u>	<u>Marca de Color</u>
1	(TG)18	234	Negro
*1	(CA)9.(CA)7	186	Rojo
3	(GT)13	331	Azul
*5	(TG)16	192	Negro
7	(TG)13	228	Azul
*8	(CA)9	228	Rojo
*10	(TG)27	179	Verde
*14	(GATA)13	184	Azul
18	(TG)8	221	Verde

Para visualizar la amplificación de los fragmentos, se analizaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio. En la Figura 3 se visualizan las bandas consistentes con la amplificación del locus *10. Se observó variabilidad en los tamaños de las bandas, lo que sugiere altos valores de polimorfismo (Ellegren, 1992). Este patrón se repitió en los 9 locus utilizados.

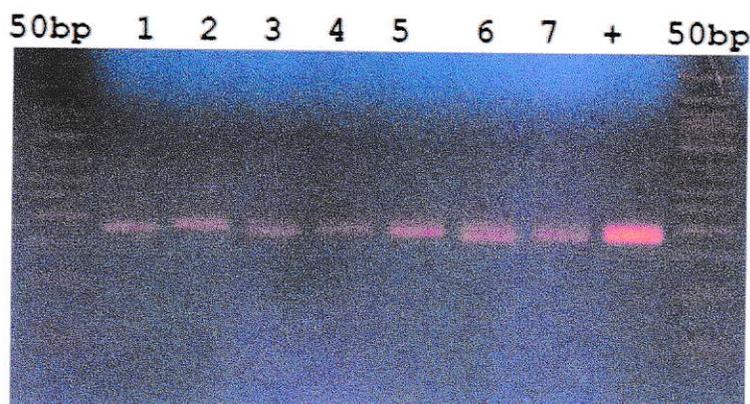


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la visualización de las bandas consistentes con la amplificación del locus *10 (de 179 pb). La primera y última columna corresponde a los marcadores de peso molecular. Si bien los 7 individuos muestreados (enumerados del 1 al 7) presentan bandas cercanas a lo esperado, se observa variabilidad en las bandas.

Para el análisis de paternidad, se evaluaron 137 individuos (97 polluelos, 21 madres y 19 padres). Una vez obtenida la genotipificación de los individuos, se revisó la calidad informativa de cada loci. Se eliminó el locus 1 por determinarse alelo nulo, como lo recomiendan Jones & Ardren, (2003). Tampoco fueron utilizados los alelos 7 y *10 por presentar alto número de individuos sin caracterizar. Por lo tanto se utilizó 6 de los 9 microsatélites. La descripción de la metodología utilizada y los software aplicados se detalla en el Anexo 2. Una vez obtenidos los pares de padres más probables para cada polluelo, se compararon los padres sociales con los padres genéticos más probables. Se obtuvo una clara concordancia entre la paternidad observada en terreno y la asignación de paternidad genética. Se consideró sólo individuos que tuvieran datos de genotipificación para al menos 3 loci. Del total de individuos, 2 padres y 1 polluelo fueron excluidos por no tener la genotipificación mínima.

De los 97 polluelos, 55% fueron atribuidos a sus respectivos padres sociales (53), 44% (43) a paternidad extra-pareja y un 1% no fue determinado (1 polluelo no genotipificado). Las crías extra-pareja se distribuyeron en 16 de 19 nidadas, observando una frecuencia de presentación de EPP del 84,3%. En la Tabla 7 (Anexo 2) se muestran las comparaciones de paternidad observada y genética más probable. Los patrones de EPP a

nivel poblacional se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los patrones de EPP observado a nivel poblacional.

<u>Año</u>	<u>Nidos</u>	<u>Nidos con EPP</u>	<u>% Nidos con EPP</u>	<u>Polluelos</u>	<u>EPO (crías extra-pareja)</u>	<u>% EPO</u>
2010	19	16	84,3	96	43	44

Dentro de las nidadas fue posible encontrar distribuciones del 0 al 100% de paternidad extra-pareja. La distribución de presentación de EPP para cada nido, se visualiza en la Figura 3.

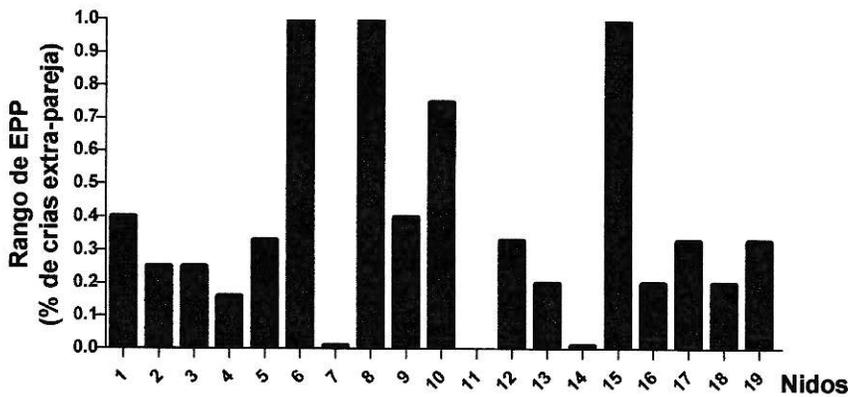


Figura 3. Rango de EPP, expresado como la razón de crías extra-pareja en relación al total de crías del nido, para cada nidada estudiada, según los datos obtenidos en Cervus 3.0.3 (n=19). Se observan 3 nidos sin EPP (nidos 7, 11 y 14), y 3 nidos donde todos los polluelos son de EPP (nidos 6, 8, y 15).

Se realizó además la reconstrucción de los genotipos parentales a partir de la progenie con el programa Gerud 2.0. Al comparar los resultados obtenidos por ambos programas computacionales, se logra confirmar la presencia de paternidad extra-pareja. Los resultados además son bastante similares en cuando a la atribución de paternidad genética al padre social y a la identificación del macho extra-pareja en cada nidada. El detalle de lo obtenido con este programa, así como las diferencias comparativas al programa Cervus 3.0.3 se encuentran en extenso en el Anexo 2.

Dentro de las 21 familias estudiadas, hubo 2 (Nido 27 y Nido 49), donde no se contó con la genotipificación del padre social. El programa Cervus 3.0.3 le atribuyó la paternidad a los candidatos conocidos más probables y Gerud 2.0, que detectó dos genotipos distintos al de los machos muestreados, sugiere que los padres de estos polluelos no estarían dentro de los machos genotipificados. Por lo tanto, no se consideraron esos datos para la determinación de frecuencias de EPP por nido. Por tanto, los análisis se realizaron considerando un tamaño muestral de 19 familias (n=19).

Basándose en las comparaciones de genotipos maternos con sus crías, no se observó evidencia de parasitismo intra-específico. Esto fue posible corroborarlo mediante ambos programas empleados (Cervus 3.03 y Gerud 2.0).

En una caja nido (nido n° 129), al padre social no se le pudo otorgar la paternidad de ningún polluelo del propio nido ni del total de polluelos muestreados (n=96) considerándolo, por lo tanto, perdedor de paternidad. En contraparte, tres nidos presentaron 100% de concordancia entre la paternidad genética y la social, asignándole la paternidad total de la nidada al padre social. Todos los machos de estas familias, presentaron asignaciones de paternidad en otros nidos (EPP), por lo que serían machos ganadores de paternidad (exitosos) dentro de este muestreo. Del total de machos evaluados (19), a 18 se le atribuyeron crías genéticamente propias. De éstos, ocho machos extra-pareja tendrían al menos crías extra-pareja en más de 1 nido, y 6 habrían fertilizado exitosamente más de 1 huevo por nido ajeno.

Para visualizar la pérdida o ganancia de paternidad (machos perdedores versus ganadores), se comparó para cada macho, su capacidad de generar descendencia dentro de la pareja y su capacidad para actuar como macho extra-pareja y tener crías en otros nidos. La frecuencia (%) entre machos perdedores y ganadores en esta población se grafica en la Figura 4. Al comparar entre machos, es posible observar que aquel macho que fertilizó el 100% de los huevos de su nido, también fue capaz de generar descendencia en nidos ajenos.

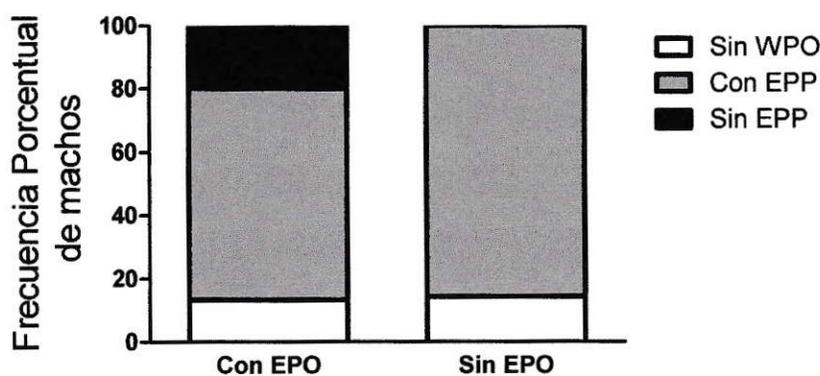


Figura 4. Comparación de machos en relación a la capacidad de obtener crías fuera de la pareja (EPO), a la capacidad de tener crías dentro de su nido, con o sin EPP. Los valores corresponden a la frecuencia porcentual en relación al total de machos muestreados. El recuadro blanco corresponde a los machos que no tuvieron crías dentro del nido (WPO = 100% EPP), el gris, a los que tuvieron paternidad extra-pareja al interior de sus nidos (con al menos 1 cría EPP dentro del nido) y, el negro a los que no criaron hijos de otros (0% EPP).

Las crías producidas aparente fue de entre 3 y 6 polluelos, con un promedio de 4,63; mientras que el número de crías producidas real promedió 4,42 y varió entre 0 y 8. Si bien dos tercios de los machos ganaron paternidad fuera del nido (macho extra-pareja = 13/19), tres de cada cuatro de estos machos, perdieron paternidad al interior de sus nidos, ya que criaron polluelos que no eran propios. Un 15% (3/19) corresponde a machos capaces de ganar paternidad fuera del nido y dentro de su nido (0% EPP). Por otro lado, de los machos que no ganaron paternidad fuera del nido, el 100% perdió paternidad al interior de su

nidada. Los machos exitosos son aquellos que engendraron crías extra-pareja y algunos (10) o todos (3) los polluelos de su nido.

Para comparar el éxito reproductivo de los machos según la presencia de crías de otros machos al interior del nido y, de la capacidad del macho social para tener crías en otros nidos (Tabla 10), se realizó un análisis de Chi-cuadrado, obteniendo diferencias significativas entre los distintos grupos ($n = 19$; $\chi^2 = 9,74$; $p = 0,0018$).

