

UCH-FC  
MAO-EBE  
P 739  
C.1



**CONDUCTA EXPLORATORIA Y PRESENCIA DE ENDOPARÁSITOS**

**EN *Zonotrichia capensis* (PASERIFORME: EMBERIZIDAE)**

Tesis  
Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De:

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

Facultad De Ciencias

Por

**YANINA DEL CARMEN POBLETE QUINTANILLA**

**NOVIEMBRE, 2012**

Director de Tesis Dr:

**RODRIGO A. VÁSQUEZ SALFATE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGISTER**

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

YANINA DEL CARMEN POBLETE QUINTANILLA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 21 de octubre de 2012.

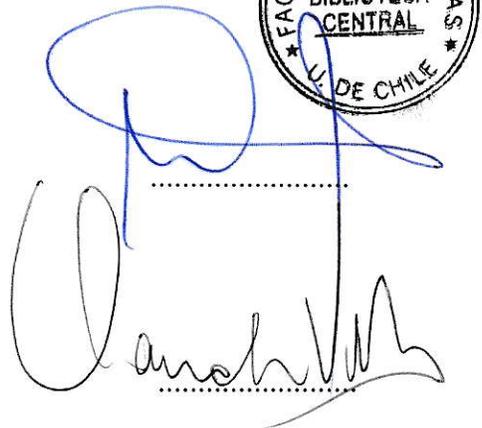
**Director de Tesis:**

Dr. Rodrigo Vásquez



**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

Dr. Mauricio Canals


Dr. Claudio Veloso



*Gracias...*



## Agradecimientos

Agradezco a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Conducta de la Universidad de Chile: Nasrim Butler, Verónica Quirici, Víctor Gutiérrez, Cristóbal Venegas, Enrique Bazán, Pablo Veas, Daniel Medina, Carolina Saavedra, Ivania Cotorás, Andrea Caiozzi, Cristian Celiz, Gabriel Cataño, Javiera Pantoja, Javiera Lagos, Ronny Zúñiga y Cristian Villalobos, por contribuir de forma desinteresada con experiencia, consejos, apoyo e ideas que enriquecieron enormemente tanto esta investigación, como también mi formación profesional y humana. Agradecer también al Dr. Elie Poulin y a la gente del Laboratorio de Ecología Molecular por estar siempre dispuestos a colaborar con su experiencia; a los Dr. Santiago Merino y Francisco Javier Martínez por su gran acogida y valiosas enseñanzas recibidas durante mi estadía en el Laboratorio de Ecología Evolutiva del Museo de Ciencias Naturales de Madrid y en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad De Alcalá de Henares respectivamente; al Dr. Fernando Fredes y al equipo del laboratorio de Medicina Preventiva de la Universidad de Chile por generar un grato ambiente para el desarrollo de parte de esta investigación. Agradecer de forma especial a mi tutor Rodrigo Vásquez, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de aprender de su experiencia y crecer como profesional y como persona. Además, quisiera agradecer de forma muy especial a Cristian Flores mi compañero, por su amor y apoyo incondicional, a mis padres y hermano por sus sabios consejos, a mis amigos por los gratos momentos de relajación y en particular a mi amiga Daniela Corvalán por su cariño y compañía.

Quisiera agradecer también a la Fundación BBVA (proyecto BIOCON-06/109) que financió mis estudios de magister, al Instituto de Ecología y Biodiversidad (proyecto ICM-P05-002, PFB-23-CONICYT) y al proyecto Fondecyt 1090794 (RAV) que junto con la Fundación BBVA financiaron íntegramente este proyecto. Además quisiera agradecer a la Escuela de Postgrado, que a través de la Beca de Estadías Cortas de Investigación en el Extranjero, financió mi estancia en el Laboratorio de Ecología Evolutiva del Museo de Ciencias Naturales de Madrid (Dr. Santiago Merino) y en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Alcalá de Henares (Dr. Javier Martínez), instancia que significó una importante contribución al desarrollo de este proyecto y a mi formación científica.

## Índice de materias

Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
<b>Resumen</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract</b>	<b>x</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>6</b>
-Área de estudio	6
-Toma de Muestras	6
-Análisis conductual	7
-Identificación de sexo	8
-Detección de hemoparásitos en frotis sanguíneos	9
-Detección de hemoparásitos desde tarjetas FTA	10
-Detección e identificación de enteroparásitos	11
-Análisis estadísticos	12
<b>Resultados</b>	<b>13</b>
-Conducta exploratoria en <i>Zonotrichia capensis</i>	13
-Análisis parasitológico	18
-Conducta exploratoria y su relación con la presencia de parásitos	18
<b>Discusión</b>	<b>22</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>26</b>

## Lista de tablas

*Tabla 1.* Combinación de partidores (Forward-Reverse), temperatura de hibridación para cada PCR, tamaño, secuencia y grupo taxonómico que amplifica.

*Tabla 2.* Variables componentes junto a sus eigenvalue y porcentaje de varianza.

*Tabla 3.* Número de individuos infectados y parásitos detectados.

*Tabla 4.* Número de individuos infectados y parásitos detectados en 95 muestras de sangre en *Z. capensis*.

## Lista de figuras

*Figura 1.* Diferencias significativas en el largo del ala (media  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

*Figura 2.* Diferencias significativas en el largo de la cola (media  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

*Figura 3.* Diferencia significativa en el largo total (medias  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

*Figura 4.* Diferencias significativas en el peso (medias  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

*Figura 5.* Diferencias significativas en la conducta exploratoria (medias  $\pm$  EE ) entre machos (n= 17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

*Figura 6.* Diferencias en el tiempo de latencia (medias  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

*Figura 7.* Conducta exploratoria y parasitismo (medias  $\pm$  DE). Los datos muestran a individuos parasitados (n=3) y no parasitados (n=23).

*Figura 8.* Latencia y parasitismo (medias  $\pm$  DE). Los datos muestran a individuos parasitados (n=3) y no parasitados (n=23).

*Figura 9.* Índice de diversidad de exploración y parasitismo (medias  $\pm$  DE). Los datos muestran a individuos parasitados (n=3) y no parasitados (n=23).

*Figura 10.* Frecuencia de desplazamiento y parasitismo (medias  $\pm$  DE). Los datos muestran a individuos parasitados (n=3) y no parasitados (n=23).

*Figura 11.* Frecuencia de indagación y parasitismo (medias  $\pm$  DE). Los datos muestran a individuos parasitados (n=3) y no parasitados (n=23).

## Resumen

La conducta exploratoria representa una medida de la tendencia natural de búsqueda o rechazo a la novedad. La intensidad de este tipo de comportamientos puede favorecer el riesgo de adquirir infecciones parasitarias. Se espera que los individuos más exploradores indaguen un mayor número de sitios y por lo tanto, adquieran una mayor cantidad de enteroparásitos. En cambio, los individuos menos exploradores al permanecer más tiempo en lugares de reposo y/o dormitorios, estarían más expuestos al ataque de vectores como pulgas, garrapatas, piojos y/o mosquitos y por lo tanto, presenten una mayor cantidad de hemoparásitos. En el presente estudio, caracterizamos la conducta exploratoria y la presencia de hemoparásitos y de parásitos intestinales en 26 individuos adultos de la especie *Zonotrichia capensis* presentes en el sector precordillerano de Cantalao (33°27'45" S; 70° 30'40" O; 978 m s.n.m.), Región Metropolitana. El análisis conductual reveló que los machos fueron significativamente más exploradores que las hembras. El análisis hemoparasitológico permitió detectar la presencia de parásitos del género *Isospora* y los haplotipos ChP2 y ChH6 de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*, respectivamente. No se detectaron parásitos en heces. La prevalencia de parásitos en la población fue de 4,2%, lo cual resultó ser insuficiente para poder establecer una relación entre conducta exploratoria y presencia de parásitos.

## Abstract

Exploratory behavior is a measure of the natural tendency to search for novelty. The intensity of this behavior may promote the risk of acquiring parasitic infections. It is expected that more exploratory individuals may visit a greater number of sites and therefore acquire a greater amount of enteroparasites. In the other hand, less exploratory individuals may stay longer in resting places or roosts, and hence they would be more prone to be infected by vectors such as fleas, ticks, lice and/or mosquitoes, and therefore, present a greater amount of blood parasites. In the present study, we characterized the exploratory behavior and the presence of blood parasites and intestinal parasites in 26 adult individuals of the avian passerine *Zonotrichia capensis*, captured in pre-mountain range at Cantalao (33° 27' 45"S, 70° 30' 40" W; 978 m a.s.l.), Santiago Metropolitan Region. The behavioral analysis revealed that males were significantly more exploratory than females. Hemoparasitologic analysis allowed to detect the presence of parasites of the genus *Isospora* and haplotypes CHP2 and ChH6 of *Plasmodium* and *Haemoproteus* genera, respectively. No parasites were detected in feces. Parasite prevalence in the population was 4.2%, which proved to be insufficient to establish a relationship between exploratory behavior and parasite abundance.

