



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DE ALGUNOS COMPONENTES DEL CORTEJO Y TASA DE CÓPULAS EN EL ÉXITO DE PUESTA Y PATERNIDAD EN LA FRAGATA COMÚN (Fregata Magnificens)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

NADJA JELIENA PALOMO CONTRERAS



DIRECTORA DE TESIS: DRA. LAURA ROXANA TORRES AVILÉS

2005

m.344021



División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Efectos de algunos componentes del cortejo y tasa de cópulas en el éxito de puesta y paternidad en la fragata común (*Fregata magnificens*)."

realizado por Nadja Jeliene Palomo Contreras

con número de cuenta 09855384-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Laura Roxana Torres Avilés

Propietario

Dr. Horacio Merchant Laríos

Propietario

Dr. Carlos Rafael Cordero Maceda

Suplente

Dr. Alejandro Córdoba Aguilar

Suplente

Dra. María Marcela Osorio-Beristain

**Consejo Departamental de**  
**Biología**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

**A Joe en su memoria**

**A Dora y Carlos por su amor**

**A Gerardo, Dora y Areli por su apoyo.**

## **Agradecimientos**

A mis padres y abuelos que siempre han estado para alentarme y apoyarme incondicionalmente pero sobre todo por la paciencia y amor que me han dado.

A mi hermana Areli (Fig) por todos los consejos y desvelos que me brindo durante todo este proceso.

De manera muy especial a Joe por haberme contagiado su pasión por la conducta, por todas las enseñanzas y el tiempo y paciencia que tuvo.

A Miguel por darme tanto apoyo en la isla y en el laboratorio, por la paciencia que siempre tuviste conmigo y por todo lo que aprendí de ti.

Al Dr. Merchant y a Norma por abrir las puertas de su laboratorio y hacerme parte de él y por toda la enseñanza.

A los voluntarios que estuvieron conmigo en el campo (Gaby, Jordi y Rodrigo) por soportar todas mis obsesiones e histerias y lograron tenerme paciencia; que hicieron de mi proyecto el suyo.

A los pescadores de Isla Isabel por mostrarme la parte humilde de la amistad.

De manera muy especial le agradezco a Roxana por todo el apoyo que me brindo para poder concluir este proyecto, sobre todo gracias por las palabras de aliento y todo el tiempo dedicado.

A todos los integrantes del Laboratorio de Conducta Animal por preocuparse, por hacerme reír, por compartir conocimientos. En especial quiero darle las gracias a Larisa por hacerme reír tanto, a Chelen por la ayuda y compañía en el laboratorito.

A Dany y Mariana por su amistad y lealtad que me han brindado en este tiempo.

A Lily y Poncho por su apoyo y paciencia que me han dado estos últimos meses.

A mis sinodales Marcela, Alex, Carlos y Dr. Merchant por los comentarios que hicieron de éste un mejor trabajo.

A la administración del Parque Nacional Isla Isabel por toda la logística para el trabajo de campo.

A Sergio, Hutch, Sofía y Hector por su constante alegría y cariño.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
Cortejo intra-pareja y cópulas repetidas.....	4
a) <i>Hipótesis de coordinación reproductiva y fertilización</i> .....	4
b) <i>Hipótesis de evaluación de la calidad pareja</i> .....	5
c) <i>Hipótesis de competencia espermática y aumento de la certeza de paternidad</i> .....	5
Señales fenotípicas.....	7
Historia natural de <i>Fregata magnificens</i> .....	8
<b>Objetivos, Hipótesis y Predicciones</b> .....	11
<b>Métodos</b>	
Área de estudio y registro de conducta.....	13
Análisis de la paternidad.....	11
Determinación de la presencia de estructuras para almacenar espermatozoides.....	15
Análisis de datos.....	15
<b>Resultados</b>	
Descripción del cortejo intra-pareja.....	18
<i>Evaluación de la calidad de la pareja</i>	
Entrega de ramas o construcción del nido.....	18
Color del saco gular.....	19
<i>Competencia espermática e incremento de la certeza de paternidad</i>	
Patrón de cópulas y éxito de puesta.....	19
<i>Paternidad</i> .....	19
<i>Histología</i> .....	20
<b>Discusión</b> .....	21
Evaluación de la calidad de la pareja.....	22
Competencia espermática e incremento de la certeza de paternidad.....	22
Patrón de cópulas.....	23
Paternidad y maternidad.....	24
Histología.....	26
<b>Conclusión</b> .....	27
<b>Apéndice I</b> .....	28
<b>Apéndice II</b> .....	31
<b>Bibliografía</b> .....	33
<b>Figuras</b> .....	39

## Resumen

En aves socialmente monógamas con largos periodos de cuidado parental se ha propuesto que el patrón de cortejo intra-pareja y las cópulas repetidas podrían tener entre otras funciones la de coordinación reproductiva, fertilización, evaluación de la calidad de la pareja, o incremento de la certeza de paternidad. En este estudio evaluamos en *Fregata magnificens* si la tasa de entrega de ramas y el cambio en el color del saco gular del macho durante los días en espera antes de la primera cópula son para la hembra indicadores de la calidad del macho. También se evaluó si la frecuencia de cópulas y/o el número de días en espera antes de la primera cópula aumentan la certeza de paternidad (estimada como la probabilidad de que la pareja establezca una puesta) y la paternidad del macho pareja. Por último se determinó si las hembras tienen la capacidad de almacenar esperma en su tracto reproductivo; de ser así, estos almacenes de esperma podrían favorecer la competencia espermática. En 23 parejas de *F. magnificens* se determinó la fecha de inicio de la pareja, de puesta o de disolución de la pareja, la tasa de entrega de ramas para la construcción del nido, el color del saco gular durante los días en espera a la primera cópula, la frecuencia de cópulas intra y extra-pareja, y la presencia de las aves focales en los sitios de cortejo. Se realizaron análisis de paternidad en 24 familias (7 familias focales en las observaciones de conducta y 17 familias que se usaron solo para análisis de paternidad) usando la técnica de microsatélites, y se sacrificaron 2 hembras para investigar la presencia de estructuras para almacenar espermatozoides. Respecto a la hipótesis de evaluación del macho por parte de la hembra, se encontró una correlación positiva entre la tasa de cópulas y la tasa de entrega de ramas, pero aunque la tendencia fue en el sentido esperado el color del saco gular al realizarse la primera cópula y el éxito de puesta no estuvieron relacionados significativamente. Acorde con la hipótesis de aumento de la certeza de paternidad, se encontró una relación positiva entre la tasa de cópulas por día y la probabilidad de éxito de puesta, sin embargo, los nidos que fracasaron por el abandono del macho no presentaron una diferencia significativa en la tasa de cópulas con respecto a los que fracasaron por el abandono de la hembra. No se encontró paternidad extra-pareja. Las dos hembras analizadas presentaron estructuras para almacenar espermatozoides en el tracto reproductivo, lo que se confirmó en una de las hembras en donde se encontraron espermatozoides dentro de estas estructuras. Este estudio sugiere que durante el periodo de cortejo intra-pareja en *F. magnificens* ambos miembros de la pareja continúan evaluándose, lo que posiblemente ha favorecido un periodo largo de cortejo. Aunque, el riesgo de competencia espermática vía cópulas extra-pareja al parecer es bajo en esta especie (en nuestro estudio no se registraron cópulas extras) dado que las hembras tienen estructuras que les permiten almacenar esperma, las cópulas pre-pareja podrían ser una fuente de riesgo de competencia espermática. Los resultados de este estudio indican que en cualquier caso las estrategias de los machos, como las cópulas intra-pareja repetidas son eficientes en asegurar su paternidad. Finalmente, este estudio reporta por primera vez en esta especie la ocurrencia de falsa maternidad; en 3 familias se encontró maternidad extra-pareja. Lo anterior sugiere la existencia de conflicto sexual de intereses entre los miembros de la pareja. Para evaluar si esta conducta es una estrategia reproductiva alternativa será necesario e interesante evaluar los mecanismos conductuales y determinar cuales son los costos y beneficios para la pareja y la hembra parásita.

## Introducción

Darwin (1871) definió la selección sexual como el proceso por el cual individuos de la misma especie compiten entre sí para la obtención de apareamientos. La selección sexual puede operar por competencia entre machos (selección intrasexual) o por preferencia de la hembra por ciertos machos que despliegan ciertas características o conductas (selección intersexual) (Darwin 1871). Los machos que desplieguen los caracteres más exagerados o intensos obtendrán más hijos, lo cual favorece la evolución de caracteres más elaborados. Las hembras que eligen a un macho en función de caracteres sexuales, dependiendo del carácter en particular, podrían obtener beneficios directos como recursos y/o cuidado parental, o beneficios indirectos como crías que hereden del padre mayor viabilidad o características atractivas (revisión en: Møller & Alatalo 1999, Neff & Pitcher 2005).

En especies donde el cuidado biparental es necesario para la supervivencia de las crías, las oportunidades de apareamiento serán limitadas; ya que la mayoría de los individuos permanecerá con la pareja por más tiempo y en algunos casos durante toda la temporada reproductiva. Se habla de un sistema de apareamiento monógamo cuando un macho y una hembra se asocian durante un evento reproductivo para la crianza y se supone que su evolución se basa en que es necesario el cuidado biparental para la supervivencia de la progenie (Krebs et al. 1993). En este tipo de sistema se espera una selección por parte de los dos sexos ya que ambos invierten en la crianza (Trivers 1972, Johnstone et al. 1996, e.g. Jones et al. 2001). Se espera que el sexo que invierte más sea el más selectivo y los individuos de baja calidad sean menos discriminantes que los individuos de alta calidad (Burley 1977, Johnstone et al. 1996). La decisión de una hembra de emparejarse con un macho estará basada en si éste es de buena calidad (Trivers 1972), si proporcionará cuidado parental (Trivers 1972) y en la posibilidad de encontrar otro macho (Kvarnemo y Ahnesjö 1996). Por su parte, la decisión del macho de emparejarse con una hembra estará basada en la calidad de ésta (e.g. Jones et al. 2001), y su percepción de paternidad (Jones y Hunter 1993, Amundsen et al. 1997, Amundsen 2000). Se pensaba que en un sistema monógamo la selección sexual operaba de manera similar en ambos sexos, ya que se suponía la exclusividad de cópulas, sin embargo, estudios moleculares y conductuales recientes han demostrado que en varias especies de aves con sistemas monógamos, existen fertilizaciones fuera de la pareja (revisión: Griffith et al. 2002;). Estas fertilizaciones extra-pareja son una fuente de variación en el éxito reproductivo del macho y de la hembra e incrementan la intensidad de selección sexual (Sheldon y Ellegren 1999). Es decir, hacen que el sistema se asemeje más a un sistema poligínico.

### Cortejo intra-pareja y cópulas repetidas

La elección y evaluación de la pareja, y finalmente del padre genético en aves, es un proceso que puede utilizar la conducta de cortejo intra-pareja antes y después de la cópula, la frecuencia y temporalidad de las cópulas intra-pareja, así como una gran variedad de señales fenotípicas (e.g. el color del plumaje, los cantos, el tamaño; Hill 1991, Palokangas et al. 1994, Moller y Thornhill 1998, Senar et al. 2002, Torres y Velando 2003). Estas conductas y características son costosas para el individuo que las realiza o las produce y afectan potencialmente el éxito reproductivo, aunque en algunos casos su función es difícil de explicar. Por ejemplo, en varias especies de aves socialmente monógamas existen cópulas repetidas antes de la puesta, durante y fuera del periodo fértil de la hembra (Birkhead et al 1987). Estas cópulas repetidas son difíciles de explicar ya que un eyaculado contiene millones de espermatozoides capaces de fertilizar los folículos maduros de la hembra. Se han sugerido varias hipótesis no excluyentes sobre la función del cortejo intra-pareja y de las cópulas repetidas intra-pareja, las principales son: (1) coordinación reproductiva y fertilización, (2) evaluación de la calidad de la pareja, y (3) competencia espermática y aumento de la certeza de paternidad (Birkhead 1987, Krebs y Davies. 1993, Hunter et al. 1993).

#### *Hipótesis de coordinación reproductiva y fertilización*

Existen varios estudios sobre el cortejo como proceso de coordinación reproductiva (Runfeldt y Wingfield 1985, Wingfield 1994). Se sabe que en algunas especies de aves el canto de los machos y su cortejo promueven el desarrollo de los folículos, como en el canario común (*Serinus canarius*) y en la codorniz común (*Coturnix coturnix*; Wingfield 1994); aunque en otras especies son solo los machos los que se coordinan fisiológicamente con las hembras (Runfeldt y Wingfield 1985). En un estudio en el gorrión cantor (*Melospiza melodia*) los machos que recibieron implantes de testosterona extendieron el periodo reproductivo, aumentaron las conductas de cortejo y defensa del territorio y retrasaron la muda, mientras que las hembras asignadas a estos machos no realizaron conductas de cortejo, ni retardaron la muda pero sí abandonaron el territorio (Runfeldt y Wingfield 1985). En contraste, al prolongar el periodo reproductivo de las hembras colocándoles implantes de estradiol, los machos permanecieron en el territorio, retrasaron la muda y presentaron niveles de testosterona altos (Runfeldt y Wingfield 1985).

El copular varias veces podría reducir la incidencia de huevos infértiles (Hunter et al. 1993).

También, las cópulas repetidas podrían estimular la ovulación de la hembra (Hunter et al 1993).



