

VCH-EC
MAG-B
R173
C.11

CONSECUENCIAS MORFOLÓGICAS Y
GENÉTICAS EN LA DIUCA COMÚN (*Diuca diuca*)
(Molina,1782) PRODUCTO DE SU RECIENTE
INTRODUCCIÓN EN LA ISLA DE PASCUA

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Tannia Soledad Ramírez Medina

Noviembre, 2017

Director de Tesis: Dr. David Véliz

Co-Director Tesis: Dr. Guillermo Luna-Jorquera

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

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.

Tannia Soledad Ramírez Medina

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 07 de Junio de 2017.

Director de Tesis
Dr. David Véliz


.....

Co-Director de Tesis
Dr. Guillermo Luna

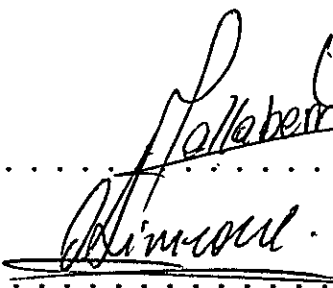
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Michel Sallaberry


.....

Dr. Alejandro Simeone


.....

*“Un pájaro posado en un árbol nunca tiene miedo de que la rama se rompa,
porque su confianza no está en la rama sino en sus propias alas.”*

BIOGRAFÍA



Tannia Soledad Ramírez Medina nació el 31 de diciembre de 1987 en Río Bueno, al sur de Chile. A la edad de cinco años, su familia se trasladó a la ciudad de Puerto Montt donde cursó su enseñanza básica y media en dicha ciudad. Posteriormente ingresó a la carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Universidad Austral de Chile en Valdivia, obteniendo el grado de licenciatura en el año 2013. El gusto por la biología hizo que Tannia siguiera avanzando en esta área, por lo que el año 2014 ingresó al programa de Magíster en Ciencias Biológicas en la Universidad de Chile, emprendiendo un nuevo desafío en esta nueva ciudad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi tutor David Veliz, por aceptarme en su laboratorio y por haber confiado en mí para realizar esta tesis y por todo el apoyo brindado durante este tiempo. Además, a mi co-tutor, Guillermo Luna, por llamarle la atención las diucas.

A mi comisión evaluadora, Michel Sallabery y Alejandro Simeone, por sus grandes aportes en cuanto a comentarios y sugerencias para que finalizara en una buena tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Ecología y Genética; Ingrid, Ernesto, Caren, Matías, Rocío, Noemí, Raúl, Javiera, Sandra y al laboratorio de Limnología, principalmente a la profesora Irma Vila.

A todas aquellas personas que me acompañaron la búsqueda de mi pequeña avecilla, a Paula Plaza por su gran ayuda en lograr capturarlas en Isla de Pascua, a Claudia Fernández por enseñarme las técnicas y manipulación con las aves, a Vale y Pau, por llevarme a sus terrenos al Peral ojo de agua y lograr así capturar mis diucas nortinas, a la gente de Rapa Nui por su curiosidad y ayuda, principalmente a la familia Hereveri Tuki por su hospitalidad y cariño, gracias a los que me regalaron parte de su tiempo para ir en busca de las pequeñas traviesas; gente del EcoGen, Camila L, Faviola, Valeria y por todas las aventuras, risas y experiencias vividas.

Y finalmente, pero no menos importante a mi familia, a mis padres Marisol y Hernán, gracias por permitirme seguir mis sueños, ya que, al acercarme a mis metas, hacen que la distancia física entre nosotros sea cada vez mayor, pero no así del corazón, por estar siempre para mí, por contar siempre con su apoyo, a mi hermana Barbara por el mejor regalo que me ha dado mi pequeño Benjamín, mi "Kimin" gracias por llegar a cambiar mi vida, llenándola de alegrías y lindos momentos, a mis abuelitas y toda mi gran familia, y a aquellos que fueron parte de mi vida.

A mis pequeñas diucas, porque sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, por permitirme conocer nuevos lugares, nueva gente y además de aportar un poco más de conocimiento a la ciencia en Chile.

Agradecer el financiamiento Núcleo Milenio NC120030 "Ecología y Manejo Sustentables de Islas Oceánicas

Gracias totales.

ÍNDICE DE MATERIAS

Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
Abstract	xi
Introducción.	01
Hipótesis.	10
Objetivos.	11
Materiales y métodos	12
Resultados	23
Discusión.	33
Conclusión	39
Bibliografía	40
Anexos	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Partidores que amplificaron para *D. diuca* descritos por Dawson et al. (2010).

Tabla 2. Análisis discriminante. Número de individuos correctamente clasificados basado en sus caracteres morfológicos.

Tabla 3. Índices de diversidad para Región Control y ND2 en las tres localidades muestreadas; h= número de haplotipos; S= sitios polimórficos, Hd= diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica; k= número promedio de diferencias entre pares de secuencias.

Tabla 4. Diferenciación genética por pares para marcador mitocondrial ND2. Valores de FST se muestran bajo la diagonal y valores de *P* sobre la diagonal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las medidas morfológicas A) narinas, ancho del pico; B) largo del pico, alto del pico y largo de la cabeza; C) largo del ala, D) largo del tarso y E) largo de la cola.

Figura 2. Biplot generado a partir del Análisis de Componentes Principales realizado con las medidas morfológicas de las aves. Las elipses muestran el 95% de la variación de los individuos muestreados dentro de cada localidad.

Figura 3. Análisis de Discriminante Lineal de las medidas morfológicas de las aves, los grupos están compuesto por las localidades (FJ = Fray Jorge, IP = Isla de Pascua y RN = Rinconada).

Figura 4. Red de haplotipos para (A) Región Control y (B) ND2. Fray Jorge (FJ=azul), Rinconada (RN=rosado) e Isla de Pascua (IP=verde). El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que contienen el haplotipo. Las líneas indican posiciones de las mutaciones dentro de las secuencias que separan los distintos haplotipos.

Figura 5. Gráfico de componentes principales genético de microsatélites. Los puntos representan los genotipos de los individuos, las localidades se encuentran marcadas dentro de una elipse de 95% de confianza.

Figura 6. Gráfico DAPC de dispersión Discriminante 1 versus Discriminante 2 y sus respectivas densidades para cada localidad.

RESUMEN

El establecimiento de una nueva población a partir de un pequeño número de individuos que derivan de una gran población de origen se conoce como efecto fundador. Unas de las consecuencias a nivel genético es la reducción de la heterocigocidad, cambia las frecuencias alélicas en la población fundadora en relación a la población original, y además pueden presentar modificaciones en caracteres morfológicos en el nuevo hábitat. En Chile, no se ha reportado estudios que muestren efectos fundadores en forma natural, sin embargo, el transporte de propágulos por causas humanas han producido efectos fundadores artificiales. Uno de estos se ha observado en la especie *Diuca diuca* (Molina, 1782), la cual fue introducida a Isla de Pascua por misioneros en 1928, siendo actualmente el ave introducida más abundante en este lugar. El objetivo del presente estudio fue de determinar diferencias genéticas y morfológicas de individuos de *Diuca diuca* establecida en Isla de Pascua con individuos de dos localidades ubicadas en Chile Continental, a saber, la Rinconada de Maipú (Región Metropolitana) y Fray Jorge (Región de Coquimbo). Para esto se utilizaron secuencias de sectores mitocondriales (Región control y ND2), nucleares (microsatélites) y además de medidas morfológicas de los tres sitios muestrales. Se observó que las aves de Isla de Pascua poseen el pico más largo, las alas más grandes y el tarso más corto cuando se comparan con los individuos del continente ($P < 0.05$). En relación a los caracteres genéticos, se encontró una baja diversidad alélica/haplotípica en los marcadores utilizados, y que

además existe una estructuración significativa entre las localidades ($P < 0.001$). Estos resultados sugieren que las diferencias genéticas encontradas estarían relacionadas con el efecto fundador, reflejado en la baja variabilidad genética observada; las diferencias morfológicas se relacionarían con características asociadas a la plasticidad de los rasgos relacionados a las nuevas condiciones ambientales.

ABSTRACT

The establishment of a new population founded by a few individuals coming from a large population of origin is known as the founding effect. Genetic consequences of the founding effect are reduction of heterozygosity, the change of allelic frequencies and it can also change the morphological characters of the populations in the new habitat. In Chile, literature do not report the presence of natural founding effects, however, the transport of propagules or adults by human have produced an artificial founding effect. One of these has been observed in the *Diuca diuca* (Molina, 1782), which was introduced to Easter Island by missionaries in 1928, and is currently the most abundant bird introduced on the island. The objective of this study was to characterize *Diuca diuca* established in Easter Island and to compare with individuals from two localities from in continental Chile, namely the Rinconada de Maipú (Metropolitan Region) and Fray Jorge (Coquimbo Region). For this, sequences of the mitochondria (Control Region and ND2), and variability of nuclear loci (microsatellites) and in addition with morphological measurements of the three sample sites were used. It was observed that *D. diuca* of Easter Island have the longest beak, the largest wings and the shortest tarsus when compared with the mainland individuals ($P < 0.05$). In relation to the genetic traits, a low allelic / haplotypic diversity was found in the markers used, and there is also a significant structuring between the localities ($P < 0.001$). These results suggest the presence of a

founding effect. In addition, morphological modifications observed in Easter Island suggest phenotypic plasticity of the characters which allows survival in this environment

INTRODUCCION

El establecimiento de una nueva población generada por un pequeño número de individuos proveniente de una gran población de origen se conoce como efecto fundador, concepto acuñado por Mayr en 1963. Esta nueva población establecida porta una pequeña proporción de variación genética contenida dentro de la población original (Eales et al. 2008), mostrando generalmente un menor número de alelos, una reducida heterocigocidad (H) y modificaciones en las frecuencias alélicas en la población fundadora en relación a la población original (Nei et al. 1975; Wright 1931). Se ha descrito que el efecto fundador puede generar cambios en los rasgos morfológicos promedios en las poblaciones colonizadoras (Kolbe et al. 2012). Por ejemplo, en poblaciones insulares de aves terrestres se ha descrito que éstas muestran aumento o disminución en el largo del pico, tarso o alas en comparación a poblaciones continentales de algunas especies similares (Abbott 1980).

El efecto fundador generalmente se produce por un proceso de dispersión de unos pocos individuos, ya sea por causas naturales o producida por el hombre. Uno de los casos más conocidos de dispersión es el descrito para los pinzones de Darwin, en donde naturalmente existió una expansión efectiva de su rango geográfico. En la actualidad Galápagos presenta 15 especies del género *Geospiza* (Grant & Grant 2001), y estudios moleculares recientes han demostrado que todos forman un único linaje, exclusivo de la familia de los fringílidos, cuya población antecesora de los pinzones actuales habría

llegado hace unos 2 a 3 millones de años, procedentes desde Venezuela, Bolivia o Ecuador (Sato et al. 2001). Es importante indicar que Darwin observó las diferencias en los picos de estas aves (Darwin 1839), evidencia que llevó a Peter Grant y Rosemary Grant a estudiar más profundamente a los pinzones. Décadas de investigación dieron como resultado que dichas diferencias, se deben principalmente a cambios en la estructura del pico, asociado a cambios en la habilidad de alimentación y nichos de alimentación que la diferenciación de pinzones ha llegado a tener Galápagos en la actualidad (Grant 1994). Además, esta respuesta se relaciona con los drásticos cambios en su entorno relacionados con periodos de sequía o de precipitación (Grant & Grant 1993).

Otro medio por el cual individuos puede ampliar su rango de distribución es a través de la introducción de especies por acción humana (Sakai et al. 2001). En este caso, la introducción puede ser accidental o intencionada, pudiendo ser clasificada desde una especie exótica a una especie invasiva. Durante el proceso de invasión, una especie debe cumplir varias etapas; al ser transportada con éxito desde su área de origen hasta un territorio nuevo, la especie será catalogada como exótica (Mack et al. 2000; Kolar & Lodge 2001). Se considera como introducida a la especie que sobrevive a la dispersión y que están en condiciones de fundar una nueva población (Blackburn et al. 2011; Duncan et al. 2003). Ya establecida, la especie se convierte en naturalizada cuando comienza a reproducirse y crecer en número (Henderson et al. 2006). Finalmente, una especie se define como invasora sólo cuando es capaz de expandirse en el nuevo rango geográfico

y afectar a otras especies. Es importante indicar que no todas las especies introducidas pueden desencadenar procesos de invasión y sólo una proporción de ellas se dispersan y se convierten en invasoras (Capdevila et al. 2013).