## Introducción

Generalmente individuos de distintos taxa, presentan variabilidad conductual intraespecífica en relación a la forma en que responden a situaciones novedosas en su medio (Wilson et al. 1994, Dingemanse et al. 2002). Esta variabilidad conductual, se expresa en diversos comportamientos, incluidos aquellos relacionados con la obtención de información del medio, como la conducta exploratoria. La conducta exploratoria es definida como cualquier comportamiento que proporciona información al animal, ya sea sobre objetos, sitios de alimentación, cualidades del territorio, refugio, rutas de escape y potenciales parejas, entre otros ( e.g., Birker & Archer 1983, Beauchamp 1999, Mettke-Hotmann et al. 2002, Van Oers et al. 2003, Garamszegi et al. 2008, Minderman et al. 2009). En un ambiente cambiante, los individuos más exploradores podrían beneficiarse, debido a que lograrían obtener mayor información sobre el estado y/o variabilidad de los recursos disponibles (Tebbich et al. 2008). Sin embargo, la conducta exploratoria también incurre en costos para el individuo, aumentando por ejemplo, el riesgo de encontrarse con depredadores (Sih et al. 2004) principalmente, cuando la exploración ocurre en una localidad expuesta o cuando el animal presenta una baja tasa de vigilancia anti-depredatoria (véase Johnson 1989, Lima & Dill 1990). Además, en varias especies, se ha documentado que la conducta exploratoria aumenta el riesgo de adquirir enteroparásitos (van der Veen 2003, James et al. 2008, Brown et al. 2009), principalmente debido a que los animales más exploradores indagan en una mayor cantidad de sitios donde además pueden beber y alimentarse, a diferencia de los

individuos menos exploradores que estarían expuestos a un menor número de sitios. Por esta razón, se espera que la conducta exploratoria se relacione positivamente con la presencia de enteroparásitos en los individuos, es decir, animales más exploradores se verían enfrentados con una mayor diversidad de sitios y organismos, por lo cual tendrían mayor cantidad de enteroparásitos. En cambio animales menos exploradores, indagarían un menor número de sitios y permanecerían más tiempo en reposo, por lo que es probable que sean atacados por un mayor número de vectores y por lo tanto presenten una mayor cantidad de hemoparásitos.

Las investigaciones en comportamiento animal sobre conductas exploratorias se han focalizado frecuentemente en aves como modelo de estudio (e.g., Dingemanse et al. 2004, Minderman et al. 2009, van Dongen et al. 2010), destacándose la gran variabilidad de comportamientos presentes en ellas (e.g., Mettke-Hotmann et al. 2002, Dingemanse et al. 2004, Quinn et al. 2009). Nuestra investigación utiliza como modelo de estudio a la especie *Zonotrichia capensis* (Chincol). Esta especie presenta una amplia distribución latitudinal y altitudinal, que abarca desde Chiapas en México hasta Cabo de Hornos en Chile, entre los 0 a 5300 metros de altitud. Habita desiertos costeros, bosques húmedos y esclerófilos, zonas urbanas y pastizales (Chapman 1940, Davis 1971, Stiles & Skutch 1989, Novoa et al. 1996), siendo una de las especies más comunes en América Latina (Fotheringham 1995).

En esta especie se han realizado varias investigaciones que han demostrado la existencia de un mayor número de vocalizaciones en poblaciones tropicales (Fotheringham 1995), mayor agresividad y territorialidad relacionadas con mayores niveles de testosterona (Moore et al. 2002, Wingfield et al. 2007, Lynn et al. 2009), variabilidad intra e inter

poblacional en conductas exploratorias (Van Dongen et al. 2010), mayor pigmentación del plumaje en individuos más dominantes (Chaine et al 2011), entre otras. Sin embargo, la relación entre conducta exploratoria y presencia de parásitos en la especie no ha sido documentada.

La adquisición de parásitos se relaciona directamente con la distribución espacial de sus vectores (Martínez-De La Puente et al. 2009). Los principales vectores de parásitos en aves, son artrópodos de hábitos hematófagos, pertenecientes a los órdenes Siphonáptera (pulgas), Acarina (garrapatas), Phthiraptera (piojos) y Díptera (mosquitos) (Merino & Potti 1995, González-Acuña 2008). Dentro de Phthiraptera, los piojos se caracterizan por desarrollar todo su ciclo biológico sobre el hospedador (González-cuña 2008). Las pulgas y garrapatas generalmente habitan en el nido durante las primeras etapas de desarrollo y cuando son adultas, regresan solamente para alimentarse (Harriman & Alisauskas 2010, Clayton et al. 2010). En cambio los mosquitos, desarrollan las primeras etapas de su ciclo biológico en el agua y los adultos solamente buscan al hospedero para alimentarse (Soum et al. 2009). Los patrones de alimentación de estos vectores, se relacionan directamente con aspectos temporales y espaciales de la actividad de las aves, atacándolas cuando éstas se encuentran relativamente inactivas (Soum et al. 2009).

Considerando estos antecedentes, es probable que las aves menos exploradoras, permanezcan más tiempo en lugares donde realizan menor actividad, como nidos, dormideros y/o perchas, y por lo tanto, estén más expuestas al ataque de vectores, aumentando el riesgo de adquirir parásitos sanguíneos.

Las principales especies de hemoparásitos, transmitidas por estos vectores, pertenecen al Orden Haemosporidia, que incluye a los géneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Leucocytozoon*, los cuales han sido habitualmente encontrados en aves silvestres (e.g., Shutler et al. 1995, Merino et al. 2008). Los Haemosporidios son parásitos intracelulares pertenecientes al grupo de los protozoos, y se caracterizan por destruir a los eritrocitos (en el caso de los géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium*) y leucocitos (en el caso de *Leucocytozoon*), y causar enfermedades en el hospedero (Quillfeldt et al. 2010). Los Haemosporidios presentan una distribución cosmopolita y son muy abundantes en las aves, encontrándose en el 68% de las 3800 especies que han sido examinadas (Friend et al. 1999). Otro grupo de parásitos intracelulares que podemos encontrar en aves, pertenecen a los órdenes Haemogregarinidae y Piroplasmolida. Estos órdenes incluyen a los géneros *Hepatozoon* y *Babesia* respectivamente. Ambos son transmitidos al hospedero principalmente por garrapatas (Quillfeldt et al. 2010). Algunos parásitos sanguíneos extracelulares como *Trypanosoma* y microfilarias también han sido detectados en aves, generalmente son transmitidas por mosquitos o moscas (Silveira et al. 2010).

Varias investigaciones, han explorado los efectos negativos de los parásitos sanguíneos en las aves (Garvit et al. 2006). Algunos estudios sugieren que estos parásitos en condiciones naturales reducen la sobrevivencia de las aves (Nordling et al. 1998, Møller & Nielsen 2007, Marzal et al. 2008). Los parásitos sanguíneos, además generan un fuerte impacto en el comportamiento reproductivo de las aves (Møller et al. 2004). Por ejemplo, una mayor carga parasitaria retarda el inicio de la nidada (Allander & Bennett 1995), incrementa la probabilidad de deserción de nidada (Sanz et al. 2001) y reduce el

tamaño de la nidada, disminuyendo la eclosión y el éxito de los volantones (Merino et al. 2000, Sanz et al. 2001, Marzal et al. 2005). Las infecciones producidas por parásitos sanguíneos en aves, también se relacionan con bajas reservas de grasa, reducción en la masa corporal (Garvit et al. 2006) y menor pigmentación en el plumaje (Hõrak et al. 2001).

Por otro lado, a diferencia de los parásitos sanguíneos, los parásitos intestinales o enteroparásitos son incorporados por vía oral, a través del consumo de sus formas infectantes en agua y/o alimentos, muchas veces durante las conductas de forrajeo que involucran el muestreo de diversas localidades y/o micrositios (Sánchez 2003). Los principales enteroparásitos corresponden a protozoos, nemátodos, céstodos y tremátodos (Pelayo 2001). Considerando estos mecanismos de infección, es probable que los animales más exploradores estén más expuestos a la adquisición de este tipo de parásitos. Las investigaciones en relación a los costos asociados a enteroparásitos, se han desarrollado principalmente en especies de importancia económica, siendo escasos los estudios sobre su impacto en fauna silvestre (Hinojosa & González-Acuña 2005, Hughes et al. 2008). Sin embargo, la evidencia empírica existente, sugiere que estos parásitos pueden afectar el estado de salud, la fecundidad, sobrevivencia y conducta de forrajeo de individuos de especies silvestres (Gunn & Irvine 2003, Irvine 2006, Hughes 2008).