Tabla 10. Éxito reproductivo de los machos según la presencia de crías de otros machos al interior del nido y, de la capacidad del macho social para tener crías en otros nidos. Prueba Chi-cuadrado ($n = 19$; $\chi^2 = 9,74$; $p = 0,0018$).

		NIDOS		
		Sin EPP	Con EPP	Total
MACHOS	Con EPO	3	10	13
	Sin EPO	6	0	6
	Total	9	10	19

Por otra parte, se realizó el análisis de parentesco entre las parejas sociales mediante la estimación de la probabilidad de obtener un alelo por herencia (y no por azar). Se determinó el grado de parentesco (r) para cada pareja (Tabla 11 en Anexo 3). En los 3 nidos donde no hubo EPP, el parentesco fue menor a 0,5. En los nidos con paternidad extra-pareja, 10 de 16 (62,5%) el r del macho social fue mayor al del macho extra-pareja y sólo en 1 caso, el macho social tenía mayores niveles de parentesco que un macho EPP, pero menor que el segundo macho EPP. Sin embargo, esto sólo se puede observar como una posible tendencia, ya que al realizar las correlaciones, no se encontraron diferencias significativas, ni una asociación que permitiera explicar la presencia de EPP asociada al parentesco dentro de la pareja social, a través del análisis de regresión lineal múltiple (Correlación de Pearson $r^2 = 0,124$ con significancia $p = 0,612$).

Finalmente, para identificar si existe algún rasgo morfológico que se relacione con la presencia de paternidad extra-pareja, se realizaron análisis de regresión lineal múltiple. Las variables incluidas fueron: peso, largo del tarso, del pico, del ala, largo de la cola izquierda y derecha, largo de rectrices derecha e izquierda y el delta (Δ) de simetría de las rectrices (más larga/más corta). Estos datos se incluyeron para machos y hembras. Además se incluyó la relación de los valores morfológicos para cada pareja social (e.g., peso hembra/peso macho) (Tabla 12, Anexo 4). Las variables asociadas fueron el número de crías extra-pareja (EPP) y el total de hijos genéticos de cada macho. La paternidad extra-pareja de la nidada se asoció positivamente con la asimetría de las rectrices de la cola en las hembras, explicando más del 70% de la varianza de los datos ($n=14$; Coeficiente de variación estandarizado $\beta = 73,3$; $ES=18,58$; $p = 0,016$). De la misma forma, machos con alas más cortas y rectrices de la cola más simétricas, tendrían un mayor número de hijos genéticos, ya que un 66% de la varianza en el número de hijos genéticos, sería explicada por estas dos variables, siendo la simetría en el largo de las rectrices de la cola, el rasgo fenotípico más importante (Tabla 13) ($n= 15$; Coeficiente de variación estandarizado $\beta = -77$; $ES= 4,774$; $p = 0,001$ para simetría de rectriz y $\beta = -36$; $ES= 2,243$; $p= 0,046$ para el largo del ala).

Tabla 13. Valores de la regresión lineal multivariable para 2 variables dependientes, la paternidad extra pareja y el número de hijos genéticos de los machos.

Variable dependiente: Paternidad extra-pareja

	<u>R²</u>	<u>R² ajustado</u>	<u>Error Estandar</u>	<u>Coeficiente β</u>	<u>Significancia (p)</u>
Simetría rectriz (Δ) hembra	0,537	0,479	1,4908	0,733	0,016

Variable dependiente: N° hijos genéticos:

	<u>R²</u>	<u>R² ajustado</u>	<u>Error Estandar</u>	<u>Coeficiente β</u>	<u>Significancia (p)</u>
Simetría rectriz (Δ) macho	0,583	0,549	1,523	-0,770	0,001
Largo ala macho	0,131	0,113	1,318	-0,362	0,046

DISCUSION

Se determinaron 9 nuevos loci para el rayadito (*A. spinicauda*), con los cuales fue posible caracterizar genéticamente la población a partir de las 142 muestras recolectadas durante la estación reproductiva en la isla de Navarino, de 21 familias diferentes. Si bien el rayadito es un ave socialmente monógama, su sistema de apareamiento a nivel genético es definitivamente más complejo que la monogamia. No se encontró parasitismo intraespecífico, pero sí se encontraron crías extra-pareja, con una frecuencia de presentación de EPP del 84,3%. Incluso, se encontró que en tres nidos, el padre crió sólo a hijos genéticamente ajenos. En estos nidos, las crías fueron engendradas por más de un macho extra-pareja.

A través de los análisis moleculares fue posible sexar a todos los individuos muestreados. Además, mediante el desarrollo de los microsatélites para el rayadito se pudo obtener información sobre la población muestreada, así como validar los 6 microsatélites utilizados para los análisis de paternidad. Con los programas computacionales fue posible identificar la presencia de paternidad extra-pareja en el rayadito y caracterizar su sistema de apareamiento. Luego, al comparar entre los distintos machos y en relación a sus parejas, los rasgos morfológicos y la cantidad de hijos engendrados se pudo describir la biología reproductiva del rayadito con mayor profundidad, encontrando asociaciones y diferencias significativas que permiten apoyar al menos parcialmente, la hipótesis planteada en este trabajo y que, ofrece una amplia y atractiva gama de estudios futuros. De la misma forma, al no haber encontrado diferencias significativas entre parentesco al interior de la pareja social y la ocurrencia de paternidad extra-pareja incluye un desafío para próximos estudios, donde un mayor número de familias estudiadas, podría ser un factor relevante para la determinación de esta variable.

Para la mayoría de los sistemas biológicos, la herramienta genética más poderosa para análisis de parentesco y paternidad serían los microsatélites (Jones & Ardren, 2003), ya que son co-dominantes, de alto polimorfismo, con bajo nivel de mutación y de relativa

complejidad en su medición e interpretación. Los microsatélites utilizados presentaron tamaños aproximados a los esperados, sugiriendo altos valores de polimorfismo (Ellegren, 1992). Este patrón se repitió en los 6 locus utilizados. El número promedio de alelos por locus fue de 9,5, valor considerado adecuado para análisis de parentesco (Kalinowski *et al.*, 2007).

Por otra parte, la asignación de paternidad mediante el sistema de exclusión perfecta, provee una estimación robusta de varianza en el éxito, pero es altamente difícil de realizar. Por tanto, Jones & Ardren (2003) sugirieron que, si es posible muestrear todos los posibles padres, un gran número de crías, y si se conoce al menos 1 padre (en este caso la madre), la técnica de elección sería mediante la estimación del rango de probabilidades (LOD) corroborada con la reconstrucción parental. Al usar Gerud 2.0 para corroborar las asignaciones de paternidad de Cervus 3.0.3, si bien se corrobora la existencia de EPP en *A. spinicauda*, se observaron diferencias en las frecuencias de presentación de EPP entre ambos programas. Esta diferencia podría deberse a las similitudes entre los genotipos de los machos a los que se les asigna la paternidad. Esto ocurre principalmente en familias donde no se tienen todos los datos de genotipificación para los 6 loci estudiados o, cuando las madres son heterocigotas y pueden existir distintas combinaciones de genotipos, aun teniendo un solo padre por familia. La diferencia en los datos obtenidos en ambos programas también pudiera deberse a la metodología de cálculo de cada programa y al decidir trabajar con un 80% de confianza (Cervus 3.0.3) para asignarle la paternidad al 99% de los polluelos. Cervus 3.0.3 incluyó a todos los polluelos que tuvieran mínimo de 4 locus con datos (sólo se excluyó 1 polluelo), asignándole paternidad al padre más probable dentro del total muestreado. Gerud 2.0 por otra parte, no logró asignar la paternidad a 26 polluelos, porque le asigna paternidad a varios machos simultáneamente o bien, porque determina que hay un genotipo no muestreado que sería mejor candidato.

La sobreestimación de EPP ha sido identificada en varios estudios previos. Ibarguchi *et al.* (2004) propusieron que se debería a la alta tasa de mutación de los microsatélites (e.g. $4,5 \times 10^{-2}$ a $5,1 \times 10^{-6}$ por locus, véase en Ibarguchi *et al.* 2004), y a que ésta podría ser guiada por los machos por el alto número de divisiones celulares en la

producción espermática en relación a la producción de óvulos y, en menor grado, por la presencia de más sitios metilados en líneas germinales paternas, donde las mutaciones son más frecuentes. Esto generaría crías legítimas con alelos nuevos, donde las discrepancias ocurrirían con el padre biológico más que con la madre biológica. Cervus es una buena herramienta para manejar este problema, ya que utiliza un rango de error conservador (que incluye errores de transcripción en la escritura, mutaciones y alelos nulos), atribuyendo paternidad aun en presencia de discrepancias entre el candidato y la descendencia (véase Ibaruchi *et al.*, 2004). La simulación de confianza en las asignaciones de paternidad usada por Cervus 3.0.3 es una importante contribución a la robustez y confianza de los resultados. Además el programa corrige por múltiples comparaciones de parejas (padre-hijo) posibles en comparación a otros programas que no lo hacen (e.g. Kindship) (Slate *et al.*, 2000).

Los resultados entregados por Cervus 3.0.3 son sensibles al valor estimado de la proporción de candidatos machos muestreados. El número total de adultos disponibles para la reproducción en la población raramente se conoce de los datos campo, por tanto, es posible que haya algún macho que pudiera haber aportado en la paternidad y que no haya sido muestreado. Sin embargo, fue posible identificar un macho (pareja social) para cada familia muestreada y en terreno sólo fue posible detectar 6 nidos en cavidades naturales, dentro de la zona estudiada. Además se realizaron constantes censos y no se capturaron individuos sin identificación. Debido a que los individuos dentro de la población que anida en esta localidad se encuentran identificados (anillos de colores), fue posible establecer la ausencia de otros individuos en el área de estudio. Esto además sugiere que la proporción de machos muestreados, efectivamente, corresponderían a los padres de los polluelos evaluados. Por tanto, el posible error asociado a muestrear menos candidatos machos es relativamente bajo. Por lo anterior, no se describen machos no-territoriales (flotantes) en el área de estudio.

En relación a las posibles explicaciones del fenómeno EPP en el rayadito, un aspecto a considerar es la frecuencia de ocurrencia, tanto a nivel intra e inter-específico. Se ha planteado previamente, que esto se debería a una combinación entre características ontogenéticas, patrones de cuidado parental y oportunidades de promiscuidad a nivel local

(Griffith *et al.*, 2002). En el rayadito, la ocurrencia de EPP en más del 80% de las nidadas concuerda con una especie de vida acelerada (Moreno *et al.*, 2005). Sin embargo, es necesario profundizar sobre la oportunidad de promiscuidad en el rayadito.