### *Hipótesis de evaluación de la calidad pareja*

En especies con cuidado biparental se espera que hembras y machos evalúen la habilidad de la pareja para invertir en las crías (Moller & Thornhill 1998), y que los machos evalúen su certeza de paternidad (Krebs & Davies 1993). Por ejemplo, en el estudio realizado con la tórtola de collar (*Streptopelia risoria*) se observó que los machos atacaban y rechazaban en base a su conducta, a las hembras antes expuestas con otros. Al parecer los machos son capaces de detectar a las hembras que ya estuvieron con otra pareja, debido a que, las hembras realizan cierta postura, la cual se realiza en una etapa avanzada del cortejo, producto de la estimulación del macho, por lo tanto, es un indicador de que la hembra copuló o al menos cortejó previamente con otro (Erickson & Zenone 1976, Zenone et al. 1979).

También, si la tasa de cópulas esta correlacionada con la calidad y/o condición del macho, las cópulas repetidas pueden servir a la hembra para evaluar la calidad del macho o su condición (Westneat et al 1990).

### *Hipótesis de competencia espermática y aumento de la certeza de paternidad*

Las conductas durante el cortejo intra-pareja de los machos que se han interpretado como mecanismos para incrementar su certeza de paternidad son: el cuidado de la pareja durante el periodo fértil (Schulze-Hagen et al. 1995), la agresión a la pareja, si ésta está dispuesta a copular relativamente pronto (Erickson y Zenone 1976, Zenone et al. 1979), retraso de las cópulas intra-pareja si la pareja se forma poco antes del periodo fértil, o simplemente abandono de la pareja cuando está en riesgo la paternidad, por ejemplo ante una puesta rápida de la hembra (Cezilly y Nager 1995, Osorno et al., sin publicar), el incremento de la frecuencia de cópulas intra-pareja (Birkhead et al. 1988, Møller 1987), la eliminación de huevos (Osorio-Beristain y Drummond 2001, Veiga 1993), o reducción del cuidado paterno (Trivers 1972, Davies et al 1992, Owens 1993, Dixon et al. 1994, Westneat & Sargent 1996, Mauck et al. 1999, Chuang-Dobbs et al. 2001). Sólo en casos en los que la protección de la paternidad este restringida y existan altos costos para obtener una nueva pareja, se esperaría que los machos modulen su contribución parental de acuerdo a su paternidad percibida; no obstante, si no existe percepción de la paternidad la inversión parental no será modulada (Whittingham et al. 1992, e.g. Davies 1992).

En las especies donde es posible el cuidado de la pareja, el macho permanece muy cerca de la hembra, de esta manera es capaz de impedir y detectar cópulas extra-pareja de su hembra (Birkhead 1998). Por ejemplo, en el cardenal rojo (*Cardinalis cardinalis*) los machos permanecen el 73% de su tiempo a 8.8 ( $\pm 3.9$ ) metros de su hembra en los nidos que se forman al principio de la temporada

reproductiva (Ritchison et al. 1994); en el acentor común (*Prunella modularis*) al presentarse dos machos en el mismo territorio, el macho dominante permanece un 80% del tiempo a unos cinco metros de su hembra y en los territorios donde sólo hay un macho, el macho permanece 60% del tiempo a unos cinco metros de su hembra (Davies 1992). Sin embargo, existen otras especies donde el cuidado de la pareja no es tan intenso, como en el escribano cerillo (*Emberiza citrinella*), donde los machos resguardan a su pareja durante el periodo fértil (Sundberg 1992). En la mayoría de las especies el periodo fértil comienza diez días antes de la puesta del primer huevo y termina cuando el último óvulo se fertiliza (Birkhead y Møller 1992).

En las aves la frecuencia de fertilizaciones extra-pareja en especies socialmente monógamas es alta al igual que las cópulas extra-pareja (Griffith et al. 2002). Las fertilizaciones extra-pareja pueden deberse a cópulas extra-pareja (Birkhead et al. 1988, Birkhead y Lessells 1988, Hunter et al. 1992), o a cópulas previas a la formación de la pareja siempre que el esperma pueda permanecer viable (Birkhead y Møller 1992; e.g. Olsson et al 2001). Las cópulas extra-pareja se definen como aquellas cópulas que realiza la hembra con cualquier individuo que no sea su pareja; estas pueden ser forzadas o solicitadas por la hembra (no forzadas; Birkhead y Moller 1992).

Cuando una hembra copula con más de un macho en un mismo evento reproductivo se establece la posibilidad de que opere la competencia espermática; es decir, la competencia entre espermatozoides de dos o más machos por la fertilización de los óvulos de una hembra (Parker 1979). En el caso de las aves, las hembras de algunas especies pueden almacenar espermatozoides viables por días o semanas en túbulos especializados para el almacenamiento de espermatozoides (Jonhnsen 1998), y esto podría promover la competencia espermática (Birkhead y Møller 1992), o permitir que opere algún tipo de elección críptica por parte de la hembra (Eberhard 1996). La elección críptica se refiere a la elección postcópula que realiza la hembra del macho que fertilizará sus huevos, por medio de algunas conductas, estructuras morfológicas o fisiológicas presentes en la hembra (Eberhard 1996).

Los túbulos especializados para el almacenamiento de espermatozoides en el tracto de la hembra son invaginaciones del epitelio cuya función es almacenar espermatozoides (Van Drimmelen 1946). Estas estructuras están presentes en el tracto reproductor de la hembra en la región del infundíbulo (Van Drimmelen 1946) y en la región útero-vaginal (Hatch 1983, Bakst y Bird 1987). Estas estructuras guardan a los espermatozoides que entran en el tracto reproductor de la hembra y después son liberados y transportados al infundíbulo donde se lleva a cabo la fertilización (Johnson

2000). La vida media de los espermatozoides dentro del tracto de la hembra es de entre 6 a 45 días (Birkhead y Møller 1992). Adicionalmente, se sabe que el último macho en copular con la hembra es el padre de la mayoría de los críos (precedencia espermática; Birkhead et al. 1988, Birkhead y Møller 1992, Birkhead y Biggins 1998). Se ha sugerido que esto ocurre debido a la pérdida pasiva de esperma: el segundo macho que insemina a una hembra tendrá una tasa más alta de huevos fecundados que el primer macho que copuló, ya que el espermatozoides del primer macho se habrá ido perdiendo. Por ejemplo, en el diamante mandarín (*Poephila guttata*) en el 84% de los casos el último macho en copular con la hembra fertilizó a los huevos (Birkhead et al. 1988), mientras que en el pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*) en el 80% de los casos el último macho en copular fertilizó los huevos de la hembra (Birkhead et al. 1989).

El incremento en la frecuencia de cópulas antes del periodo fértil de la hembra puede promover la disolución de esperma de otros machos (Hunter et al. 1992), formar la estratificación del esperma, es decir la formación de capas de espermatozoides (Westneat 1996), o remplazar el esperma guardado en túbulos especializados para el almacenamiento de esperma en el tracto de la hembra (Hatch 1983). El incremento en la frecuencia de cópulas es un mecanismo que normalmente ocurre en especies donde el resguardo de pareja no es posible, como en aves coloniales (Birkhead et al. 1989, Hunter et al. 1992), y en aves de presa (Birkhead et al. 1988, Møller 1987). En las aves coloniales un miembro de la pareja permanece defendiendo el nido mientras el otro miembro forrajea. En las aves de presa, la hembra permanece todo el tiempo en el nido y el macho la alimenta.

También se ha sugerido que las hembras podrían presentar conductas para incrementar la confianza del macho sobre su paternidad. Estas pueden ser la solicitud o cooperación en las cópulas con su pareja (Birkhead et al. 1989, Petrie 1992).

#### Señales fenotípicas

Por otro lado, además del cortejo y la frecuencia de cópulas existe un gran número de estudios que indican que hembras y machos utilizan señales fenotípicas para evaluar a sus parejas (Hill 1991, Palokangas et al. 1994, Møller y Thornhill 1998, Senar et al. 2002, Torres y Velando 2003). Hill (1991) demostró en el pinzón mexicano (*Carpodacus mexicanus*), una correlación positiva entre el color de los machos, luminosidad del plumaje de los hijos y la tasa de alimentación a la madre y a los pollos. En el cernícalo común (*Falco tinnunculus*) se encontró que las hembras preferían a los machos con plumajes más brillantes y también se encontró una correlación positiva entre la

coloración de los machos, el número de críos y su habilidad para la caza (Palokangas et al. 1994). Las parejas con machos con plumajes más brillantes tuvieron un éxito reproductivo mayor que las parejas con machos con plumajes pardos. También se encontró que en las parejas con machos “brillantes“ las hembras cazaban menos que en las parejas con machos “pardos“. Estos resultados muestran que la coloración de los machos refleja su habilidad en el cuidado parental, lo que favorece la preferencia de las hembras por machos con plumajes brillantes (Palokangas et al. 1994). En los bobos de patas azules (*Sula nebouxii*), un ave marina con un largo cuidado biparental, las hembras prefieren a los machos con las patas de un azul turquesa mas brillante, que está relacionado con una mejor condición nutricional y tasas mas altas de crecimiento de sus crías (Torres y Velando 2003; Torres y Velando 2005). Estos resultados muestran que el color de las patas de los machos es un ornamento o indicador de calidad que pueden utilizar las hembras durante el cortejo intra-pareja.

#### Historia natural de *F. Magnificens*

Las fragatas *Fregata magnificens*, son aves marinas coloniales socialmente monógamas y sexualmente dimórficas: las hembras son 6 a 12% mas grandes que los machos (Nelson 1975), el plumaje de éstos es casi o completamente negro y presentan un saco gular, el cual es rojo escarlata durante el periodo de cortejo (Nelson 1975). El plumaje de las hembras es negro y blanco el pecho (Nelson 1975). Ponen solamente un huevo y presentan cuidado biparental por periodos de 20 a 125 días, por lo que la adecuación del macho se basa en ser el padre genético del pollo (Osorno 1996). Después de esta primera parte de cuidado biparental el macho deserta y la hembra continua el cuidado de la cría por 12 a 15 meses más (Osorno 1996, Osorno y Szekely 2004). La mortalidad de los pollos es alta al desertar el macho durante los primeros 30 días de nacido el crío y va disminuyendo al quedarse más tiempo el macho en el nido (Osorno 1996).

En estas aves el periodo de cortejo es un proceso que puede durar en promedio 13 días (E.E.=0.89; Osorno 1996). Al inicio de este proceso el macho perchado sobre la rama de un árbol, despliega su saco gular inflado que es de color rojo muy brillante, y espera a ser preferido por una hembra. El sitio desde donde despliegan los machos será el sitio donde construirán su nido (Osorno 1996). No existen estudios detallados sobre la segunda parte del cortejo, sin embargo, Osorno (1996) ha descrito algunos aspectos del cortejo de esta especie en la localidad de la Isla Isabel, Nayarit, en el pacífico mexicano. Las hembras sobrevuelan el área, visitando a varios machos antes de permanecer con uno en particular. Una vez que la hembra se percha junto a un macho permanece en contacto físico con él por aproximadamente dos días sin que ninguno de los dos se aleje del sitio; si durante este periodo el macho o la hembra se alejan, la pareja se disuelve. Después de este periodo

de latencia o permanencia juntos la pareja copula y construye el nido durante varios días ( $13 \pm 0.89$  días, rango=7 a 23, n=22; Osorno 1996). Al principio del periodo de construcción de nido y cópulas la hembra y el macho permanecen un 70% del tiempo juntos; después el macho comienza a llevar ramas para la construcción del nido permaneciendo menos tiempo en éste; al final de este periodo, el macho aporta la mayor cantidad de ramas (Osorno 1996). La frecuencia de cópulas presenta el pico máximo 6 días antes de la puesta del huevo y decrece dos días antes de la puesta, en promedio copulan 1.3 veces por día (E.S.=0.2, rango 0 a 10, n=22; Osorno 1996).

Se ha observado que en estas aves aproximadamente el 50% de las parejas formadas fracasan antes de la puesta del huevo y después de copular varias veces (Osorno 1996). También se ha detectado un porcentaje bajo de cópulas extra-pareja (8%; Osorno 1996). Es posible que las disoluciones de parejas iniciadas por el macho antes de la puesta se deban a la detección del macho de cópulas extra-pareja de la hembra o a cópulas pre-pareja realizadas por la hembra suponiendo que ésta puede almacenar espermia y mantenerlo viable hasta su periodo fértil. Por otro lado, la disolución de la pareja iniciada por la hembra podría deberse a la evaluación negativa que la hembra hace de la calidad del macho. Por ejemplo, un posible indicador de calidad del macho podría ser la tasa de entrega de ramas. En la fragata común, la obtención de ramas es una actividad que solo realizan los machos y que es aparentemente riesgosa y energéticamente costosa. La obtención directa de ramas implica el riesgo de quedar atrapado en el sotobosque y una vez que el macho tiene una rama es atacado y perseguido por varios machos que intentan robarle el material. Por lo anterior la hembra podría evaluar la calidad del macho por la cantidad de ramas que éste le entrega para la construcción del nido; y la cantidad de material para el nido debe ser un elemento importante para asegurar que el huevo tenga una superficie adecuada y no se caiga.

Para evaluar las posibles funciones del cortejo intra-pareja y de las cópulas repetidas en *F. magnificens* se describieron las conductas que ocurrieron después de formada la pareja y el patrón de cópula intra y extra-pareja de hembras y machos. Se establecieron las consecuencias, en términos de la paternidad, de las cópulas extra o previas a la pareja y se pusieron a prueba predicciones de las hipótesis de evaluación de la calidad de la pareja y competencia espermática e incremento de la certeza de paternidad. Por último se determinó si las hembras tienen estructuras en el tracto reproductivo que les permitan almacenar espermia de cópulas extra o previas a la pareja. En aves socialmente monógamas con largos periodos de cuidado parental se propone que el patrón de cortejo intra-pareja y de las cópulas repetidas tienen como función evaluar e incrementar su certeza de paternidad, y de la evaluación de la calidad pareja.