En la presente tesis se caracterizó la conducta exploratoria y la parasitosis presentes en una población de *Z. capensis*, con el fin de establecer una relación entre la abundancia de parásitos y la conducta exploratoria.

## **Materiales y métodos**

### Área de estudio

La recolección de muestras se desarrolló durante los meses de marzo y abril del año 2011 en el sector pre-cordillerano de Cantalao (33°27'45" S; 70° 30'40" O; 978 m s.n.m.), Región Metropolitana. El sector se encuentra inserto en un bioma de matorral característico de las zonas mediterráneas. La vegetación típica del lugar corresponde a árboles y arbustos esclerófilos (Donoso 1982). En el sector se pudo detectar la presencia de una amplia variedad de aves silvestres, como chercán, tijeral, cachudito, fio fio; canastero, chincol, loica, carpinterito, tórtola, codorniz, entre otras.

### Toma de muestras

Las aves fueron capturadas con redes niebla y trasladadas a un aviario experimental (270 cm de longitud x 150 cm de ancho x 150 cm de alto) diseñado para caracterizar la conducta exploratoria frente a un ambiente nuevo (véase Van Dongen et al. 2010). Luego de un período de aclimatación de 5 minutos, periodo durante el cual el ave se encontraba dentro del aviario en una jaula pequeña (20 x 30 cm) cubierta con una lona, se registraron durante 10 minutos las conductas de los individuos dentro del aviario, utilizando una grabadora de voz digital (Olympus modelo VN-960PC).

Finalizado el experimento, se procedió a revisar el plumaje de las aves para detectar parásitos externos. Posteriormente, se realizaron algunas mediciones morfométricas

(largo del culmen, tarso, ala, cola, largo total y peso) y se tomó una pequeña muestra de sangre desde la vena alar con la cual se preparó un frotis de capa fina con portaobjeto, el cual fue fijado con etanol absoluto. Una porción de la sangre extraída fue almacenada en tarjetas FTA para un posterior análisis genético-molecular, con el fin de evaluar la presencia de parásitos sanguíneos (véase e.g., Merino et al. 2008).

Adicionalmente se revisó la superficie del sector de aclimatación del aviario, con el fin de recolectar heces para un posterior análisis parasitológico. Esta superficie de material plástico fue removida y reemplazada cada vez que se introducía en la zona un individuo diferente. Las heces también se obtuvieron durante la manipulación de las aves en la captura, traslado y medición. Las heces colectadas fueron almacenadas en alcohol al 70% en tubos Eppendorf.

### Análisis conductual

Las grabaciones de audio sobre el registro conductual de los animales obtenidas en el aviario fueron analizadas con el programa JWatcher 1.0 (Macquarie University and UCLA, Australia), el cual permitió obtener la frecuencia y duración de las conductas registradas. Se registraron las siguientes variables dependientes obtenidas del análisis conductual:

-Latencia: Tiempo que demora el individuo en entrar al aviario experimental desde el sector de aclimatación.

-Frecuencia: Número de veces que el individuo salta, vuela, utiliza perchas, picotea y/o escarba.

-Tiempo de desplazamiento: Tiempo que invierte en conductas de desplazamiento (i.e., saltar y volar).

-Tiempo de indagación: Tiempo que invierte en conductas como picotear y escarbar el terreno.

-Diversidad de exploración: Número de veces que visita cada parche o percha, obtenido con el índice de diversidad de Shannon (véase Midermann et al. 2009, Van Dongen et al. 2010).

### Identificación de sexo

Considerando que *Zonotrichia capensis* no presenta dimorfismo sexual aparente y que las características asociadas al canto o al desarrollo de la cloaca en los machos, no se presentan durante el período en el cual se recolectaron los datos, fue necesario sexar a los individuos utilizando técnicas moleculares. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad De Chile a cargo del Dr. Elie Poulin. Para la extracción de ADN desde las tarjetas FTA, se utilizó un Kit de extracción marca QIAGEN (Inc., Valencia, CA). Luego, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el gen CHD-W, ubicado en el cromosoma W de la hembra (hembras WZ) y el gen CHD-Z presente en el cromosoma Z (machos ZZ). Los partidores utilizados fueron P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') y P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') descritos por Griffith (1998). La reacción de PCR consistió en un volumen de 20 ul con 20 a 100 ng de ADN, en un mix que contenía 2 ul de Buffer - 1,5ul de MgCl - 0,8ul de cada partidore - 0,8ul de Dntps - 10,8 ul de agua

MILIQ y 0,3 ul de Ampli Taq (Invitrogen, Brasil). Los ciclos de reacciones en el termociclador consistieron en una etapa de activación de la polimerasa de 2 minutos a 95°C, 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos (temperatura de activación), 72°C por 30 segundos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 1 ciclo de 72°C por 4 minutos y 25°C por 5 minutos y una etapa de extensión final de 4°C por 10 segundos. Los fragmentos de ADN obtenidos después de los ensayos de PCR fueron cuantificados por comparación utilizando un marcador de ADN a través de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

#### Detección de hemoparásitos en frotis sanguíneos

Los frotis fijados con etanol absoluto en el campo, fueron teñidos con solución Giemsa con 10 partes de tampón fosfato pH 7,2 (1/10v/v) por 45 minutos según protocolo descrito en Merino et al. (2008b). Este procedimiento se realizó en el laboratorio de Conducta Animal de la Universidad de Chile.

La detección e identificación de parásitos sanguíneos desde estos frotis, se realizó en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC), junto al Dr. Santiago Merino. El procedimiento realizado consistió en recorrer la mitad de la preparación con el objetivo 10x, con el fin de detectar parásitos extracelulares. Posteriormente, para la detección de parásitos intracelulares, se escogieron 20 campos homogéneos en la otra mitad de la muestra, los cuales se observaron con el objetivo 40X. Frente a la presencia de parásitos, se utilizó el objetivo de inmersión para su identificación (Merino 1999).

## Detección de hemoparásitos desde tarjetas FTA

Los procedimientos descritos a continuación, se realizaron en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Alcalá de Henares, a cargo del Dr. Francisco Javier Martínez. Para la extracción de ADN, se obtuvo una pequeña porción de sangre (2 a 3 mm<sup>2</sup>) desde las tarjetas FTA. Posteriormente se preparó un mix con 250 ul de set buffer, 12,5 ul de SDS 10% y 2,62 ul de proteinasa K por cada muestra. Finalmente, las muestras se mantuvieron en agitación a 800g y 55°C durante toda la noche. Utilizando el método AMONIO-ACETATO se extrajo finalmente el ADN. Luego, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron diferentes genes mitocondriales de acuerdo al tipo de parásito sanguíneo esperado para esta especie (véase e.g., Martinez et al. 2009). En la tabla 1 se muestra la combinación de partidores, temperatura de hibridación (annealing) de cada uno de ellos, secuencias utilizadas, tamaño de los partidores y géneros que reconocen. La reacción de PCR consistió en preparar un volumen de 20 ul que contenía de 20 a 100 ng de ADN, 2 ul MgCl<sub>2</sub> - 1,2 ul de partidore forward y reverse (25 um) - 0,6 ul de Dnts - 13,4 ul agua MILIQ y 0,2ul AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los ciclos de reacciones en el termociclador consistieron en una etapa de activación de la polimerasa de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, Ta (dependiendo de la combinación de partidores usados), 72°C por 40 segundos y una extensión final de 2°C por 10 segundos.

Tabla 1 . Combinación de partidores (Forward-Reverse), temperatura de hibridación (annealing) para cada PCR, tamaño, secuencia y grupo taxonómico que amplifica.

Partidores		T de hibridación (°C)	Tamaño pb	Secuencia	Especie
Forward	Reverse				
PALU F	PALU R	54	19/21	GGG TCA AAT GAG TTT CTG G/ DGG AAC AAT ATG TAR AGG AGT	<i>Plasmodium, Haemoproteus</i>
LPLD	LPRD	58	20/20	CAT TCY ACW GGT GCA TCT TT/ CTG GAT GWG ATA ATG GWG CA	<i>Leucocytozoo</i>
HEP900F	HEP161 5R	54	25/19	GTC AGA GGT GAA ATT CTT AGA TTT G/ AAA GGG CAG GGA CGT AAT C	Varias especies

Los fragmentos de ADN obtenidos después de los ensayos de PCR fueron cuantificados por comparación utilizando un marcador de ADN a través de electroforesis en geles de acrilamida 2%. Los productos de PCR positivos fueron secuenciados con el secuenciador ABI 3130 XL (Applied Biosystems) del Servicio de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares.