Para lograr pasar todas las etapas, las especies introducidas cuentan con atributos que les permiten adaptarse y sobrevivir en las nuevas condiciones ambientales, entre los cuales se encuentra las elevadas tasas de crecimiento y reproducción, facilidad para hibridar con otras especies permitiéndoles aumentar su variabilidad genética, y finalmente la flexibilidad y plasticidad de caracteres fenotípicos (Duncan et al. 2003). El desarrollo de ésta última característica le otorga alta posibilidad de supervivencia frente a las nuevas condiciones ambientales. En este sentido, la plasticidad fenotípica, definida como la capacidad de un genotipo para modificar su fenotipo a través de los ambientes, puede permitir a los organismos hacer frente a la variación ambiental mediante el ajuste de rasgos como las defensas, la tolerancia al frío o comportamiento de alimentación, resultando en un aumento de la supervivencia y rendimiento (Pigliucci et al. 2006). Las respuestas de plasticidad en un organismo incluyen cambios en el comportamiento, fisiología, morfología, crecimiento, variación en rasgos de historia de vida, demografía y pueden ser expresadas ya sea dentro de la vida de un solo individuo (Young et al. 2003) como a través de generaciones (Agrawal et al. 1999). Estos cambios son permanentes, a diferencia de la flexibilidad fenotípica, la cual es reversible y varía en el tiempo como respuesta a oscilaciones ambientales. Un ejemplo de flexibilidad en el carácter es lo que ocurre con el plumaje de algunas aves frente al cambio estacional, como el plumaje

invernal, este es reversible frente al cambio de temporada (Piersma & Drent 2003; Niinemets et al. 2003).

Un ejemplo de introducción de especies, es el que se ha descrito en los lagartos del género *Anolis* introducidos en el Caribe. Las nuevas generaciones de lagarto modificaron algunos rasgos morfológicos, principalmente el largo de sus extremidades posteriores, acortándolas producto del cambio de vegetación (Kolbe et al. 2012). En este caso, la población original habita una vegetación de mayor tamaño (árboles) y en el caso de las islas, donde la especie fue introducida, la vegetación presente es de un tamaño mucho más reducido (malezas). La necesidad de sobrevivir a este nuevo ambiente causó la modificación en el tamaño de sus extremidades, lo cual favorece a los lagartos otorgándole una mayor velocidad para escapar de sus depredadores en las Islas (Losos 2009; Kolbe et al. 2012). Además, las especies introducidas pueden presentar diferencias en la diversidad genética, como lo ocurrido con el pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*) un ave de jaula (mascota) la cual muestra una pequeña pérdida de alelos comparada con la población salvaje (Blackburn et al. 2009). Otros estudios en el gorrión (*Passer domesticus*) en Norte América y el verderón europeo *Carduelis chloris* en Nueva Zelanda muestran en general un patrón similar de baja diversidad genética (Merila et al. 1996).

El impacto que causan las especies invasoras son tanto económicos como ambientales. En Chile, se encuentra una gran cantidad de estas especies (Quiroz et al. 2003), sobresaliendo un anfibio, cinco aves y once mamíferos (SAG 2016). Uno de los más conocidos es lo que ocurre con los castores introducidos en la Patagonia Chile-Argentina,

donde la construcción de sus madrigueras en ríos y lagos conlleva a una importante modificación del territorio ocasionando grandes daños en los bosques nativos (Baldini et al. 2008). También existen plantas vasculares invasivas (Arroyo et al. 2000), y animales como anfibios (rana africana "*Xenopus laevis*") y aves, entre ellas el caso más conocido mundialmente es el gorrión común (*Passer domesticus*) introducido desde Europa a América del Sur (Skjelseth et al. 2007; Jaksic 1998).

Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), dentro de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas, se encuentran tres aves, la miná común (*Acridotheres tristis*), el bulbul cafre (*Pycnonotus cafer*) y el estornino pinto (*Sturnus vulgaris*). Los efectos de las especies invasoras suelen ser bien estudiados, sin embargo, los cambios en la estructura genética de la población y la dinámica de dichas especies durante el proceso de invasión rara vez se han investigado utilizando técnicas moleculares (Lecis et al. 2008).

Invasiones biológicas en territorio insular por acción humana

Las islas generalmente son usadas como laboratorios naturales, y como tales, los estudios de las formas de la isla han hecho contribuciones importantes al desarrollo de la teoría evolutiva general (Grant 2001). La biota de las islas remotas difiere de las del continente de varias maneras, siendo en general pobres en especies y desarmónicas (peculiares en la composición taxonómica), pero ricas en especies endémicas (Losos &

Ricklefs 2009). Es por esto que el alto endemismo presente en las islas puede ser perjudicado por la introducción de especies exóticas, pérdida de hábitat, depredación por humanos y la propagación de enfermedades (Whittaker & Fernandez 2007).

El establecimiento de las especies introducidas causa que las islas se vuelvan más vulnerables frente a estos ataques, ya que permiten una mayor expansión geográfica con gran rapidez de la especie introducida, ya que en este nuevo ambiente no se encuentran sus competidores y depredadores naturales de dicha especie. Es conocido que especies que han sido llevadas desde el continente por acción humana han causado grandes daños en este tipo de hábitat, como por ejemplo las ratas y su depredación sobre aves (Jones et al. 2008) o reptiles (Cree et al. 1995). Gran impacto ha causado la introducción de gatos domésticos, por ejemplo; aquellos que fueron introducidos en Isla Marión en 1949, los cuales mataron aproximadamente 400.000 aves anualmente, siendo responsables de la extinción de 2 aves endémicas (Medina et al. 2011). En Chile, la herbivoría del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) ha modificado y dañado el suelo del archipiélago de Juan Fernández (Camus et al. 2008).

Una de las islas más remotas del planeta es Isla de Pascua o Rapa Nui (27° 09' S, 109° 26' W), ubicada en el sureste de Polinesia, a 2.250 km al este de la isla Pitcairn y a una distancia de 3.700 km desde la costa de Chile. Esta isla de origen volcánico posee una superficie aproximada de 163 km², y su altura máxima es de 560 m en el cerro Terevaka en el sector NorOeste de la isla (Jaramillo et al. 2008).

A pesar de poseer una gran riqueza cultural y arqueológica, la isla presenta uno de los casos más dramáticos de pérdida de la biota nativa terrestre causados por la actividad humana. Con la llegada de los polinésicos, gran cantidad de árboles fueron cortados para ser usados en la labor de construcción y transporte de *moais*. Actualmente la avifauna marina está compuesta por 25 especies pertenecientes a 7 familias y 4 órdenes (Flores et al. 2014), no existiendo registro de avifauna terrestre nativa actualmente en la Isla de Pascua. En los últimos años, sólo podemos encontrar aves introducidas, 11 especies fueron llevadas desde Chile continental entre los años 1888 y 1928 por los colonos misioneros para su alimentación y como aves ornamentales; hoy en día se encuentran cinco de estas especies: el gorrión (*Passer domesticus*), la paloma doméstica (*Columba livia*), el tuique (*Milvago chimango*), la perdiz chilena (*Nothoprocta perdicaria*) y la diuca (*Diuca diuca*), además de la gallina (*Gallus gallus*) (Marín & Cáceres 2010). Por lo tanto, estas especies introducidas, ofrecen la oportunidad de investigar procesos de efectos fundadores y cambios morfológicos con carácter adaptativo.

Organismo de estudio

Dentro de las aves introducidas, una de las especies que se destaca por su alta presencia de individuos en Isla de Pascua es la diuca común (*Diuca diuca*), un ave passeriforme del sur de Sudamérica, la cual habita naturalmente la zona central de Chile desde Coquimbo hasta Magallanes. La diuca común habita en zonas de matorrales, semi abiertas y bordes

de bosque, dentro de Chile no tienen carácter migratorio, solo localmente en forma altitudinal (Barros 1921; Jaramillo 2008). En período de reproducción vive en parejas, pero durante el resto del año forman bandadas de numerosos individuos. La diuca puede tener más de una nidada por temporada, llegando a tres por año, nidifica entre septiembre y enero, de preferencia elige árboles con follaje frondoso, las nidadas presentan de dos a cuatro huevos de color celeste verdoso (Marín 2011). En el continente, la reducción de la nidada se debe a la presencia de mirlos (*Molothrus bonariensis*) que parasita los nidos de estas aves al igual que al chincol (*Zonotrichia capensis*), eliminando los huevos y colocando los de ellas (Reed 1912). Su dieta está conformada de un 88% a 99% de semillas de pasto y un 33% de insectos (grillos y saltamontes) (López-Calleja et al. 1995; Barceló et al. 2016).

En Chile, podemos encontrar tres subespecies: la diuca común (*Diuca diuca diuca*) distribuida desde Coquimbo a Magallanes y de donde se sugiere pudo ser llevada a la Isla desde esta zona; la diuca nortina (*Diuca diuca crassirostris*), distribuyéndose desde la II a la IV región; la diuca de Chiloé (*Diuca diuca chiloensis*), habitante de la Isla de Chiloé (<http://www.avesdechile.cl>). En Isla de Pascua, Johnson et al. (1970) fueron los primeros que informaron la presencia de *Diuca diuca*, indicando que pudo haber sido introducida en 1928, junto a otras aves exóticas, y plantean que pudo ser llevada por misioneros desde Valparaíso de donde salían las embarcaciones hacia la isla. En la literatura no se cuenta con registros de la cantidad de individuos que fueron introducidos a la isla, pero

se presume que debieron de ser pocos ya que la finalidad de esta ave era ser usada como ave ornamental (ave de jaula).

En Isla de Pascua, la diuca es conocida por los algunos lugareños como “manu puhi” (pájaro silbador), actualmente es el ave introducida más abundante llegando a ser 77 veces más abundante que la perdiz chilena (Jaramillo et al. 2008; Marín & Cáceres 2010).

Es común observar que en Isla de Pascua las diucas se alimentan de semillas, polillas y restos de comida y algunos frutos (observaciones personales), sin embargo, no se conocen aspectos básicos de su biología, tales como dieta, reproducción y conducta en esta localidad. Es por esto, que estudiar las diferencias tanto morfológicas como genéticas entre las aves presentes naturalmente en el continente y aquellas que viven actualmente en la isla nos permitirá determinar cuan diferentes son genéticamente y como la insularidad podría estar afectando rasgos morfológicos de las mismas.

HIPÓTESIS

Asumiendo la introducción de un bajo número de individuos de la especie *Diuca diuca* desde Chile continental hasta Isla de Pascua, la población actual de *D. diuca* presente en la isla presenta menor diversidad genética y cambios morfológicos con respecto a poblaciones de Chile central.

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Caracterizar genética y morfológicamente individuos de *Diuca diuca* establecida en Isla de Pascua y compararla con individuos de dos localidades ubicadas en Chile Continental, a saber, la Rinconada de Maipú (Región Metropolitana) y Fray Jorge (Región de Coquimbo).

- **Objetivos específicos**

- Comparar caracteres morfológicos y genéticos de ejemplares de *D. diuca* provenientes de Isla de Pascua, Rinconada de Maipú y Fray Jorge.
- Determinar la diversidad genética de individuos de *Diuca diuca* provenientes de Isla de Pascua, Rinconada de Maipú y Fray Jorge.