## Objetivos

1. Describir el patrón de entrega de ramas intra-pareja en la fragata común y su relación con la tasa de cópulas y la probabilidad de abandono del nido por la hembra.
2. Evaluar si el color del saco gular al realizarse la primera cópula está relacionado con el éxito de puesta.
3. Describir el patrón (frecuencia y temporalidad) de cópulas intra-pareja y extra-pareja y su relación con el éxito de puesta.
4. Evaluar si existe relación entre el número de días en “espera” antes de la primera cópula y (a) la tasa de cópulas, (b) la probabilidad de éxito de puesta.
5. Determinar la proporción de falsa paternidad y su relación con el patrón de cópulas intra y extra pareja.
6. Determinar si las hembras tienen estructuras en el tracto reproductivo que les permitan almacenar esperma.

## Hipótesis y predicciones

### *Evaluación de la calidad de la pareja*

La tasa de entrega de ramas es un indicador para la hembra de la calidad del macho, por lo que esperamos:

- 1) Una relación positiva entre la tasa de entrega de ramas y la tasa de cópulas.
- 2) En nidos donde la hembra abandonó, la tasa de entrega de ramas será menor que en nidos abandonados por el macho.

El color rojo y tamaño del saco gular del macho reflejan su condición de salud o calidad fenotípica y el reasignar los recursos necesarios para desplegar un saco gular rojo intenso lleva varios días. Por lo tanto, el mantener el color rojo hasta la primera cópula podría indicarle a la hembra la condición y calidad del macho, por lo que esperamos que en comparación con los machos de sacos gulares con colores mas naranjas:

- 3) Los machos con sacos gulares mas rojos y grandes a la primera cópula tengan una mayor probabilidad de éxito de puesta.

*Competencia espermática e incremento de la certeza de paternidad.*

Durante el cortejo intra-pareja los machos incrementan su certeza de paternidad aumentando la frecuencia de cópulas y/o aumentando el número de días en espera antes de la primera cópula, por lo que esperamos:

- 4) Una relación positiva entre la tasa de cópulas y la probabilidad de éxito de puesta.
- 5) Una relación positiva entre el número de días en espera y el éxito de puesta.
- 6) Una relación positiva entre la tasa de cópulas y la paternidad del macho pareja.

## Métodos

### Área de estudio y registro de conducta

El estudio se llevó a cabo de noviembre a diciembre del 2001 en la población de *F. magnificens* que anida en la Isla Isabel, Nayarit, México (21° 52'N, 105° 54'W). Se registró diariamente el cortejo en un total de 39 parejas desde su formación hasta la puesta del huevo o hasta la disolución de la pareja; las parejas que se iban formando se agregaban a la muestra de estudio. Se observaron los machos que desplegaban un saco gular rojo e inflado y se inició el registro de conducta cuando una hembra estaba con él por más de dos horas y el saco-gular del macho comenzaba a desinflarse o estaba desinflado, en este momento ya eran considerados pareja. Se consideró que una pareja estaba disuelta cuando en el sitio de despliegue (1) sólo estuvo presente un miembro de la pareja por un periodo de más de 6 días, (2) cuando ninguno de los miembros de la pareja estuvo presente (si el nido se deja desatendido por varios segundos, otros machos toman inmediatamente el sitio, Osorno 1996), y/o (3) cuando se observó a un nuevo macho desplegando en el sitio de la pareja focal. Las aves de las parejas focales fueron marcadas temporalmente durante la noche con chorros de pintura de agua; se utilizó este método para disminuir la perturbación durante el cortejo, cuando las aves son más sensibles. Los registros de conducta se llevaron a cabo por tres observadores de las 06:00 a las 18:00 h, en relevos de dos horas y media. El promedio de parejas que registraba un observador fue de 9 parejas al día ( $\pm 0.13$ , rango=1 a 19). Las observaciones se hicieron desde una caseta situada a una distancia entre 4 a 20 m de los nidos focales; a esta distancia las aves no son perturbadas.

De cada pareja se registró cualitativamente el color del saco gular (rojo, rojo-naranja, naranja, rosa o blanco) y su tamaño (muy inflado, inflado, desinflado o contraído). Los criterios para determinar las categorías de color se establecieron mediante la observación de la variación natural en el color de los sacos gulares durante las pruebas de confiabilidad que se realizaron previo al inicio de los registros. Un saco gular se consideró *muy inflado* cuando parecía estar a su máxima capacidad y se alcanzaban a ver algunas venas en éste; *inflado* cuando no estaba a su máxima capacidad pero sí presentaba bastante volumen; *desinflado* cuando no presentaba ningún volumen y la membrana del saco gular se encontraba flácida y colgando; y *contraído* cuando era muy pequeño sin notarse capacidad para ser inflado. Se registró la fecha, hora de llegada y salida de los individuos, la presencia de huevo en el nido y la presencia de los individuos en el sitio de despliegue cada hora. Se registró la frecuencia de entrega de ramas por parte del macho focal (intra-pareja) o por cualquier otro macho (extra-pareja), y las cópulas intra y extra-pareja. Se registró *cópula* cuando el macho



subía al dorso de la hembra con las alas extendidas y se orientaba en la misma dirección que la cabeza de la hembra, ésta extendía su cuello y el macho tocaba su cuello con el pico rozando las plumas de la cabeza de la hembra. En esta posición el macho se movía hacia atrás moviendo las plumas de su cola y empujando las plumas de la cola de la hembra a un lado. La hembra levantaba las plumas de la cola y el macho movía la pelvis hacia abajo hasta alcanzar la cloaca de la hembra. Se registró *intento de cópula* cuando el macho se paraba en la espalda de la hembra sin alcanzar la aposición de cloacas. Se registró *cópula extra-pareja* cuando el macho que subía al dorso de la hembra no era el macho focal marcado.

Para determinar la fecha de puesta y presencia del huevo en el nido se realizaron inspecciones nocturnas cada dos días en las horas sin luna. En los días de luna llena no se hicieron inspecciones. En nueve nidos se determinó la fecha de puesta por este método, en cinco nidos la fecha de puesta se observó durante los registros de conducta. Una vez puesto el huevo, cuando las aves son menos propensas a abandonar por perturbación, se capturaron por la noche a ambos miembros de la pareja. De cada ave capturada se midió el pico y la ulna ( $\pm 1$  mm), se pesó ( $\pm 20$ g), se colocó una etiqueta numerada en el ala izquierda y se obtuvo una muestra de 100 $\mu$ l. de sangre para el análisis de paternidad.

De las 39 parejas incluídas en este estudio 18 fueron exitosas (lograron poner huevo) y 21 no lograron poner huevo. En 14 de las 18 parejas exitosas se determinó la fecha de formación de la pareja y la fecha de puesta; en dos parejas sólo se determinó su fecha de formación y no se determinó la fecha de puesta y en dos parejas sólo su fecha de puesta pero no su fecha de formación. En 17 de las 21 parejas que no lograron poner huevo se determinó la fecha de inicio de pareja y la fecha de disolución de la pareja. Sólo en tres parejas no se determinó la fecha de inicio. De estas parejas, ocho perdieron el nido al ser robados por otras fragatas, cinco se disolvieron por abandono del macho, cuatro por abandono de la hembra, dos parejas se disolvieron durante la noche y dos parejas desertaron del nido posiblemente por la interferencia de los observadores durante las inspecciones nocturnas.

Con cada observador se realizaron pruebas de confiabilidad durante aproximadamente una semana. Para realizar las pruebas de confiabilidad primero se mostraron las diferentes conductas a los observadores. Las pruebas consistieron en la observación y registro de las diferentes conductas de nidos seleccionados. Las observaciones fueron hechas por dos observadores (uno de los observadores ya había realizado pruebas de confiabilidad y estandarizado sus observaciones de las

conductas) durante una hora y media a dos horas dos veces al día. Al final del día se obtenía la diferencia entre los registros. Todas las diferencias se analizaban y platicaban con los observadores. Las pruebas continuaron hasta lograr una diferencia del 5% al 0% (Observador 1:  $r=0.980$ ,  $p=0.001$ ,  $n=6$ ; observador 2:  $r=0.935$ ,  $p=0.006$ ,  $n=6$ ; observador 3:  $r=0.975$ ,  $p=0.001$ ,  $n=6$ ).

#### Análisis de la paternidad

Para los análisis de paternidad, se intentó coleccionar de los adultos y la cría en cada nido focal 100  $\mu$ l de sangre. La sangre fue colocada en tubos ependorff que contenía 1ml de una solución de lisis (EDTA 10 mM, Tris-Cl 10 mM, SDS 2% pH=8.0) a temperatura ambiente. En el caso de que un huevo fuera expulsado del nido por accidente o por robo del nido por otras aves, se coleccionó el embrión y se conservó en solución de lisis. En marzo de 2002 regresamos a la isla para obtener la sangre de los críos de los nidos focales donde el huevo no se perdió, sin embargo ningún pollo sobrevivió. En total, de las 39 parejas focales se obtuvo sangre de siete familias completas; en estas siete familias los nidos fueron abandonados por lo que los huevos fueron coleccionados.

Las muestras se analizaron utilizando la técnica de microsatélites. Los microsatélites son secuencias de pares de bases repetidas en "tandem" (Lewin 1997). El tamaño de las secuencias es muy variable entre los individuos, debido a una tasa de mutación alta. Cuando el ADN se replica en la meiosis, la ADN polimerasa puede deslizarse hacia delante o hacia atrás en las regiones repetidas quitando o añadiendo pares de bases a la hebra hija. Esto significa que la nueva hebra de ADN tiene tan solo un poco menos o un poco más de pares de bases que la hebra madre. Estas alteraciones son heredadas "mendelianamente", por lo que pueden ser utilizadas para las pruebas de paternidad.

La técnica de microsatélites consiste en: a) extracción orgánica de ADN a partir de las muestras de sangre; b) amplificación de microsatélites específicos de *F. magnificens* por PCR (Polymerase Chain Reaction), y c) electroforesis en gel de poliacrilamida. Se utilizaron cuatro microsatélites polimórficos especialmente diseñados para esta especie (Serrano P.M., datos no publicados; Tabla 1). La falsa paternidad es posible atribuirla cuando el crío no comparte al menos uno de los alelos con el macho de su familia. Igualmente se puede determinar la ocurrencia de falsa maternidad comparando los alelos de la cría con los de la supuesta madre. La técnica se explica en mas detalle en el apéndice 1.

### Determinación de la presencia de estructuras para almacenar espermatozoides

Una condición que puede afectar las estrategias de cópula de las hembras es su capacidad para almacenar en el tracto reproductivo espermatozoides viables. Para establecer si la hembra de fragata tiene tales estructuras en donde pueda almacenar esperma, se sacrificaron dos hembras, las cuales llevaban alrededor de 6 días de haber formado una pareja y tenían entre tres y cuatro días copulando respectivamente. Las dos hembras se sacrificaron inyectándoles 2ml de pentobarbital (anestésico), posteriormente se extrajo el oviducto y el ovario. El oviducto y el ovario se fijaron en paraformaldehído al 4%. Este procedimiento permite que las células preserven sus características estructurales y bioquímicas hasta su análisis histológico. El análisis consistió en: a) obtención de cortes y localización de las estructuras para almacenar espermatozoides en el microscopio de luz y b) obtención de cortes y localización de las estructuras en el microscopio electrónico. El detalle de esta técnica se encuentra en el apéndice 2.

### Análisis de datos

Los nidos que se perdieron durante la noche (n=2), los desertados por la interferencia de los observadores (n=2) y los nidos robados por otras fragatas (n=8) fueron excluidos de todos los análisis estadísticos debido a que éstas pérdidas son independientes de las hipótesis.

Se utilizó una prueba de *t* de dos colas para comparar la proporción promedio del tiempo que los miembros de la pareja permanecieron juntos en nidos exitosos y abandonados.

Para obtener las tasas de cópulas y entrega de ramas por los machos se sumaron las diferentes variables independientemente y se dividieron por el total de días observados hasta la puesta o días hasta la disolución. En todos los casos se verificó la normalidad de cada variable con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, donde el intervalo de confianza fue del 95%. La proporción de cópulas se normalizó utilizando una transformación de raíz cuadrada del arcoseno (Zar 1984). Se utilizaron regresiones logísticas con distribución binomial para evaluar la relación entre la tasa de cópulas y el éxito de puesta, el tiempo en “espera” y la probabilidad de éxito, y la probabilidad de éxito y la tasa de entrega de ramas.

Para evaluar las correlaciones entre la tasa de cópulas y de entrega de ramas por nido se utilizó el coeficiente de correlación de *Pearson* de una cola. En los nidos abandonados la tasa de entrega de ramas se normalizó utilizando la raíz cuadrada del valor real de la variable (Zar 1984).

Para evaluar si el color del saco gular al realizarse la primera cópula está relacionado con el éxito de puesta se utilizó una tabla de 2X2 usando una prueba de  $\chi^2$ . Las categorías utilizadas en el color del saco gular fueron rojo, rojo-naranja, naranja, rosa y blanco.

Se utilizó una regresión lineal simple para evaluar la relación entre el tiempo en “espera” antes de la primera cópula y la tasa de cópulas, siendo la variable dependiente la tasa de cópulas.

La frecuencia de nidos robados, exitosos, abandonados por la hembra y los abandonados por el macho se compararon usando pruebas de  $\chi^2$ . A lo largo del escrito se reporta el promedio  $\pm$  el error estándar.