#### Detección e identificación de enteroparásitos

El análisis parasitológico de las heces colectadas en el campo, se realizó en el Laboratorio de Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile, a cargo del Dr. Fernando Fredes. Para la detección de ooquistes y/o huevos presentes en las heces, se utilizó la técnica de flotación con el método de Willis-Molloy o de solución saturada de Cloruro de Sodio. Los resultados de la técnica de flotación fueron observados al microscopio con objetivos 10X y 40X con el fin de identificar a nivel de género los ooquistes presentes.

### Análisis estadísticos

Con el programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, USA) se realizó un análisis de componentes principales (ACP) entre las variables conductuales, con el fin de establecer variables componentes que nos permitieran cuantificar la conducta exploratoria de los individuos. Con el mismo programa se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con el fin de determinar diferencias morfológicas entre machos y hembras, análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar diferencias en la conducta exploratoria entre machos y hembras y finalmente se realizó la prueba de T y la prueba Kolmogorov-Smirnov para establecer diferencias en la conducta exploratoria entre individuos parasitados y no parasitados.

## Resultados

El análisis molecular para la identificación del sexo de los individuos nos permitió identificar a 17 machos y 9 hembras.

### Conducta exploratoria en *Zonotrichia capensis*

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) entre las siguientes variables: Tiempo de desplazamiento (TD), tiempo de indagación (TI) y latencia (L), obteniéndose dos variables componentes, las cuales denominamos: Exploración y Latencia, ya que estas conductas expresan la mayor parte de la varianza de cada variable componente (véase tabla 2). En la tabla 2 se muestran las variables componentes, los eigenvalue y el porcentaje de varianza representado por cada variable componente.

Tabla 2. Variables componentes junto a sus eigenvalue y porcentaje de varianza.

<b>Variables componentes</b>	<b>Eigenvalue</b>	<b>% varianza</b>	<b>Eigenvalue Acumulado</b>	<b>% varianza acumulado</b>
Latencia (L)	1,43	47,57	1,43	47,57
Tiempo de desplazamiento (TD)	1,00	33,43	2,43	81,00
Tiempo de indagación (TI)	0,57	18,98	3	100

Considerando el escaso dimorfismo sexual en la especie estudiada, se procedió a determinar posibles diferencias morfométricas entre machos y hembras. Se evaluó la normalidad de los datos morfométricos obtenidos en el campo (peso, largo del culmen, tarso, ala, cola y largo total). Posteriormente se realizaron análisis de varianza (ANOVA) considerando el sexo como variable categórica y los rasgos morfométricos como variables dependientes. El resultado de estos análisis muestra que los machos son significativamente más grandes que las hembras en relación al largo de las alas ( $P=0,000081$ ;  $F=22,44$ ;  $R^2=0,46$ ; media para machos  $76,47 \pm EE 0,75$  y hembras  $70,44 \pm EE 1,02$ ; figura 1), largo de la cola ( $P=0,00054$ ;  $F=15,9$ ;  $R^2=0,40$ ; media para macho  $60,20 \pm EE 0,63$  y hembras  $60,88 \pm EE 0,87$ ; figura 2), largo total ( $P=0,021$ ;  $F=6,07$ ;  $R^2=0,2$ ; media para machos  $143,88 \pm EE 1,22$  y hembras  $138,77 \pm EE 1,67$ ; figura 3) y peso ( $P=0,00054$ ;  $F=15,9$ ;  $R^2=0,40$ ; medias para machos  $20,78 \pm EE 0,2$  y hembras  $19,26 \pm EE 0,29$ ; figura 4).

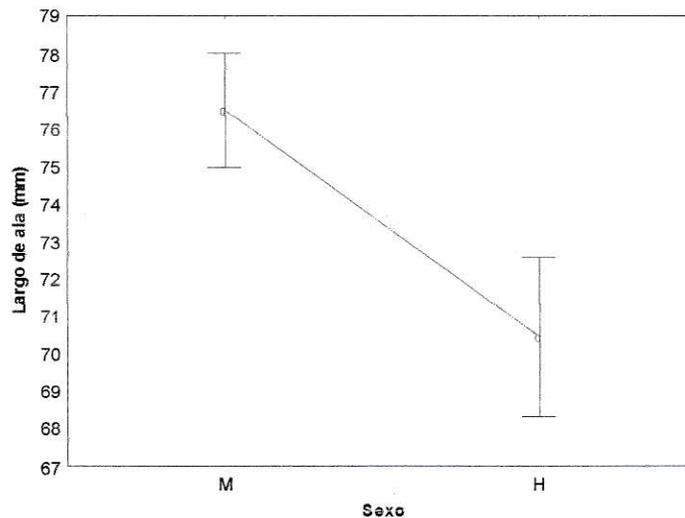


Figura 1. Diferencias significativas en el largo del ala (media  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

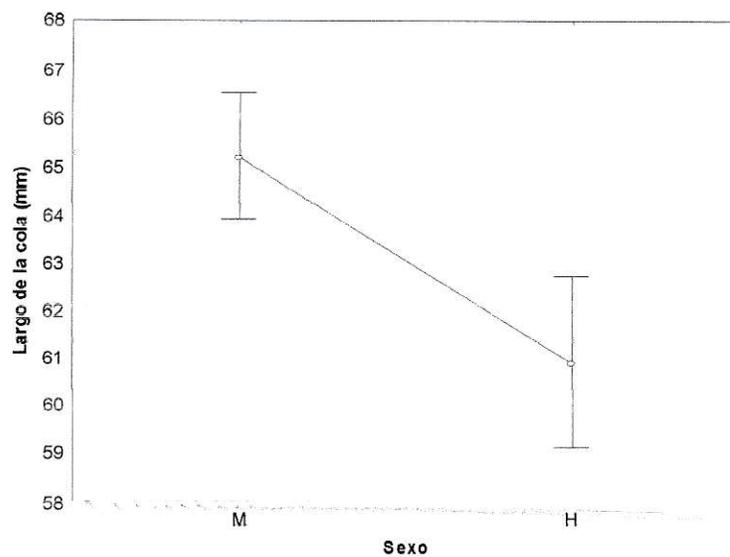


Figura 2. Diferencias significativas en el largo de la cola (media  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

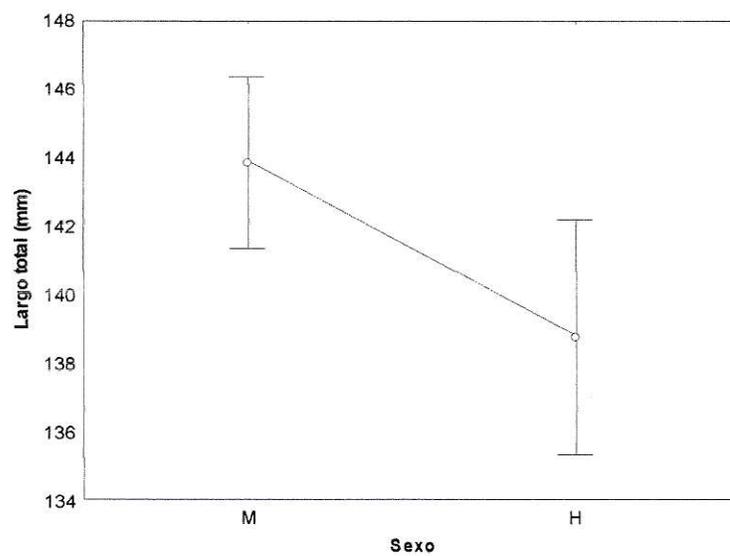


Figura 3. Diferencia significativa en el largo total (medias  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