Por otra parte, estudios sobre la ocurrencia de EPP se han enfocado en determinar la potencial importancia de la paternidad extra-pareja en la variación del éxito reproductivo (Yezerinac *et al.*, 1995). Los machos con paternidad extra-pareja con mayor cantidad de crías (ganadores de paternidad), aunque hayan tenido EPP al interior de sus nidos, engendraron más hijos de los posibles sólo al interior del nido (4 padres con > 6 hijos genéticos en total). Esta diferencia en las ganancias de paternidad entre los machos, implicaría un aumento del éxito reproductivo de algunos, a expensas de otros. En este estudio, la presencia de EPP pareciera generar diferencias entre el éxito reproductivo de los distintos machos, aumentando por tanto, la oportunidad de selección sexual en una especie socialmente monógama.

Los machos que obtuvieron una ganancia neta de paternidad gracias a cópulas extra-pareja, tenían las mismas probabilidades de criar hijos ajenos que cualquier macho de la población. Este patrón no es el esperado si las hembras tuvieran el control total sobre las fertilizaciones extra-pareja y escogieran a machos extra-pareja por sus “buenos genes” (Birkhead & Moller, 1993). Sin embargo, podría ser consistente con que las hembras busquen EPP con machos de mejor calidad y/o con asimetrías en la habilidad de competencia de los machos (Yezerinac *et al.*, 1995).

La selección sexual trabaja a través de la varianza en el éxito reproductivo (Arnold, 1994). Sin embargo, varias especies socialmente monógamas con bajos valores de variabilidad en el éxito reproductivo, muestran fuertes signos de selección sexual (Andersson & Iwasa, 1996). Este patrón genera una importante paradoja evolutiva: si los machos sólo obtienen una pareja en el sistema monógamo, ¿cuáles son las causas de varianza en el éxito reproductivo que pudieran generar selección sexual? (Webster *et al.*, 2007). Darwin (1871) reconoció esta paradoja y sugirió dos posibles mecanismos de

selección sexual en sistemas monógamos. El primero, a través de la desviación en la proporción de sexos, por tanto sólo algunos machos conseguirían pareja y otros no. La otra opción, es que algunos machos atraerían hembras de “mejor calidad” o capaces de generar más crías. Recientemente, los estudios genéticos en poblaciones silvestres sugieren una tercera explicación para esta paradoja: la paternidad extra-pareja, generada a partir de cópulas entre machos y hembras que no son pareja social (Webster *et al.*, 2007). En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que la paternidad extra-pareja es una estrategia reproductiva que actúa como una fuerza selectiva que definiría el sistema de apareamiento del rayadito.

Desde la perspectiva de la hembra, dilucidar la función evolutiva de EPP ha sido un problema (Griffith, 2007). Arnqvist & Kirkpatrick (2005) concluyeron que la selección indirecta en hembras con cópulas extra-pareja era biológicamente insignificante y que las EPP son un resultado dinámico de coevolución sexual antagonista con machos bajo una gran presión de selección, para obtener rasgos adaptativos que les permitan obtener crías extra pareja. Por tanto, la explicación más probable sería que la selección actúa sobre los machos para que busquen fertilizaciones extra-pareja (Dolan *et al.*, 2007). Sin embargo, en un estudio realizado con 2 especies de *Ficedula* que se reproducen en simpatria, se observó que las hembras se emparejaban con sus hetero-específicos, pero que escogían machos extra-pareja co-específicos, reduciendo el número de descendientes híbridos infértiles. Estos resultados soportan la hipótesis de los beneficios de EPP para las hembras, a través de asegurar la fertilidad y de los beneficios indirectos por la calidad genética de la descendencia (véase revisión de Griffith & Immler, 2009). Aún es desconocido si son los machos, las hembras o ambos los que buscan las cópulas extra-pareja en el rayadito, pero por los resultados obtenidos en esta investigación pareciera que, tanto machos como hembras participan de la decisión.

Lo anterior también cobraría sentido si la pareja social presenta un alto grado de parentesco. De ser ese el caso, obtener crías con una pareja poco emparentada podría ser un mecanismo para mantener niveles bajos de endogamia a nivel poblacional, como se plantea en la hipótesis de la diversidad genética. Una mayor ocurrencia de EPP asociada a la

similitud genética entre la hembra y su pareja social se ha observado en diversas especies (Tarvin *et al.*, 2005; Blomqvist *et al.*, 2002). En este estudio fue posible encontrar una tendencia, ya que en los nidos con EPP, en el 62,5% de los casos el parentesco del macho social fue mayor al del macho extra-pareja. Sin embargo, no fue posible encontrar diferencias significativas. Es posible que con un mayor número de parejas evaluadas, sea posible distinguir esta tendencia y obtener valores de significancia estadística.

En relación con el posible efecto de los rasgos morfológicos en la EPP, si bien en estudios anteriores se había encontrado una relación entre el peso del macho y el de la hembra de las parejas sociales (Moreno *et al.*, 2007), en el presente estudio no se encontraron resultados similares. En el caso del rayadito, la simetría entre las rectrices de la cola en los machos se asoció positivamente con un mayor número de hijos genéticos, mientras que la asimetría entre las rectrices de la cola de las hembras se asoció positivamente con la ocurrencia de paternidad extra-pareja.

Lehtonen *et al.* (2009) describieron que los rasgos que influyen la decisión de buscar una pareja externa, no necesariamente son los mismos rasgos usados para elegir a un macho extra-pareja. Además, no siempre un rasgo genera los mismos efectos en machos y en las hembras. Es posible que este sea el caso para el rayadito. Una alternativa para explicar este fenómeno sería que la simetría en los machos es atractiva para las hembras y la asimetría de las hembras es atractiva para los machos. De esta forma, hembras “asimétricas” accederían a un mayor número de cópulas extra-pareja, por tanto, obteniendo mayores niveles de EPP, al igual que los machos “simétricos” generarían más hijos propios tanto vía cópulas dentro como fuera de la pareja. Moller (1992) manipuló el largo y la simetría de las colas en los machos en golondrinas (*Hirundo rustica*) y encontró que machos con colas más largas y simétricas se reproducían antes y durante más tiempo en la estación reproductiva, sugiriendo que las hembras usarían estos rasgos fenotípicos para la elección de su pareja y que la simetría sería un indicador confiable de la calidad del macho.

La elección de pareja de las hembras basadas en la expresión de rasgos ornamentales de atractivo sexual es un mecanismo bastante aceptado para maximizar el

éxito reproductivo, tanto para la pareja social, como para la elección de machos fuera de la pareja (Griffith, 2007). Sin embargo, esto no ocurriría en todas las especies, ya que Westneat (2006) al estudiar la paternidad extra-pareja en el mirlo de alas rojas (*Agelaius phoeniceus*), describió que, a pesar de encontrar altos niveles de varianza en el éxito reproductivo de los machos, los rasgos morfológicos con dimorfismo sexual que presentaban variabilidad entre machos, no se encontraban bajo presión de selección. Por otro lado, en la golondrina europea y en la americana (*Hirundo rustica rustica* e *Hirundo rustica erythrogaster*, respectivamente), el largo de la cola en los machos, es un rasgo de selección sexual y un indicador honesto de viabilidad. Además, la EPP en estas especies de golondrinas estudiadas afectaba significativamente la varianza en el éxito reproductivo de los machos, ya que machos con colas más largas presentaban mayores niveles de EPP (Kleven *et al.*, 2005).

Algunos rasgos con simetría bilateral son asociados a rasgos ornamentales extravagantes usados en la selección sexual. La expresión de estos rasgos es costosa y mucho más sensible a estrés de tipo ambiental en relación con otros rasgos morfológicos que no se encuentran bajo una fuerte presión de selección. Por esto, Moller & Hoglund (1991) predijeron que individuos de mayor calidad, presentaron rasgos más simétricos. En consecuencia, es posible que la simetría entre las rectrices de la cola del rayadito, pueda actuar como una señal honesta de calidad. Sin embargo, esto debe ser objeto de estudios futuros.

Ahora bien, la relación entre los beneficios en fertilidad y EPP pueden ser biológicamente muy relevantes. Por ejemplo, el fracaso en fertilizar un huevo le puede representar una considerable pérdida de su potencial reproductivo a una hembra (Griffith, 2007). Del total de los machos muestreados en este estudio, uno no fue capaz de dejar descendencia en la estación reproductiva. Se desconoce la frecuencia de esterilidad en las poblaciones silvestres de rayadito, pero un estudio realizado por Lifjeld *et al.*, (2004), reportaron un 4% de azoospermia en el *Phylloscopus trochilus*. Evitar perder el potencial reproductivo, por parte de la hembra, podría explicar en parte la presencia de EPP en el rayadito. Sin embargo, es necesario poner a prueba esta hipótesis en una futura

investigación. Asimismo, se ha descrito una correlación general entre “fenotipo atractivo” y fertilidad en aves, por ejemplo, en rasgos ornamentales, donde la expresión de estos caracteres y la producción espermática, están positivamente correlacionadas con el nivel de testosterona circulante (Owens & Short, 1995). Con el antecedente de la presencia de EPP en una alta frecuencia dentro de la población muestreada, nace la interrogante de si existe alguna relación entre los rasgos fenotípicos atractivos (e.g., simetría de las rectrices de la cola) y la fisiología reproductiva en el rayadito (e.g., capacidad de producción y almacenamiento espermático, hormonas circulantes).

Otra de las interrogantes que aparece luego de este trabajo de investigación dice relación con determinar si existen beneficios indirectos para la hembra en cuanto a la calidad de su descendencia, que se traduzcan en un diferencial en la adecuación biológica de hijos extra-pareja provenientes de machos de mejor calidad, en comparación con las crías dentro de la pareja.

Con los datos obtenidos en este estudio se abre un nuevo camino para profundizar en el conocimiento de esta especie y su sistema de apareamiento, tales como factores ecológicos, diferencias geográficas o latitudinales, variaciones anuales y entre poblaciones que pueden afectar o explicar la presencia de EPP.

CONCLUSIONES

- Los microsatélites generados para el rayadito, y utilizados en este estudio, fueron suficientes para los análisis de parentesco y paternidad. Por lo que se proponen como candidatos para futuras investigaciones tanto en el rayadito como en otras especies de furnáridos.
- No se encontró machos no-territoriales (flotantes) presentes en el área de estudio ni se observó evidencia de parasitismo intra-específico.
- Cervus 3.0.3 permitió asignar rangos de confianza estadística y entregar valores de confianza esperada en la asignación de pares padre-hijo, además permitió calcular las probabilidades de exclusión. Al corroborar los resultados con Gerud 2.0, fue posible asegurar la ocurrencia de EPP en el rayadito. Por lo que se propone como un buen método para usar en estudios futuros de paternidad.
- Los resultados obtenidos en este estudio permiten por primera vez, determinar la presencia de crías extra-pareja en una población de *A. spinicauda*.
- La presencia de EPP generó diferencias en el éxito reproductivo de los machos, por tanto, es posible que aumente la selección sexual en esta especie socialmente monógama. Sin embargo, machos con ganancia neta de paternidad gracias a EPP, tenían las mismas probabilidades de criar hijos ajenos que cualquier macho de la población.