## Resultados

### Descripción del cortejo intra-pareja

El periodo de cortejo intra-pareja en la fragata incluye la espera a la primera cópula, la construcción del nido y cópulas hasta la puesta del huevo. Este periodo fue 2.5 veces mayor en las parejas exitosas (pusieron un huevo) que en las que no lograron poner huevo por el abandono de alguno de los individuos (parejas exitosas:  $13.29 \pm 0.93$  días,  $n=14$ ; parejas abandonadas:  $5.11 \pm 1.32$  días,  $n=9$ ;  $t=5.22$ ;  $g.l.=21$ ;  $p=0.00$ ). Las parejas exitosas en promedio pasaron en espera 1.22 días ( $\pm 0.33$ ,  $n=14$ ) y 12.06 días ( $\pm 0.88$ ) en construcción de nido y cortejo. El tiempo en “espera” fue de 1.06 días ( $\pm 0.40$ ) en parejas abandonadas ( $n=6$ ; en tres parejas no se registraron cópulas) y 4.93 días ( $\pm 1.92$ ) en construcción de nido y cortejo. El patrón de permanencia en el nido de ambos adultos, en parejas exitosas y abandonadas, mostró un decline en la proporción de tiempo juntos en el nido, después de la formación de la pareja (Figura 1). De las 9 parejas que fracasaron por abandono de alguno de los individuos en el 55% ( $n=5$ ) los machos abandonaron a la pareja y en el 45% ( $n=4$ ) abandonó la hembra. La diferencia no fue significativa ( $X^2=2.57$ ;  $g.l.=1$ ;  $p=0.11$ ).

### *Evaluación de la calidad de la pareja*

#### Entrega de ramas o construcción del nido

Durante el periodo de cortejo intra-pareja los machos entregaron ramas para la construcción del nido, la tasa de entrega de ramas fue de 2.94 ( $\pm 0.65$ ,  $n=23$ ) ramas por pareja al día. El patrón de entrega de ramas se incrementó después de formada la pareja tanto en las parejas exitosas como en las abandonadas. En las parejas exitosas hubo un pico máximo aproximadamente entre el día ocho y el día doce después de formada la pareja; las parejas abandonadas no presentaron una tendencia clara (Figura 2).

Consistente con la primera predicción de evaluación del macho por parte de la hembra se encontró una correlación positiva entre la tasa de entrega de ramas y la tasa de cópulas ( $r=0.60$ ,  $p=0.001$ ,  $n=23$ ; Figura 3). En la segunda predicción se esperaba que la hembra abandonara el nido al presentarse una baja tasa de entrega de ramas. Al comparar la tasa de entrega de ramas de los nidos abandonados por la hembra ( $0.71 \pm 0.53$  ramas al día;  $n=4$ ) y los abandonados por el macho ( $1.28 \pm 0.95$  ramas al día;  $n=5$ ) no se encontró diferencia significativa ( $U=8.5$ ;  $z=-0.38$ ;  $p=0.70$ ).

### Color del saco gular

El color del saco gular al formarse las parejas, tanto en parejas exitosas como en abandonadas fue de color rojo sin registrarse variación. El tamaño registrado para la mayoría de las parejas fue inflado, sólo en una pareja fue muy inflado.

Se esperaba en la tercera predicción que los machos con sacos gulares mas rojos y grandes a la primera cópula tuvieran mayor probabilidad de éxito de puesta, sin embargo el color del saco gular al realizarse la primera cópula no estuvo relacionado con el éxito de puesta ( $X^2=1.27$ ,  $gl=2$ ,  $p=0.53$ ). En el 79% ( $n=11$ ) de las parejas exitosas el color del saco fue rojo, color rojo-naranja en el 7% ( $n=1$ ) y color naranja en el 14% ( $n=2$ ). En las parejas abandonadas el 68% ( $n=4$ ) fue de color rojo y 33% ( $n=2$ ) de color naranja.

### *Competencia espermática e incremento de la certeza de paternidad*

#### Patrón de cópulas y éxito de puesta

La tasa promedio de cópulas totales (cópulas e intentos de cópula) intra-pareja, fue de 1.88 ( $\pm 0.21$ ,  $n=23$ ) cópulas al día; el 67% fueron cópulas exitosas (1.27 $\pm$ 0.16 cópulas por pareja al día,  $n=23$ ). No se registraron cópulas extra-pareja. La tasa promedio de cópulas en parejas exitosas presentó un incremento después de formarse la pareja con un pico máximo aparentemente en el día cuatro después de formada la pareja, es decir 8 días antes de la puesta. En las parejas abandonadas no hubo una tendencia clara (Figura 4).

Consistente con la cuarta predicción del aumento de la certeza de paternidad, se encontró una relación positiva entre la tasa de cópulas por día y la probabilidad de éxito de puesta ( $X^2=13.31$ ;  $gl=1$ ,  $p<0.00$ , Figura 5). Sin embargo, contrario a lo esperado en la quinta predicción, el tiempo en “espera” no estuvo relacionado con la tasa de cópulas intra-pareja ( $r=-0.11$ ,  $F=0.23$ ,  $p=0.64$ ,  $n=20$ ), ni con el éxito de puesta ( $X^2=0.09$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.76$ ,  $n=20$ ).

### *Paternidad*

En las siete familias en que se obtuvo sangre del embrión no se detectó ningún caso de extra-paternidad de los cuatro microsatélites analizados (Tabla 1). Sin embargo sorprendentemente, en dos familias se detectó maternidad extra-pareja. En la familia “E” y “F” en los microsatélites 79 y 102 la hembra no comparte ningún alelo con el crío, en cambio el macho si comparte uno de los alelos con el crío (Tabla 1). En la familia “E” el huevo se perdió 25 días después de puesto por el

robo del nido al macho. La tasa de cópulas al día fue de 1.2 cópulas y la puesta se realizó el décimo día el promedio de puesta fue de 13 días en las otras parejas. En el caso de la familia "F" el huevo fue abandonado por la hembra 19 días después de puesto. La tasa de cópulas en esta pareja fue de 2 cópulas por día y la puesta fue el día 14.

De las siete familias en tres (43%) el huevo se perdió por robo del nido al macho, en dos (29%) se perdió por abandono del nido por parte del macho, en una (14%) se perdió por abandono del nido por parte de la hembra y en otra familia, durante la noche los individuos abandonaron el nido.

### *Histología*

En los dos tractos reproductivos de hembras analizados se localizaron estructuras donde se alojan los espermatozoides en la región útero-vaginal y no se hallaron en otras secciones. En el primer tracto las espermatecas se encontraron en el segmento S4 y en el segundo tracto se encontraron en los segmentos S4 y S5 y no en otros segmentos (Figura 6).

Al microscopio de luz, se observó que el epitelio de la región útero-vaginal presenta numerosas invaginaciones. El epitelio en el que se localizaron las espermatecas es un epitelio estratificado de células columnares que presentan cilios. También se encuentran vasos en el tejido estromático entre los epitelios (Figura 7a). En los cortes las espermatecas aparecen como circulares u ovals, sin ramificaciones, compuestos de células tipo columnares con núcleo basal y un lumen donde se observan los espermatozoides (Figuras 7b y 7c).

Sólo en el tracto de una de las hembras se detectaron espermatozoides dentro de las espermatecas por microscopía electrónica (Figuras 7b y 7c). Los espermatozoides se encontraron agrupados en el lumen; con las cabezas apuntando hacia el lado contrario del comienzo de las estructuras. Al microscopio electrónico, se observó que algunas de las células que forman los anillos de las estructuras poseen abundantes micro vellosidades y complejos de unión de las células (Figura 8a). En el lumen se pudieron identificar las cabezas de los espermatozoides, algunos con su acrosoma (Figura 8a). También observamos espermatozoides en el lumen del oviducto por fuera de las espermatecas. En este caso los espermatozoides aparecen rodeados por cilios de las células epiteliales. Éstos se pudieron observar en la región vaginal y útero-vaginal (Figura 8b).

## Discusión

En la fragata común la elección y evaluación de la pareja incluye varias fases. Los machos perchados en ramas de árboles despliegan su saco gular rojo inflado y producen un sonido de tamborileo mientras esperan ser elegidos por una hembra (Osorno 1996, Madsen et al. 2004). Las hembras sobrevuelan el área visitando a varios machos antes de percharse junto a un macho. En este estudio encontramos que una vez perchados, macho y hembra permanecen en contacto físico (en “espera”) en promedio durante 1.22 días antes de la primera cópula, después empiezan a construir el nido, que toma en promedio 12 días en las parejas que establecen una puesta. El color del saco gular parece ser una característica sexual importante que las hembras utilizan para la elección inicial de pareja ya que en todos los casos en que una hembra se perchó junto a un macho, éste desplegaba un saco gular de color rojo intenso (no se analizó el tamaño del saco gular). Madsen y colaboradores (2004) han sugerido que el tamaño del saco gular debe ser importante en la elección inicial de la pareja ya que el señalamiento de esta característica esta dado por dos modalidades (visual y auditiva), y se espera que solo cuando la diferencia en el éxito reproductivo sea grande habrá una fuerte presión de selección en los machos para incrementar la señalización de una sola característica. El color y tamaño del saco gular pueden ser indicadores de la calidad del macho o simplemente ser una preferencia arbitraria de la hembra, esto podría investigarse en estudios futuros. En las 39 parejas observadas 54% se disolvieron antes de la puesta, lo que sugiere que después de una primera elección de las hembras (al elegir un macho y percharse junto a él), los procesos de evaluación de la pareja por parte del macho y la hembra siguen operando.

Ninguno de los huevos de las parejas focales que establecieron una puesta sobrevivió. En algunos casos se le caía el huevo a alguno de los padres, es decir el huevo se perdía aparentemente sin intención de tirarlo ( $n=6$ ), en otros casos el nido era robado por otra pareja y el huevo era desechado por la nueva pareja ( $n=5$ ). Sólo siete parejas, de las 18 que pusieron huevo sobrevivieron hasta la primera semana de enero del 2002, no obstante al regresar a la isla en marzo ninguna de esas siete familias existía. De esas siete familias no se sabe si el huevo se perdió por alguna de las causas ya mencionadas o por la deserción de alguno de los padres. Esta alta perdida de nidos puede deberse a una baja disponibilidad de alimento o a la interferencia intra-específica.



### *Evaluación de la calidad de la pareja*

Un posible indicador de la calidad del macho en *F. magnificens* es la obtención de ramas. La competencia que se ha observado entre machos por el material para la construcción del nido es muy intensa, por lo que podría ser una conducta costosa para el macho. Consistente con la primera predicción se encontró una correlación positiva entre la tasa de entrega de ramas y la tasa de cópulas. Contrario a lo esperado en la segunda predicción no se encontraron diferencias significativas entre la tasa de entrega de ramas en nidos abandonados por la hembra (n=4) y nidos abandonados por el macho (n=5), sin embargo el tamaño de muestra para esta comparación es muy pequeño por lo que el poder estadístico es inadecuado.

Durante el periodo de latencia a la primera cópula la intensidad del color del saco gular del macho disminuyó en algunos casos. Si reasignar los recursos necesarios para poder desplegar un saco gular rojo intenso lleva varios días, la “espera” a la primera cópula podría ser un indicador para la hembra de la condición y la calidad del macho. Por lo que se esperaba que los machos con colores más intensos (rojo) a la primera cópula tuvieran una mayor probabilidad de establecer una puesta. No se detectó ninguna relación entre el color del saco gular al realizarse la primera cópula y el éxito de puesta, sin embargo, el 79% de los machos que establecieron una puesta desplegaban un color rojo intenso en el momento de la primera cópula. Lo anterior sugiere que si las hembras estuvieran utilizando el cambio en color del saco gular del macho durante la latencia a la primera cópula prefieren a los machos que pueden mantener por más horas el color más intenso, y el color podría indicar la condición del macho. Estas ideas podrían ponerse a prueba en un estudio futuro, utilizando un sistema de medición de color mas preciso.

### *Competencia espermática e incremento de la certeza de paternidad*

En este estudio evaluamos la idea de que el tiempo en “espera” que pasan los individuos de cada pareja antes de realizar la primera cópula podría tener varias funciones: las hembras podrían evaluar la condición o calidad del macho a través del cambio en el color del saco gular del macho (ver hipótesis sobre evaluación de la pareja), mientras que los machos podrían prolongar la latencia a la primera cópula para disminuir el riesgo de competencia espermática vía cópulas pre-pareja, y en consecuencia estar mas dispuestos a permanecer con esa hembra y establecer una puesta. Sin embargo, no se detectó relación entre el tiempo en “espera” y el éxito de puesta y tampoco se registró ningún caso de paternidad múltiple, por lo que los datos no apoyan la hipótesis. Es posible

que el tiempo en espera tenga alguna otra función como el reconocimiento de la pareja. Por el momento, el hecho de que en la fragata común las parejas esperen sin moverse del sitio de percha entre 1-5 días antes de copular, sigue siendo una incógnita.

#### Patrón de cópulas

Las parejas focales copularon en promedio 1.27 cópulas al día; una pareja en promedio copuló 22.64 veces antes de poner el huevo. El promedio de cópulas durante el periodo de cortejo en especies de aves marinas que solo ponen un huevo es de 31 cópulas (rango 10 a 100, n=6; Birkhead et al. 1987, Olsson et al. 2001), y las cópulas comienzan varios días antes de la puesta del huevo (e.g. en el fulmar boreal -*Fulmar glacialis*-, en el alcatraz atlántico -*Sula bassana*- y en el petrel de alas grandes -*Pterodroma macroptera*- las cópulas comienzan 45 días antes de la puesta del huevo; Birkhead y Moller 1992). Lo anterior sugiere que las cópulas fuera del periodo fértil de la hembra, además de fertilizar el huevo, podrían tener otras funciones como la de coordinarse reproductivamente, evaluar a la pareja, o aumentar la certeza de paternidad.