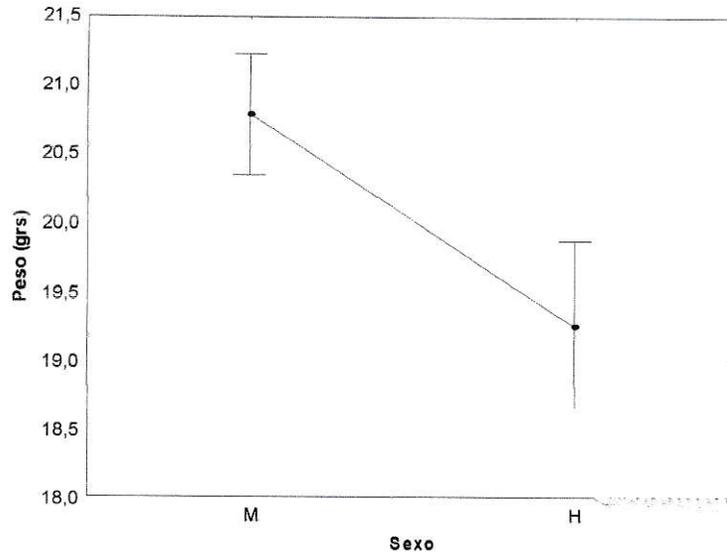


Figura 4. Diferencias significativas en el peso (medias  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

Posteriormente se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar si existen diferencias significativas en la conducta exploratoria entre machos y hembras. Se consideró como variable categórica el sexo, como variable dependiente la conducta de exploración y como covariables a los rasgos morfométricos. El resultado de este análisis muestra que los machos son significativamente más exploradores que las hembras y que el mayor tamaño total de los machos influye de forma significativa en esta relación ( $P=0,0039$ ;  $F=7,09$ ;  $R^2=0,33$ ; media para machos  $0,53 \pm EE 0,24$  y hembras  $-1,00 \pm EE 0,35$ ; figura 5). Además se muestra una tendencia de las hembras a tener periodos de latencia mayores que los machos ( $P=0,056$ ;  $F=2,6$ ;  $R^2=0,39$ ; media para machos  $-0,22 \pm EE 0,24$  y hembras  $0,42 \pm EE 0,36$ ; figura 6).

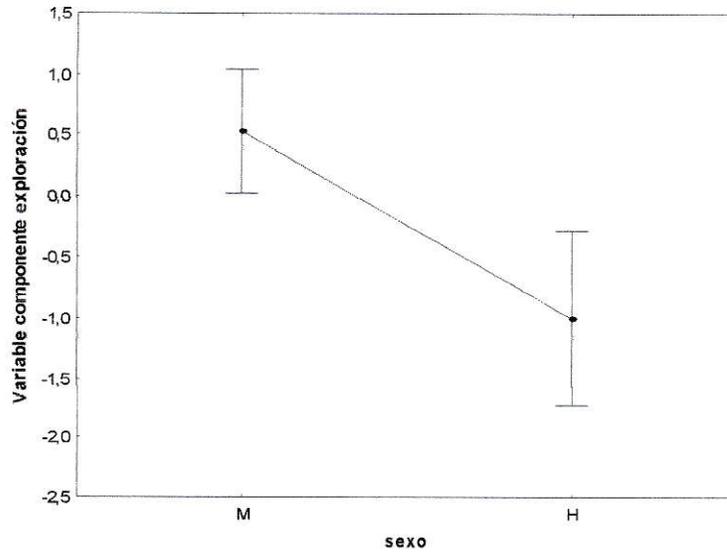


Figura 5. Diferencias significativas en la conducta exploratoria (medias  $\pm$  EE ) entre machos (n= 17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

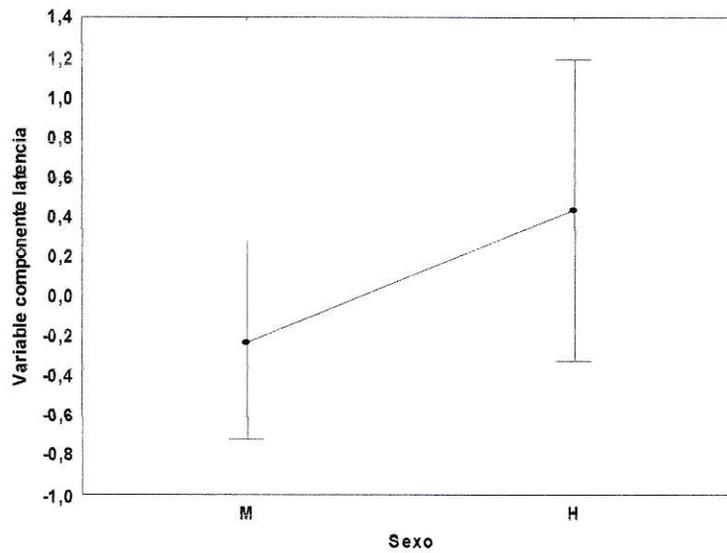


Figura 6. Diferencias en el tiempo de latencia (medias  $\pm$  EE) entre machos (n=17) y hembras (n=9) de *Z. capensis*.

### Análisis parasitológico

Durante las revisiones realizadas a los animales capturados en el campo no se detectaron ectoparásitos.

La observación de frotis sanguíneos y el posterior análisis genético-molecular permitió detectar la presencia de parásitos del género *Isospora* y los haplotipos ChP2 y ChH6 de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*, respectivamente (tabla 3).

Tabla 3. Número de individuos infectados y parásitos detectados.

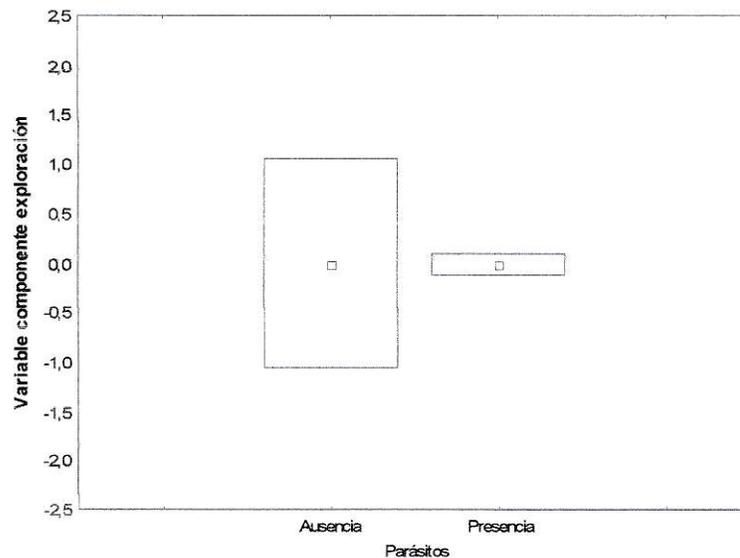
N° de individuos infectados	Género
1	<i>Plasmodium</i> (ChP2)
1	<i>Haemoproteus</i> (ChH6)
1	<i>Isosporas</i>

La técnica de flotación y posterior revisión al microscopio en busca de parásitos intestinales presentes en heces, no arrojó resultados positivos.

### Conducta exploratoria y su relación con la presencia de parásitos

Se consideraron las variables componentes exploración y latencia como variables dependientes, y la presencia y/o ausencia de parásitos como variables categóricas independientes. No se encontró ninguna relación significativa con la variable componente exploración ( $P < 0,10$ ; media para individuos parasitados  $0,001 \pm$  DE 1,06 y no parasitados ( $0,1 \pm$  DE 0,10; figura 7) y con la variable componente latencia ( $P >$

0,10; media para individuos parasitados  $0,07 \pm DE 1,23$  y no parasitados  $-0,57 \pm DE 0,27$ ; figuras 8). Frente a estos resultados, se realizaron otras pruebas con otros indicadores de exploración como el índice de diversidad de exploración ( $P = 0,12$ ; media para individuos parasitados  $1,67 \pm DE 0,44$  y no parasitados  $1,61 \pm DE 0,24$ ; figura 9), la frecuencia de conductas asociadas al desplazamiento (saltar-volar) ( $P > 0,10$ ; media para individuos parasitados  $129 \pm DE 86,66$  y no parasitados  $155,08 \pm DE 84,78$ ; figura 10) y la frecuencia de conductas de indagación (escarbar con patas y pico) ( $P > 0,10$ ; media para individuos parasitados  $8,86 \pm DE 13,74$  y no parasitados  $0,33 \pm DE 0,57$ ; figura 11). Sin embargo, tampoco se encontró una relación significativa entre estas variables con la presencia y/o ausencia de parásitos.



*Figura 7.* Conducta exploratoria y parasitismo (medias  $\pm DE$ ). Los datos muestran a individuos parasitados ( $n=3$ ) y no parasitados ( $n=23$ ).

