



Universidad Nacional Autónoma de México
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
(BIOLOGÍA MARINA)

**PARENTESCO GENÉTICO ENTRE LOS MIEMBROS DE LA PAREJA SOCIAL Y LA
PRESENCIA DE PATERNIDAD EXTRAPAREJA EN EL BOBO DE PATAS AZULES**
Sula nebouxii

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIÓL. MARINO CAROLINA FRANCO ESPINOSA

TUTOR:

DR. GUILLERMO JUAN FERNÁNDEZ ACEVES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ALBERTO ABREU GROBOIS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNAM. MÉXICO, D.F.

DR. LUIS MANUEL ENRÍQUEZ PAREDES
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

DRA. SILVIA ALEJANDRA GARCÍA GASCA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por haberme permitido ingresar al posgrado y así poder continuar con mi desarrollo profesional, en particular a la Unidad Académica Mazatlán.

Al Grupo de Investigación de Ecología de Aves de la Unidad Académica Mazatlán: al Dr. Guillermo Fernández Aceves, por dirigir este proyecto de manera continua prestándome asesoría y sobre todo paciencia, al Dr. Alfredo Castillo por transmitirme su fascinación por los súlidos y su ayuda en el trabajo de campo. A mis compañeros de laboratorio y amigos Miriam Lerma Lizárraga, Alfredo Leal Sandoval, Hugo Manuel Espinoza y Erick González Medina.

Al Grupo de Investigación de Ecología Molecular de la Universidad de Baja California en Ensenada (Campus Sauzal), de forma especial al Dr. Luis Enríquez por haber dedicado su paciencia y conocimiento para instruirme en las técnicas de laboratorio y análisis de datos moleculares de este trabajo.

Al Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza A.C. (PIE-2012-A-P-C-IGSI-12-12), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por autorizarme la beca durante el periodo de estudios (491261/281585) y CONANP Islas del Golfo de California (Sinaloa y Sonora), especialmente a Miguel Guevara Medina y Jesús Ventura Trejo por su apoyo logístico.

A los miembros del comité: Dr. Alberto Abreu-Grobois, Dra. María del Coro Arizmendi, Dr. Luis Enríquez Paredes y a la Dra. Alejandra García por las valiosas aportaciones que dieron para la realización de este trabajo. Agradezco su disponibilidad y atención.

Al personal del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por su apoyo en todo momento que se necesitó; Margarita Cordero, Natalia Medina y Clara Ramírez.

DEDICATORIAS

A mi familia

Por apoyarme incondicionalmente en todo momento, por su enorme paciencia, dedicación y sobre todo por la confianza que me dieron para continuar con mis objetivos y metas, este proyecto se lo dedico a ustedes. Gracias por todo Oscar, Lucy, Lau y Cris.

Amigos

A mis compañeros de generación por todos esos buenos momentos compartidos, a mis compañeros de la maestría: Betty, Miriam, José Yacomelo, Brigitte, Eduardo, Itzel y Roberto por brindarme su apoyo , amistad y confianza, por todos esos divertidos momentos que compartí con ustedes.

A la familia Lerma Lizárraga, por ser mi familia mazatleca, les agradezco por abrirme las puertas de su casa, brindarme su apoyo y compañía.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Sistemas de apareamiento de aves.....	10
1.2. Parentesco genético de la pareja social y PEP.....	11
1.3. Coeficientes de Parentesco.....	12
1.4. Sistema de apareamiento del bobo de patas azules.....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1. Conflicto sobre la paternidad en <i>S. nebouxii</i>	17
2.2. Dispersión natal y reproductiva del bobo de patas azules.....	21
2.3. Dispersión entre colonias.....	24
2.4. Similitud genética entre miembros de la pareja en aves.....	25
2.5. Análisis de paternidad en aves marinas.....	27
3. JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivos específicos.....	31
5. HIPÓTESIS.....	32
6. ÁREA DE ESTUDIO.....	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
7.1. Trabajo de campo.....	36
7.2. Fase de laboratorio.....	36
7.2.1. Extracción del ADN y evaluación de su calidad.....	36
7.2.2. Control de calidad y condiciones óptimas para la amplificación de los microsatélites.....	37
7.3. Fase de gabinete.....	42
7.3.1. Genotipado.....	42
7.3.2. Control de calidad del genotipado.....	42
7.3.3. Diversidad genética.....	44
7.3.4. Parentesco entre parejas y adultos de ER, FSI y SPM.....	44
7.3.5. Asignación de paternidad.....	45
8. RESULTADOS.....	46