En las fragatas la tasa promedio de cópulas presentó un punto máximo aproximadamente cuatro días después de formada la pareja, es decir 8 días antes de la puesta. Posiblemente esto se debe a que la tasa de entrega de ramas aumenta en promedio 7 días antes de la puesta, lo que implica que los machos pasan mas tiempo fuera del nido buscando ramas.

La tasa de cópulas por día se relacionó positivamente con la probabilidad de éxito de puesta. Es poco probable que esta relación se deba al número de días que las parejas pasaron juntas ya que en promedio las parejas que se disolvieron estuvieron juntas 5.11 días, es decir estuvieron juntas un periodo que incluye el pico de cópulas y se disolvieron cuando los machos pasan mas tiempo fuera del sitio buscando material de construcción del nido. En *F. magnificens*, una especie socialmente monógama, que solo pone un huevo y presenta un largo cuidado biparental, la adecuación del macho depende de que éste sea el padre genético del crío. En estudios anteriores con aves marcadas se han registrado cópulas extra-pareja (Osorno 1996), y ahora se sabe que las hembras son capaces de almacenar espermatozoides en estructuras especializadas, por lo tanto se espera que los machos presenten tácticas durante el cortejo intra-pareja para incrementar su certeza de paternidad, y si la certeza es baja deserten. Los resultados sugieren que los machos que copularon más fueron los que no desertaron, por lo menos hasta la puesta del huevo, lo que podría deberse a una mayor certeza de paternidad. Al presentarse una alta tasa de cópulas los machos pueden diluir el esperma de otros machos o asegurar ser el último macho en copular con la hembra y de esta manera incrementar su certeza de paternidad. También, los machos podrían intentar copular desde la formación de la pareja

ya que posiblemente desconocen el periodo fértil de la hembra, de esta manera el macho podría llenar las espermatecas con su esperma y aumentar así la probabilidad de ser el padre de la cría. Por otro lado y aunque los datos son sólo correlacionales, una baja tasa de cópulas intra-pareja, y supuesta disminución en la certeza de la paternidad, podría estar relacionada con la deserción del macho. Alternativamente, las parejas en que la frecuencia de cópulas fue baja podrían haberse disuelto debido a que la hembra no recibió suficiente esperma o no fue suficientemente estimulada (si es que la frecuencia de cópulas es parte de la coordinación fisiológica entre la pareja) para lograr producir un huevo. Las cópulas repetidas podrían reducir la incidencia de huevos infértiles. Sin embargo lo anterior es poco probable ya que para la fertilización de un huevo no es necesario grandes cantidades de esperma; un eyaculado contiene millones de espermatozoides. Tampoco se tiene evidencia de que una mayor tasa de copulas este relacionada con periodos de puesta más cortos. Desconocemos si en las fragatas el macho transfiere nutrientes u otras sustancias que puedan ser relevantes para la producción del huevo o la adecuación de la hembra en general.

En este estudio no se registraron cópulas extra-pareja ni en los nidos abandonados, ni en los nidos exitosos. En la misma colonia en la isla Isabel en años anteriores (1994) la incidencia de cópulas extra-pareja fue del 8% (Osorno 1996), mientras que en otro estudio paralelo al presente en el que se manipuló la tasa de cópulas, se detectaron cópulas extra-pareja en cuatro parejas experimentales (cópulas disminuidas, n=18) pero no en las controles (Serrano Pinto M, com pers). Lo anterior indica que la frecuencia de cópulas extra-pareja en la fragata común es baja. Sin embargo, la presencia de las espermatecas en las hembras y el alto porcentaje de disolución de parejas podrían producir una importante competencia espermática y favorecer entonces conductas en los machos, como una alta tasa de cópulas y largo periodo de cortejo, para aumentar su certeza de paternidad.

#### *Paternidad y maternidad*

En este estudio no se detectaron fertilizaciones extra-pareja en las 24 familias analizadas (7 parejas de la muestra de focales en los registros de conducta y 17 parejas que anidaron en la misma zona). La incidencia de fertilizaciones extra-pareja en especies de aves socialmente monógamas varía de 0% a 65% (Birkhead y Moller 1992). Por ejemplo, la incidencia de fertilizaciones extra pareja fue de 0% en el fulmar boreal (*Fulmarus glacialis*; Hunter et al. 1992), en el paño boreal (*Oceanodroma leucorhoa*; Mauck et al. 1995), y en los pingüinos humboldt (*Spheniscus humboldti*; Schwartz et al. 1999), mientras que en el petrel de Galápagos (*Phoebastria irrorata*) se encontró un 25% de paternidad extra-pareja (Huyvaert et al 2000). En *Fregata minor* en los años de 1998 y 1999 se detectó un porcentaje de fertilizaciones extra-pareja muy bajo 1.1%; (Deaborn et al. 2001).

En las especies que sólo ponen un huevo y requieren de cuidado biparental por temporadas largas, como en *F. magnificens*, se espera un porcentaje bajo de cópulas y paternidad extra-pareja (Birkhead y Moller 1996), ya que es muy costoso para el macho pareja no ser el padre genético del pollo, por lo que el macho debería tener mecanismos eficientes para cuidar la paternidad. Los resultados de este estudio son consistentes con esta idea. El no haber encontrado paternidad extra-pareja implica que las cópulas extra-pareja no son una fuente importante de variación del éxito reproductivo para las hembras y machos promiscuos en esta especie. Lo que sugiere que las estrategias utilizadas por los machos para cuidar o incrementar su paternidad (e.g. alta tasa de cópulas intra-pareja) son exitosas, aunque esto podría variar entre años.

Sorprendentemente en el 12% de las familias analizadas (tres de 24 familias) se encontró maternidad extra-pareja o *quasi* parasitismo, es decir, la hembra del nido no es la madre genética del crío pero el macho si lo es. Sólo se ha reportado maternidad extra-pareja en 12 especies, por lo que esta táctica es poco común (Griffith et al. 2004). En este estudio la maternidad extra-pareja fue determinada por análisis moleculares utilizando microsatélites. Con este método los individuos heterócigos y los homócigos son mostrados con dos o una banda, respectivamente, por lo que hay menos error al momento de atribuir el número de bandas compartidas entre el crío y sus dos padres. Por otro lado los microsatélites donde no hubo banda compartida por la madre, tienen un polimorfismo de 5 y 6 alelos lo cual nos da un grado alto de confiabilidad. Dos de las tres familias con maternidad extra-pareja pertenecían a las parejas focales en los registros de conducta, sin embargo no se observó la puesta del huevo por una hembra diferente a la hembra pareja (marcada con pintura). En ninguna de las dos familias el huevo logró eclosionar, en una el huevo se perdió 25 días después de puesto por el robo del nido al macho y en la otra el huevo fue abandonado por la hembra 19 días después de puesto. La hembra pudo haber desertado porque detectó que el huevo no era de ella, sin embargo esto es poco posible ya que se esperaría que si una hembra es capaz de diferenciar un huevo propio de uno ajeno esto debería ocurrir los primeros días de puesto el huevo. La tercera familia con maternidad extra-pareja no era parte de los focales de conducta. En esta familia la sangre se obtuvo del pollo que tenía aproximadamente un mes de edad.

Desconocemos los mecanismos conductuales mediante los cuales una hembra pone un huevo en el nido de otra hembra. En los nidos focales nunca se registró la presencia simultanea de dos huevos. Tampoco en otros estudios realizados en la misma colonia a lo largo de mas de diez años se han registrado puestas mayores a un huevo. Por lo que, para poner un huevo en el nido de otra hembra, la hembra *quasi* parásita podría (a) eliminar el huevo del nido y poner el suyo, probablemente

mientras la hembra del nido está en un viaje de forrajeo, (b) poner un huevo después que el macho del nido elimina el huevo puesto por la hembra pareja, (c) poner un huevo antes que la hembra pareja, suponiendo que la presencia de un huevo inhibe la puesta en la hembra pareja. En un experimento piloto en el cual se colocó un huevo artificial en el nido de varias parejas próximas a la puesta, tres hembras pusieron su propio huevo e incubaron por dos días los dos huevos (Palomo N y Osorno JL, datos no publicados). Lo anterior sugiere que la hembra una vez avanzado el proceso de producción del huevo no puede reabsorberlo. Sería interesante investigar los mecanismos conductuales por los cuales puede ocurrir el *quasi* parasitismo en la fragata común.

En especies donde existe una alta frecuencia de paternidad extra-pareja o parasitismo se puede esperar que el *quasi*-parasitismo se dé por azar (Alves y Bryant 1998). Griffith et al. (2004) proponen que para poder descartar que esta estrategia sucede por azar es necesario saber la frecuencia de paternidad extra-pareja y parasitismo en la población y el número de nidos que pueden ser parasitados (vecino alrededor del nido focal). Entonces para que el *quasi*-parasitismo sea una estrategia o táctica adaptativa debe presentarse en mayor frecuencia que el parasitismo o que ocurra a una mayor frecuencia que la esperada por azar (Griffith 2004). En *F. magnificens* la frecuencia de paternidad extra-pareja y parasitismo fue nula por lo que esta conducta presente en algunas hembras podría ser una estrategia reproductiva alternativa. Para evaluar que el *quasi* parasitismo en la fragata es una estrategia reproductiva se tendría que determinar cuales son los mecanismos conductuales y determinar cuales son los costos y beneficios para la pareja y la hembra parásita.

Estos resultados nos indican que existe conflicto sexual en los miembros de la pareja, ya que los intereses entre los sexos difieren la estrategia que maximiza la adecuación del macho no coincide con la estrategia que maximiza la adecuación de la hembra pareja (Trivers 1972, Parker 1979, Gowaty 1996, Stockley 1997, Chapman et al. 2003). Las diferencias en los intereses de un macho y una hembra podrían favorecer mecanismos en cada sexo que permitan aumentar la adecuación del individuo aunque esto disminuya la adecuación de la pareja (Clutton-Brock y Parker 1995, Holland y Rice 1998).

### *Histología*

Se identificaron en los dos tractos de hembras analizados estructuras que permiten el almacenamiento de esperma, lo cual podría tener implicaciones en las estrategias reproductivas de *F. magnificens*. Si una hembra es inseminada y pocos días después cambia de pareja, la paternidad

genética del nuevo macho con el que establezca pareja podría estar en riesgo. La presencia de las espermatecas en las hembras abren la posibilidad de que en esta especie este operando la competencia espermática y elección críptica por parte de las hembras (Eberhard 1996). Sin embargo, falta saber cuanto tiempo pueden permanecer viables los espermatozoides en estas estructuras, y cuantos espermatozoides se pueden almacenar. Sería interesante también caracterizar el mecanismo de selección de los espermatozoides al entrar en estas estructuras y la liberación de los espermatozoides de éstas. Se sabe que en aves sólo espermatozoides morfológicamente normales y móviles son capaces de entrar a las espermatecas (Birkhead 1998).

## Conclusiones

Este estudio sugiere que durante el periodo de cortejo intra-pareja en *F. magnificens* ambos miembros de la pareja continúan evaluándose, lo que posiblemente ha favorecido un periodo largo de cortejo y cópulas intra-pareja múltiples. Las cópulas intra-pareja repetidas podrían servir para aumentar la certeza de paternidad, aunque no podemos descartar que cumplan también otras funciones como la coordinación reproductiva y la evaluación de la pareja ya que desde la formación de la pareja hasta la puesta hubo cópulas. Aunque, si solo consideramos las cópulas extra-pareja el riesgo de competencia espermática al parecer no es grande en esta especie, existe la posibilidad de que las cópulas pre-pareja, dado que las hembras tienen estructuras que les permiten almacenar espermia, incrementen el riesgo de competencia espermática. Los resultados de este estudio indican que en cualquier caso las estrategias de los machos son eficientes en asegurar su paternidad. Una evidencia que sugiere conflicto entre los miembros de la pareja es el hecho de que en esta población detectamos casos de maternidad extra-pareja. Hace falta ahora investigar los mecanismos conductuales y los beneficios y costos, en particular para el macho pareja, para determinar si el *quasi-parasitismo* en esta especie realmente es una estrategia reproductiva alternativa.

## APÉNDICE I

### Extracción orgánica de ADN (modificado de Seutin et al. 1993).

El ADN fue extraído de las muestras de sangre obtenidas en el campo. Primero se les colocó 100µl de agua grado biología molecular “Milli Q” estéril y se resuspendieron; luego se les agregó 100µl de proteinasa K 10mg/µl (Invitrogen) para la digestión de proteínas y se incubó a 55 °C durante toda la noche. A continuación se les agregó 200 µl de fenol equilibrado (pH=7.5), se mezcló por inversión y se centrifugó a 13krpm por 5 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio, a éste se le agregaron 200 µl de fenol-cloroformo 1:1, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13 krpm por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se volvieron a agregar 200µl 1:1 de fenol-cloroformo y se centrifugó. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se le agregaron 20µl de acetato de sodio 3M (pH=5.2), se agitó suavemente y se adicionaron 500µl de etanol absoluto a -20°C para precipitar el ADN. La muestra se incubó en hielo durante 5 minutos y después se centrifugó a 13krpm por 10 minutos. Lo siguiente fue retirar todo el etanol y se dejó secar el botón de ADN presente en el fondo del tubo a temperatura ambiente por 10 minutos. Después se resuspendió el ADN en 200µl de T.E. (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH=8.0) y se incubó toda la noche a 55 °C, para que las cadenas de ADN se resuspendieran completamente.