- No fue posible distinguir diferencias en los niveles de parentesco dentro de la pareja y la ocurrencia de EPP.
- La paternidad extra-pareja se asoció positivamente con la asimetría de las rectrices de la cola en las hembras, mientras que en los machos, rectrices de la cola más simétricas se relacionó fuertemente con un número mayor de hijos genéticos. Por lo que se propone la simetría en el largo de las rectrices de la cola, como rasgo fenotípico de selección sexual bidireccional.
- Este es el primer estudio que evalúa y comprueba la presencia de crías extra-pareja en una especie de la familia Furnariidae.

BIBLIOGRAFÍA

Akçay E. & Roughgarden J. 2007. Extra-pair paternity in birds: Review of the genetic benefits. *Evolutionary Ecology Research* 9: 855-868.

Andersson M. & Iwasa Y. 1996. Sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 11(2): 53-58.

Arnold S. 1994. Bateman's principles and the measurement of sexual selection in plants and animals. *The American Naturalist* 144: 126-149.

Arnold K. & Owens I. 2002. Extra-pair paternity and egg dumping in birds: life history, parental care and the risk of retaliation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences* 269: 1263-1269.

Arnqvist G. & Kirkpatrick M. 2005. The evolution of infidelity in socially monogamous passerines: The strength of direct and indirect selection on extrapair copulation behavior in females. *American Naturalist* 165: 26-37.

Austin J. & Parkin D. 1996. Low frequency of extra-pair paternity in two colonies of the socially monogamous short-tailed shearwater *Puffinus tenuirostris*. *Molecular Ecology* 5(1): 145-150.

Augustin J. 2012. Infidelity in Birds: Causes and consequences of Extra-pair Paternity. Tesis (Doctor of Philosophy). Gothenburg, Suecia. University of Gothenburg, Faculty of Sciences. 54p.

Avise J. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Springer. Chapman & Hall, Nueva York, E.E.U.U. 511p.

Birkhead T. & Moller A. 1992. Sperm competition in birds. Evolutionary causes and consequences. Academic Press, San Diego. E.E.U.U. 282 p.

Birkhead T. & Moller A. 1993. Female control of paternity. Trends in Ecology and Evolution 8: 100-104.

Birkhead T. 1998. Sperm competition in birds: mechanisms and function. En: Sperm competition and sexual selection. Academic Press, San Diego, E.E.U.U. 579-622.

Blomqvist D., Andersson M., Küpper C., Cuthill I., Kis J., Lanctot R., Sandercock B., Székely T., Wallander J., Kempenaers B. 2002. Genetic similarity between mates and extra-pair parentage in three species of shorebirds. Nature 419: 613-615.

Blums P., Nichols D., Hines J., Lindberg M., Mednis A. 2005. Individual quality, survival variation and patterns of phenotypic selection on body condition and timing of nesting in birds. Oecologia 143: 365-376.

Bouwman K. M., Burke T., Komdeur J. 2006. How female reed buntings benefit from extra-pair mating behaviour: Testing hypotheses through patterns of paternity in sequential broods. Molecular Ecology 15: 2589-2600.

Botstein D., White R., Skolnick M., Davis R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32: 314-331.

Buitron D. 1983. Extra-pair courtship in black-billed magpies. Animal Behaviour 31: 21-220.

Chapuis M. & Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution 24 (3): 621-631.

Charmantier A., Blondel J., Perret P., Lambrechts M. 2004. Do extrapair paternities provide genetic benefits for female blue tits *Parus caeruleus*? *Journal of Avian Biology* 35: 524-532.

Cohas A., Yoccoz N., Da Silva A. 2006. Extra-pair paternity in the monogamous alpine marmot (*Marmota marmota*): the roles of social setting and female mate choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59: 597-605.

Dolan A., Murphy M., Redmond L., Sexton K., Duffield D. 2007. Extrapair paternity and the opportunity for sexual selection in a socially monogamous passerine. *Behavioral Ecology* 18(6): 985-993.

Cornelius C., Cofré H., Marquet P. 2000. The effects of habitat fragmentation on bird species in a relict temperate forest in semiarid Chile. *Conservation Biology* 14: 1-11.

Cornelius C. 2008. Spatial variation in nest-side selection by a secondary cavity-nesting bird in a human-altered landscape. *The Condor* 110: 615-626.

Darwin C. 1871. *The descent of man, and selection in relation to sex*. Princeton University Press, NJ.

Dawson R., Gibbs L., Hobson K., Yezerinac S. 1997. Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79: 506-514.

Devlin B., Roeder K., Ellstrand N. 1988. Fractional paternity assignment – theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 369-380.

Dietrich V., Schmoll T., Winkel W., Epplen J. T., Lubjuhn T. 2004. Pair identity: An important factor concerning variation in extra-pair paternity in the coal tit (*Parus ater*). Behaviour 141: 817-835.

Dixon A., Ross D., O'Malley S., Burke T. 1994. Paternal investment inversely related to degree of extra-pair paternity in the reed bunting (*Emberiza schoeniclus*). Nature 371: 857-859.

Drickamer L., Gowaty P., Wagner D. 2003. Free mutual mate preferences in house mice affect reproductive success and offspring performance. Animal Behaviour 65: 105-114.

Ellegren H. 1992. Polymerase-Chain-Reaction (PCR) analysis of microsatellites: A new approach to studies of genetic relationships in birds. The Auk 109: 886-895.

Espinoza J., Fuentes-Contreras E., Barros W., Ramirez C. 2007. Utilización de microsatélites para la determinación de la variabilidad genética de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (*Lepidoptera: Tortricidae*) en Chile central. Agricultura Técnica (Chile) 67(3): 244-252.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.

Foerster K., Delhey K., Johnsen A., Lifjeld J., Kempenaers B. 2003. Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. Nature 425: 714-717.

Gonzalez-Solis J., Sokolov E., Becker, P. H. 2001. Courtship feedings, copulations and paternity in common terns, *Sterna hirundo*. Animal Behaviour 61: 1125-1132.

Guo X. & Elston R. 1999. Linkage information content of polymorphic genetic markers. Human Heredity 49: 112-118.

Gowaty P. 1996. Battles of the sexes and origins of monogamy. *Partnerships in Birds: The Study of Monogamy* En: *The Study of Monogamy*. Oxford University Press. New York, USA. 425 p.

Gowaty P., Drickamer L., Schmid-Holmes S. 2003. Male house mice produce fewer offspring with lower viability and poorer performance when mated with females they do not prefer. *Animal Behaviour* 65: 95-103.

Gray E. M. 1997. Female red-winged blackbirds accrue material benefits from copulating with extra-pair males. *Animal Behaviour* 53: 625-639.

Griffith S., Owens I., Thuman A. 2002. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* 11: 2195-2212.

Griffith S. 2007. The evolution of infidelity in socially monogamous passerines: neglected components of direct and indirect selection. *The American Naturalist* 169 (2): 274-281.

Griffith S. & Immler S. 2009. Female infidelity and genetic compatibility in birds: the role of the genetically loaded raffle in understanding the function of extrapair paternity. *Journal of Avian Biology* 40: 97-101.

Hansson B., Bensch S., Hasselquist D., Åkesson. 2001. Microsatellite diversity predicts recruitment of sibling great reed warblers. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 268: 1287-1291.

Hartl D. & Clark A. 1989. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates., Massachusetts, E.E.U.U. 682p.

Hoi H. 1997. Assessment of the quality of copulation partners in the monogamous bearded tit. *Animal Behaviour* 53: 277-286.

Hoi-Leitner M., Hoi H., Romero-Pujante M., Valera F. 1999. Female extra-pair behaviour and environmental quality in the serin (*Serinus serinus*): a test of the “constrained female hypothesis”. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266: 1021-1026.

Hunter F. M., Burke T. & Watts S. E. 1992. Frequent copulations as a method of paternity assurance in the northern fulmar. *Animal Behaviour* 44: 149-156.

Ibarguchi G., Gissing G., Gaston A., Boag P., Friesen V. 2004. Male-biased mutation rates and the overestimation of extrapair paternity: problem, solution and illustration using thick-billed murre (*Uria lomvia*, Alcidae). *Journal of Heredity* 95 (3): 209-216.

Ippi S. & Trejo A. 2003. Dinámica y estructura de bandadas mixtas de aves en un bosque de lenga (*Nothofagus pumilio*) del noroeste de la patagonia argentina. *Ornitología Neotropical* 14: 353-362.

Ippi S., R. A. Vásquez, W. F. D. van Dongen, I. Lazzoni. 2011. Geographical variation in the vocalizations of the suboscine Thorn-tailed Rayadito *Aphrastura spinicauda*. *Ibis* 153: 789-805.

Johnsen A. & Lifjeld J. 2003. Ecological constraints on extra-pair paternity in the bluethroat. *Oecologia* 136: 476-483.

Johnson D., Krapu G., Reinecke K., Jorde D. 1985. An evaluation of condition indices for birds. *Journal of Wildlife Management* 49: 569-575.

Johnstone R. 1995. Sexual selection, honest advertisement and the handicap principle: reviewing the evidence. *Biological Reviews* 70:1-65.

Jones A. 2001. Gerud 1.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from progeny arrays using multilocus DNA data. *Molecular Ecology Notes* 1: 215-218.

Jones A. 2005. Gerud 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes* 5: 708-711.

Jones A. & Ardren W. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12: 2511-2523.

Jones A. & Avise J. 1997. Polygynandry in the dusky pipefish *Syngnathus floridae* revealed by microsatellite DNA markers. *Evolution* 51: 1611–1622.

Jones A., Small C., Paczolt K., Ratterman N. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10: 6-30.

Kalinowski S., Taper M., Marshall T. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.

Kempnaers B. 2007. Mate choice and genetic quality: A review of the heterozygosity theory. In: *Advances in the Study of Behavior*. Vol. 37. San Diego, USA. Elsevier Academic Press Inc. p. 189-278.

Kempnaers B., Everding S., Bishop C., Boag P., Robertson R. 2001. Extra-pair paternity and the reproductive role of male floaters in the tree swallow (*Tachyneta bicolor*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49: 251-259.

Kirkpatrick M. & Ryan M. J. 1991. The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature* 350: 33-38.