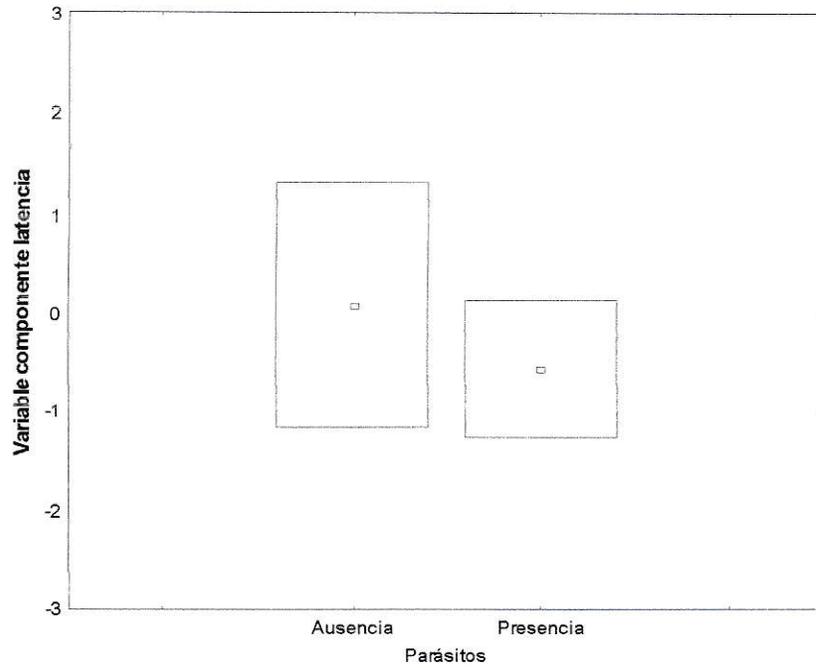


Figura 8. Latencia y parasitismo (medias  $\pm$  DE). Los datos muestran a individuos parasitados (n=3) y no parasitados (n=23).

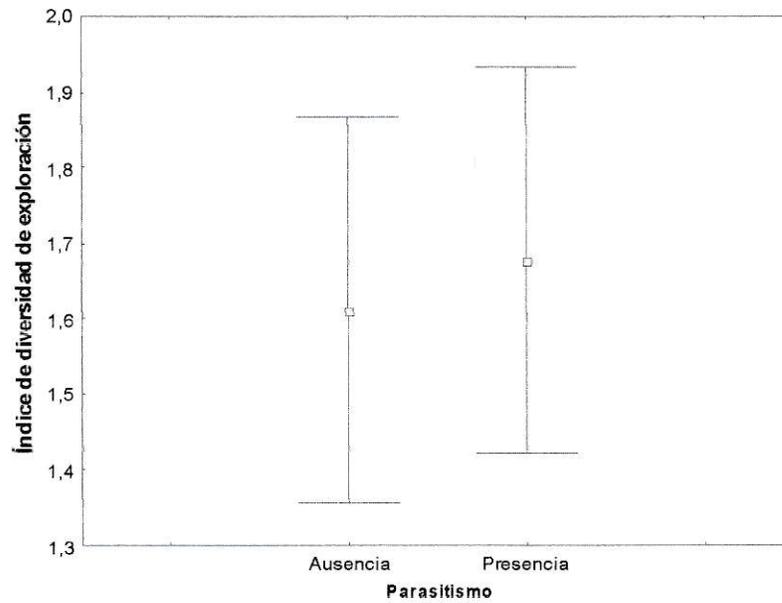


Figura 9. Índice de diversidad de exploración y parasitismo (medias  $\pm$  DE). Los datos muestran a individuos parasitados (n=3) y no parasitados (n=23).

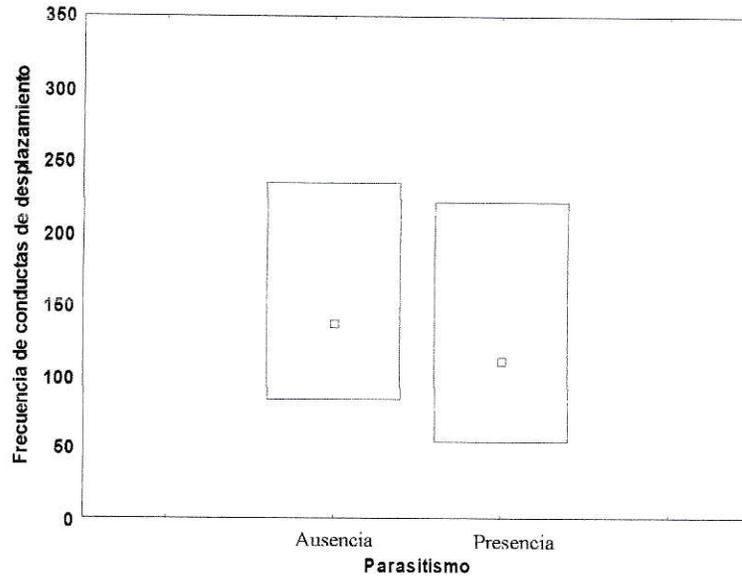


Figura 10. Frecuencia de desplazamiento y parasitismo (medias  $\pm$  DE). Los datos muestran a individuos parasitados (n=3) y no parasitados (n=23).

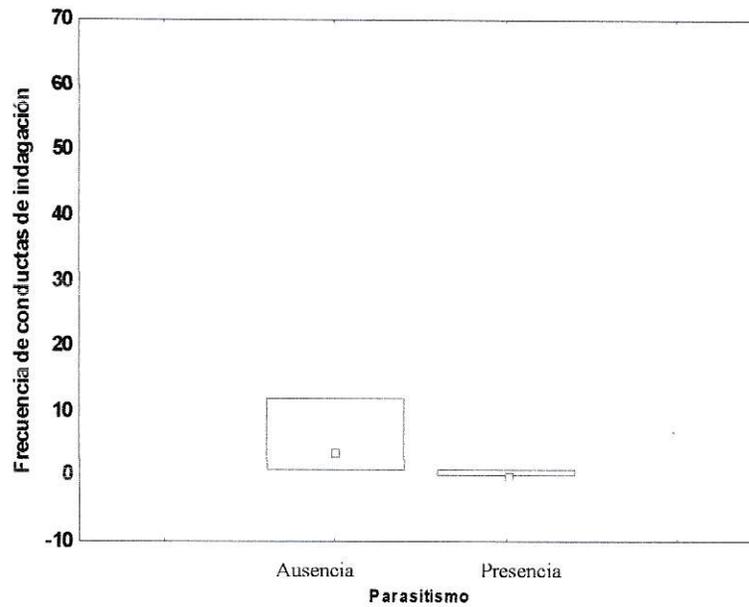


Figura 11. Frecuencia de indagación y parasitismo (medias  $\pm$  DE). Los datos muestran a individuos parasitados (n=3) y no parasitados (n=23).

## Discusión

Los efectos del parasitismo sobre el comportamiento han sido ampliamente investigados en aves (e.g., Allander & Bennett 1995, Sanz et al. 2001, Møller et al. 2004). Sin embargo, cómo la conducta exploratoria puede influir en la adquisición de infecciones parasitarias ha sido escasamente documentada (Dunn et al. 2011). En *Zonotrichia capensis* se han realizados varias investigaciones que abarcan diversos aspectos de su biología, sin embargo, son escasas las investigaciones que caracterizan a la comunidad parasitaria de esta especie en Chile, lo cual es fundamental, considerando que estas aves podrían transformarse en reservorio de enfermedades que pueden afectar seriamente a numerosas especies susceptibles, vulnerables y en peligro de extinción con las cuales coexisten en un amplio territorio.

En este estudio detectamos la presencia de 2 haplotipos pertenecientes a los géneros *Plasmodium* (ChP2) y *Haemoproteus* (ChH6). El haplotipo ChH6 ha sido detectados anteriormente en individuos de *Z. capensis* presentes en Rinconada de Maipú (RM) y Pantanillo (VII Región) (Merino et al. 2008). Además este haplotipo ha sido encontrado en otras especies y sitios de estudio, como *Troglodytes musculus* (chercán) y *Elaenia albiceps* (Fiofio) en Pantanillo (VII Región), *Turdus falcklandii* (Tordo), *Elaenia albiceps* y *Aphrastura spinicauda* (Rayadito) en Ancud (X Región) y *Elaenia albiceps* en Isla Navarino (XII Región). El haplotipo ChP2 ha sido reportado solamente en *Turdus falcklandii* en Ancud (Merino et al. 2008). Además se encontró un individuo de *Z. capensis* de la población en estudio infectado con *Isospora*, parásito muy común en

la familia Emberizidae (Balthazar et al. 2008).