La concentración de ADN fue estimada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en TBE 0.5X. Para la electroforesis 2µl de muestra fueron mezclados con 5µl de colorante, el gel permaneció por 10 minutos a 100volts en la cámara de electroforesis. El gel fue teñido con bromuro de etidio (5µg/ml) por 10 minutos, después se visualizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta. Se incluyeron concentraciones estándar de ADN de fago  $\lambda$ , para facilitar la cuantificación.

### Amplificación de microsatélites específicos de *Fregata magnificens* por PCR.

Las condiciones de amplificación de todos los loci variaron en la temperatura de alineamiento y la concentración de MgCl<sub>2</sub> (ver tabla de primers. Tabla 2). De 20-40 ng de ADN genómico total fueron amplificados por PCR en 20 µl de reacción que contenían amortiguador para polimerasa 1X, MgCl<sub>2</sub> de acuerdo al óptimo para cada locus, dNTPs 0.1 mM (mezcla equimolar de los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfatados), 0.5 U Taq (Gibco, DNA polimerasa III de *Thermus aquaticus*) con los siguientes parámetros de amplificación en el termociclador: 95 °C 4min, 24 ciclos de 95 °C 10seg, la temperatura apropiada para cada locus por 45seg, 72 °C 45seg y un paso final de extensión de 72 °C 5min.



### Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para evaluar la amplificación, los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 6% (TBE 1X, Urea 5.8 M, acrilamida: bis-acrilamida 9:1, APS 0.1%, TEMED 27  $\mu$ L), utilizando espaciadores de 0.4 mm. El gel se sometió una hora a voltage constante de 1600V. Las reacciones fueron mezcladas 1:1 con colorantes de Formamida (Xilen-Cianol 1mg/mL, EDTA 10 mM, diluidos en Formamida). Las reacciones con el colorante se desnaturizaron durante 10' a 95 °C e inmediatamente enfriadas en hielo. Se colocó en el gel 7  $\mu$ l de cada reacción con colorante y 3  $\mu$ l de marcador de peso molecular "10bp ladder" (Gibco) (18  $\mu$ l de agua, 2  $\mu$ l de marcador de peso molecular y 20  $\mu$ l de colorante de Formamida). El gel se sometió a un campo eléctrico de 1600V constantes alrededor de 4 hrs. Después, los geles fueron fijados durante dos horas en ácido acético 10%. Posteriormente, los geles se lavaron dos veces con agua desionizada y una vez con agua "Milli Q" y fueron incubados durante 30min en una solución de nitrato de plata 1g/l, formaldehído 0.057%. Se removió el exceso de plata del gel con un lavado de 5-10 seg en agua "Milli Q" y se reveló el gel con agitación en una solución de carbonato de sodio anhidro 30g/l, tiosulfato de sodio 2mg/l, formaldehído 0.057% preenfriada a 10 °C. Una vez que las bandas de ADN eran visibles en el gel, se detuvo el revelado con 1/2 volumen de ácido acético 10% y se fijó en esa solución durante 5 min, posteriormente el gel se lavó en agua destilada por 5min.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## APÉNDICE II

### Análisis histológico

Los análisis histológicos de los tractos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. H. Merchant, en El Instituto de Investigaciones Biomédicas. Para el análisis histológico cada tracto fue dividido en segmentos transversales de 2 a 3.5cm de longitud (Figura 6). Cada segmento fue deshidratado colocándolo en alcohol al 30%, 40%, 50% y 60%, dos hora en cada uno subsecuentemente. El tejido se dejó alrededor de 24 horas en alcohol al 70% y dos horas en alcohol al 80%, después se colocó en alcohol 90%, 95%, y por último en alcohol absoluto. A continuación los segmentos se sumergieron una hora en una mezcla de xilol-alcohol 1:1 a temperatura ambiente; después las muestras se colocaron en xilol puro a 60°C. Se dejaron los segmentos 24 horas en parafina a 60°C. Al siguiente día se incluyeron en parafina y una vez secos se cortaron con microtomo. Los cortes obtenidos fueron de 7 micras de espesor y los segmentos cortados comprendieron a las zonas: S2, S3, S4, S7, S9, S10 para el primer tracto y para el segundo tracto S2, S3 y S4 (Figura 6).

Para su fijación en el porta-objetos los cortes obtenidos se desparafinaron en xilol durante 15 minutos a 60°C; después se hidrataron pasando por los alcoholes 100, 96, 70, 50% durante 5 minutos cada uno respectivamente. Los cortes se lavaron con agua bidestilada rápidamente y se procedió a teñirlos. Para la tinción de núcleos celulares, las laminillas permanecieron por dos minutos en hematoxilina, después se pasaron por agua corriente hasta que viraron a color azul. Lo siguiente fue enjuagarlos en agua bidestilada para detener el "viraje". A continuación se sumergieron rápidamente por alcohol-ácido y se lavaron con agua bidestilada. Los cortes quedaron de color café claro. Después se colocaron, los cortes en carbonato de litio para reestablecer nuevamente la tonalidad azul de los núcleos, se enjuagaron en agua bidestilada y se dejaron las laminillas por 2 minutos en alcohol al 70%. Lo siguiente fue dejar las laminillas un minuto en eosina para la tinción del citoplasma. Las laminillas se deshidrataron en alcoholes al 70, 96 y 100% durante cinco minutos cada uno y por último se dejaron en xilol por cinco minutos y se colocaron en portaobjetos para poderlos observar en el microscopio de luz.

La región útero-vaginal, la región más promisoría para detectar las espermatecas (S3 y S4) se desparafinó para poderlos incluir en epón y ser cortados para microscopía electrónica. Para ser desparafinados, los segmentos se colocaron en xilol por 10 minutos a 60°C; después en xilol a temperatura ambiente, también por 10 minutos y por último en xilol-alcohol por 20 minutos. Después de ser desparafinado, el tejido, se rehidrató pasando por los alcoholes 100, 96, 80, 70, 60, 50, 30% por 20 minutos cada uno. Al terminar, el segmento fue cortado en rebanadas tipo pastel. Se

obtuvieron 18 cortes en forma de triángulo. Los cortes se lavaron por 20 minutos en solución tampón de cacodilato de sodio, se colocaron 30 minutos en fijador de Karnovsky y se dejaron en cacodilato por 24 horas. Al siguiente día los cortes se colocaron en tetróxido de ósmio 1% "zelterqust" por una hora y se lavaron tres veces con agua destilada. Después, los cortes se deshidrataron pasándolos por alcohol al 70% a 4°C por 20 minutos, alcohol al 80, 90 y 95% por 10 minutos y cuatro cambios de alcohol al 100% por 20 minutos cada cambio. Por último se llevó a cabo la impregnación en epón (una hora en epón-óxido de propileno 1:1; una hora epón-óxido de propileno 2:1 y 24 horas en epón puro a temperatura ambiente). Al tener los cortes incluidos en epón estos se cortaron y se observaron en el microscopio electrónico para detectar la posible presencia de espermatozoides.

El segundo tracto también se dividió en segmentos transversales de 2 a 3.5 cm, no todo el oviducto se seccionó (Figura 6). Los segmentos pares se incluyeron en parafina y los nones en epón para obtener cortes para el microscopio de luz y el microscopio electrónico alternadamente. De los segmentos incluidos en parafina sólo se cortaron los correspondientes a la región vaginal y útero-vaginal (S2, S4). Los cortes fueron transversales de 7 micras y se tiñeron con eosina / hematoxilina, al igual que en el primer tracto. El segmento incluido en epón correspondiente a la región útero-vaginal (S3), se cortó para microscopía electrónica.

## Bibliografia

Alves M. A. & Bryant D.M. 1998. Brood parasitism in the sand martin, *Riparia riparia*: evidence for two parasitic strategies in a colonial passerine. *Animal Behaviour*. 56: 1323-1331.

Amundsen, T; Forsgren, E. & Hansen L.T.T. 1997. *On the function of female ornaments: male bluethroats prefer colourful females*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*. 264:1579-1586.

Amundsen, T. 2000. *Why are female birds ornamented?*. *Trends in Ecology and Evolution*. 15: 149-155.

Bakst, M.R. & Bird, D.M. 1987. *Localization of oviductal sperm-storage tubules in the American Kestrel (*Falco sparverius*)*. *The Auk*. 104:321-324.

Birkhead T.R; Atkin L. & Møller A.P. 1987. *Copulation behaviour of birds*. *Behaviour*. 101:101-138.

Birkhead, T.R. & Lessells, C.M. 1988. *Copulation behaviour of the osprey: *Pandion haliaetus**. *Animal Behavior*. 36: 1672-1682.

Birkhead, T.R; Pellat J. & Hunter F.M. 1988. *Extra-pair copulation and sperm competition in the zebra finch*. *Nature*. 334:60-62.

Birkhead, T.R; Hunter F.M. & Pellatt J.E. 1989. *Sperm competition in the zebra finch, *Taenipygia guttata**. *Animal Behaviour*.. 38:935-950.

Birkhead, T.R. & Moller, A.P. 1992. *Sperm competition in birds. Evolutionary causes and consequences*. Ed. Academic Press.

Birkhead, T.R. & Moller, A.P. 1996. *Monogamy and sperm competition in birds*. Ed. Black J. M. *Partnership in Birds: The study of Monogamy*. Oxford University Press, Oxford.

- Birkhead T.R. & Biggins J.D. 1998. *Sperm competition mechanisms in birds: models and data*. Behavioral Ecology. 3:253-260.
- Birkhead T.R. 1987. *Sperm competition in birds*. Trends in Ecology and Evolution. 2: 268-272.
- Birkhead T.R. 1998. *Sperm competition in birds: mechanisms and function*. Pp. 579-622. En Sperm competition and sexual selection.
- Cezilly, F. & Nager, R. 1995. *Comparative evidence for a positive association between divorce and extra-pair paternity in birds*. Proceedings of the Royal Society of London, series B: Biological Sciences. 262:7-12.
- Chapman T; Arnqvist G; Bangham J. & Rowe L. 2003. *Sexual Conflict*. Trends in Ecology and Evolution. 18:41-47.
- Chuang-Dobbs H.C; Webster M.S. & Holmes R.T. 2001. *Paternity and parental care in the black-throated blue warbler, Dendroica caerulescens*. Animal Behaviour. 62:83-92.
- Clutton-Brock T.H. & Parker G.A. 1995. *Sexual coercion in animal societies*. Animal Behaviour. 49:1345-1365.
- Darwin, C. 1871. *The descent of man, and selection in relation to sex*. Princeton University Press, Princeton New Jersey.
- Davies N.B. 1992. *Dunnock behaviour and social evolution*. Ed. Oxford University Press.
- Davies N.B; Hatchwell B.J; Robson T. & Burke T. 1992 *Paternity and parental effort in dunnocks Prunella modularis: how good are male chick-feeding rules?*. Animal Behaviour. 43:729-745.
- Dearborn D.C; Anders A.D. & Parker P.G. 2001. *Sexual dimorphism, extrapair fertilizations, and operational sex ratio in great frigatebirds (Fregata minor)*. Behavioural Ecology. 6:746-752
- Dixon A; Ross D; O'Malley S.L.C. & Burke T. 1994. *Paternal investment inversely related to degree of extra-pair paternity in the reed bunting*. Nature. 371:698-700.

- Eberhard W.G. 1996. *Female control: Sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press.
- Erickson C.J. & Zenone P.G. 1976. *Courtship differences in male ring doves: avoidance of cuckoldry?*. Science. 192:1353-1354.
- Gowaty, P.A. 1996. *Battles of the sexes and origins of monogamy*. En: Partnership in birds. Ed. Oxford University Press. Pp.21-52.
- Griffith S.C; Owens I.P.F & Thuman K.A. 2002. *Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function*. Molecular Ecology. 11:2195-2212.
- Griffith S.C; Lyon B.E. & Montgomerie R. 2004. *Quasi-parasitism in birds*. Behavioural Ecology and Sociobiology. 56:191-200.
- Hatch S.A. 1983. *Mechanism and ecological significance of sperm storage in the northern fulmar with reference to its occurrence in other birds*. The Auk. 100:593-600.
- Hill, G.E. 1991. Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. Nature. 350:337-339.
- Hill G.E; Montgomerie R; Roeder C. & Boag P. 1994. *Sexual selection and cuckoldry in a monogamous songbird: implications for sexual selection theory*. Behavioural Ecology and Sociobiology 35:193-199.
- Holland B. & Rice W.R. 1998. *Perspective: Chase-away sexual selection: Antagonistic seduction versus resistance*. Evolution. 52:1-7.
- Hunter F.M; Burke, T. & Watts, S.E. 1992. *Frequent copulations as a method of paternity assurance in the northern fulmar*. Animal Behaviour.. 44:149-156
- Hunter F.M; Petrie M; Otronen M; Birkhead T.R. & Moller A.P. 1993. *Why do females copulate repeatedly with one male?*. Trends in Ecology and Evolution. 8:21-26.

Huyvaert K.P; Anderson D.J; Jones T.C., Duan W & Parker P.G. 2000. *Extra-pair paternity in waved albatrosses*. *Molecular Ecology*. 9:1415-1419.

Johnsen A; Lifjeld J.T; Rohde P.A; Primmer C.R & Ellegren H. 1998. *Sexual conflict over fertilizations: female bluethroats escape male paternity guards*. *Behavioural Ecology and Sociobiology*. 43:401-408.

Johnson A.L. 2000. *Reproduction in the female*. En: Sturkie's Avian Physiology. Fifth edition. Academic press. Pp 569-591.

Johnston R.A; Reynolds J.D. & Deutsch J.C. 1996. *Mutual mate choice and sex differences in choosiness*. *Evolution*. 50:1382-1391.