8.1. Genotipado de los individuos.....	46
8.2. Tasa de error	47
8.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg	47
8.4. Probabilidad de Identidad	48
8.5. Índices de diversidad molecular	49
8.6. Grado de similitud genética entre los miembros de las parejas.....	50
8.7. Paternidad de los polluelos	51
9. DISCUSIÓN	53
9.1 Diversidad Genética	54
9.2 Parentesco Genético.....	57
9.3 Paternidad Genética.....	60
10. CONCLUSIONES	62
11. LITERATURA CITADA.....	64
ANEXOS	72

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Mezcla de productos de PCR utilizadas en cada colonia detallando el fluorocromo, tamaño alélico y nombre de la mezcla para cada uno de los nueve loci microsatélites de *S. nebouxii*. 41
- Tabla 2.** Descripción del panel de loci microsatélites que fueron optimizados y empleados en el análisis genético del bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) en el presente estudio (Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM, NA: Número de alelos) (Faircloth *et al.* 2009 y Taylor *et al.* 2010). 46
- Tabla 3.** Índices descriptivos de diversidad genética a nivel global y de población en colonias del bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) en el Golfo de California: Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM. N= Número de individuos muestreados por colonia, a = Número promedio de alelos por locus, U = Número de alelos únicos por colonia, F= Frecuencia alelo más frecuente, H_e y H_o = Heterocigosidad esperada y observada (Nei 1978). 48
- Tabla 4.** Valores de heterocigosidad observada y esperada para los 9 loci microsatélites del bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) optimizados para individuos de tres colonias del Golfo de California: Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM, los valores con asterisco (*) mostraron desviaciones significativas del equilibrio H-W (Prueba Chi-Cuadrado). 49
- Tabla 5.** Valores de probabilidad de identidad multilocus (producto acumulativo de la PI proporcionada por cada locus) para individuos emparentados y no relacionados de acuerdo a la información de 9 loci microsatélites en el bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) de tres colonias del Golfo de California: Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM (N= Número total de individuos genotipados por colonia, PI_{NE} = PI acumulada para individuos no emparentados, PI_{HC} = PI acumulada para hermanos completos). 50
- Tabla 6.** Coeficientes de parentesco genético de las parejas sociales y adultos en general de bobo de pata azules (*Sula nebouxii*) en el Golfo de California: Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM. Los coeficientes están basados en el estimador Trio-ML (N= Número de duplas de individuos a los cuales se les estimó el parentesco). 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de las tres colonias del bobo de patas azules (<i>Sula nebouxii</i>) muestreadas en el presente estudio (Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM).	34
---	----