MATERIALES Y MÉTODOS

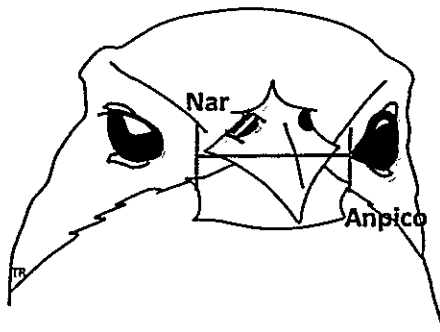
Área de estudio

Se capturaron 54 individuos de *Diuca diuca* en Isla de Pascua (27°08' S; 109°25' W), 58 individuos desde el Peral Ojo de Agua (secano costero de Ovalle) cercanías del Parque Fray Jorge, Región de Coquimbo (30°33' S; 71°39' W) y 6 individuos en el Fundo Rinconada de Maipú de la Universidad de Chile (33°29' S; 70°49' W). Para simplificar en los gráficos y tablas, se utilizará "IP" para denominar al sitio Isla de Pascua, "FJ" al sitio Peral Ojo de Agua de Fray Jorge y "RN" a Rinconada de Maipú. Es importante indicar que además se visitó tres veces el Parque El Panul ubicado en la comuna de La Florida (Región Metropolitana) pero la captura de las aves no fue exitosa. Las fechas de muestreo para cada localidad fue: desde el 25 de junio al 09 de julio de 2015 en IP, para FJ se realizó una campaña entre 18 al 21 de diciembre del mismo año y una segunda entre el 13 al 18 de enero de 2016; finalmente para RN se muestreo desde el 25 al 28 de enero de 2016; los horarios de muestre fue al amanecer (06 am) y al atardecer (18 pm), días lluviosos con vientos o muy calurosos no se abrían las redes para no lastimar a las aves. Las aves fueron capturadas utilizando redes de niebla especiales para paseriformes de 9 x 3m con luz de malla de 30mm, la cantidad de redes varió en cada localidad (entre 3 y 5), siguiendo los estándares protocolares de captura y manipulación de aves (Ralph et al. 1996). Este muestreo se realizó con los permisos respectivos del Servicio Agrícola y Ganadero (Nº:78/2015).

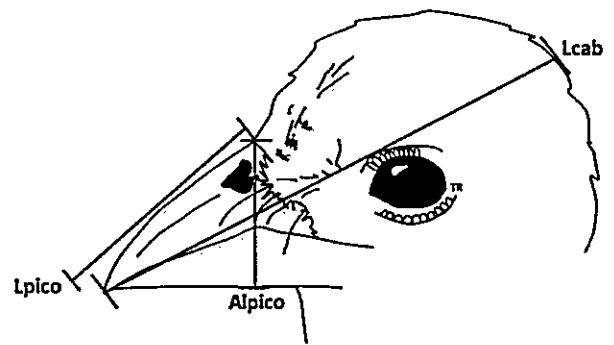
Se obtuvo las siguientes medidas morfológicas de los individuos capturados: largo del tarso (Ltarso), largo de la cabeza (Lcab), narinas (Nar), a la altura del culmen se midió el alto del pico (Alpico), largo (Lpico) y ancho del pico (Anpico) con un pie de metro digital (exactitud de 0.01mm). Las medidas de tamaño además del largo de la cola (Lcola) y el largo del ala (Lala) se midieron con una regla metálica (exactitud 0.1 mm). La masa corporal se midió utilizando una balanza digital de 100 g (exactitud 0.1 g). Para más detalles ver Figura 1. Para disminuir un posible error producido por una asimetría bilateral, se midió el largo del ala derecha y el tarso de la pata derecha a todos los individuos.

De cada individuo se obtuvo una muestra de sangre desde la vena braquial del ala derecha y se le realizó una punción con una aguja hipodérmica (NIPRO 25Gx1") individual para cada ave previa limpieza de la zona con alcohol. Después de realizado el proceso, el sangrado se detuvo con un algodón estéril. Para que la sangre no se coagule, se extrajo con un capilar heparinizado (HIRSHMANN) e inmediatamente fue depositada sobre una tarjeta FTA (Whatman Bioscience, USA). Las tarjetas FTA fueron individualizadas y almacenadas durante el terreno, para finalmente en el laboratorio realizar la extracción de ADN. Con el fin evitar muestrear dos veces el mismo individuo, estos fueron marcados en la pata derecha con un marcador permanente no tóxico. Todo el procedimiento, medidas y toma de muestra fue realizado solo por el autor de esta tesis para disminuir el error en el muestreo y además para que la manipulación del ave sea en un menor tiempo posible.

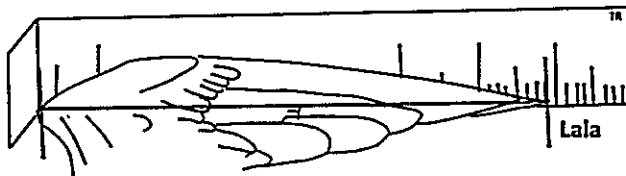
A)



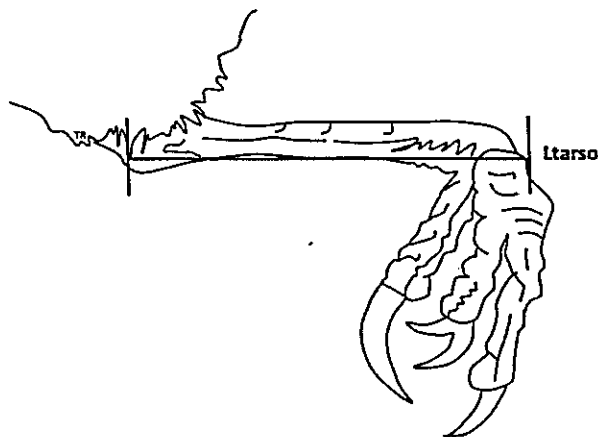
B)



C)



D)



E)

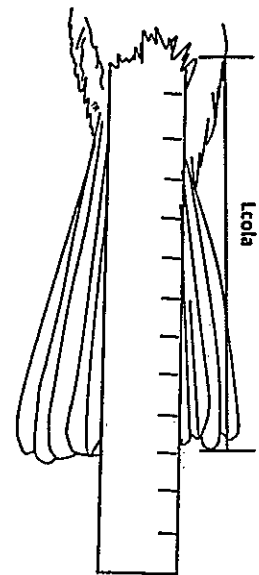


Figura 1: Esquema de las medidas morfológicas A) narinas, ancho del pico; B) largo del pico, alto del pico y largo de la cabeza; C) largo del ala, D) largo del tarso y E) largo de la cola.

Análisis morfológico

Para detectar posibles diferencias morfológicas entre los tres sitios estudiados, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) y un análisis de Discriminación Lineal (LD) utilizando todas las mediciones estandarizadas. Este tipo de análisis permiten establecer las variables contribuyen a explicar la varianza y describir algún patrón de segregación de los grupos dentro del espacio multivariado (Maćkiewicz et al. 1993).

Para el PCA, las variables fueron estandarizadas siguiendo las recomendaciones de Grant (2001) y Keller (2001). Estos autores indican que cada variable métrica se transforma a logaritmo natural para estabilizar las varianzas y para el caso de la variable masa corporal (unidad de volumen), el logaritmo natural se divide por tres. Estos datos se estandarizaron a una media de cero y una varianza de uno para minimizar el efecto de diferentes unidades iniciales (Shao et al. 2016). Considerando que este análisis requiere cumplir con algunos supuestos, se realizó el test de Levene para examinar la homogeneidad de las varianzas y un test de Shapiro-Wilks para examinar la normalidad de las variables. Los datos morfológicos no presentaron evidencias que permitieran rechazar la hipótesis nula de normalidad y homogeneidad de varianza por lo tanto se cumplen con los supuestos.

Para realizar un análisis cuantitativo, los scores de los dos primeros componentes (PC1 y PC2) del PCA fueron utilizados como una variable dependiente y las localidades como variables independientes en un ANOVA de una vía con Permutaciones (1000

permutaciones). Como test *a posteriori*, se realizó comparaciones pareadas usando un script de comparación de medias usando permutaciones. Todos estos análisis se realizaron en el software R (R Core Team 2017). De forma complementaria, se estimó diferencias morfológicas entre la población insular y continente a través de un ANOVA de una vía para cada variable. Cada variable se estandarizó por el largo del tarso y se utilizó un test de Tukey como test *a posteriori*.

En el caso del Análisis de Discriminantes, se utilizó la procedencia de los individuos para maximizar las diferencias de los grupos (IP, RN y FJ) usando todas las variables estandarizadas. Se utilizó la función “predict” del Análisis de Discriminante Linear para determinar la probabilidad de pertenencia de los individuos a los grupos establecidos (IP, FJ, RN).

Análisis genético: Extracción de ADN

Con el fin de evitar contaminación, se cortó un cuadrado de 0.3 mm de la tarjeta FTA con hojas individuales de bisturí para cada individuo. La extracción de ADN se obtuvo usando el protocolo de extracción de Sales (Aljanabi & Martinez 1997); la concentración total de ADN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000). Para las PCR, se realizaron diluciones de cada muestra para igualar las concentraciones a 50ng/μl.

Determinación del sexo

Para determinar el sexo de las aves, se utilizó los primer descritos por Fridolfsson & Ellegren (1999) (2550F: 5'-GTTACTGATTCGTCTA-CGAGA-3' y 2718R: 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'). Para un volumen final de 15 µl de producto PCR se utilizó 0.2 µl de TaqDNA polimerasa Platinum (Invitrogen) (5U/µl), 1.5 µl de Buffer (10x), 1 µl de dNTPs (10Mm), 2 µl de MgCl₂ (25mM), 1µl de cada partidor (ambos a concentración de 10 pmol/µl) 2µl de DNA y 6.3 µl de agua miliQ hasta completar el volumen final. Se utilizó el protocolo PCR descrito por Quintana et al. (2008) el cual incluye una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 95°C por 30s, alineamiento a 50°C por 45s y una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8%, finalizada la electroforesis se reveló la presencia de una banda para machos (ZZ) o dos bandas que representan un patrón femenino (ZW).

Secuenciación de ADN mitocondrial

Se realizaron PCR para amplificar dos regiones del ADN mitocondrial. Se probaron 6 partidores mitocondriales (Sato et al. 2001; Sorenson et al. 1999) de los cuales finalmente solo dos pares funcionaron: uno para la Región Control (L15725: 5'-AAR CCM GAA TGR TAY TTY CTW TTY GC-3'; H1251: 5'-TCT TGG CAT CTT CAG TGC CRT GC-3') y otro

para la subunidad 2 del complejo NADH deshidrogenasa (L5215: 5'-TAT CGG GCC CAT ACC CCG AAA AT-3'; H6313: 5'-ACT CTT RTT TAA GGC TTT GAA GGC-3').

Para un volumen total de 25 µl de reacción PCR, los productos usados fueron los siguientes: 0.2 µl de TaqDNA polimerasa Platinum (Invitrogen) (5U/µl), 2.6 µl de Buffer (10x), 2 µl de dNTPs (10Mm), 1.6µl de MgCl₂ (25mM), 1µl de cada partidor (ambos a concentración de 10 pmol/µl) 2µl de DNA y 14.6µl de agua miliQ hasta completar el volumen final. Se utilizó el protocolo PCR descrito por Sorenson et al. (1999) el cual incluye una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 95°C por 30s, alineamiento a 60°C para el partidor de la Región Control y 57°C para ND2 y 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos PCR se enviaron a purificar y secuenciar a la empresa Macrogen (Corea).

Genotipificación de Microsatélites

Se probaron 35 pares de partidores universales de microsatélites desarrollados para aves por Dawson et al. (2010). De estos, 15 amplificaron para *Diuca diuca*, pero solo 7 resultaron polimórficos. Para los marcadores microsatélites que funcionaron, el oligo forward fue marcado con la cola M13F (-29) 5'- CACGACGTTGTAAAACGAC-3'. Los fluoróforos utilizados para la cola M13, fueron FAM, VIC, NED y PET.