Jones, I.L. & Hunter, F.M. 1993. *Mutual sexual selection in a monogamous seabird*. *Nature*. 362:238-239.

Jones K.M; Monaghan P. & Nager R.G. 2001. *Male mate choice and femal fecundity in zebra finches*. *Animal Behaviour*. 62:1021-1026.

Krebs J.R. & Davies N.B. 1993. *An introduction to Behavioural Ecology*. 3rd ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Kvarnemo C. & Ahnesjö. 1996. *The dynamics of operational sex ratios and competition for mates*. *Trends in Ecology and Evolution*. Vol. 11 No. 10:404-408.

Lewin B. (1997) *Genes VII*. 7ª Edición. Oxford University Press. U.S.A..

Madsen V; Balsby T.J.S; Dabelsteen T. & Osorno J.L. 2004. *Bimodal signalling of a sexually selected trait: gular pouch drumming in the Magnificent Frigatebird*. *Condor*. 106:157-161.

Mauck R.A; Marscahl E.A. & Parker P.G. 1999. *Adult survival and imperfect assessment of parentage: effect on male parenting decisions*. *The American Naturalist*. 154:99-109.

- Mauck R.A; Waite T.A. & Parler P.G. 1995. *Monogamy in Leach's Storm-petrel: DNA fingerprinting evidence*. The Auk 112:473-482.
- Møller, A.P. 1987. *Copulation behaviour in the goshawk: Accipiter gentilis*. Animal Behaviour. 35:755-763.
- Møller A.P. & Alatalo R.V. 1999. *Good-genes effects in sexual selection*. Proceedings of the Royal Society of London Series B. 266:85-91.
- Møller, A.P. & Thornhill R. 1998. *Male parental care, differential parental investment by females and sexual selection*. Animal Behaviour. 55:1507-1515.
- Neff, B.D. & Pitcher, T.E. 2005. *Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes*. Molecular Ecology. 14:19-38
- Nelson, J.B. 1975. *The breeding biology of frigatebirds: a comparative review*. Living Bird. 113-155.
- Olsson, O., Bonnedahl J. & Anker-Nilssen P. 2001. *Mate switching and copulation behaviour in King Penguins*. Journal of Avian Biology. 32:139-145.
- Osorio-Beristain M. & Drummond H. 2001. *Male boobies expel eggs when paternity is in doubt*. Behavioural Ecology. Vol. 12 No. 1:16-21.
- Osorno J. L. 1996. *Evolution of breeding behavior in the Magnificent frigatebird: copulatory pattern and parental investment*. Ph. D. dissertation , University of Florida, Florida.
- Osorno J.L & Székely T. 2004. *Sexual conflict and parental care in magnificent frigatebirds: full compensation by deserted females*. Animal Behaviour. 68:337-342.
- Owens I.P. 1993. *When kids jus't aren't worth it: cuckoldry and parental care*. Trends in Ecology and Evolution. Vol. 8, no. 8.



- Palokangas P; Korpimäki E; Hakkarainen H; Hunta E; Tolonen P. & Alatalo R.V. 1994. *Female kestrels gain reproductive success by choosing brightly ornamented males*. *Animal Behaviour*. 47:443-448.
- Parker G.A. 1979. *Sexual selection and sexual conflict*. Pp123-166 en *Sexual selection and reproductive competition in insects*. Academic Press, New York.
- Petrie M. 1992. *Copulation frequency in birds: why do females copulate more than once with the same male?*. *Animal Behaviour*. 44:790-792.
- Ritchison G; Klatt P.H. & Westneat D.F. 1994. *Mate guarding and extra-pair paternity in northern cardinals*. *The Condor*. 96:1055-1063.
- Runfeldt S. & Wingfield J.C. 1985. *Experimentally prolonged sexual activity in female sparrows delays termination of reproductive activity in their untreated mates*. *Animal Behaviour*. 33:403-410.
- Senar J.C; Figuerola J. & Pascual J. 2002. *Brighter yellow blue tits make better parents*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*. 269:257-261.
- Schulze-Hagen K; Leisler B; Birkhead T.R. & Dyrce A. 1995. *Prolonged copulation, sperm reserves and sperm competition in the Aquatic Warbler: *Acrocephalus paludicola**. *IBIS*. 137:85-91.
- Sheldon B.C. & Ellegren H. 1999. *Sexual selection resulting from extrapair paternity in collared flycatchers*. *Animal Behaviour*. 57:285-289.
- Stockley P. 1997. *Sexual conflict resulting from adaptations to sperm competition*. *Trends in Ecology and Evolution*. 12:154-159.
- Sunderg J. & Larsson C. 1994. *Male coloration as an indicator of parental quality in the yellowhammer, *Emberiza citrinella**. *Animal Behaviour*. 48: 885-892.
- Torres R. & Velando A. 2003. *A dynamic trait affects continuous pair assessment in the blue footed booby*. *Behavioural Ecology and Sociobiology*. 55:65-72.

Torres R. & Velando A. 2005. Male preference for female foot colour in the socially monogamous blue-footed booby, *Sula nebouxii*. *Animal Behaviour*. 69:59-65.

Trivers R.L. 1972. *Parental investment and sexual selection*. En: *Sexual selection and the descent of man*. Campbell B (ed) Heinemann, London. Pp 136-179.

Van Drimmelen G.C. 1946. 'Spermnests' in the oviduct of the domestic hen. *Journal South African Veterinary Medicine Association*. 17:42-52.

Veiga J. P. 1993. *Prospective infanticide and ovulation retardation in free-living house sparrows*. *Animal Behaviour*. 45:43-46.

Westneat D.F, Sherman P.W. & Morton M. 1990. *The ecology and evolution of extra-pair copulations in birds*. *Current Ornithology*. 7:331-369.

Westneat D.F. 1996. *Reproductive physiology and sperm competition in birds*. *Trends in Ecology and Evolution*. 11:191-192.

Westneat D.F & Sargent R.C. 1996. *Sex and parenting: the effects of sexual conflict and parentage on parental strategies*. *Trends in Ecology and Evolution*. 11:87-91.

Whittingham L.A; Dunn P.O. & Robertson R.J. 1992. *Confidence of paternity and male parental care*. *The American Naturalist*. 139:1115-1125.

Wingfield, J.C. 1994. *Hormone-behavior interactions and mating systems in male and female birds*. En: *The difference between the sexes*. Short & Balaban (ed). Cambridge University Press. Pp.303-330.

Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. 2d. Ed. Prentice Hall.

Zenone, P.G; Sims, M.E. & Erickson, C.J. 1979. *Male ring dove behavior and the defense of genetic paternity*. *The American Naturalist*. 114:615-626.

**Tabla 1.** Secuencias de “primers” e información relacionada para cuatro microsatélites desarrollados para *Fregata magnificens*. *micro*, microsatélite; *n*, tamaño de muestra; *T<sub>a</sub>*, temperatura de alineación; *H<sub>E</sub>*, heterócigos esperados en equilibrio Hardy Weinberg; *H<sub>o</sub>*, heterócigos observados, *H*, homócigos.

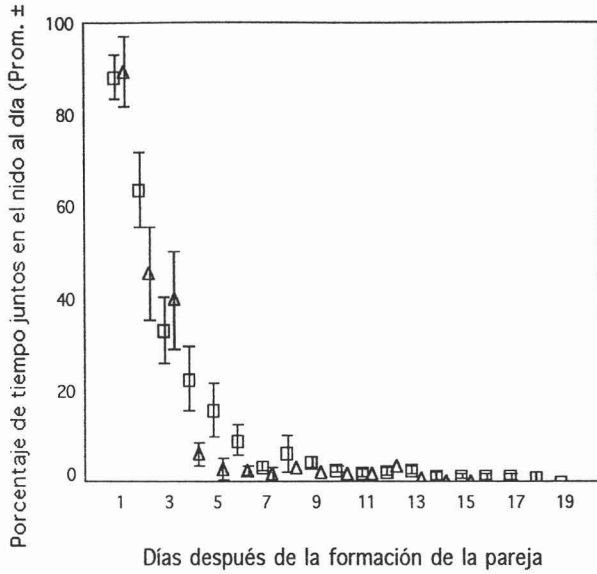
Nombre micro	Composición de nucleótidos	Secuencia de iniciadores.	T <sub>a</sub>	[MgCl <sub>2</sub> ] <sub>f</sub>	n	No. alelos.	Intervalo de tamaño	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	H
FB12	(CA) <sub>20</sub> GAGA	Fwd 5'-CTG GAT GTC CAA GTC CCT GA-3' Rev 5'-GCG TAG GTG ATG TGG TCT GG-3'	58 °C	1.5 mM	31	5	186-196 pb	.68	.45	.55
FB44	AT(AC) <sub>18</sub>	Fwd 5'-CCA TGG GCT GAT GCT AGT TA-3' Rev 5'-AAA TAA AAG GGG CCA GTT GC-3'	58 °C	1.5 mM	56	4	203-220 pb	.46	.33	.54
FB 79	(CA) <sub>20</sub> (GA) <sub>2</sub> GCTGTCT	Fwd 5'-CTG GAT GTC CAA GTC CCT GA-3' Rev 5'-AGC CAG GGG TGA CTC TAA GG-3'	56 °C	1.5 mM	51	5	166-174 pb	.58	.70	.30
FB 102	(AC) <sub>15</sub>	Fwd 5'-TTA CTG ATG CTC CCA ATG AGG-3' Rev 5'-GTG ACG CCA TTG TGT CAG AG-3'	56 °C	1.0 mM	38	6	198-208pb	.69	.68	.32

**Tabla 2.** Genotipo (número de pares de bases para los alelos de cada microsatélite) determinado para cada individuo de las diferentes familias (*m*, macho; *c*, crío; *h*, hembra) en cada microsatélite.

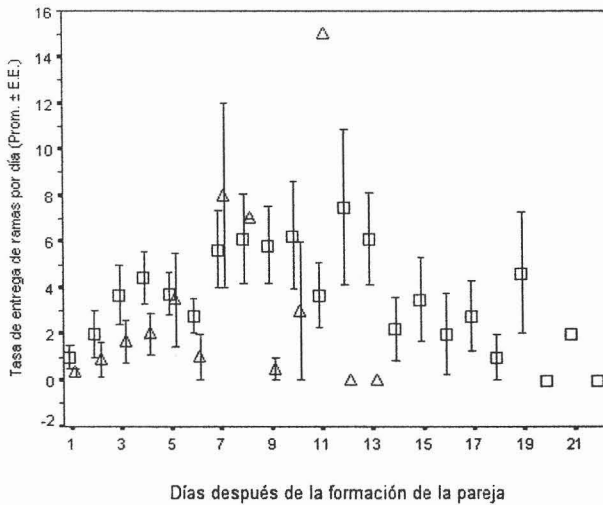
		FB12	FB44	FB79	FB102
Familia A	m	186; 194	203; 206	160; 175	206; 206
	c	186; 194	203; 220	160; 173	206; 206
	h	194; 194	218; 220	160; 173	206; 206
Familia B	m	190; 190	208; 218	163; 173	204; 204
	c	190; 194	208; 218	163; 163	202; 204
	h	186; 194	206; 218	163; 173	202; 204
Familia C	m	190; 190	218; 220	163; 167	204; 206
	c	190; 194	218; 218	167; 173	206; 208
	h	194; 186	203; 218	161; 173	208; 210
Familia D	m	190; 194	218; 220	171; 173	202; 206
	c	190; 194	218; 220	163; 173	202; 206
	h	190; 190	218; 228	163; 167	202; 204
Familia E	m	188; 194	206; 218*	165; 173*	205; 205*
	c	186; 188	206; 220*	161; 165*	205; 205*
	h	186; 194	206; 208*	163; 175*	203; 207*
Familia F	m	194; 194	203; 218	165; 174*	208; 208*
	c	190; 194	218; 220	165; 177*	202; 208*
	h	194; 196	218; 220	165; 173*	204; 208*
Familia G	m	186; 194	218; 218	160; 173	198; 206
	c	186; 194	206; 218	160; 173	198; 206
	h	186; 194	206; 218	160; 175	198; 206

\* Maternidad extra-pareja.

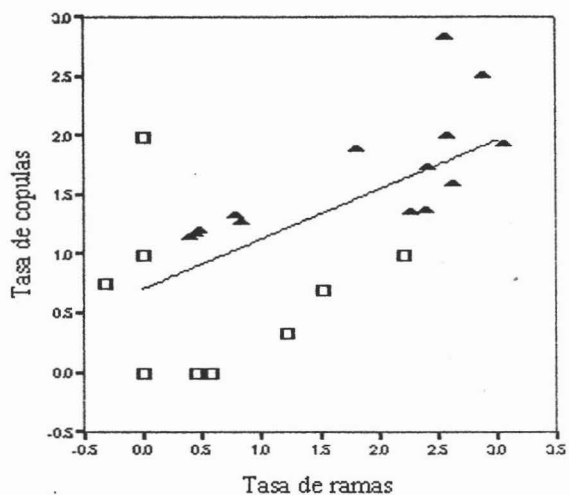
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



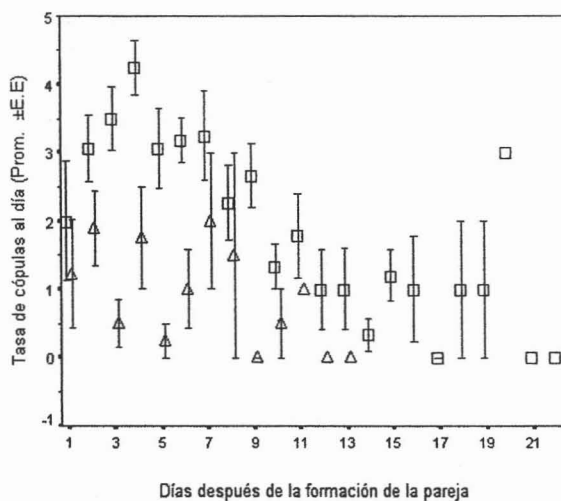
**Figura 1.** Variación en la proporción de tiempo que ambos miembros de la pareja permanecieron juntos en el nido, en nidos exitosos (□; n=16) y en nidos en donde algún miembro de la pareja abandonó (Δ; n=9). Se muestra el porcentaje promedio (±E.E.) desde la formación de la pareja hasta la puesta en nidos exitosos y en los abandonados hasta la disolución.