RESUMEN

Se utilizaron nueve marcadores neutrales tipo microsatélites para determinar si el parentesco genético entre los miembros de la pareja social y la edad relativa de la colonia (relacionada con el nivel de consolidación de vecindarios de parientes) determinan la presencia de la paternidad extrapareja (PEP) en el bobo de patas azules *Sula nebouxii* anidando en tres colonias del Golfo de California (El Rancho, Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir). El panel de marcadores empleados mostró un nivel alto de polimorfismo, sin errores asociados al genotipado (alelos nulos, tartamudeo de la polimerasa, desviaciones de HW) y el poder informativo fue bastante alto. La probabilidad acumulada de encontrar hermanos con genotipos idénticos fue de 3.1×10^{-4} y de encontrar individuos que no sean parientes con el mismo genotipo fue de 3.24×10^{-9} . La diversidad genética promedio global fue de 0.65 ± 0.20 , no se encontraron diferencias entre los valores de heterocigosidad y número de alelos únicos en las tres colonias. Lo anterior indica que existe una alta variabilidad genética para estos grupos, con un bajo potencial de endogamia y ausencia de reducciones drásticas en su flujo génico. En las tres colonias no hay evidencia de que parientes cercanos (padres, hijos y hermanos) estén formando parejas sociales (0.04-0.06) y el parentesco se mantiene bajo también para los adultos en edad reproductiva que no son pareja (~ 0.06). Los valores de parentesco encontrados son similares a los de primos en segundo grado (R_{xy} : $1/32$) y difieren drásticamente de los valores promedio reportados para especies (0.1- 0.59) que usan la PEP como estrategia para evitar endogamia. Con respecto a la paternidad genética se encontró evidencia escasa de paternidad extrapareja en el bobo de patas azules, sólo un posible caso de paternidad EP (PEP, $1/96 \sim 1\%$). Es posible que la efectividad de las estrategias de vigilancia de la pareja sean los causantes del bajo éxito de fertilización EP debido a cópulas intrapareja frecuentes (competencia espermática) y aumento de las horas de presencia en el nido a medida que ser acerca el período fértil. Con respecto a la hipótesis la formación de parejas genéticamente similares y la presencia de paternidad EP no está relacionada con la edad relativa de la colonia en *S. nebouxii* en estas tres colonias.

Palabras clave: Microsatélites, Aves marinas, México, Parentesco genético

ABSTRACT

Nine microsatellite loci were used to evaluate if social mates relatedness and relative colony age (related to establishment of kin neighborhoods) determined the presence of extrapair paternity in the Blue-footed Booby *Sula nebouxii* on three colonies of the Gulf of California: San Pedro Mártir Island, Farallón de San Ignacio and El Rancho Island. This set of markers presented high polymorphism, without genotyping errors such as null alleles, polymerase stuttering and deviations from HW equilibrium. Moreover the informative power was relatively high, the cumulative probability of brothers having identical genotypes was 3.1×10^{-4} and for non-related individuals this probability was 3.24×10^{-9} . Average genetic diversity was 0.65 ± 0.20 ; there were no differences among colonies in terms of heterozygosity and private allele values, meaning that there is high variability in these groups that could account for low inbreeding potential and lack of severe reductions of gene flow. Kinship evaluation reveals that average genetic relatedness is low, showing that breeding mates are not close relatives (parents-offspring, siblings) (0.04-0.06), these average values of relatedness (close to zero) were also found in all breeding adults (non-social pairs)(~0.06). Genetic relatedness values were close to those reported for second cousins (R_{xy} : 1/32) and differed from average relatedness found in monogamous species that use EP paternity as a mechanism to avoid inbreeding. Extrapair paternity frequency was very low, only one possible case in a total of 96 genotyped chicks (PEP, 1/96 ~1%). This lack of EPP can be explained as high effectivity of mate guarding strategies, that are responsible for low fertilization success of the EP copulations (sperm competition), also there is an increase in attendance hours at the nest site of the social male when the presumed fertile period approaches. With respect to the hypothesis, pairs of individuals genetically related and the presence of EP were not related to the relative age of colony in *S. nebouxii* in these three nesting colonies.