Los microsatélites fueron amplificados con un volumen final de PCR de 10.7 µL que incluye 1.3 µL of 10× PCR buffer (Invitrogen), 0.5 µL de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen), 0.5 µL de partidor reverse (50 ng/µL) y M13 (20 ng/µL), para el partidor forward se agregó

0.2 μL (50ng/ μL) (Applied Biosystems), 2.4 μL de dNTPs (2.5 mM) (Invitrogen), 0.5 μL de BSA (Albúmina de Suero bovino) (10mg/mL), 4.7 μL de Agua miliQ y 0.12 μL de Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). A la mezcla se agregó 2 μL de DNA (50 ng/ μL) y se utilizó el siguiente programa PCR: 94°C por 5 min, seguido por 25 ciclos a 94°C por 30s, temperatura de alineamiento correspondiente a cada partidador (Tabla 1) por 40s, 72°C por 30s y otros 10 ciclos 94°C por 30s, 53°C por 40s, 72°C por 30s y finalmente 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron genotificados por el Servicio de Secuenciación del Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Tabla 1: Partidores que amplificaron para *Diuca diuca* descritos por Dawson et al. (2010).

LOCUS	SECUENCIA (5'-3')	FLUORÓFORO	TEMPERATURA	TAMAÑO ESPERADO
TG01-147-F TG01-147-R	M13-TGAGCCACTACAGAGTGGAAA GCCACTACAATGAAGAAAATATTACAG	VIC	59	303
TG13-009-F TG13-009-R	M13-TGTGGTGGGATAGTGGACTG CTGTAAAATGTGCAAGTAACAGAGC	PET	60	206
TG03-002-F TG03-002-R	M13-TCTTGCCTTTTTGGTATGAGTATAG TACAAAGCACTGTGGAGCAG	NED	57	147
TG05-053-F TG05-053-R	M13-GCATCATCTGGTTGAACTCTC ACCCTGTTTACAGTGAGGTGTT	PET	57	216
TG08-024A-F TG08-024A-R	M13-CCCACAAATCCTGAATTCATATC ACTGGCTTATAAAGTCCATGGTTG	PET	58	193
TG01-114-F TG01-114-R	M13-TTGAAACATTGTGAAGCAG CAGATAGTGTCATAACAATACTTTTC	NED	53	286
TG04-004-F TG04-004-R	M13-CTGGAGCAGTATTTATATTGATCTTCC GAAGATGTGTTTACAGCATAACTG	FAM	60	148

Análisis de datos moleculares.

Diversidad genética para ambos marcadores mitocondriales.

Las secuencias obtenidas de la Región Control y el gen ND2 se alinearon en el programa Proseq v 2.0 (Filatov 2009). Se estimaron los siguientes índices de diversidad genética: número de Haplotipos (h), número de sitios polimórficos (S), número promedio de diferencias entre pares de secuencias (k), diversidad haplotípica (Hd) y la diversidad nucleotídica (π), usando el programa DnaSP 5.10 (Rozas et al. 2010).

Para evaluar relaciones genealógicas, se construyeron redes de haplotipos utilizando el algoritmo de Median-Joining implementado en el programa PopART (<http://popart.otago.ac.nz>). Para realizar comparaciones pareadas de las secuencias mitocondriales, se estimó F_{ST} pareados utilizando el programa Arlequin V 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer 2010) y su significancia utilizando 1.000 permutaciones.

Microsatélites

Se construyó una matriz de datos alélicas utilizando el programa GeneMarker (SoftGenetics). Para identificar posibles errores en el genotipificado o la presencia de alelos nulos, se usó el programa MICROCHECKER (Van Oosterhout et al. 2004). El número de alelos por locus, desequilibrio de ligamiento, las desviaciones al equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho) fueron estimados usando el software GENETIX 4.0.5 (Belkhir et al. 2000). Además, se comparó entre los

sitios muestrales dos medidas de diversidad genética: (i) riqueza alélica (número promedio de alelos por locus) y (ii) heterocigocidad esperada usando el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995).

Para evaluar el nivel de diferenciación genética poblacional se realizaron dos tipos de análisis. Primero, se compararon las frecuencias alélicas entre los pares de sitios y el total de sitios, mediante la estimación del índice de diferenciación F_{ST} y su significancia utilizando permutaciones (5000 permutaciones) implementado en el software GENETIX.

Segundo, para comparar entre la población continental e insular estudiadas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), para resumir la diversidad genética entre los individuos muestreados, el cual además se complementó con un análisis de discriminantes de componentes principales (DAPC). Con el fin de determinar el número de cluster o grupos genéticos (k) con mayor verosimilitud existentes en una muestra de individuos se utilizó métodos libres de modelo *K-means clustering* basado en la distancia genética. Este tipo de análisis busca combinaciones lineales de los alelos o funciones discriminantes (DA) para demostrar las diferencias entre grupos (Jombart et al. 2010). Además, este análisis permite calcular la probabilidad de asignar cada individuo a los grupos genéticos obtenidos.

Para detectar el número de grupos (k) se usó la función "find.cluster", el cual utiliza el método de criterio de información Bayesiano (BIC), realizándose con 100.000 iteraciones conservándose todos los alelos. Finalmente, se realizó un gráfico de dispersión y

frecuencia para ambos discriminantes lineales (LD). Para estos análisis se utilizó el paquete Adegenet 3.3.1 implementado en el software R (R Core Team 2017).

RESULTADOS

Datos morfológicos

En el análisis de componente principales, los dos primeros componentes explicaron el 53.3% de la varianza. El primer Componente Principal (CP1), el cual explicó el 36.4% de la varianza, está definido por la "forma del pico" (Largo, Alto y Ancho del pico) y el largo de la cabeza. El segundo componente (CP2, 16.9% de la varianza) está definido por "medidas corporales" tales como el largo del tarso, largo del ala y narina.

Desde un punto de vista cualitativo, las aves de Fray Jorge y Rinconada tienen más alto y ancho el pico, además de poseer el tarso más largo, a diferencia de la población de Isla de Pascua, la cual posee las alas más largas, tarso más corto y sólo el pico más largo (Figura 2).

Un segundo análisis de Componentes Principales, realizado solo con solo hembras, mostró una distribución similar de los individuos en el espacio bidimensional, las variables morfológicas que separaron los grupos fueron las mismas al análisis global de componentes principales previamente realizado (Anexo 5a). Similar patrón se observó en un tercer PCA el cual solo incluyó datos de machos (Anexo 5b).

EL ANOVA realizado con los scores del PC1, mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). En el test *a posteriori*, las comparaciones pareadas indicaron que Fray Jorge presentó valores de scores estadísticamente mayores a Rinconada e Isla de Pascua ($P < 0.05$), estas últimas no mostraron diferencias

significativas ($P > 0.05$). En el caso de los scores del PC2, los individuos de Isla de Pascua presentaron scores estadísticamente significativos con Fray Jorge y Rinconada ($P < 0.05$) y esta dos últimas no presentaron diferencias estadísticas entre sí ($P > 0.05$).

El ANOVA realizado para cada variable por separado mostró resultados similares al ANOVA realizado para los scores, las variables que separan los sitios en el Componente principal fueron aquellas que presentaron diferencias estadísticas entre ellos (anexo 3).

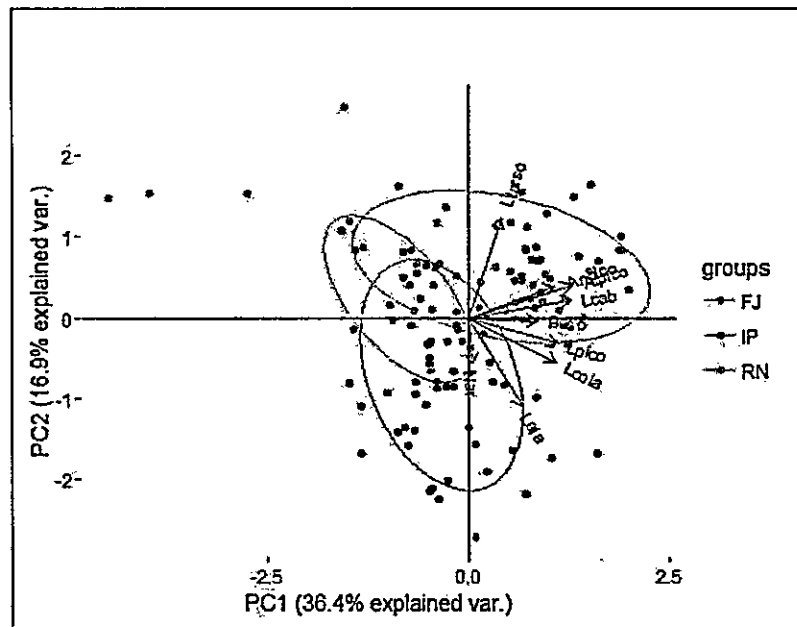


Figura 2: Biplot generado a partir del Análisis de Componentes Principales realizado con las medidas morfológicas de las aves, los grupos están compuesto por las localidades (FJ = Fray Jorge, IP = Isla de Pascua y RN = Rinconada). Las flechas corresponden al valor del coeficiente de esa variable. Las elipses muestran el 95% de la varianza de los individuos muestreados desde de cada localidad.

El Análisis de Discriminante Lineal también detectó diferencias en las variables morfológicas. El DL1 explicó el 72.3% de la varianza, y las variables con mayor valor absoluto fueron: Ancho del pico, largo de la cabeza y largo de la cola. Por otro lado, el LD2 explicó el 27.7% de la varianza conformado por las variables alto del pico, largo del ala y largo del tarso. Cualitativamente, las poblaciones se diferencian por el alto del pico, ancho del pico para Fray Jorge, largo de la cola para Rinconada y largo del ala y largo del pico para Isla de Pascua (Figura 3).

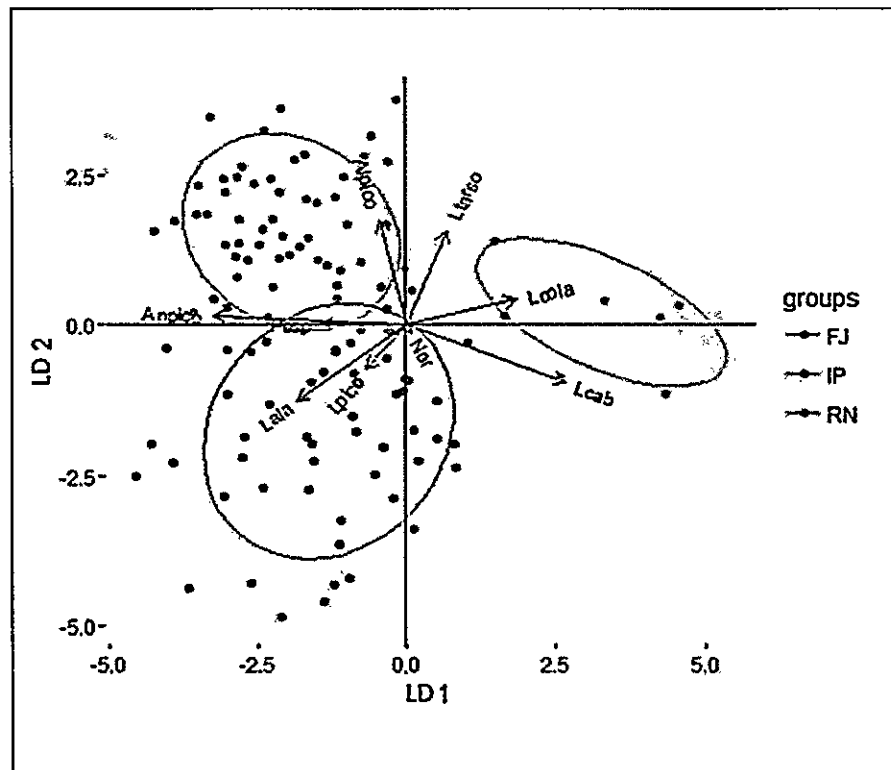


Figura 3: Análisis de Discriminante Lineal de las medidas morfológicas de las aves, los grupos están compuesto por las localidades (FJ = Fray Jorge, IP = Isla de Pascua y RN = Rinconada).

En la clasificación de los individuos usando la función discriminante, se logró un 87% de aciertos en la reasignación de los individuos correspondientes a Isla de Pascua, un 90% de aciertos para Fray Jorge y 100% de aciertos para Rinconada. Ver Tabla 2 para más detalles de acierto y fallos.