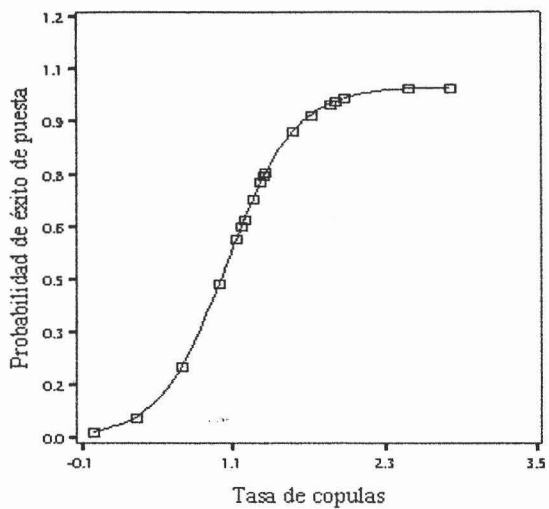
**Figura 2.** Patrón de entrega de ramas por parte del macho a la hembra en el nido a lo largo de la temporada de reproducción en nidos exitosos (□) y abandonados (Δ). Se muestran los promedios (± ee) desde la formación de la pareja (día 1) hasta la puesta en nidos exitosos y hasta la disolución de la pareja, en nidos abandonados.



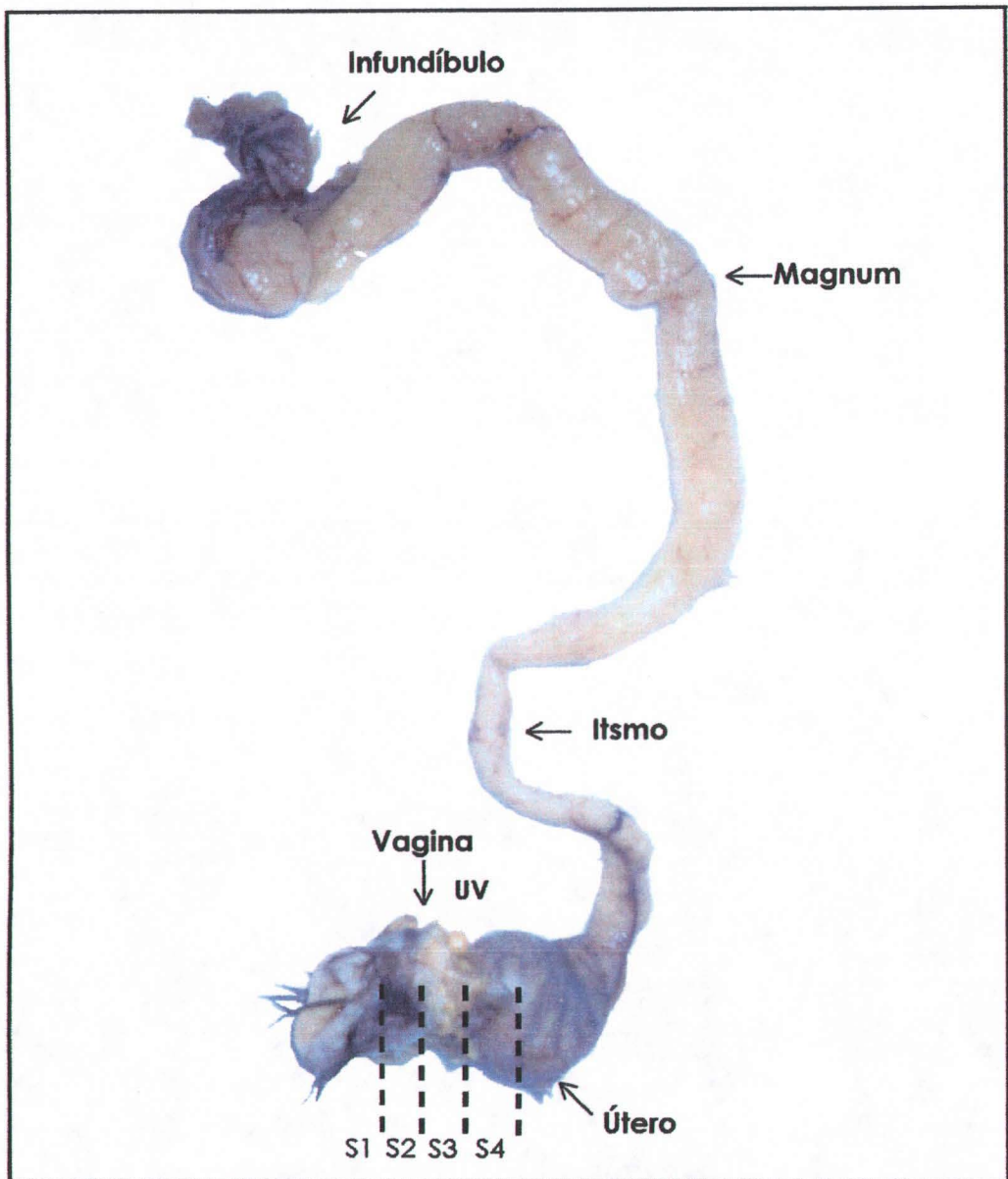
**Figura 3.** Correlación entre la tasa diaria de entrega de ramas por nido y la tasa de cópulas por nido al día en los nidos exitosos ( $\square$ ) y en nidos abandonados ( $\blacktriangle$ ).



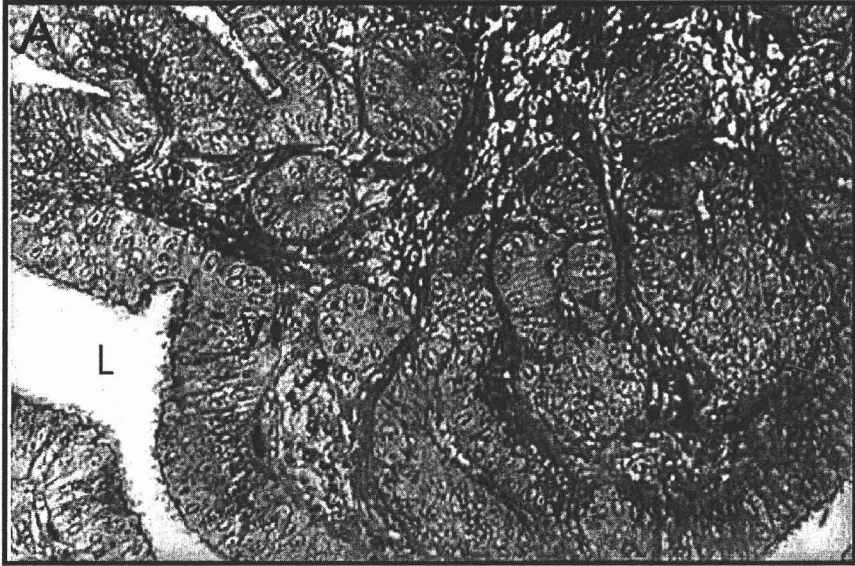
**Figura 4.** Patrón de cópulas a lo largo de la temporada de cortejo intra-pareja en nidos exitosos ( $\square$ ) y en nidos abandonados ( $\Delta$ ). Se graficó desde la formación de la pareja hasta la puesta, en nidos exitosos y en los abandonados hasta la disolución.



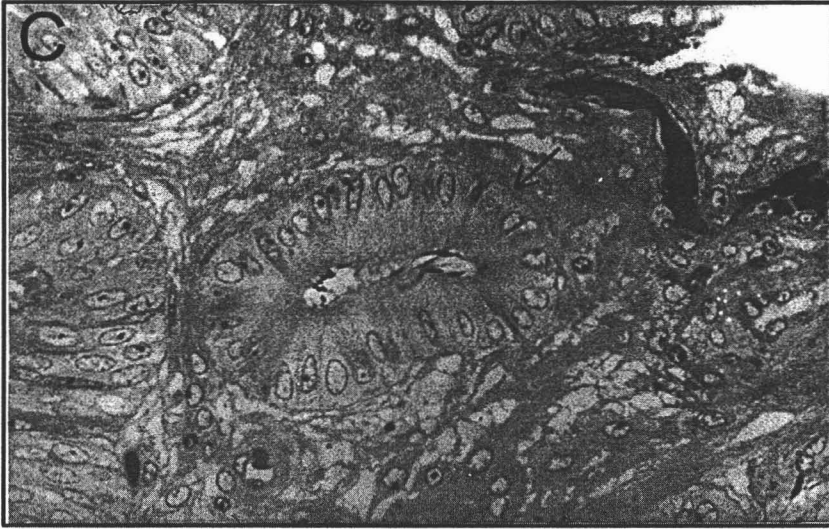
**Figura 5.** Tasa diaria de cópulas intra-pareja y el éxito de puesta (n=23 parejas). Se realizó una regresión logística con distribución. Los parámetros para la curva son:  $\beta=3.71$ , cte.=-3.95).



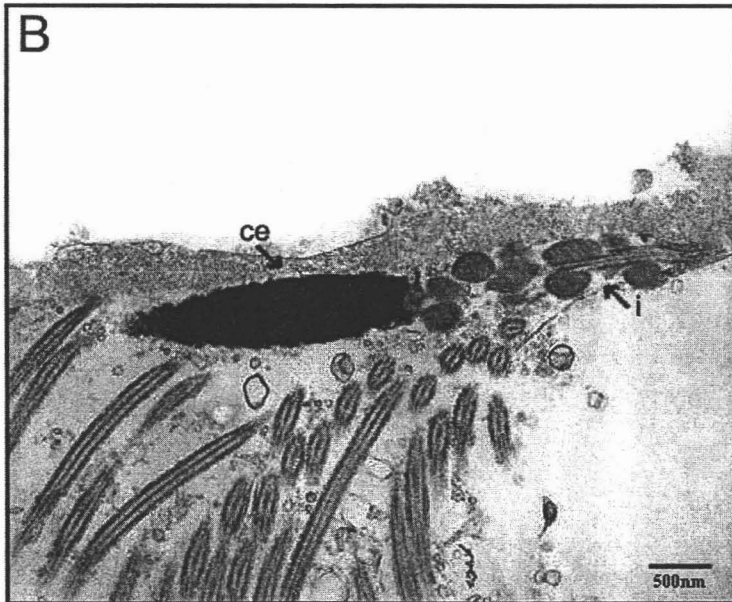
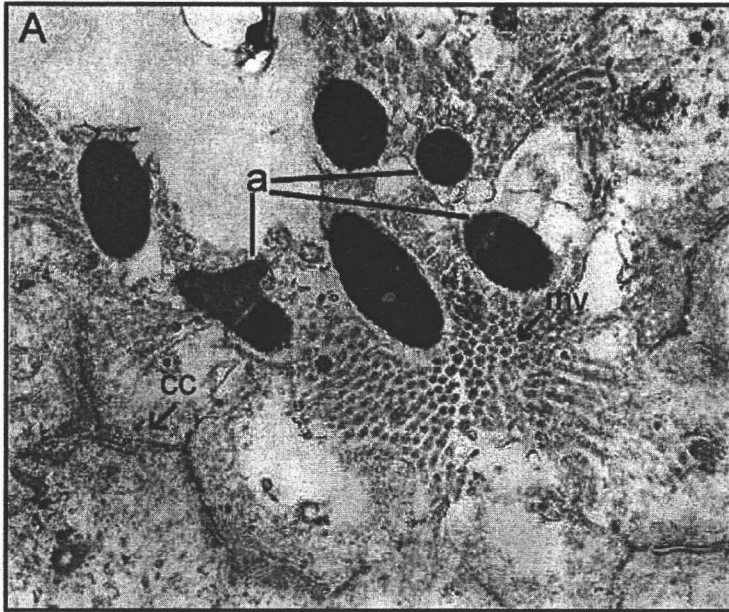
**Figura. 6.** Oviducto de una hembra de *Fregata magnificens* en periodo reproductivo. En la fotografía se señalan las diversas regiones del tracto y como fueron seccionados los trectos durante el estudio. Los segmentos midieron entre 2 a 3.5 cm. UV: región útero-vaginal.







**Figura 7.** Micrografías de la región útero-vaginal de una hembra de *F. Magnificens* al microscopio de luz. (A) Corte transversal de la región útero-vaginal (20X). (B) Estructura para almacenar espermatozoides con espermatozoides en el lumen, corte transversal (60X) y (C) corte semi-longitudinal (60X). Se señala luz del oviducto (L), vasos (V). Las flechas indican las estructuras para almacenar espermatozoides.



**Figura 8. (A)** Corte transversal de una espermateca mostrando parte del lumen al microscopio electrónico. Se observan seis cabezas de espermatozoides cortadas a diferentes niveles. En tres de ellas se puede observar parte del acrosoma (a). Micro vellosidades (mv) y complejos de unión (cc) de células epiteliales. **(B)** Corte tangencial de un espermatozoide en la luz del tracto, mostrando parte de la cabeza (ce) y algunas mitocondrias del segmento intermedio (i). También se muestran los cilios de las células epiteliales que rodean al espermatozoide.