Keywords: Microsatellites, Seabirds, Mexico, Genetic relatedness

INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemas de apareamiento de aves

El estudio de sistemas de apareamiento se centra en las diferentes formas en que los individuos obtienen parejas, el número de individuos con quienes se aparean y las tasas de divorcio (Davies 1991). Aunque tradicionalmente la descripción de los sistemas de apareamiento se han fundamentado casi exclusivamente en observaciones del comportamiento, la inclusión de las técnicas moleculares ha revelado patrones inesperados de transmisión genética como resultado de las diversas tácticas de comportamiento que usan los individuos (Hughes 1998). Es por ello que solo a través de la evaluación precisa de la paternidad, es posible estudiar el resultado genético de las estrategias de comportamiento observadas y evaluar el éxito reproductivo a largo plazo (Westneat *et al.* 1990).

Si bien los primeros estudios de sistemas reproductivos en aves sugerían que la mayoría de las especies eran monógamas (Lack 1968), la determinación de la paternidad mediante técnicas moleculares ha evidenciado que en especies aparentemente monógamas se presentan casos de paternidad extrapareja (PEP), alcanzando en casos extremos hasta un 90% (Bennett & Owens 2002, Griffith *et al.* 2002, Westneat & Stewart 2003). Por lo anterior, la terminología referente a la monogamia en aves ha sido revalorada y actualmente se distingue la monogamia genética (relación entre un macho y una hembra con fines reproductivos de carácter exclusivo) de la monogamia social (relación con fines reproductivos no necesariamente exclusiva), la cual puede dar lugar a eventos de cópula extrapareja (CEP) y PEP (Petrie & Kempenaers 1998).

1.2. Parentesco genético de la pareja social y PEP

Las hembras usualmente se ven limitadas en la selección de pareja social tanto por la competencia hembra-hembra, como por la relación costo-beneficio implícita en la elección de un macho por sus beneficios directos (calidad del territorio, habilidad y disposición a proporcionar cuidado parental) o indirectos (genéticos) (Petrie & Kempenaers 1998). Por consiguiente en especies socialmente monógamas, las hembras que han escogido una pareja social, pueden modificar posteriormente la elección del padre de su descendencia a través de cópulas EP (Møller 1992). Se ha planteado que la frecuencia de PEP es directamente proporcional a la similitud genética entre los miembros de una pareja social (Blomqvist *et al.* 2002), ya que el apareamiento entre parientes cercanos propicia endogamia y reduce el valor de adecuación (éxito reproductivo) (Charlesworth & Charlesworth 1987,1999). La depresión genética por endogamia ocurre cuando alelos deletéreos recesivos o parcialmente recesivos, que normalmente son poco frecuentes en la población, se presentan en homocigosis. En los individuos heterocigotos, los efectos deletéreos se encuentran parcialmente cubiertos por el alelo dominante (Hipótesis de Dominancia Parcial, Wright 1977). En las aves, las consecuencias negativas de la pérdida en adecuación debido al apareamiento con individuos genéticamente similares pueden incluir: menor éxito de eclosión (Kempenaers *et al.* 1996, Castele *et al.* 2003), disminución en el número de individuos que llegan a la edad de volantón (Castele *et al.* 2003) y reducción del número de individuos que se reclutan a la población reproductiva (Keller & Waller 2002).

En algunas especies de aves monógamas se ha evidenciado que las parejas sociales genéticamente similares tienen mayor probabilidad de tener pollos EP que aquellas con menor parentesco genético, lo cual apoya la hipótesis de que este comportamiento puede estar actuando como una estrategia para evadir los efectos nocivos de la endogamia (Blomqvist *et al.* 2002, Foerster *et al.* 2003, Masters *et al.* 2003).