Tabla 2: Análisis discriminante. Número de individuos correctamente clasificados basado en sus caracteres morfológicos.

<i>Localidad</i>	<i>Porcentaje correcto de reasignación</i>	<i>IP</i>	<i>FJ</i>	<i>RN</i>	<i>Total individuos</i>
<i>IP</i>	87	47	6	1	54
<i>FJ</i>	90	5	52	1	58
<i>RN</i>	100	0	0	6	06

Análisis genético poblacional

Región Control. Los 530 pb secuenciados de la Región Control (D-Loop) del ADN mitocondrial no mostraron inserciones o deleciones. Los valores de diversidad indicaron que Fray Jorge presentó mayor diversidad haplotípica y número promedio de diferencias entre pares de secuencias ($Hd = 0.644$; $k = 1.467$) seguido de Isla de Pascua ($Hd = 0.453$; $k = 0.507$). Debido a que sólo se obtuvo una secuencia de buena calidad para los individuos de Rinconada, no fue posible calcular los índices para esta localidad.

ND2. Se secuenciaron 884 pb del gen ND2. No se detectó inserciones o deleciones y los valores de diversidad indicaron que ambas localidades del continente Fray Jorge y

Rinconada poseen mayor diversidad haplotípica y número promedio de diferencias entre pares de secuencias al ser comparadas con IP. Ver Tabla 3 para el valor de los índices.

Tabla 3: Índices de diversidad para Región Control y ND2 en las tres localidades muestreadas; *h*= número de haplotipos; *S*= sitios polimórficos, *Hd*= diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica; *k*= número promedio de diferencias entre pares de secuencias.

<i>Localidades</i>	Región Control					ND2				
	H	S	Hd	π	k	H	S	Hd	π	k
<i>Fray Jorge (FJ)</i>	3	4	0.644	0.00277	1.467	23	34	0.943	0.00538	4.723
<i>Isla de Pascua (IP)</i>	3	2	0.453	0.00096	0.507	2	1	0.054	0.00006	0.054
<i>Rinconada (RN)</i>	0	0	0	0	0	6	19	1	0.00965	8.533
<i>Total</i>	5	6	0.535	0.00167	0.886	28	42	0.797	0.00522	4.617

Red de Haplotipos

La red de haplotipos, construida para la región control, mostró la presencia de tres haplotipos separados por un paso mutacional, siendo uno compartido por las tres localidades. Fray Jorge e Isla de Pascua presentaron un haplotipo único cada uno (Figura 4a). En el caso del gen ND2, tres de los 28 haplotipos fueron compartidos entre Fray Jorge y Rinconada. Isla de Pascua presentó dos haplotipos únicos separados por un paso mutacional (Figura 4b).

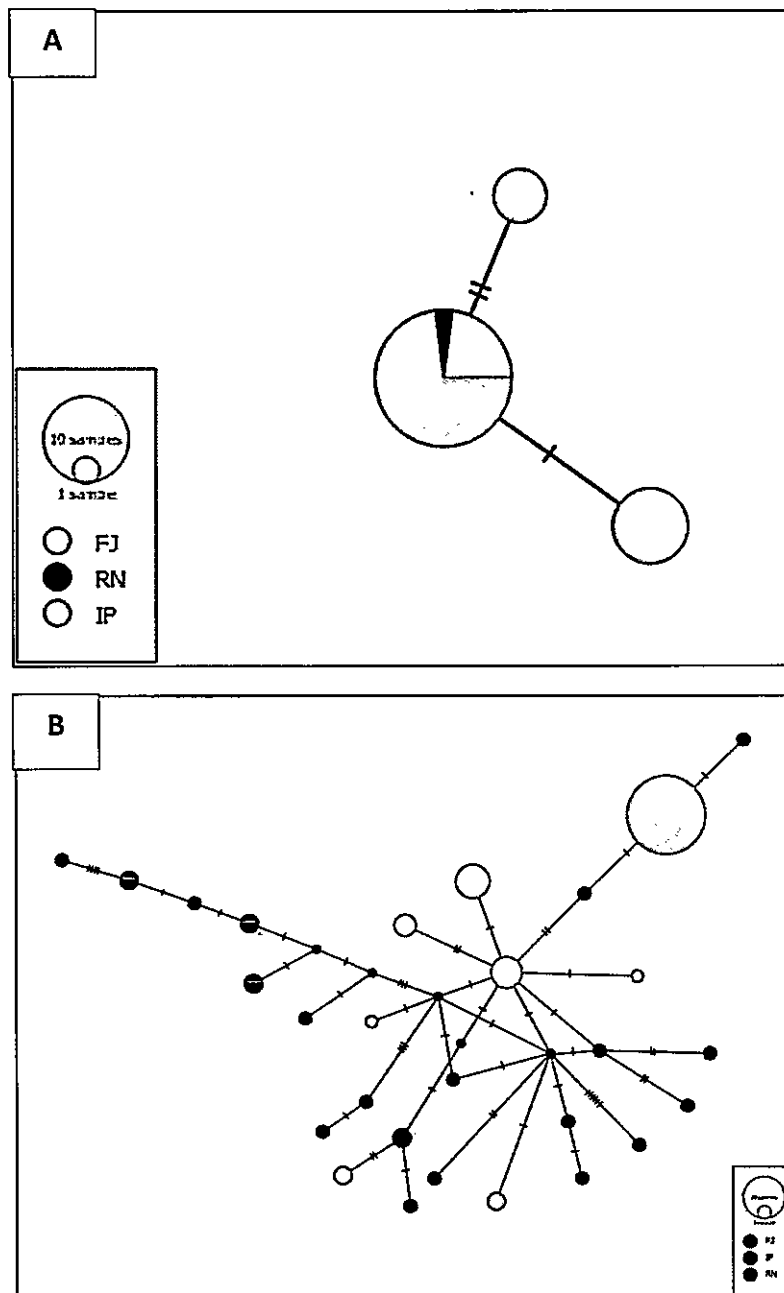


Figura 4: Red de haplotipos (A) la Región Control y (B) ND2. Fray Jorge (FJ = rojo), Rinconada (RN = azul) e Isla de Pascua (IP = verde). El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que contienen el haplotipo. Las líneas indican posiciones de las mutaciones dentro de las secuencias que separan los distintos haplotipos.

Comparaciones pareadas para los marcadores mitocondriales

Región Control. Para este sector del ADN mitocondrial se detectó diferencias significativas cuando se comparó IP y FJ ($F_{ST} = 0.333$; $P < 0.0001$). Es importante indicar que no fue posible comparar RN con las otras localidades debido al bajo número de muestras que se logró amplificar.

ND2. Las comparaciones pareadas de F_{ST} fueron utilizadas para evaluar diferenciación genética entre los sitios muestreados (Tabla 4). Se detectó diferencias altamente significativas al comparar Isla de Pascua con las localidades del continente ($P < 0.0001$). Por su parte, Rinconada y Fray Jorge también presentaron diferencias significativas entre ellas ($P = 0.014$).

Tabla 4: Diferenciación genética por pares para marcador mitocondrial ND2. Valores de F_{ST} se muestran bajo la diagonal y valores de P sobre la diagonal.

<i>Localidad</i>	<i>RN</i>	<i>FJ</i>	<i>IP</i>
<i>RN</i>	-	0.014	<0.0001
<i>FJ</i>	0.1738	-	<0.0001
<i>IP</i>	0.5949	0.3861	-

Microsatélites

Siete de los 25 loci probados resultaron polimórficos. La riqueza alélica más alta se detectó en RN ($R_a = 3.818$) para el locus TG03-002 y la más baja en IP ($R_a = 1$) para tres loci TG13-009, TG01-114 y TG04-004. El promedio de la heterocigocidad esperada, fue más alto y similar para las poblaciones continentales (FJ = 0.3795 y RN = 0.3763) y menor en IP (0.2383) (ver Anexo 2). No se detectó evidencias de desviaciones significativas a lo esperado para Hardy-Weinberg (HWE), ni desequilibrio de ligamiento ($P > 0.05$).

El valor de F_{ST} global fue de 0.07183 ($P < 0.001$) por lo que al menos una comparación pareada entre localidades presenta diferencias estadísticamente significativas. Las comparaciones por pares de sitios mostraron diferencias significativas entre Isla de Pascua y Fray Jorge ($F_{ST} = 0.0744$; $P < 0.0001$) y entre Rinconada e Isla de Pascua ($F_{ST} = 0.04749$; $P = 0.0449$); la comparación entre Fray Jorge y Rinconada no mostró significancia estadística ($F_{ST} = 0.02748$; $P = 0.0566$).

En cuanto al análisis de Componentes Principales realizado con microsatélites, éste mostró que los dos primeros componentes explicaron el 27.3% de la varianza total. El Componente 1 (15.5% de la varianza) separó a los individuos de Isla de Pascua de las otras dos localidades y el Componente 2 (11.8% de la varianza) separó a Rinconada de las otras dos localidades (Figura 5).

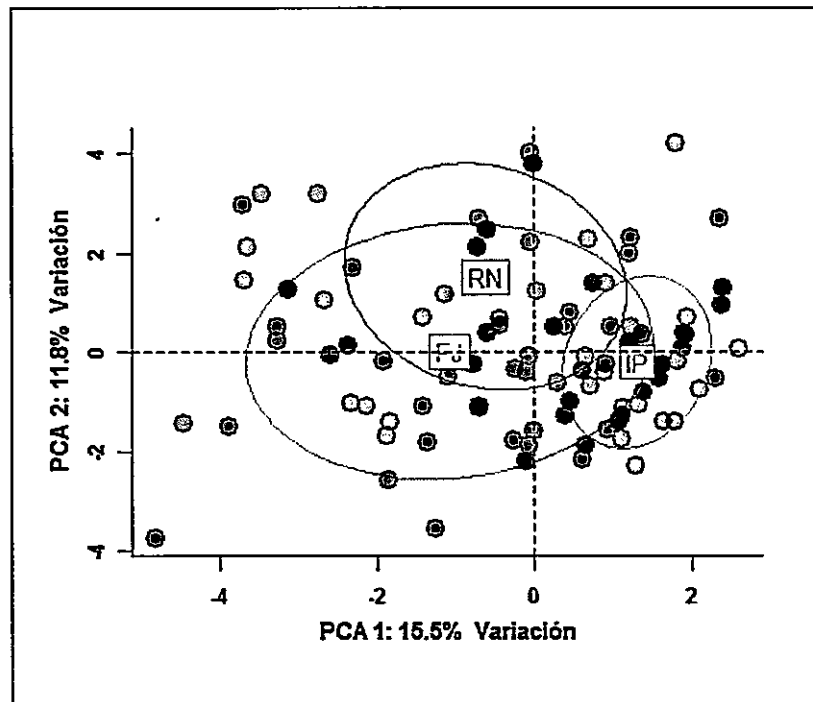


Figura 5: Gráfico de componentes principales genético de microsatélites. Los puntos representan los genotipos de los individuos, las localidades se encuentran marcadas dentro de una elipse de 95% de confianza.

Con el análisis de discriminantes para componentes principales (DAPC), se obtuvo como resultado que el número óptimo de cluster genéticos fue $K = 2$, en el cual, el primer grupo estuvo constituido mayoritariamente por individuos del continente asignando los siguientes individuos para cada localidad: FJ = 43, IP = 8 y RN = 2. El segundo grupo estuvo conformado en su mayoría por individuos de Isla de Pascua, asignando FJ = 15, IP = 43 y RN = 4. Además, el gráfico de dispersión muestra que el Discriminante 1 explica el mayor porcentaje de las diferencias entre clusters, separa a los individuos de Isla de Pascua de las otras dos localidades. Por su parte, el Discriminante 2 separa a dos grupos de clusters,

uno que agrupa a los clusters de Fray Jorge e Isla de Pascua, separando a los individuos de RN (Figura 6).