Considerando que en las muestras obtenidas (n=26) solamente encontramos 3 individuos infectados, se calculó la prevalencia de parásitos presente en la población a través de la observación de frotis sanguíneos. El análisis se realizó en el Museo de Ciencias Naturales de Madrid, a cargo del Dr. Santiago Merino. Se observó un total de 95 frotis pertenecientes a la especie, obtenidos durante el año 2011 como parte de otros proyectos de investigación (R. Vázquez, datos no publicados). De los 95 frotis observados, se detectaron 4 con hemoparásitos (Tabla 4). La prevalencia de parásitos sanguíneos en la zona estudiada fue de 0,042 o sea el 4,2 % de los individuos muestreados.

Tabla 4. Número de individuos infectados y parásitos detectados en 95 muestras de sangre en *Z. capensis*.

Nº de individuos infectados	Género
1	<i>Plasmodium</i>
3	<i>Haemoproteus</i>

Con esta información pudimos corroborar que la parasitosis en el lugar es baja. Por esta razón, no fue posible rechazar la hipótesis nula. Sin embargo, este resultado no significa necesariamente que la relación entre conducta exploratoria y presencia de parásitos no exista en otras poblaciones. En canastero común se ha documentado que las hembras más exploradoras tienen una mayor carga hemoparasitaria (Dunn et al. 2011). Además en ardillas se encontró que los machos más audaces (donde la variable audacia está definida por mayor grado de exploración, trapabilidad, nivel de actividad y capacidad de lucha al ser manipulado) presentan una mayor carga enteroparasitaria, en relación con

los menos audaces (Pettersson et al. 2011).

La baja parasitosis encontrada en esta población, podría estar relacionada con las condiciones del sector, el cual se caracteriza por ser un lugar seco, sin un afluente o caudal de agua que pudiera generar las condiciones apropiadas para el desarrollo de ciertos vectores como mosquitos y zancudos. Además el lugar se encuentra inserto en una zona protegida, libre de escombros u otros artefactos que pudieran transformarse en zonas de crianza artificial por la acumulación de agua durante la estación lluviosa.

No se realizaron revisiones de los nidos, por lo tanto, desconocemos la presencia de vectores como pulgas, garrapatas y piojos en dichos lugares. Sin embargo, estos tipos de parásitos pueden ser encontrados directamente sobre los animales. Sin embargo, durante las revisiones realizadas a los individuos capturados no se detectó su presencia. Es probable que mientras el sector se encuentre protegido y alejado de las zonas urbanas, sus habitantes se encuentren escasamente expuestos a infecciones de este tipo.

Por otro lado se pudo corroborar la existencia de dimorfismo sexual asociado al tamaño corporal. Se encontró que los machos son significativamente más grandes que las hembras. Sin embargo, el dimorfismo en esta especie es bastante discreto. Este grado de dimorfismo es frecuente en especies con sistemas sociales aparentemente monógamos y donde el cuidado parental es compartido por el macho y la hembra (Moreno et al. 2007). *Zonotrichia capensis* usualmente tiene este tipo de sistema reproductivo (Chapman, 1940, Miller & Miller 1968, Bush et al 2004, Lynn et al. 2009). Sin embargo, eventos esporádicos de poliginia y poliandria han sido reportados para la especie (Miller & Miller, 1968, Smith, 1978).

En relación a la conducta exploratoria hemos encontrado que los machos son

significativamente más exploradores que las hembras. Si bien en este estudio solamente evaluamos este rasgo de la personalidad, otras investigaciones han caracterizado otros comportamientos de *Z. capensis*. Por ejemplo, se ha descrito que los machos son mucho más territoriales que las hembras, defendiendo su territorio de forma agresiva frente a la llegada de otros machos adultos, en cambio las hembras muestran un comportamiento territorial muy por debajo del desplegado por los machos (Bush et al. 2004). Por lo tanto, los machos adultos deben ser lo suficientemente exploradores para adueñarse de un territorio de calidad, que les asegure sobrevivencia, oportunidades de reproducción y resguardo de la nidada. Posteriormente deberán proteger este territorio y mantenerse como residentes en él. Esta condición generalmente se mantiene a lo largo del año (Moore et al. 2004) y sería ventajosa para los individuos ya que no gastarían energía en buscar y disputar un nuevo territorio durante cada época reproductiva (Bush et al 2004). Además se piensa que esta condición favorece la obtención de pareja (Kunkel 1974) y le permitiría mantener un estatus social sin la necesidad de enfrentarse constantemente otros individuos (Bush et al. 2004). Otros estudios señalan que los individuos más exploradores dispersan más (Armitage & van Vuren 2003), son competitivamente superiores (Sundström et al. 2004) y preferidos por las hembras (Godin & Dugatkin 1996). Sin embargo, se encontrarían en constante riesgo de adquirir parásitos, lo cual generaría un compromiso que afectaría su adecuación biológica (Peterson et al 2011).

A pesar de que no se pudo establecer una relación entre conducta exploratoria y presencia de parásitos, nuestro estudio proporciona los primeros antecedentes sobre la parasitosis presente en la población y contribuye directamente al conocimiento del comportamiento de *Z. capensis*.

## Bibliografia

Allander K. & Bennett G.F. 1995. Retardation of Breeding Onset in Great Tits (*Parus major*) by Blood Parasites. *Functional Ecology* . 9: 677-682

Armitage K.B. & Van Vuren D.H. 2003. Individual differences and reproductive success in yellow-bellied marmots. *Ethology Ecology & Evolution*. 15, 3: 207-233.

Balthazar M. C., Berto B.P., Flausino W. & Lopes C.G.W. 2008. *Isospora ticoticoi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Rufous collared Sparrow *Zonotrichia capensis* in South America. *Acta Protozoologica*. 48: 347–351

Beauchamp G. 1999. Individual differences in activity and exploration influence leadership in pairs of foraging zebra finches. *Behaviour*. 137; 301-314

Birke, L. I. A. & Archer, J. 1983. Some issues and problems in the study of animal exploration. In: *Exploration in Animals and Humans* 1-21. New York: Nostrand Reinhold.

Bush S.D., Wingfield J.C., & Moore I.T. 2004. Territorial aggression of a tropical passerine, *Zonotrichia capensis*, in response to a variety of Conspecific intruders. *Behaviour*, 141; 9. 1173-1188.

Chaine A., Tjernell K.A., Shizuka D., & Lyon B.E. 2011. Sparrows use multiple status

signals in winter social flocks. *Animal Behaviour*. 81; 447-453.

Chapman F., 1940. Post-glacial history of *Zonotrichia capensis*. *Bulletin American Museum of Natural History* . 77, 381–439.

Clayton D.H., Koop J.A.H., Harbison C.W., Moyer B.R. & Bush S.E. 2010. How Birds Combat Ectoparasites. *The Open Ornithology Journal*. 3: 41-71

Dingemanse N.J., Both C., Drent P.J., van Oers K. & Van Noordwijk A.J. 2002. Repeatability and heritability of exploratory behaviour in great tits from the wild. *Animal Behaviour*. 64:929–938.

Dingemanse N.J., Both C., Drent P.J. & Tinbergen J.M. 2004. Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. *Proceedings of the Royal Society London* 271, 847–852.

Dunn J.C., Cole E.F. & Quinn J.L. 2011. Personality and parasites: sex-dependent associations between avian malaria infection and multiple behavioural traits. *Behaviour Ecology Sociobiology* 65:1459–1471.

Fotheiungham J. 1995. Difference in singing behavior between Rufous-collared sparrows in Costa Rica and Northwestern Argentina. *The Condor* 97:821-826

Garamszegi L., Eens M. & Toro k. 2008. Bird reveal their personality when singing. *Plos One*. 3 : 7:e2647.

Garvin, M. C., Szell, C. C. & Moore, F. R. 2006. Blood parasites of nearctic-

neotropical migrant passerine birds during spring trans-gulf migration: impact on host body condition. *Journal of Parasitology*. 92: 990-996.

Godin, J.G.J. & Dugatkin L.A.. 1996. Female mating preference for bold males in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 10262-10267.

González & Acuña. 2008. Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos. Cap. Invertebrados terrestres. 145. 2º edición Conama. Santiago-Chile.

Griffiths R., Double M.C., Orr K. & Dawson J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7:1071–1075.

Gunn, A. & Irvine, R. J. 2003. Subclinical parasitism and ruminant foraging strategies – a review. *Wildlife Society Bulletin*. 31: 117–126.

Harriman, V.B. & Alisauskas R.T. 2010. Of fleas and geese: The impact of an increasing nest ectoparasite on reproductive success. *Journal of Avian Biology* . 41(5): 573-579.