1.3. Coeficientes de Parentesco

Los estudios a largo plazo de poblaciones naturales, en los que individuos marcados son monitorizados para registrar todos sus intentos reproductivos, proporcionan una oportunidad valiosa para cuantificar la magnitud de la depresión por endogamia bajo condiciones naturales y evaluar los niveles de parentesco dentro de una población (Kruuk *et al.* 2002, Clutton-Brock & Sheldon 2010). En aves, la mayoría de los estudios de endogamia han sido realizados en poblaciones insulares de paserinos, los cuales tienen un tiempo generacional corto y usualmente se reproducen en su primer año de vida (Frankham 1997). En especies longevas, en las que la edad de madurez sexual se alcanza varios años después, se requieren de observaciones a largo plazo para poder reconstruir el pedigrí adecuadamente (Rabouam *et al.* 1998, Ludwig & Becker 2012). Existen además otros factores que limitan este tipo de estudios y que en consecuencia proporcionan una imagen estrictamente contemporánea de los patrones de dispersión y flujo génico (p.e. especies con probabilidad de recaptura baja). En contraste, con el uso de la herramientas moleculares es posible reconstruir los

eventos evolutivos y los procesos demográficos históricos que dieron como resultado la estructura poblacional observada en el presente (Avice 1994).

Los niveles de parentesco genético son útiles para examinar la estructura social a una escala fina (Girman *et al.* 1997, Peters *et al.* 1999) y pueden ser calculados a partir de marcadores genéticos cuando no existen registros genealógicos (pedigrí) o estos no son muy confiables (Wang 2002). El análisis de marcadores minisatélite para determinar la huella genética (“fingerprinting”) ha sido comúnmente usado en las estimaciones de parentesco (Vassart *et al.* 1987). Este análisis consiste en la evaluación del número variable de repeticiones en tándem en una gran cantidad de loci hipervariables, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo del genoma nuclear. El perfil de marcadores minisatélites de cada individuo se puede observar fácilmente como un arreglo de bandas en un gel de electroforesis, mismo que representa la huella genética del individuo (Lynch 1988). A pesar de su gran aplicabilidad en estudios de aves y mamíferos, tiene ciertas limitaciones: generalmente se desconoce que bandas pertenecen a que loci y, en consecuencia no se puede establecer si los individuos son homocigotos o heterocigotos para cada loci, además de que las bandas compartidas no necesariamente equivalen a genes compartidos (Lynch 1988). En humanos se ha demostrado que la variación en las repeticiones de cada locus de huella genética es tan grande que virtualmente las huellas genéticas de todos los individuos (excepto gemelos monocigóticos) serían únicos (Jeffreys *et al.* 1985).

Los loci microsatélites proporcionan información genotípica exclusiva de un locus y con el desarrollo de métodos estadísticos apropiados, dan lugar a estimadores no sesgados del coeficiente de parentesco de los individuos de una población (Tautz 1989, Queller *et al.* 1993). Los estimadores basados en marcadores moleculares tienen una medida de error considerable debido a la variación en el muestreo, pero este error puede ser reducido usando la información de tantos loci polimórficos como sea posible (Castele *et al.* 2001). Los marcadores moleculares conocidos como loci microsatélites son secuencias cortas (2-4 nucleótidos) repetidas de forma consecutiva, ubicadas en lugares particulares del cromosoma (Tautz 1989). Su patrón de herencia mendeliano combinado con niveles muy altos de polimorfismo hace de los microsatélites una de las herramientas moleculares más poderosas para calcular los coeficientes de parentesco y el análisis de la estructura y la dinámica de genes en una población (Castele *et al.* 2001).

El desempeño de los estimadores de parentesco depende de varios elementos: el verdadero valor de parentesco que está siendo estimado, el grado de información de los marcadores (número de loci, número y frecuencia de los alelos de cada locus) utilizados en los análisis y el tamaño de la muestra en la estimación de las frecuencias alélicas (Castele *et al.* 2001). Milligan (2003) demostró, a través de simulaciones, que los estimadores de verosimilitud tienen el menor valor de raíz cuadrada del error medio (RMSE), una medida de precisión que incorpora tanto la estimación del sesgo como la varianza de muestreo. Adicionalmente, Wang (2007) propone un nuevo estimador basado en el criterio de verosimilitud para calcular el parentesco pareado basado en la estimación de coeficientes de idéntico por

ascendencia (IBD) entre tríos de individuos (Trio-ML). Usando tríos en vez de parejas de individuos, este estimador de verosimilitud controla el ruido de fondo causado por la similitud de genotipos en una pareja debido al azar y permite una estimación del parentesco entre parejas de individuos con el menor porcentaje de error.