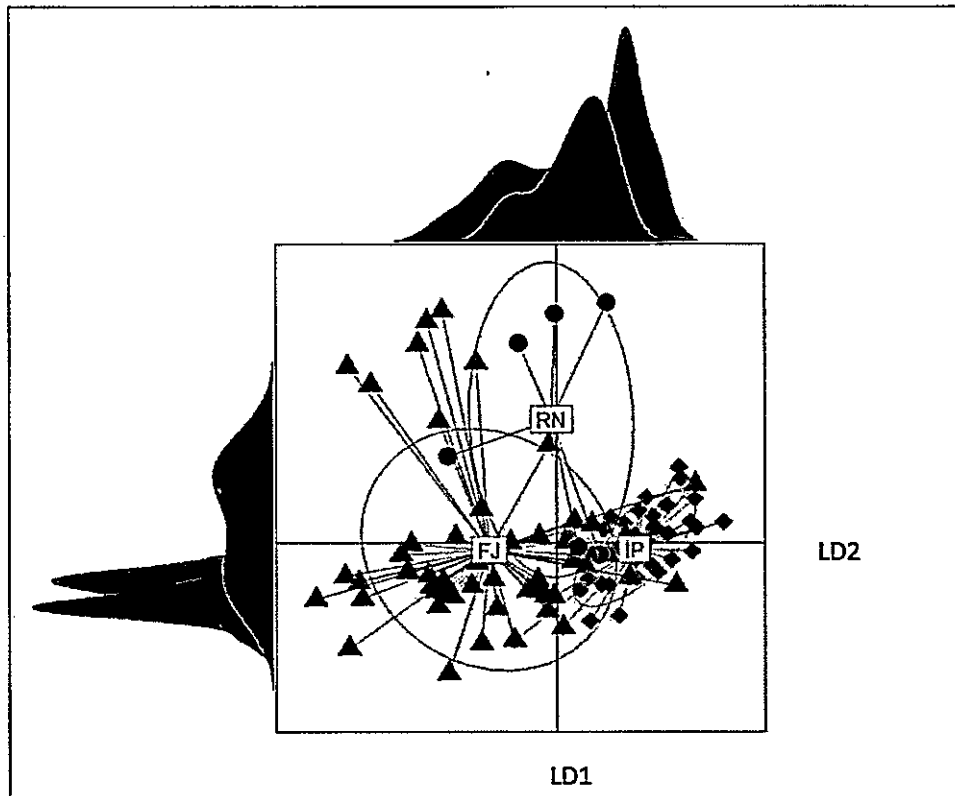


Figura 6: Gráfico DAPC de dispersión Discriminante 1 versus Discriminante 2 y sus respectivas densidades para cada localidad.

DISCUSIÓN

El presente estudio detectó las primeras diferencias entre los individuos de *Diuca diuca* presentes en el continente con aquellos que actualmente habitan en Isla de Pascua, los cuales provienen de una introducción intencional como especie ornamental. La población actual en la isla presenta menor diversidad genética y modificaciones en algunos rasgos morfológicos asociados a medidas corporales y forma del pico al ser comparados con individuos muestreados en Chile continental.

Caracteres morfológicos

La literatura sugiere que aves y mamíferos muestran diferentes patrones de evolución en las islas (Clegg & Owens 2002). Para mamíferos se ha descrito la “regla de isla” en donde las especies que presentan gran tamaño corporal en el rango geográfico original cambian hacia tamaños más pequeños en islas y los taxa de tamaños pequeños evolucionan hacia tamaños más grandes (Lomolino 1985; Brown et al. 1993). En el caso de las aves, no se ha demostrado una tendencia clara relacionada con el tamaño corporal (Case 1978; Grant & Grant 1998; Blondel 2000). Sin embargo, se indica que las aves en las islas tienden a tener el pico más largo en aquellas especies que se especializan en alimentación de semillas y pequeños invertebrados (Case 1978; Blondel 2000), sugiriendo que cambios de alimentación sería una de las primeras causas que conduciría

a la divergencia morfológica en aves que llegan a las islas (Grant 1965; Grant & Grant 1998).

Abbott (1980) y Scott et al. (2003) indicaron que, en ausencia de competidores interespecíficos, los picos de pequeños passeriformes pueden alargarse en las islas como respuesta a una amplia gama de tamaño en las presas. En el presente estudio, las diucas de Isla de Pascua poseen solamente el pico más largo a diferencia de los individuos colectados desde las localidades continentales. Se conoce que en el continente *D. diuca* se alimenta de semillas de gramíneas y de algunos frutos e insectos (Marín 2011), sin embargo, en Isla de Pascua esta especie vive muy cerca de los habitantes, alimentándose de desechos domésticos (migajas de pan o inclusive carne restante en las parrillas). Además, las observé ingresando a los gallineros a alimentarse del alimento para aves de corral. Esta evidencia sugiere que *D. diuca* pasó de ser una especie granívora a una especie generalista en Isla de Pascua.

En contraste con los rasgos relacionados con el forrajeo, largo de ala y de cola, la población insular posee las alas más largas a diferencia de las poblaciones del continente. Estudios previos, asocian la longitud del ala y de la cola con la densidad arbórea, lo que sugiere que la morfología de vuelo puede verse afectada por las distancias de vuelo entre los árboles. Los mecanismos de vuelo predicen que las alas largas son favorecidas para el vuelo rápido y directo con baja vegetación, mientras que las alas más cortas y más redondeadas confieren maniobrabilidad en ambientes más densos (Milá et al. 2009).

Otro rasgo morfológico que presentó diferencias fue el largo del tarso, cuya función es de dar soporte y locomoción al ave en tierra. Las diferencias en el tamaño del tarso podrían estar igualmente correlacionadas con actividades de forrajeo, variando al tipo de alimentación y uso de sustrato. El tarso de las diucas de Isla de Pascua fue más corto que las del continente. Generalmente, las aves que se alimentan y se mueven en perchas o sustratos más delgados y no tan rígidas (i.e colgando de ellas), son más propensas a tener un tarso más corto, que aquellas que se alimentan en una percha más grande y firme en una postura vertical (Grant 1965; Grant 1996; Covas 2016). Esta evidencia de literatura se contrapone a lo observado en la isla, ya que se puede observar diucas alimentándose en el suelo en postura vertical. Otros estudios que incorporan análisis biomecánicos han demostrado que las especies que suben a los árboles saltando hacia arriba en los troncos, tendrían tarsos más cortos, con el fin de minimizar la distancia entre el centro de masa y el tronco y reducir así las fuerzas musculares necesarias en la flexión y extensión de la pierna durante el apego a una superficie vertical (Zeffer & Norberg 2003).

Otro punto importante es la interacción con predadores. En el continente se conoce que son depredadas por tiuques, cernícalos, chunchos, lechuzas y gatos (Housse 1945), siendo esto una presión constante al momento del forrajeo (Clegg & Owens 2002; Lomolino 2005). En Isla de Pascua el número de predadores es bajo para la especie, conviviendo sólo con gatos y tiuques, por lo tanto, existiría mayor libertad de movimiento de esta especie cerca de los habitantes sin tener presión de depredación.

Otra característica del comportamiento diferente observada entre el continente y la Isla de Pascua es el gregarismo. En el continente se observa que forman bandadas, solamente durante la temporada invernal o para alimentarse en grupo cuando el alimento es reducido (Goodall et al. 1946; Housse 1945; Fjeldså et al. 1990). Sin embargo, en Isla de Pascua todo el tiempo se les puede observar agrupadas formando bandadas, esto podría ser explicado por la baja estacionalidad climática de la isla (comunicación personal Alejandro Simeone).

Otra característica que distingue a las diucas de Isla de Pascua, es la alta frecuencia de individuos con alteraciones cromáticas; conocida como leucismo. Acosta (2005) indicó que el leucismo es poco común y su origen suele ser genético (Acosta 2005). Dado que en el continente no se ha reportado individuos de *D. diuca* con leucismo (Fuentes & González 2011; Marín & Cáceres 2011), es posible que la alta endogamia, causada por la baja introducción de individuos de *D. diuca* llegados a la isla, podrían haber provocado un aumento en la frecuencia de algún alelo recesivo albino del gen codificante de la melanina.

Finalmente, las diferencias morfológicas encontradas entre Isla de Pascua y el continente podrían ser dadas por los individuos que fueron introducidos poseían ese tipo de fenotipo o características especiales; pico más largo, longitud del tarso más corto o alas más largas y lo que estamos observando actualmente sea solo la presencia de estos caracteres especiales en todos los individuos que poblaron la isla.

Análisis genéticos

Los haplotipos de las dos regiones del ADN mitocondrial (D-Loop y ND2) evidencian un interesante resultado para ambas regiones, ya que en ambas se encontraron haplotipos únicos para Isla de Pascua. Considerando el poco tiempo que poseen los individuos en la isla (90 años aprox.), es posible que estos haplotipos no se originaran en la Isla, sino que posiblemente estos haplotipos ya se encuentren presentes de forma natural en la zona central de Chile, pero en bajas proporciones, por lo tanto, difícil de muestrear. Nuevos muestreos podrían detectar estos haplotipos en el continente.

Los microsatélites nos mostraron un patrón bastante claro, existiendo menor diversidad genética en la Isla al ser comparado con los sitios del continente y una consistente diferencia genética entre estas dos zonas. El DAPC sugiere una mayor similitud de los individuos de Isla de Pascua con aquellos presentes en Rinconada pudiendo ser consistente con las evidencias del transporte de las primeras aves desde la V Región del país. La baja heterocigocidad observada en isla de Pascua en relación a los valores observados en el continente sugieren un evento fundador causado por la introducción de pocos individuos de *D. diuca* a Isla de Pascua. No podemos estimar cuantos fueron los individuos introducidos, sin embargo, al encontrar un número máximo de 4 alelos en los microsatélites más variables, esto es indicativo que un mínimo de un macho y una hembra heterocigota para este carácter podrían haber sido los individuos que iniciaron la población de Isla de Pascua.

Finalmente, este estudio mostró una clara diferencia en la diversidad genética y cambios en los caracteres morfológicos de la población de *D. diuca* presente en Isla de Pascua, causado por un efecto fundador producida por el hombre. Esta evidencia indica que las especies introducidas/invasoras pueden ser exitosas inclusive con una reducida variabilidad genética, encontrándose cambios que no sólo pueden ser explicados como respuesta frente al ambiente, sino que además por un componente genético. Es por esto que la combinación genotipo + ambiente provocaría que el fenotipo de *D. diuca* a su llegada a Isla de Pascua modificara algunos rasgos morfológicos (carácter plástico) para lograr sobrevivir a este nuevo ambiente, a diferencia de otras especies las cuales fueron introducidas en esta localidad y que actualmente no se encuentran presentes, como, por ejemplo, la loica, loros, lechuzas (Marín 2010). Esta plasticidad fenotípica en sí misma es un carácter que puede evolucionar y que puede o no ser adaptativo (Ghalambor et al. 2007; Reznick et al. 2001).

En la presente tesis se muestra las primeras evidencias tanto genéticas como morfológicas, que nos sugieren que las diucas en Isla de Pascua están comenzando a diferenciarse de aquellas poblaciones del continente, pero aún estamos en un proceso inicial por lo que es muy arriesgado hablar de proceso de especiación reciente, ya que solo han pasado aproximadamente 90 años desde que fue introducida en la isla. Lo que queda pendiente es evaluar cómo estos individuos en Isla de Pascua han cambiado algunos caracteres de historia de vida, tales como tamaño de huevos, número de huevos, sobrevivencia en polluelos uso de hábitat, alimentación.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la población de *Diuca diuca* presente en Isla de Pascua posee diferencias tanto genéticas como morfológicas, evidenciando que existe una reducida diversidad con ambos marcadores; nuclear y mitocondrial. En cuanto a las diferencias en la morfología del ave, estas se relacionan principalmente con la forma del pico (asociadas al tipo de alimentación) y en medidas corporales (asociadas a la conducta).