Kleven O., Jacobsen F., Izadnegahdar R., Robertson R., Lifjeld J. 2006. Male tail streamer length predicts fertilization success in the North American barn swallow (*Hirundo rustica erythrogaster*). *Behaviour Ecology and Sociobiology* 59: 412-418.

Kokko H. & Lindström J. 1996. Evolution of female preference for old mates. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 263: 1533-1538.

Komdeur J., Kraaijeveld-Smit F., Kraaijeveld K., Edelaar P. 1999. Explicit experimental evidence for the role of mate guarding in minimizing loss of paternity in the Seychelles warbler. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 266: 2075-2081.

Konovalov D., Manning C., Henshaw M. 2004. Kingroup: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes* 4: 779-782.

Kraaijeveld K., Gregurke J., Hall C., Komdeur J., Mulder R. 2004. Mutual ornamentation, sexual selection, and social dominance in the Black Swan. *Behavioral Ecology* 15: 380-389.

Lack D. L. 1968. *Ecological adaptations for breeding in birds*: Methuen, London.

Landry C., Garant D., Duchesne P., Bernatchez L. 2001. Good genes as heterozygosity: the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268 (1473): 1279-1285.

Lehtonen P., Primmer C., Laaksonen T. 2009. Different traits affect gain of the extrapair paternity and loss of paternity in the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*. *Animal Behaviour* 77 (5): 1103-1110.

Lifjeld J. T., Laskemoen T., Fossøy F., Johnsen A., Kleven O. 2007. Functional infertility among territorial males in two passerine species, the willow warbler *Phylloscopus trochilus* and the bluethroat *Luscinia svecica*. *Journal of Avian Biology* 38: 267-272.

Macedo R., Karubian J., Webster M. 2008. Extrapair paternity and sexual selection in socially monogamous birds: are tropical birds different? *The Auk* 125 (4): 769-777.

Manning J. T. 1985. Choosy females and correlates of male age. *Journal of Theoretical Biology* 116: 349-354.

Marshall R. C., Buchanan K. L., Catchpole C. K. 2003. Sexual selection and individual genetic diversity in a songbird. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270: 248-250.

Marshall T., Slate J., Kruuk L., Pemberton J. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7(5): 639-655.

Matysiokova B & Remes V. 2012. Faithful females receive more help: the extent of male parental care during incubation in relation to extra-pair paternity in songbirds. *Journal of Evolutionary Biology* 26 (1): 155-162.

McKinney F., Derrickson S. R., Mineau P. 1983. Forced copulation in waterfowl. *Behaviour* 86: 250-294.

Mock, D. 1985. An introduction to the neglected mating system. En: Gowaty & Mock (Eds.). *Ornithological Monographs No. 37: Avian Monogamy* Washington D.C., E.E.U.U. 1-10 p.

Moller A. & Hoglund J. 1991. Patterns of fluctuating asymmetry in avian feather ornaments: implications for models of sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 245: 1-5.

Moller A. 1992. Female swallow preference for symmetrical male sexual ornaments. *Nature* 357: 238-240.

Moller A. & Birkhead T. 1993. Certainty of paternity covaries with paternal care in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 33:261-268.

Moreno J., Merino S., Lobato E., Rodríguez-Girones M., Vásquez R.A. 2007. Sexual dimorphism and parental roles in the Thorn-tailed rayadito (Furnadiidae). *The Condor* 109:312-320.

Moreno J., Merino S., Vásquez R.A., Armesto J. 2005. Breeding biology of the Thorn-tailed rayadito (Furnadiidae) in Routh-temperate rainforests of Chile. *The Condor* 107: 69-77.

Mulder R. A., Dunn P. O., Cockburn A., Lazenbycohen K. A., Howell, M. J. 1994. Helpers liberate female fairy-wrens from constraints on extrapair mate choice. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 255: 223-229.

Neff B. 2001. Genetic paternity analysis and breeding success in bluegill sunfish (*Lepomis macrochiros*). *Journal of Heredity* 92: 111-119.

Neff B. & Pitcher T. 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology* 14: 18-38.

Ottinger M.A. 2001. Quail and other short-lived birds. *Experimental Gerontology* 36: 859-868.

Owens I. & Short R. 1995. Hormonal basis of sexual dimorphism in birds: implications for new theories of sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution* 10(1): 44-47.

Petrie M., Doums C., Moller A. 1998. The degree of extra-pair paternity increases with genetic variability. *Evolution* 95: 9390-9395.

Petrie M. & Kempenaers B. 1998. Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 52-58.

Queller D., Strassmann J., Hughes C. 1993. Microsatellites and kindship. *Trends in Ecology and Evolution* 8(8): 285-288.

Quilodrán C., Vásquez R.A., Estades C. 2012. Nesting of the Thorn-Tailed rayadito (*Aphrastura spinicauda*) in a Pine Plantation in Southcentral Chile. *The Wilson Journal of Ornithology* 124 (4): 737-742.

Qvarnström A. & Price T. 2001. Maternal effects, paternal effects and sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 95-99.

Reichard U. & Boesche C. 2003. Monogamy: mating strategies and partnerships in birds, humans and other mammals. Cambridge University Press. Cambridge. United Kingdom. 269p.

Raymond M. & Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

Remsen J. 2003. Family Furnariidae (Ovenbirds) En: Del Hoyo J., Elliot A. y Christie D. (*editores*). Handbook of the Birds of the World Vol. 8. Broadbills to Tapaculos. Lynx Editions, Barcelona. 162-357p.

Reudink M., Mech S., Curry R. 2006. Extrapair paternity and mate choice in a chickadee hybrid zone. *Behavioral Ecology* 17: 56-62.

Reynolds J. D. 1996. Animal breeding systems. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 68-72.

Ryan K. & Altmann J. 2001. Selection for male choice based primarily on mate compatibility in the oldfield mouse, *Peromyscus polionotus rhoadsi*. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 50: 436-440.

Schlotterer C. & Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 211-215.

Schmoll T. 2011. A review and perspective on context-dependent genetic effects of extra-pair mating in birds. *Journal of Ornithology* 152: 265-277.

Schmoll T., Dietrich V., Winkel W., Epplen J., Lubjuhn T. 2002. Long-term fitness consequences of female extra-pair matings in a socially monogamous passerine. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270: 259-264.

Schmoll T., Quellmalz A., Dietrich V., Winkel W., Epplen J., Lubjuhn T. 2005. Genetic similarity between pair mates is not related to extrapair paternity in the socially monogamous coal tit. *Animal Behaviour* 69: 1013-1022.

Seddon N., Amos W., Mulder R. A., Tobias J. A. 2004. Male heterozygosity predicts territory size, song structure and reproductive success in a cooperatively breeding bird. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 271: 1823-1829.

Slagsvold T., Johnsen A., Lampe H., Lifjeld J. 2001. Do female pied flycatchers seek extrapair copulations with familiar males? A test of the incomplete knowledge hypothesis. *Behavioural Ecology* 12: 412-418.

Slate J., Marshall T., Perberson J. 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology* 9: 801-808.

Strohbach S., Curio E., Bathen A., Epplen J., Lubjuhn T. 1998. Extrapair paternity in the great tit (*Parus major*): a test of the “good genes” hypothesis. *Behavioral Ecology* 9: 388-396.

Svensson L. 1984. Identification guide to European passerines. Lars Svensson, Estocolmo, Suecia.

Svensson E. & Nilsson J. 1996. Mate quality affects Offspring sex ratio in blue tits. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 263: 357-361.

Tarvin K., Webster M., Tuttle E., Pruet-jones S. 2005. Genetic similarity of social mates predicts the level of extrapair paternity in splendid fairy-wrens. *Animal Behaviour* 70: 945-955.

Townsend A.K., Clark A.B., McGowan K.J. 2010. Direct benefits and genetic costs of extrapair paternity for female American crows (*Corvus brachyrhynchos*). *The American Naturalist* 175: 1-9.

Trivers R. L. 1972. Parental investment and sexual selection. Chicago, E.E.U.U. Aldine Publishing Co. 136-179 p.

Van Dongen W., Munimanda G., Augustin J., Blomqvist D., Szép T. Wagner R. 2010. Identification of novel microsatellite loci in the sand martin, *Riparia riparia*, and cross-amplification of loci from other bird species. *Journal of Ornithology* 151: 761-764.

Van Oosterhout C., Hutchinson W., Wills D., Shipley P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.

Vedder O., Magrath M., Niehoff D., Van der Velde M., Komdeur J. 2012. Declining extra-

pair paternity with laying order associated with initial incubation behaviour, but independent of final clutch size in the blue tit. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 68: 603-612.

Weatherhead P. & Yezerinac S. 1998. Breeding synchrony and extra-pair mating in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43:217-219.

Webster M., Tarvin K., Tuttle E., Puett-Jones S. 2007. Promiscuity drives sexual selection in a socially monogamous bird. *Evolution* 62: 2205-2211.

Westneat D. & Stewart I. 2003 Extra-pair paternity in birds: causes, correlates, and conflict. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 34: 365-396.

Westneat D. 2006. No evidence of current sexual selection on sexually dimorphic traits in a bird with high variance in mating success. *The American Naturalist* 167: 171-189.

Wetton J. H. & Parkin, D. T. 1991. An association between fertility and cuckoldry in the house sparrow *Passer domesticus*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 245: 227-233.

Wickler W. & Seibt U. 1983. Monogamy: An ambiguous concept. En: *Mate Choice*. Ed: Bateson. Cambridge University Press, Cambridge.

Whittingham L. & Dunn P. 2005. Effects of extra-pair and within-pair reproductive success on the opportunity for selection in birds. *Behavioral Ecology* 16:138-144.

Yezerinac S., Weatherhead P., Boag P. 1995. Extra-pair paternity and the opportunity for sexual selection in a socially monogamous bird (*Dendroica petechia*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 37: 179-188.

Zhang D. 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends in*

Ecology and Evolution 19: 507-509.

Zeh J. and Zeh D. 1997. The evolution of polyandry II: post-copulatory defenses against genetic incompatibility. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 1378: 69-75.

Anexo 1

Tabla 1. Resumen del número del nido, identificación del anillo de cada individuo, estado (a = adulto; p = polluelo), sexo, para las 21 familias muestreadas (n = 142 individuos en total).