1.4. Sistema de apareamiento del bobo de patas azules

El bobo de patas azules (*Sula nebouxii*), perteneciente al Orden Suliformes, es un ave marina colonial que anida en islas del Pacífico Tropical cercanas a corrientes de surgencia (Nelson 1978). Existe un dimorfismo sexual en esta especie, las hembras son más grandes y pesadas (32%) que los machos (Guerra & Drummond 1995). Los machos establecen el territorio de anidación y las hembras eligen entre los machos, ambos sexos se involucran en el cuidado parental que consiste en incubar de 1 a 3 huevos durante 41 días (Nelson 1978, Drummond *et al.* 1986) y cuidan y alimentan a los pollos hasta que alcanzan la independencia, a una edad aproximada de 120 días (Nelson 1978, Guerra y Drummond 1995). Durante la temporada reproductiva, cada sexo divide el tiempo entre viajes de forrajeo que duran unas cuantas horas y períodos en los que se encuentran cerca del nido (Osorio-Beristain & Drummond 1998). Las aves marinas coloniales están expuestas a un alto riesgo de infidelidad debido a que anidan en altas densidades, además de que los extensos viajes de forrajeo limitan su capacidad de vigilar a sus parejas continuamente (Birkhead & Møller 1992), lo que genera mayor oportunidad para las CEP, razón por la que los machos sociales han desarrollado

mecanismos de vigilancia de la pareja tratando de prevenir la inseminación por parte de machos EP (Beecher & Beecher 1979).

El bobo de patas azules macho posee estrategias de vigilancia de la pareja que involucran un incremento en las horas de presencia en el nido a medida que se acerca el período fértil y un aumento en la frecuencia de cópula luego de que la hembra se haya involucrado en alguna CEP (Osorio Beristain & Drummond 1998). Debido a que la presencia de los machos inhibe la CEP de sus parejas sociales, las hembras tratan de evadir estas estrategias de vigilancia para involucrarse en CEP donde su pareja social no pueda verlas y así evitar la disminución en la inversión parental causada por dudas de paternidad. Esto lo hacen modificando su horario de presencia en el nido e involucrándose en CEP lejos del nido o por lo menos donde el macho no tenga visibilidad (Pérez-Staples & Drummond 2005). Para el bobo de patas azules, existe evidencia de que el comportamiento de cortejo y la CEP son bastante frecuentes (Osorio-Beristain & Drummond 1998, Osorio-Beristain & Drummond 2001; Castillo-Guerrero *et al.* 2005, Pérez-Staples & Drummond 2005, Osorio-Beristain *et al.* 2006, Kiere & Drummond 2014, Ramos *et al.* 2014); el 38-100% de las hembras de *S. nebouxii* cortejan y entre el 33-56% de las hembras copulan con otro macho en algún momento previo al periodo de la puesta.

A pesar de que los registros de comportamiento extrapareja en la especie son frecuentes, se desconoce cuál es el porcentaje de éxito de estas cópulas, es decir cuántas inseminaciones tienen como resultado un producto viable (pollo EP) por lo

tanto se propone el uso de un marcador neutral tipo microsatélites para determinar si el parentesco genético entre los miembros de la pareja social y el nivel de consolidación de vecindarios de parientes determinan la presencia de la paternidad extrapareja en el bobo de patas azules anidando en tres colonias del Golfo de California (El Rancho, Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir).