Estas diferencias se podrían asociar principalmente a un reciente efecto fundador causado por la acción humana, complementándose con las diferencias ecológicas existentes en la isla, como lo es la adquisición de nuevos hábitos alimenticios y la modificación de algunas características conductuales, distintas a las de la población presente en el continente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, I. (1980) Theories dealing with the ecology of landbirds on islands (1st ed.). London: Academic Press, 11: 329-371.
- Acosta, L. (2005) Primer caso conocido de leucismo parcial en *Tiaris olivacea* en Cuba. *Huitzil*, 6: 14-15.
- Agrawal, A.A., Laforsch, C., Tollrian, R. (1999) Transgenerational induction of defenses in plants and animals. *Nature* 401: 60-63.
- Aljanabi, S.M., and Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25(22): 4692-4693.
- Arroyo, M.T.K., Marticorena, C., Matthei, O., Cavieres, L. (2000) Plant invasions in Chile: Present patterns and future predictions. *Invasive Species in a Changing World*: 385-421.
- Baldini, A., Oltremari, J., Ramírez, M. (2008) Impact of american beaver (*Castor canadensis*, Rodentia) in lenga (*Nothofagus pumilio*) forests of Tierra del Fuego, Chile. *Bosque* 29(2): 162-169.

- Barceló, G., Ríos, J.M., Maldonado, K., Sabat, P. (2016) Energetic cost and implications of the intake of plant secondary metabolites on digestive and renal morphology in two austral passerines. *Journal of Comparative Physiology B* 186(5): 625-637.
- Barros, R. (1921) Aves de la cordillera de Aconcagua. *Revista Chilena de Historia Natural* 25:167-192.
- Blackburn, T., Lockwood, J., Cassey, P. (2009) Avian invasions: The ecology and Evolution of exotics birds. *Oxford University Press Inc, New York*.
- Blackburn, T., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J., Duncan, R., & Jarošík, V., Wilson, J., Richardson, D. (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 26: 333-339.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikki, L., Goudet, J., Bonhomme, F. (2000) GENETIX version 4.02. Logiciel sous WindowsMT pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Blondel, J. (2000) Evolution and ecology of birds on islands: trends and perspectives. *Vie Et Millieu* 50: 205-220.
- Brown, J. H., Marguet, P. A. Tagler, M. L. (1993) Evolution of body size: consequences of an energetic definition of fitness. *The American Naturalist* 142: 573-584.

- Camus, P., Castro, S., Jaksic, F. (2008) El conejo europeo en Chile: Historia de una invasión biológica. *Historia* 41(2): 305-339.
- Capdevila, L., Zilletti, B., Suárez, V. (2013) Causes of biodiversity loss: Invasive Alien Species. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* 10: 55-75.
- Case, T. (1978) A General Explanation for Insular Body Size Trends in Terrestrial Vertebrates. *Ecology* 59 (1): 1-18.
- Clegg, S., and Owen, I. (2002) The "islan rule" in birds: medium body size and its ecological explanation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269:1359-1365.
- Covas, R. (2016) Life-History Evolution in Island Populations of Birds. Kliman, R.M. (ed.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. vol. 2, pp. 352-358. Oxford: Academic Press.
- Cree, A., Daugherty, Ch., and Hay, J. (1995) Reproduction of a Rare New Zealand Reptile, the Tuarara *Sphenodon punctatus*, on Rat-Free and Rat-Inhabited Islands. *Conservation Biology* 9(2): 373-383.
- Darwin, Ch (1839) The voyage of the Beagle. Versión online <http://www2.hn.psu.edu/faculty/jmanis/darwin/voyagebeagle.pdf>

- Dawson, D. A., Horsburgh, G.J., Küpper C., Stewart, I.R., Ball, A.D., Durrant, K.L., Hansson, B., Bacon, I.D.A., Bird, S., Klein, A., Krupa, A.P. (2010) New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility -as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 475-494.
- Duncan, R.P., Blackburn, T.M., Sol, D. (2003) The ecology of birds introductions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 71-98.
- Eales, J., Thorpe, R., Malhotra, A. (2008) Weak founder effect signal in a recent introduction of Caribbean *Anolis*. *Molecular Ecology* 17: 1416-1426.
- Excoffier, L., and Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Filatov, D. (2002) PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology* 2: 621-624.
- Fjeldså, J. and Krabbe, N. (1990) Birds of de High Andes. *Zoological Museum, University of Copenhagen*.
- Flores, M., Schlatter, R., Hucke-Gaete, R (2014) Seabirds of Easter Island, Salas y Gómez Island and Desventuradas Islands Southeastern Pacific Ocean. *Latin American Journal of Aquatic Research* 42(4): 752-759.

- Fridolfsson, A. and Ellegren, H. (1999) A simple and universal method for molecular sexing of nonratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.
- Fuentes, D. and González, D. (2011) Aberraciones cromáticas del plumaje en aves: nuevos reportes en Chile. *Boletín Chileno de Ornitología* 17(2): 113-121.
- GeneMarker <http://www.softgenetics.com/GeneMarker.php>.
- Ghalambor, C., McKay, J., Carroll, S., Reznick, D. (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environment. *Functional Ecology* 21: 394-407.
- Grant, P. (1965) The Adaptive Significance of Some Size Trends in Island Birds. *Evolution* 19(3): 355-367.
- Grant, P.R., and Grant, B.R. (1993) Evolution of Darwin's finches caused by a rare climatic event. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 251: 111-117.
- Grant, P. (1994) Population variation and hybridization: comparison of finches from two archipelagos. *Evolutionary Ecology* 8: 598-617.
- Grant, P. (1996) High survival of finch hybrids: effects of beak morphology and diets. *Ecology* 77: 500-509.
- Grant PR and Grant BR (1998) Speciation and hybridization of birds on islands. In: *Evolution on Islands* (ed. Grant PR), *Oxford University Press*. 142-162

- Grant, P. (2001) Reconstructing the evolution of birds on islands: 100 years of research. *Oikos* 92: 385-403.
- Grant, P.R., and Grant, B.R. (2002) Unpredictable evolution in a 30-year study of Darwin's finches. *Science* 296: 707-711.
- Goodall, J. D., Johnson, A. W., Philippi, R. A. (1946) Las Aves de Chile, su conocimiento y sus costumbres " Tomo 1. Buenos Aires, Platt Establecimientos Gráficos S.A.
- Goudet, J. (1995) FSTAT: a computer program to calculate F-statistics. *Journal Heredity* 86: 485-486.
- Henderson, S., Dawson, T.P., & Whittaker, R.J. (2006) Progress in invasive plants research. *Progress in Physical Geography* 30: 25-46.
- Housse, R. (1945) Las aves de Chile en su clasificación moderna, su vida y costumbre. *Ediciones Universidad de Chile*.
- Jaksic, F. (1998) Vertebrate invaders and their ecological impacts in Chile. *Biodiversity and Conservation* 7: 1427-1445.
- Jaramillo, A., Johnson, M., Rothfels, C., Johnson, R. (2008) The native and exotic avifauna of Easter Island: Then and now. *Boletín Chileno de Ornitología* 14(1): 8-21.
- Johnson, A.W., Millie W.R, & Moffett G. (1970) Notes on the birds of Easter Island. *Ibis* 112: 532-538.

- Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F. (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11(1): 1.
- Jones, H.P., Tershy, B.R., Zavaleta, E.S., Croll, D.A., Keitt, B.S., Finkelstein, M.E., Howald, G.R. (2008) Severity of the effects of invasive rats on seabirds: a global review. *Conservation Biology* 22: 16-26.
- Keller, L., Grant, P., Grant, R., Petren, K., (2001) Heritability of morphological traits in Darwin's Finches: misidentified paternity and maternal effects. *Heredity* 87:325-336.
- Kolar, C.K., and Lodge, D.M. (2001) Progress in invasions biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 199-204.
- Kolbe, J., Leal, M., Schoener, T., Spiller, D., Losos, J. (2012) Founder effects persist despite adaptive differentiation: a field experiment with lizards. *Science* 335: 1086-1089.
- Lecis, R., Ferrando, A., Ruiz-Olmo, J., Mañas, S., Domingo-Roura, X. (2008) Population genetic structure and distribution of introduced American mink (*Mustela vison*) in Spain, based on microsatellite variation. *Conservation Genetics* 9: 1149-1161.
- Lambrinos, J.G. (2004) How interactions between ecology and evolution influence contemporary invasion dynamics. *Ecology* 95: 2061-2070.

- Lomolino, M. (1985) body size of mammals on islands: the island rule reexamined. *The American Naturalist* 125: 310-316.
- Lomolino, M. (2005) Body size evolution in insular vertebrates: generality of the island rule. *Journal of Biogeography* 32: 1683-1699.
- López-Calleja, M.V. (1995) Diet of *Zonotrichia capensis* and *Diuca diuca*: effects of seasonal changes in trophic resources and richness of granivorous birds in central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 68: 321-331.
- Losos, J., and Ricklefs, R. (2009) Adaptation and diversification on islands. *Nature* 457: 830-836.
- Mack, R.N., Simberloff D, Lonsdale, W.M., Evans, H., Clout, M., Bazzas, F.A. (2000) Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10: 689-710.
- Maćkiewicz, A., and Ratajczak, W. (1993) Principal components analysis (PCA). *Computers & Geosciences* 19(03): 303-342.
- Marín, M. & Cáceres, P. (2010) Sobre las aves de Isla de Pascua. *Boletín del Museo de Historia Natural, Chile* 59: 75-95.
- Marín, M. (2011) Sobre la biología reproductiva de la Diuca (*Diuca diuca*) en Chile central. *Ornitología Neotropical* 22: 3669-3678.
- Mayr, E. (1963) *Animal Species and Evolution*. Belknap Press, Cambridge, Massachusetts.

- Medina, F.M., Bonnaud, E., Vidal, E., Tershy, B.R., Zavaleta, E.S., Josh Donlan, C., Keitt, B.S., Le Corre, M., Horwath, S.V., Nogales, M. (2011) A global review of the impacts of invasive cats on island endangered vertebrates. *Global Change Biology* 17: 3503-3510.
- Merila, J., Björklund, M., Baker, A. (1996) The successful founder: genetics of introduced *Carduelis chloris* (greenfinch) populations in New Zealand. *Heredity* 77: 410-422.
- Milá, B., Wayne, R., Fitze P., Smith, T. (2009) Divergence with gene flow and fine-scale phylogeographical structure in the wedge-billed woodcreeper, *Glyphorhynchus spirurus*, a Neotropical rainforest bird. *Molecular Ecology* 18:2979–2995.
- Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R. (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.
- Niinemets, Ü., Valladares, F., Ceulemans, R. (2003) Leaf-level phenotypic variability and plasticity of invasive *Rhododendron ponticum* and non-invasive *Ilex aquifolium* co-occurring at two contrasting European sites. *Plant, Cell and Environment* 26: 941-956.
- Piersma, T., and Drent, J. (2003) Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology and Evolution* 18(5): 228-233.

- Pigliucci, M., Murren, C., Schlichting, C. (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology* 209: 2362-2367.
- PopART (2013) Population Analysis with Reticulate Trees. <http://popart.otago.ac.nz>
- Quintana, F., López, G., Somoza, G. (2008) A Cheap and Quick Method for DNA-based Sexing of Birds. *Waterbirds* 31(3): 485-488.
- Quiroz, C., Pauchard, A., Cavieres, L., Anderson Ch. (2009) Quantitative analysis of the research in biological invasions in Chile: Trends and challenges. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 497-505.
- R Core Team (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Ralph, C., Geupel, G., Pyle, P., Martin, T., Desante, D., Milá, B. (1996) Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-159. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, 46 p.
- Reznick, D.N., and Ghalambor, C.K. (2001) The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about conditions that promote adaptive evolution. *Genetica* 112: 183-198.