NIDO N°	ANILLO	EDAD	SEXADO
8	RV3608	A	Macho
8	RV3617	A	Hembra
8	RV3693	P	Hembra
8	RV3694	P	Macho
8	RV3695	P	Macho
8	RV3696	P	Hembra
8	RV3697	P	Macho
25	RR327	A	Hembra
25	RV3221	A	Macho
25	RV3698	P	Macho
25	RV3699	P	Hembra
25	RV3700	P	Hembra
25	RV3701	P	Hembra
26	RV3620	A	Hembra
26	RV5604	A	Macho
26	RV3716	P	Hembra
26	RV3717	P	Hembra
26	RV3718	P	Macho
26	RV3719	P	Macho
27	RV3609	A	Macho
27	RV3675	A	Hembra
27	RV3676	P	Macho
27	RV3677	P	Hembra
27	RV3678	P	Hembra
27	RV3679	P	Hembra
29	RV3603	A	Hembra
29	RV3616	A	Macho
29	RV3639	P	Macho
29	RV3640	P	Hembra
29	RV3641	P	Macho
29	RV3642	P	Hembra
29	RV3643	P	Hembra
29	RV3644	P	Hembra
44	AA00322	A	Macho
44	RV3611	A	Hembra
NIDO N°	ANILLO	EDAD	SEXADO
80	RR342	A	Macho
80	RR5103	A	Hembra
80	RV3635	P	Macho
80	RV3636	P	Macho
80	RV3637	P	Hembra
80	RV3638	P	Hembra
88	RR340	A	Macho
88	RV3799	A	Hembra
88	RV3624	P	Hembra
88	RV3625	P	Hembra
88	RV3626	P	Hembra
88	RV3632	P	Macho
88	RV3633	P	Macho
88	RV3634	P	Macho
90	RR5101	A	Macho
90	RV3601	A	Hembra
90	RV3650	P	Macho
90	RV3651	P	Hembra
90	RV3652	P	Hembra
98	RV3602	A	Macho
98	RV3605	A	Hembra
98	RV3645	P	Hembra
98	RV3646	P	Hembra
98	RV3647	P	Macho
98	RV3648	P	Macho
98	RV3649	P	Macho
122	RR328	A	Macho
122	RV3604	A	Hembra
122	RV3711	P	Hembra
122	RV3712	P	Hembra
122	RV3713	P	Macho
122	RV3714	P	Hembra
122	RV3715	P	Hembra
129	RV3613	A	Hembra
129	RV3619	A	Macho

44	RV3658	P	Macho
44	RV3659	P	Macho
44	RV3660	P	Macho
44	RV3661	P	Hembra
44	RV3662	P	Macho
44	RV3670	P	Hembra
46	AA00393	A	Hembra
46	RV3245	A	Macho
46	RV3663	P	Macho
46	RV3664	P	Macho
46	RV3665	P	Hembra
46	RV3666	P	Macho
46	RV3667	P	Macho
46	RV3668	P	Hembra
49	RR291	A	Macho
49	RR315	A	Hembra
49	RV3653	P	Hembra
49	RV3654	P	Hembra
49	RV3655	P	Hembra
49	RV3656	P	Macho
49	RV3657	P	Hembra
51	AA00321	A	Macho
51	RV3614	A	Hembra
51	RV3690	P	Hembra
51	RV3691	P	Macho
51	RV3692	P	Macho
56	RR5107	A	Hembra
56	RV3259	A	Macho
56	RV3685	P	Macho
56	RV3686	P	Macho
56	RV3687	P	Macho
56	RV3688	P	Macho
56	RV3689	P	Hembra
71	RV3612	A	Hembra
71	RV3618	A	Macho
71	RV3680	P	Macho
71	RV3681	P	Macho
71	RV3682	P	Hembra
71	RV3683	P	Hembra
71	RV3684	P	Hembra

129	RV3669	P	Macho
129	RV3671	P	Macho
129	RV3672	P	Macho
129	RV3673	P	Hembra
129	RV3674	P	Hembra
138	RV3615	A	Hembra
138	RV3621	A	Macho
138	RV3706	P	Hembra
138	RV3707	P	Macho
138	RV3708	P	Macho
138	RV3709	P	Macho
138	RV3710	P	Hembra
140	RV3622	A	Hembra
140	RV3703	A	Macho
140	RV3607	P	Hembra
140	RV3704	P	Hembra
140	RV3705	P	Macho
144	RV3623	A	Hembra
144	RV3702	A	Macho
144	RV3720	P	Hembra
144	RV3721	P	Hembra
144	RV3722	P	Hembra
144	RV3723	P	Macho
144	RV3724	P	Hembra
159	AA00306	A	Hembra
159	RR5109	A	Macho
159	A01990	P	Hembra
159	RV3627	P	Macho
159	RV3628	P	Hembra
159	RV3629	P	Hembra
159	RV3630	P	Macho
159	RV3631	P	Macho

Anexo 2

Descripción de la metodología utilizada para la determinación de paternidad genética:

Los análisis de genética poblacional se obtuvieron a través de los programas computacionales Cervus 3.0.3 y fueron corroborados con Genepop V.4, utilizando todos los individuos muestreados ($n = 142$). No se observaron diferencias entre los datos obtenidos en ambos programas. Se estimó la frecuencia alélica, heterocigosidad esperada y observada, y el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), con corrección de Bonferroni debido a las comparaciones múltiples (Tabla 3).

Tabla 3. Datos de genética poblacional para el rayadito (*A. spinicauda*) en la isla Navarino durante la estación reproductiva del año 2010. Para cada locus, se detalla el número de alelos (A), heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho). Se estimó la significancia (P) para el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) (valores entre paréntesis), donde los asteriscos indican diferencias significativas, NS muestra diferencias no significativas y ND corresponde a valores no determinados. Se detalla la estimación de frecuencias de alelos nulos (A N).

Locus	N° A	He	Ho	HW P	A N
1	10	0,707	0,372	*** (1×10^{-7})	+0,3098
*1	7	0,727	0,637	** (0,0004)	+0,00691
3	11	0,792	0,742	NS (0,689)	+0,0321
*5	15	0,879	0,843	*** ($3,6 \times 10^{-6}$)	+0,0228
7	11	0,805	0,800	ND	-0,0070
*8	4	0,605	0,606	NS (0,946)	-0,0780
*10	10	0,820	0,699	NS (0,0778)	-0,0659
*14	15	0,800	0,805	ND	+0,0786
18	5	0,439	0,393	NS (0,1579)	-0,0659

Los programas usados distinguieron al locus 1 como alelo nulo. Esto ocurre cuando un alelo sufre una mutación en la región flanqueante complementaria al cebador, reduciendo el éxito en la amplificación del alelo. De esta manera, individuos que eran heterocigotos con uno de estos alelos, son genotipados como homocigotos para el alelo no mutado (Chapuis & Estoup, 2007), resultando en un exceso de homocigotos para el locus en cuestión.

Se obtuvo una heterocigosidad esperada (He) promedio de 0,7303. El número de alelos varió entre 4 para el locus *8 y 15 para los locus *5 y *14, con un promedio de 9,78 alelos por locus.

Posteriormente, para determinar la paternidad, se utilizó el programa computacional Cervus 3.0.3 y se confirmaron los resultados con el programa Gerud 2.0 de reconstrucción de genotipos. Se evaluaron 137 individuos (97 polluelos, 21 madres y 19 padres), utilizando 6 de los 9 microsatélites. Se eliminó el locus 1 por determinarse alelo nulo, como lo recomiendan Jones & Ardren, (2003), ya que Cervus 3.0.3 acomoda el rango de error o de mutación, disminuyendo el poder discriminatorio de los loci que no poseen alelos nulos. Tampoco fueron utilizados los alelos 7 y *10 por presentar alto número de individuos sin caracterizar. Con los 6 microsatélites utilizados se obtuvo un promedio de 9,5 alelos por locus.

Para estimar la utilidad de cada microsatélite en la detección de paternidad, se estimó el contenido de información polimórfica (PIC, del inglés polymorphism information content) (Guo & Elston, 1999). La fórmula empleada por el programa computacional para calcular PIC es descrita por Botstein *et al.* (1980) y considera las frecuencias alélicas para los n alelos de un locus, considerando altamente informativos a aquellos loci cuyo PIC es mayor a 0,5.

La probabilidad de no exclusión (PNE) parental es la probabilidad de no excluir del análisis a uno o a un par de individuos seleccionados al azar que no están emparentados con el individuo en cuestión, para un locus dado (Marshall, 1998; Kalinowski *et al.*, 2007). El programa Cervus estima las probabilidades de no exclusión para cada locus y combinadas para el conjunto de locus, cuando se conocen los datos de un padre. Cinco de los 6 microsatélites usados presentaron valores de $PIC > 0,5$. Sólo 1 (Locus 18) presentó valores considerados medianamente informativos ($0,25 < PIC < 0,5$). El PIC promedio fue de 0,6711 y la probabilidad de no-exclusión combinada para el primer padre (PNE) fue de 0,061, como se observa en la Tabla 4. Los valores de PIC, tanto a nivel individuos como para el

conjunto de loci, resultaron ser altamente informativos, por lo que el contenido polimórfico de estos loci sería apropiado para realizar estudios poblacionales y de parentesco. Los valores obtenidos para las probabilidades de no-exclusión parental en tanto, proveen elevada confiabilidad.

Tabla 4. Número de alelos (N° A), valores de contenido de información polimórfica (PIC) y probabilidad de no-exclusión combinada para el primer padre (PNE) para cada locus utilizado.

<u>Locus</u>	<u>N° A</u>	<u>PIC</u>	<u>PNE</u>
*1	7	0,674	0,694
3	11	0,762	0,574
*5	15	0,864	0,399
*8	4	0,538	0,816
*14	15	0,794	0,523
18	5	0,394	0,901

Con el programa, además se calculó la probabilidad de cada macho de ser padre, para cada cría. Luego, se estimó la diferencia crítica entre la probabilidad de los dos padres más probables (Delta crítico) asignando como padre al individuo con LOD mayor. Se utilizaron los datos de cada polluelo, las madres y de los padres candidatos. Se determinaron 2 niveles de confianza para la asignación de paternidad de 80% y 95%, con un Delta crítico calculado de 5,0 y 2,86, respectivamente (Tabla 5). Para la detección de EPP a través de la asignación de paternidad al 99% de los polluelos muestreados, se utilizó el Delta de 2,86 con 80% de nivel de confianza (Slate *et al.*, 2000). En relación al rango de error medio observado para los 6 loci fue de 0,1517. Los valores de probabilidades de detección y la estimación del rango de error se detallan para cada locus en la Tabla 6.

Tabla 5. Tabla comparativa de las asignaciones de paternidad al considerar los datos de los polluelos y de sus madres. Los valores observados y los valores esperados, entre paréntesis, se presentan como números absolutos y porcentuales, para niveles de confianza de 95% y 80%, así como de aquellos que no fue posible asignarle padre.

	Asignaciones de Paternidad		Proporción de Asignaciones de Paternidad	
	Observadas	Esperadas	Observadas	Esperadas
95% Confianza	14	(43)	15%	(45%)
80% Confianza	94	(95)	98%	(99%)
Sin Asignar	2	(1)	2%	(1%)
Total	96	(96)	100%	(100%)

Tabla 6. Estimación de la probabilidad de error en la detección de la paternidad y estimación del rango de error, para cada locus evaluado.