Hinojosa-Sáez A. & Gonzalez-Acuña D. 2005. Estado actual del conocimiento de helmintos en aves silvestres de Chile. *Gayana*. 69(2):241-253

Hörak P. , Ots I, Vellau H., Spottiswoode C. & Møller A.P. 2001. Carotenoid- based plumage coloration reflects hemoparasite infection and local survival in breeding great tits. *Oecologia* 126:166–173

- Hughes J., Albon S. D., Irvine R. J. & Woodin S. 2009. Is there a cost of parasites to caribou? *Parasitology*. 136: 253–265.
- Irvine, R. J. 2006. Parasites and the dynamics of wild mammal populations. *Animal Science* 82: 775–781.
- James, C. T., Noyes, K. J., Stumbo, A. D., Wisenden, B. D. & Goater, C. P. 2008. Cost of exposure to trematode cercariae and learned recognition and avoidance of parasitism risk by fathead minnows *Pimephales promelas*. *Journal of Fish Biology*. 73; 2238-2248.
- Johnson M. L. 1989. Exploratory behaviour and dispersal: a graphical model. *Canadian Journal of Zoology*. 67: 2325-2328.
- Klein, S. L. 2004 Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology*. 26; 247–264.
- Kunkel P. 1974. Mating systems of tropical birds: the effects of weakness or absence of external reproduction-timing factors, with special reference to prolonged pair bonds. *Zeitschrift fur tierpsychologie-journal of comparative ethology*. 34: 265-307.
- Lima S.L. & Dill L.M. 1990. Behavioural decisions made under the risk of predation: A review and prospectum. *Canadian Journal of Zoology*. 68:619-640.
- Lynn S., Prince L., Schook D. and Moore I., 2009. Supplementary testosterone inhibits parental care in a tropically breeding sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Physiological and Biochemical Zoology* . 82: 699–708.

Martínez J., Martínez de la Puente J., Herrero J., Del Cerro S., Lobato E., Rivero de Aguilar J., Vásquez R.A. & Merino S. 2009. A restriction site to differentiate Plasmodium and Haemoproteus infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. *Parasitology*. 136:713–22

Martínez-De La Puente J., Merino S., Tomás G., Moreno J., Morales J., Lobato E, Talavera S. & Sarto i Monteys V. 2009. Factors affecting *Culicoides* species composition and abundance in avian nests. *Parasitology* 136: 1033–1041.

Marzal, A., de Lope, F., Navarro, C. & Møller, A. P. 2005 Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia*. 142:541–545.

Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J. & de Lope, F. 2008. Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *Journal of Evolutionary Biology* . 21: 979–987.

Merino S., & Potti J. 1995. High prevalence of haematozoa in nestlings of a passerine species, the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Journal of the American Ornithologists' Union*. 112: 1041–1043.

Merino S., Moreno J., Sanz J. J. & Arriero E. 2000 Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings Biological Sciences*. 267: 2507–2510.

Merino S., Vásquez R. A., Martínez J., Celis-Diez J., Martínez-De la Puente J. & Marin P. 2008. A Sarcocystid misidentified as *Hepatozoon didelphys*: molecular data from a parasitic infection in the blood of the southern Mo use Opossum (*Thylamys elegans*) from Chile. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 55(6):536-40.

Merino S., Moreno J., Vásquez R. A., Martínez J., Sánchez-Monsálvez I., Estades C. F., Ippi S., Sabat P., Rozzi R. & McGehee S. 2008. Haematozoa in forest birds from southern Chile: looking for latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. *Austral Ecology*. 33: 329-340.

Mettke-Hofmann C., Winkler H. & Leisler B. 2002. The significance of ecological factors for exploration and neophobia in parrots. *Ethology*. 108, 249-272.

Miller A.H. & Miller V.D. 1968. The behavioral ecology and breeding biology of the Andean sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Caldasia* 10; 83-154.

Minderman J., Reid J., M., Evans P. G. H. & Whittingham M. J. 2009. Personality traits in wild starlings: exploration behavior and environmental sensitivity. *Behavioral Ecology* 20: 830-837.

Møller A. P. & Nielsen J. T. 2007. Malaria and risk of predation: a comparative study of birds. *Ecology* 88,871–881.

Møller A. P., de Lope F. & Saino N. 2004. Parasitism, immunity, and arrival date in a migratory bird, the barn swallow. *Ecology* 85: 206-219.

Moore S.L. & Wilson K. 2002. Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. *Science* 297, 2015–2018.

Moore I., Wada H., Perfito N., Busch D.S., Hahn T.P. & Wingfield J.C. 2004a. Territoriality and testosterone in an equatorial population of rufous-collared sparrows, *Zonotrichia capensis*. *Animal Behaviour*. 67: 411–420.

Nordling D. & Gustafsson L. 1998. Increased reproductive effort induces immune suppression with long-term effects on parasite resistance and viability. *Proceedings Biological Sciences*. 1403: 1291-1298.

Pelayo L., Lops A. Valdés-Dapena M. & Suazo J. 2001. Microbiología y Parasitología Médicas III. Cap. 76 pp.12-13. Editorial Ciencias Médicas, La Habana-Cuba.

Patterson L.D. & Schulte-Hostedde A.I. 2011. Behavioural correlates of parasitism and reproductive success in male eastern chipmunks, *Tamias striatus*. *Animal Behaviour*. 81: 1129- 1137.

Quillfeldt P., Martínez J., Hennicke J. Ludynia K., Gladbach A., Masello J.F., Riou S. & Merino S. 2010. Hemosporidian blood parasites in seabirds a comparative genetic study of species from Antarctic to tropical habitats. *Naturwissenschaften* 97: 809–817.

Quinn J.L., Patrick S.C., Bouwhuis S., Wilkin T.A. & Sheldon B.C. 2009. Heterogeneous selection on a heritable temperament trait in a variable environment.

*Journal Animal Ecology*. 78:1203-1215

Sánchez R. 2003. Los parásitos intestinales de las aves. *Boletín de ornitología*. Divasa farmavic S.A. Barcelona-España.

Sanz J.J., Arriero E., Moreno J., Merino S. 2001b Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. *Oecologia* 126: 339–344.

Shutler D., Bennett G.F. & Mulliet A. 1995. Sex proportions of *Haemoproteus* blood parasites and local mate competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92: 6748-6752.

Sih A., Bell A.M., Chadwick J. J. & Ziemba R.E. 2004a. Behavioral syndromes: An integrative overview. *The Quarterly Review of Biology*. 79: 241-277.

Silveira P., Belo N.O., Rodello D., Pinheiro R.T. & Braga E.M 2010. Microfilariae Infection in Wild Birds from the Brazilian Cerrado. *Journal of Wildlife Diseases*. 46: 1305–1309.

Smith S.M. 1978. The ‘underworld’ in a territorial sparrow: adaptive strategy for floaters.

*The American Naturalist*. 112: 571-582.

Stiles F. & Skutch A. 1989. A Guide to the Birds of Costa Rica. Cornell University Press Ithaca, New York.

- Suom C., Ginsberg H.S., Bernick A., Klein C., Buckley P.A., Salvatore C. & LeBrun R.A. 2010. Host-seeking activity and avian host preferences of mosquitoes associated with West Nile virus transmission in the northeastern U.S.A. *Journal of Vector Ecology*. 35: 69-74.
- Sundström L. F., Petersson E., Höjesjö J., Johnsson J. I. & Jarvi T. 2004. Hatchery selection promotes boldness in newly hatched brown trout (*Salmo trutta*): implications for dominance. *Behavioral Ecology*. 15: 192-198.
- Tebbich S., Fessl B. & Blomqvist D. 2008. Exploration and ecology in Darwin's finches. *Evolutionary Ecology Research*. DOI 10.1007/s10682-008-9257-1
- Van der Veen, I. T. 2003. Is body size or activity of copepods related to ingestion of parasite larvae? *Parasitology*. 126, 173-178.
- Van Dongen W., Maldonado K. Sabat P. & Vasquez R.A. 2010. Geographic variation in the repeatability of a personality trait. *Behavioral Ecology* 21: 1243-1250.
- Van Oers K., Drent P., Goede P. & Noordwijk A. 2003. Realized heritability and repeatability of risk-taking behaviour in relation to avian personalities. *Proceedings of the Royal Society London*. 271: 65–73.
- Wilson D.S., Clark A.B., Coleman K. & Dearstyne T. 1994. Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology & Evolution*. 9: 442–446

Wingfield J. C., Meddle S. L., Moore I., Busch S., Wacker D., Lynn S., Clark A., Vásquez R. A. & Addis E. 2007. Endocrine responsiveness to social challenges in northern and southern hemisphere populations of *Zonotrichia*. *Journal Ornithology*. 148 (Suppl 2): 435–441.