- Rozas, J., Sánchez-Del Barrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19(18): 2496-2497.
- Reed, C. (1912) Datos para la biología del *Molothrus bonariensis*. *Revista Chilena de Historia Natural* 17: 172-179.
- Sakai, A., Allendorf, F., Holt, J., Lodge, D., Molofsky, J., With, K., Cabin, R., Cohen, J., Norman, C., Mccauley, D., Neil, P., Parker, M., Thompson, J., Weller, S. (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 305-332.
- Sato, A., Tichy, H., Colm, O., Grant, P.R., Grant, B.R., Klein, J. (2001) On the Origin of Darwin's Finches. *Molecular Biology and Evolution* 18: 299-311.
- Scott, S., Clegg, S., Blomberg, S., Kikkawa, J., Owens, I. (2003) Morphological shifts in island-dwelling birds: the roles of generalist foraging and niche expansion. *Evolution* 57(9): 2147-2156.
- Shao, S., Quan, Q., Cai, T., Song, G., Qu Y., Lei, F (2016) Evolution of body morphology and beak shape revealed by a morphometric analysis of 14 Paridae species. *Frontiers in Zoology* 13:30.
- Servicio Agrícola y Ganadero (2016) <http://www.sag.cl>. Permiso (Nº:78/2015)

- Skjelseth, S., Ringsby, T., Tufto, J., Jensen, H., Sæther, B.E. (2007) Dispersal of introduced house sparrows *Passer domesticus*: an experiment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 274: 1763-1771.
- Sorenson, M., Ast, J., Domcheff, D., Yuri, T., Mindell, D. (1999) Primers for a PCR-Based Approach to Mitochondrial Genome Sequencing in Birds and Other Vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12(2): 105-114.
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN)
<https://www.iucn.org/es>
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. (2004) Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology* 4: 535-538.
- Whittaker, R., and Fernández-Palacios, J (2007) Island Biogeography Ecology, Evolution, and Conservation. Oxford University Press, Oxford
- Wright, S. (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Young, T.P., Stanton, M.L., Christian, C.E. (2003) Effects of natural and simulated herbivory on spine lengths of *Acacia drepanolobium* in Kenya. *Oikos* 101: 171-179.
- Zeffer, A., and Norberg, U. (2003) Leg morphology and locomotion in birds: requirements for force and speed during ankle flexion. *The Journal of Experimental Biology* 206: 1085-1097.

ANEXO

Anexo 1. Resumen de las variables genéticas estimadas a partir de los siete microsatélites analizados. N: número de individuos, Na: número de alelos, Ra: riqueza alélica, He: heterocigosidad esperada, Ho: heterocigosidad observada.

<i>Locus</i>	<i>FJ</i>	<i>RN</i>	<i>IP</i>
<i>TG01-147</i>			
<i>N</i>	58	6	50
<i>Na</i>	3	3	2
<i>Ra</i>	2.691	2.818	1.769
<i>He</i>	0.5575	0.4028	0.2262
<i>Ho</i>	0.6552	0.3333	0.26
<i>TG13-009</i>	<i>FJ</i>	<i>RN</i>	<i>IP</i>
<i>N</i>	58	6	51
<i>Na</i>	2	1	1
<i>Ra</i>	1.306	1	1
<i>He</i>	0.066	0	0
<i>Ho</i>	0.069	0	0
<i>Fis</i>	-0.02703	NA	NA
<i>TG03-002</i>	<i>FJ</i>	<i>RN</i>	<i>IP</i>
<i>N</i>	58	6	51
<i>Na</i>	4	4	4
<i>Ra</i>	2.828	3.818	3.304
<i>He</i>	0.5733	0.6806	0.6745
<i>Ho</i>	0.6724	0.7424	0.6812
<i>TG05-053</i>	<i>FJ</i>	<i>RN</i>	<i>IP</i>
<i>N</i>	58	6	49
<i>Na</i>	3	3	3
<i>Ra</i>	2.82	2.833	2.765
<i>He</i>	0.6153	0.4861	0.5589
<i>Ho</i>	0.6207	0.5	0.5714
<i>TG08-024A</i>	<i>FJ</i>	<i>RN</i>	<i>IP</i>
<i>N</i>	58	5	49
<i>Na</i>	3	2	2
<i>Ra</i>	2.16	2	1.747
<i>He</i>	0.3774	0.42	0.2149

<i>Ho</i> <i>TG01-114</i>	0.4828	0.6	0.2449
<i>N</i>	58	6	51
<i>Na</i>	2	2	1
<i>Ra</i>	1.921	1.985	1
<i>He</i>	0.3381	0.2778	0
<i>Ho</i>	0.431	0.3333	0
<i>TG04-004</i>	FJ	RN	IP
<i>N</i>	58	6	51
<i>Na</i>	3	2	1
<i>Ra</i>	1.564	2	1
<i>He</i>	0.1295	0.375	0
<i>Ho</i>	0.1379	0.5	0

Anexo 2: Resumen de la frecuencia alélica por locus para cada localidad. N: número de individuos.

Locus	LOCALIDAD		
TG01-147	FJ	RN	IP
N	58	6	50
295	0.3103	0.1667	0.13
297	0.5776	0.75	0.87
299	0.1121	0.0833	0
TG03-002	FJ	RN	IP
N	58	6	51
146	0.5603	0.4167	0.3333
148	0.319	0.3333	0.4118
150	0.1034	0.1667	0.2059
152	0.0172	0.0833	0.049
TG05-053	FJ	RN	IP
N	58	6	49
218	0.1552	0.25	0.1429
223	0.3793	0.6667	0.5918
229	0.4655	0.0833	0.2653
TG08-024A	FJ	RN	IP
N	58	5	49
143	0.0259	0	0
147	0.7586	0.7	0.8776
149	0.2155	0.3	0.1224
TG01-114	FJ	RN	IP
N	58	6	51
202	0.7845	0.8333	1
204	0.2155	0.1667	0
TG04-004	FJ	RN	IP
N	58	6	51
187	0.931	0.75	1
189	0.0603	0.25	0
192	0.0086	0	0
TG13-009	FJ	RN	IP
N	58	6	51
217	0.9655	1	1
219	0.0345	0	0

Anexo 3: Tabla para cada variable morfológica estandarizada con el largo del tarso, con su promedio y desviación estándar, además del ANOVA, con su análisis posterior. En asterisco se encuentran identificadas las combinaciones de las localidades que fueron significativas ($P < 0.05$).

Peso	localidad	Promedio	Desviación	ANOVA	Test de Tukey
	IP	1.65	0.169	F = 9.1281; $P < 0.05$	IP-FJ
	FJ	1.59	0.221		RN-FJ*
	RN	1.301	0.04		RN-IP*
Lpico	localidad	Promedio	Desviación	ANOVA	Test de Tukey
	IP	0.701	0.059	F = 19.968; $P < 0.05$	IP-FJ*
	FJ	0.6471	0.044		RN-FJ
	RN	0.6105	0.019		RN-IP*
Anpico	localidad	Promedio	Desviación	ANOVA	Test de Tukey
	IP	0.3976	0.032	F = 1.324; $P > 0.05$	IP-FJ
	FJ	0.394	0.020		RN-FJ
	RN	0.377	0.011		RN-IP
Alpico	localidad	Promedio	Desviación	ANOVA	Test de Tukey
	IP	0.3972	0.032	F = 4.8549; $P < 0.05$	IP-FJ
	FJ	0.3879	0.022		RN-FJ
	RN	0.3631	0.011		RN-IP*
Nar	localidad	Promedio	Desviación	ANOVA	Test de Tukey
	IP	0.074	0.013	F = 11.99; $P < 0.05$	IP-FJ*
	FJ	0.0635	0.011		RN-FJ
	RN	0.063	0.002		RN-IP
Lcab	localidad	Promedio	Desviación	ANOVA	Test de Tukey
	IP	1.606	0.099	F = 23.817; $P < 0.05$	IP-FJ*
	FJ	1.503	0.069		RN-FJ
	RN	1.4695	0.045		RN-IP*

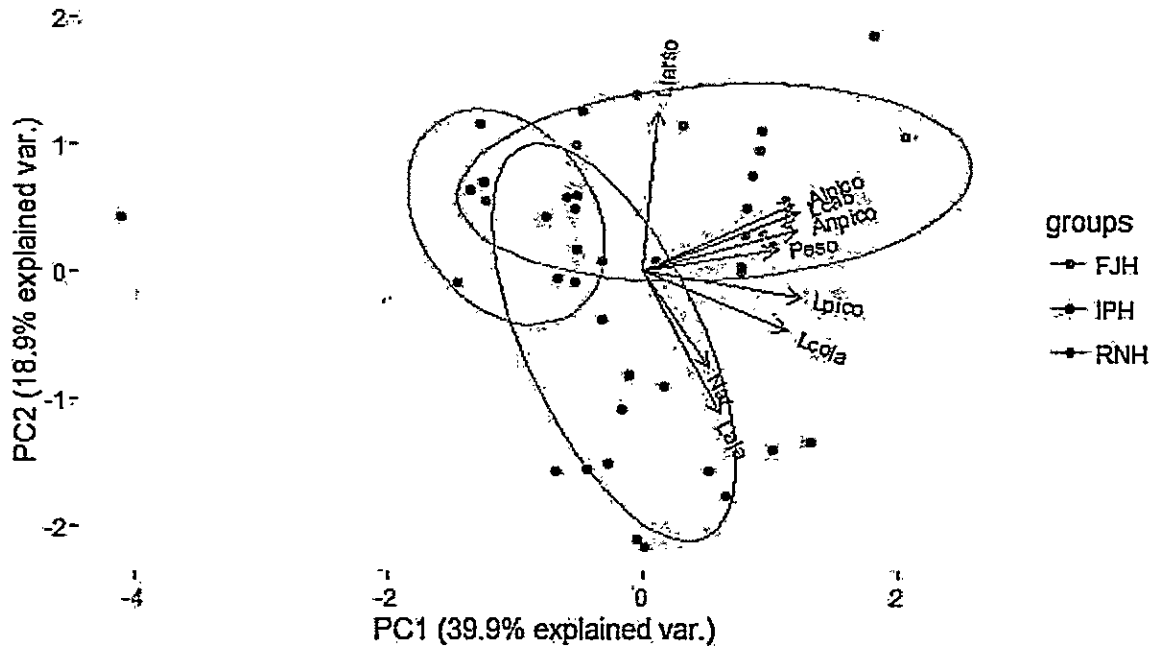
Lala	localidad	Promedio	Desviación	ANOVA	Test de Tukey
	IP	4.0205	0.316	F = 155.51; P < 0.05	IP-FJ*
	FJ	3.509	0.617		FJ-RN*
	RN	0.3565	0.01		RN-IP*
Lcola	Localidad	Promedio	Desviación	ANOVA	Test de Tukey
	IP	3.265	0.327	F = 300.54; P < 0.05	IP-FJ*
	FJ	3.057	0.237		FJ-RN*
	RN	0.3357	0.01		RN-IP*

Anexo 4: Tabla para cada variable morfológica con los datos en bruto, con su promedio y desviación estándar.

Peso	localidad	Promedio	Desviación
	IP	35.74	2.90
	FJ	37.37	5.03
	RN	33.83	3.06
Lpico	localidad	Promedio	Desviación
	IP	15.18	0.78
	FJ	15.21	1.05
	RN	14.61	0.44
Anpico	localidad	Promedio	Desviación
	IP	8.59	0.42
	FJ	9.11	0.49
	RN	7.68	0.57
Alpico	localidad	Promedio	Desviación
	IP	8.60	0.38
	FJ	9.26	0.55
	RN	8.38	0.41
Nar	localidad	Promedio	Desviación
	IP	1.60	0.25
	FJ	1.49	0.26
	RN	1.46	0.20
Lcab	localidad	Promedio	Desviación
	IP	34.76	0.96
	FJ	35.33	1.40
	RN	34.92	0.36

LAla	localidad	Promedio	Desviación
	IP	86.94	3.24
	FJ	85.27	2.80
	RN	84.33	2.06
Ltarso	localidad	Promedio	Desviación
	IP	21.71	1.33
	FJ	23.52	0.82
	RN	23.85	0.75
Lcola	localidad	Promedio	Desviación
	IP	70.59	4.77
	FJ	71.87	5.45
	RN	73.16	5.23

Anexo 5: Análisis de componentes principales para datos morfológicos de las diucas hembras de las tres localidades.



Anexo 6: Análisis de componentes principales para datos morfológicos de las diucas machos de las tres localidades.