<u>Locus</u>	<u>Prob. de detección</u>	<u>Est. rango de error</u>
*1	0,3062	0,0687
3	0,4261	0,3178
*5	0,6013	0,0796
*8	0,1840	0,1196
*14	0,4767	0,2177
18	0,0993	0,1072

Tabla 7. Asignación de paternidad con Cervus 3.0.3 para las 21 familias. Se detallan el número de nido, los individuos, edad (a = adulto; p = polluelo), sexo (1 = macho; 2 = hembra), la madre y padre sociales y el padre genético asignado. Los asteriscos (*) señalan los machos que no fueron genotipificados. Los valores que se desconocen se presentan con un signo de interrogación.

Nº NIDO	Nº ANILLO	EDAD	SEXO	MADRE	P SOCIAL	P GENETICO
8	RV3608	a	1	?	?	?
8	RV3617	a	2	?	?	?
8	RV3693	p	2	RV3617	RV3608	RV3608
8	RV3694	p	1	RV3617	RV3608	RV3608
8	RV3695	p	1	RV3617	RV3608	RV3608
8	RV3696	p	2	RV3617	RV3608	RR328
8	RV3697	p	1	RV3617	RV3608	RR328
25	RR327	a	2	?	?	?
25	RV3221	a	1	?	?	?
25	RV3698	p	1	RR327	RV3221	RV3221
25	RV3699	p	2	RR327	RV3221	No Muestreado
25	RV3700	p	2	RR327	RV3221	RV3702
25	RV3701	p	2	RR327	RV3221	RV3221
26	RV3620	a	2	?	?	?
26	RV5604	a	1	?	?	?
26	RV3716	p	2	RV3620	RV5604	RV3618
26	RV3717	p	2	RV3620	RV5604	RV5604
26	RV3718	p	1	RV3620	RV5604	RV5604
26	RV3719	p	1	RV3620	RV5604	RV5604
27	RV3609*	a	1	?	?	?
27	RV3675	a	2	?	?	?
27	RV3676	p	1	RV3675	RV3609	RV3616
27	RV3677	p	2	RV3675	RV3609	RV3616
27	RV3678	p	2	RV3675	RV3609	RV3616
27	RV3679	p	2	RV3675	RV3609	RV3621
29	RV3603	a	2	?	?	?
29	RV3616	a	1	?	?	?
29	RV3639	p	1	RV3603	RV3616	RV3616
29	RV3640	p	2	RV3603	RV3616	RV3616
29	RV3641	p	1	RV3603	RV3616	RV3703
29	RV3642	p	2	RV3603	RV3616	RV3616
29	RV3643	p	2	RV3603	RV3616	RV3616
29	RV3644	p	2	RV3603	RV3616	RV3616
44	AA00322	a	1	?	?	?
44	RV3611	a	2	?	?	?
44	RV3658	p	1	RV3611	AA00322	AA00322
44	RV3659	p	1	RV3611	AA00322	RV3621
44	RV3660	p	1	RV3611	AA00322	AA00322
44	RV3661	p	2	RV3611	AA00322	RV3616
44	RV3662	p	1	RV3611	AA00322	AA00322
44	RV3670	p	2	RV3611	AA00322	AA00322

46	AA00393	a	2	?	?	?
46	RV3245	a	1	?	?	?
46	RV3663	p	1	AA00393	RV3245	RV3608
46	RV3664	p	1	AA00393	RV3245	RV3221
46	RV3665	p	2	AA00393	RV3245	RV3616
46	RV3666	p	1	AA00393	RV3245	RV3221
46	RV3667	p	1	AA00393	RV3245	RV3221
46	RV3668	p	2	AA00393	RV3245	RV3221
49	RR291 *	a	1	?	?	?
49	RR315	a	2	?	?	?
49	RV3653	p	2	RR315	RR291	RR5109
49	RV3654	p	2	RR315	RR291	RV3618
49	RV3655	p	2	RR315	RR291	RR5109
49	RV3656	p	1	RR315	RR291	RV3618
49	RV3657	p	2	RR315	RR291	RV3618
51	AA00321	a	1	?	?	?
51	RV3614	a	2	?	?	?
51	RV3690	p	2	RV3614	AA00321	AA00321
51	RV3691	p	1	RV3614	AA00321	AA00321
51	RV3692	p	1	RV3614	AA00321	AA00321
56	RR5107	a	2	?	?	?
56	RV3259	a	1	?	?	?
56	RV3685	p	1	RR5107	RV3259	AA00321
56	RV3686	p	1	RR5107	RV3259	RV3618
56	RV3687	p	1	RR5107	RV3259	RV3618
56	RV3688	p	1	RR5107	RV3259	AA00321
56	RV3689	p	2	RR5107	RV3259	AA00321
71	RV3612	a	2	?	?	?
71	RV3618	a	1	?	?	?
71	RV3680	p	1	RV3612	RV3618	RR340
71	RV3681	p	1	RV3612	RV3618	RV3618
71	RV3682	p	2	RV3612	RV3618	RV3618
71	RV3683	p	2	RV3612	RV3618	RV3618
71	RV3684	p	2	RV3612	RV3618	RV3259
80	RR342	a	1	?	?	?
80	RR5103	a	2	?	?	?
80	RV3635	p	1	RR5103	RR342	RV3259
80	RV3636	p	1	RR5103	RR342	RR342
80	RV3637	p	2	RR5103	RR342	AA00322
80	RV3638	p	2	RR5103	RR342	RV3621
88	RR340	a	1	?	?	?
88	RV3799	a	2	?	?	?
88	RV3624	p	2	RV3799	RR340	RR340
88	RV3625	p	2	RV3799	RR340	RR340
88	RV3626	p	2	RV3799	RR340	RR340
88	RV3632	p	1	RV3799	RR340	RR340
88	RV3633	p	1	RV3799	RR340	RR340
88	RV3634	p	1	RV3799	RR340	RR340
90	RR5101	a	1	?	?	?
90	RV3601	a	2	?	?	?

90	RV3650	p	1	RV3601	RR5101	RR5101
90	RV3651	p	2	RV3601	RR5101	RV3608
90	RV3652	p	2	RV3601	RR5101	RR5101
98	RV3602	a	1	?	?	?
98	RV3605	a	2	?	?	?
98	RV3645	p	2	RV3605	RV3602	RV3602
98	RV3646	p	2	RV3605	RV3602	RV3602
98	RV3647	p	1	RV3605	RV3602	RV3602
98	RV3648	p	1	RV3605	RV3602	RR5101
98	RV3649	p	1	RV3605	RV3602	RV3602
122	RR328	a	1	?	?	?
122	RV3604	a	2	?	?	?
122	RV3711	p	2	RV3604	RR328	RR328
122	RV3712	p	2	RV3604	RR328	RR328
122	RV3713	p	1	RV3604	RR328	RR328
122	RV3714	p	2	RV3604	RR328	RR328
122	RV3715	p	2	RV3604	RR328	RR328
129	RV3613	a	2	?	?	?
129	RV3619	a	1	?	?	?
129	RV3669	p	1	RV3613	RV3619	RR328
129	RV3671	p	1	RV3613	RV3619	RR5109
129	RV3672	p	1	RV3613	RV3619	RV3703
129	RV3673	p	2	RV3613	RV3619	RR5109
129	RV3674	p	2	RV3613	RV3619	RV3703
138	RV3615	a	2	?	?	?
138	RV3621	a	1	?	?	?
138	RV3706	p	2	RV3615	RV3621	RV3621
138	RV3707	p	1	RV3615	RV3621	RV3621
138	RV3708	p	1	RV3615	RV3621	RV3245
138	RV3709	p	1	RV3615	RV3621	RV3621
138	RV3710	p	2	RV3615	RV3621	RV3621
140	RV3622	a	2	?	?	?
140	RV3703	a	1	?	?	?
140	RV3607	p	2	RV3622	RV3703	RV3703
140	RV3704	p	2	RV3622	RV3703	RV3616
140	RV3705	p	1	RV3622	RV3703	RV3703
144	RV3623	a	2	?	?	?
144	RV3702	a	1	?	?	?
144	RV3720	p	2	RV3623	RV3702	RV3702
144	RV3721	p	2	RV3623	RV3702	RV3702
144	RV3722	p	2	RV3623	RV3702	RR5101
144	RV3723	p	1	RV3623	RV3702	RV3702
144	RV3724	p	2	RV3623	RV3702	RV3702
159	AA00306	a	2	?	?	?
159	RR5109	a	1	?	?	?
159	A01990	p	2	AA00306	RR5109	RR5109
159	RV3627	p	1	AA00306	RR5109	RV3621
159	RV3628	p	2	AA00306	RR5109	RR5109

Luego, se hizo la reconstrucción de genotipos con el programa computacional Gerud 2.0 y se compararon los genotipos de cada polluelo con su madre y padre genético designado. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 8.

De los 97 pollos, 55% fueron atribuidos a sus respectivos padres sociales (53), 18% (18) a paternidad extra-pareja y un 27% (26) no fue determinado. Este mayor número de individuos sin asignación de paternidad se debió a que el programa otorgaba la paternidad tanto al padre social como a otro macho o bien, en las nidadas donde no se contaba con la genotipificación del padre (2 nidos), el programa asignaba la mayor probabilidad a un genotipo diferente al de los machos muestreados. Las crías extra-pareja se encontraron en 7 de 19 nidadas. El programa detectó que 6 nidadas posiblemente presentaban EPP, por lo que se observa una frecuencia de presentación de EPP de al menos 37%. Las diferencias encontradas entre ambos programas se visualizan en la Tabla 9 tanto a nivel de familias (n=19) como a nivel individual (n =97 polluelos).

Tabla 8. Asignación de paternidad con Gerud 2.0 para las 21 familias. Se detallan el número de nido, el nombre de los individuos (anillo), edad (a = adulto; p = polluelo), sexo (1 = macho; 2 = hembra), el padre sociales y los padres con genotipos concordantes ordenados según probabilidad (mayor a menor). Los asteriscos (*) señalan los machos que no fueron genotipificados. Los valores que se desconocen se presentan con un guión (-).

NIDO	ANILLO	PADRE SOCIAL	PADRES SEGÚN GERUD (genotipos concordantes)
8	RV3608	-	-
	RV3617	-	-
	RV3693	RV3608	RV3608
	RV3694	RV3608	RV3608
	RV3695	RV3608	RV3608
	RV3696	RV3608	RV3608 - RV3259 - RR328 - RV3703
	RV3697	RV3608	RV3608 - RV3259 - RR328 - RV3703
25	RR327	-	-
	RV3221	-	-
	RV3698	RV3221	RV3221
	RV3699	RV3221	-
	RV3700	RV3221	RV3702
	RV3701	RV3221	RV3221
26	RV3620	-	-
	RV5604	-	-
	RV3716	RV5604	RV5604- RV3618-RR340-RV3602-RV3619
	RV3717	RV5604	RV5604
	RV3718	RV5604	RV5604
	RV3719	RV5604	RV5604
27	RV3609 *	-	-
	RV3675	-	-
	RV3676	RV3609	-
	RV3677	RV3609	-
	RV3678	RV3609	-
	RV3679	RV3609	-
29	RV3603	-	-
	RV3616	-	-
	RV3639	RV3616	RV3616
	RV3640	RV3616	RV3616
	RV3641	RV3616	RV3616 - RV3703
	RV3642	RV3616	RV3616
	RV3643	RV3616	RV3616
	RV3644	RV3616	RV3616
44	AA00322	-	-

	RV3611	-	-
	RV3658	AA00322	AA00322
	RV3659	AA00322	AA00322 - RV3621
	RV3660	AA00322	AA00322
	RV3661	AA00322	AA00322 -RV3616- RR5101 - RV3703
	RV3662	AA00322	AA00322
	RV3670	AA00322	AA00322
46	AA00393	-	-
	RV3245	-	-
	RV3663	RV3245	RV3608 o RV3259
	RV3664	RV3245	RV3608 o 3259 o 3619
	RV3665	RV3245	RV3616
	RV3666	RV3245	RV3259
	RV3667	RV3245	RV3608, 3259
	RV3668	RV3245	RV3221, 3602, RR5109
49	RR291 *	-	-
	RR315	-	-
	RV3653	RR291	-
	RV3654	RR291	-
	RV3655	RR291	-
	RV3656	RR291	-
	RV3657	RR291	-
51	AA00321	-	-
	RV3614	-	-
	RV3690	AA00321	AA00321
	RV3691	AA00321	AA00321
	RV3692	AA00321	AA00321
56	RR5107	-	-
	RV3259	-	-
	RV3685	RV3259	padre no muestreado - AA00321
	RV3686	RV3259	padre no muestreado - RV3618 -RR328
	RV3687	RV3259	padre no muestreado - RV3618 -RR328
	RV3688	RV3259	padre no muestreado - AA00321
	RV3689	RV3259	padre no muestreado - AA00321
71	RV3612	-	-
	RV3618	-	-
	RV3680	RV3618	RR340
	RV3681	RV3618	RV3618
	RV3682	RV3618	RV3618
	RV3683	RV3618	RV3618
	RV3684	RV3618	-
80	RR342	-	-
	RR5103	-	-

	RV3635	RR342	RV3618 - RR328-RV3703
	RV3636	RR342	-
	RV3637	RR342	RV3618
	RV3638	RR342	RV3618
88	RR340	-	-
	RV3799	-	-
	RV3624	RR340	RR340
	RV3625	RR340	RR340
	RV3626	RR340	RR340
	RV3632	RR340	RR340
	RV3633	RR340	RR340
	RV3634	RR340	RR340
90	RR5101	-	-
	RV3601	-	-
	RV3650	RR5101	RR5101
	RV3651	RR5101	RR5101
	RV3652	RR5101	RR5101
98	RV3602	-	-
	RV3605	-	-
	RV3645	RV3602	Multiples opciones (minimo 2 padres por nido)
	RV3646	RV3602	-
	RV3647	RV3602	-
	RV3648	RV3602	-
	RV3649	RV3602	-
122	RR328	-	-
	RV3604	-	-
	RV3711	RR328	RR328
	RV3712	RR328	RR328
	RV3713	RR328	RR328
	RV3714	RR328	RR328
	RV3715	RR328	RR328
129	RV3613	-	-
	RV3619	-	-
	RV3669	RV3619	RV3619
	RV3671	RV3619	RV3619 - RR340 - RR5109
	RV3672	RV3619	RV3619
	RV3673	RV3619	RV3619 - RR340 - RR5109
	RV3674	RV3619	RV3619
138	RV3615	-	-
	RV3621	-	-
	RV3706	RV3621	RV3621
	RV3707	RV3621	RV3621
	RV3708	RV3621	RV3621 - RV 3602 - RV3702

Tabla 9. Cuadro comparativo de los resultados obtenidos entre los programas Cervus 3.0.3 y Gerud 2.0. Los porcentajes se presentan entre paréntesis y se calculan en relación al total de nidos evaluados (n=19) y para cada polluelo (n=97).

<u>Familias</u>	<u>Cervus</u>	<u>Gerud</u>
Presencia EPP	16 (84,3%)	7 (36,8%)
Posible EPP	0 (0%)	6 (31,5%)
Ausencia EPP	3 (15,7%)	5 (26,3%)
No clasificado	0	1 (5,2%)
Total Evaluado	19 (100%)	19 (100%)

<u>Individuos</u>	<u>Cervus</u>	<u>Gerud</u>
Padre social	53 (54,6%)	53 (54,6%)
EPP	43 (44,3%)	18 (18,5%)
No		
Determinado	1 (1%)	26 (26,8%)
Total	97 (100%)	97 (100%)

Anexo 3

Tabla 10. Asignación de parentesco para las 19 familias genotipificadas con el uso del Software Kingroup v.2. Se detalla el grado de parentesco (r) en relación a la hembra de cada nidada, considerando a la pareja social y a cada macho extra-pareja (cuando corresponde).

Hembra	Macho Social	Parentesco (r)	Macho EPP 1	Parentesco Macho EPP 1	Macho EPP 2	Parentesco Macho EPP 2	Macho EPP 3	Parentesco Macho EPP 3
RV3614	AA00321	0,36	Sin EPP					
RV3799	RR340	0,133	Sin EPP					
RV3604	RR328	0,038	Sin EPP					
RV3613	RV3619	0,89	RR5109	0,644	RV3703	0,367	RR328	0,28
RR5103	RR342	0,517	RV3259	0,083	RV3621	0,034	AA00322	0,073
AA00393	RV3245	0,335	RV3221	0,323	RV3616	0,538	RV3608	0,02
RR5107	RV3259	0,014	AA00321	0,968	RV3618	0,619		
RV3611	AA00322	0,982	RV3621	0,767	RV3616	0,245		
RV3612	RV3618	0,32	RR340	0,178	RV3259	0,441		
RV3623	RV3702	0,454	RV5101	0,957				
RV3605	RV3602	0,135	RV5101	0,125				
RV3603	RV3616	0,608	RV3703	0,062				
RR327	RV3221	0,919	RV3702	0,408				
AA00306	RR5109	0,008	RV3621	0,42				
RV3620	RV5604	0,485	RV3618	0,878				
RV3622	RV3703	0,705	RV3616	0,912				
RV3601	RR5101	0,071	RV3608	0,005				
RV3615	RV3621	0,537	RV3245	0,74				
RV3617	RV3608	0,249	RR328	0,056				

Anexo 4

Tabla 11. Rasgos morfológicos evaluados en las parejas sociales de rayaditos. Para cada individuo, se detalla su número de anillo, sexo, peso (gr), el largo (mm) del tarso, del pico, ala, rectriz derecha e izquierda, y la simetría de rectriz (rectriz más larga/rectriz más corta)

ANILLO	SEXO	PESO	TARSO	PICO	ALA	RECTRIZ	RECTRIZ	SIMETRÍA RECTRIZ
						DER	IZQ	
RV3608	Macho	13.4	21	12.5	62	73	73	1.0000
RR327	Macho	12	21.3	12.8	64	82	82	1.0000
RV5604	Macho	13.6	20.5	13.1	59.5	70	66	1.1765
RV3609	Macho	11.9	19.8	11.9	61	69	68	1.0147
RV3616	Macho	13.4	19.9	14.5	62	63	63	1.0000
AA00322	Macho	12.1	20.4	12	60	71.5	69	1.0362
RV3245	Macho	12	20.5	13.8	61.5	55	59	1.0727
RR291	Macho	12.4	20.8	12.8	60	ND	70	ND
AA00321	Macho	13.2	20.8	13.8	61.5	72	70	1.0286
RV3259	Macho	12.5	21.1	11.1	62.5	70	ND	ND
RV3618	Macho	10.2	22.3	12.4	59.5	62	61	1.0164
RR342	Macho	12.6	20.1	15	60	61	ND	ND
RR340	Macho	13.2	20.6	15	63	ND	ND	ND
RR5101	Macho	13.2	20.9	13.1	61	82	79	1.0380
RV3602	Macho	14	20.5	14.2	61	74	71	1.0423
RR328	Macho	13.4	21.3	14.1	59	62	62	1.0000
RV3619	Macho	12	20.6	12	63	65.5	56	1.1696
RV3621	Macho	12.6	19.5	14.6	57	58	60	1.0345
RV3703	Macho	12.2	20.1	13.9	58.5	57	61	1.0702
RV3702	Macho	12.6	21.1	14.6	62	ND	63	ND
RR5109	Macho	ND	21	13.6	60	70	70	1.0000

RV3617	Hembra	11.2	20.1	12.3	58.5	65	ND	ND
RV3221	Hembra	11.4	20	11.5	61	75.5	75	1.0067
RV3620	Hembra	11.6	20	12.3	57	70	69	1.0145
RV3675	Hembra	11.7	20	12	59	ND	69	ND
RV3603	Hembra	11.2	19.7	13.6	59	70	70	1.0000
RV3611	Hembra	10.8	19.8	11	57.5	79	76	1.0395
AA00393	Hembra	11.2	19.3	13.2	59	80	78	1.0256
RR315	Hembra	11.6	20.7	11.1	59.5	80.5	80	1.0063
RV3614	Hembra	11.8	20	13.7	57	65	65	1.0000
RR5107	Hembra	11.8	19.7	13.9	59	70	65	1.0769
RV3612	Hembra	11.8	20	11.6	57.5	71.5	67	1.0672
RR5103	Hembra	12.6	20.8	12.6	62	70	ND	ND

RV3799	Hembra	12	19.9	12.9	57	74	ND	ND
RV3601	Hembra	10.9	19.4	14	54	68	67	1.0149
RV3605	Hembra	11.6	21.2	11.7	61	76	74	1.0270
RV3604	Hembra	11.4	19.7	14.1	58	ND	69	ND
RV3613	Hembra	10.6	20.5	11.3	56	71	67	1.0597
RV3615	Hembra	11.8	20.1	13.7	58	45	45	1.0000
RV3622	Hembra	10.8	19.7	13	56	ND	72	ND
RV3623	Hembra	11.2	20.2	12.1	57	61	61	1.0000
AA00306	Hembra	11.4	19.8	12	59	68	68	1.0000