2. ANTECEDENTES

2.1. Conflicto sobre la paternidad en *S. nebouxii*

En especies monógamas, el apareamiento extrapareja genera conflicto sexual debido a las dudas sobre la paternidad. Diferentes machos pueden copular con una hembra perteneciente a una pareja social generando una competencia espermática para lograr la fertilización de los huevos (Birkhead & Møller 1992). Osorio-Beristain & Drummond (1998) examinaron el conflicto sexual sobre la paternidad en el bobo de patas azules y encontraron que las CEP ocurrieron en 7 de las 13 parejas focales de su estudio, representando el 13.3% de las cópulas totales de cada hembra. Sin embargo, las últimas dos cópulas de las 7 hembras promiscuas fueron con sus parejas sociales las cuales ocurrieron 11.1-14.4 h antes de la ovoposición, mientras que las CEP ocurrieron 78.0-72.2 h antes de la ovoposición. Estos autores observaron que la promiscuidad de las hembras disminuyó sustancialmente cuando la pareja social estaba presente (seis veces menos frecuente). Además, a medida que se acercó el presunto período fértil, la presencia del macho social aumentó progresivamente, inhibiendo en cierta medida la posibilidad de CEP de sus parejas sociales.

Debido a que en ambos sexos las CEP son frecuentes, Osorio-Beristain & Drummond (2001) realizaron un experimento para demostrar que el cuidado parental disminuye a medida que aumenta la incertidumbre sobre la paternidad. Estos autores capturaron y retuvieron 17 machos, durante un período de 10 a 12 horas en un solo día del período fértil en la colonia reproductiva de Isla Isabel (México), simulando un viaje de forrajeo prolongado el cual provocaría una disminución en las oportunidades para vigilar a la pareja y tener certeza de paternidad. El cortejo y tasas de CEP de las hembras no se incrementaron durante la ausencia de la pareja social. Sin embargo, 43% de los 16 machos expulsaron el primer huevo del nido, aparentemente por dudas en la paternidad, en el caso de los machos control ninguno expulsó el primer huevo puesto por su pareja social. En la misma colonia, Pérez-Staples & Drummond (2005) encontraron que los individuos responden a la actividad EP de su pareja involucrándose con mayor frecuencia en actividades intrapareja (IP), pero sin un incremento en la presencia en el nido. La presencia, cortejo y cópula IP suprimen la actividad EP, machos y hembras aumentaron la frecuencia del cortejo EP cuando la pareja estaba ausente, los individuos promiscuos evaden la vigilancia modificando sus horarios de atención al nido y llevando a cabo CEP lejos del territorio. Osorio-Beristain *et al.* (2006) reportaron algunos casos de quasiparasitismo (parasitismo intraespecífico de la nidada) en *S. nebouxii* en Isla Isabel, México; un 5% de las hembras extrapareja colocaron huevos en los nidos de aquellos machos con los que habían copulado recientemente (1-25 días). El macho hospedero toleró parcialmente, mientras que las hembras hospederas reaccionaron de forma más enérgica para ahuyentar a la hembra parásito. Se sugiere que este desinterés en

proteger el nido por parte de los machos no se relaciona al quasiparasitismo, sino a la tolerancia a las posibles compañeras EP del macho.

En el bobo de patas azules, tanto machos como hembras tienen pies coloridos que se exhiben prominentemente durante el cortejo intrapareja (Nelson 1978). En un estudio experimental, Velando & Torres (2005) atenuaron el color de las patas de las hembras (maquillaje no tóxico, a prueba de agua) para evaluar la influencia de dicho rasgo en el comportamiento sexual (atracción de la pareja social y los compañeros extrapareja). Encontraron que las hembras control fueron 5.4 veces más propensas que las hembras experimentales (patas menos coloridas) a recibir cortejo extrapareja. Esta respuesta negativa a parejas con patas menos coloridas sugiere que el color de las patas influye en el atractivo de las hembras y las oportunidades de interacciones extrapareja. Estos resultados apoyan la idea de que la intensidad en el color de las patas en *S. nebouxii* está sujeta a selección sexual a través de la preferencia de los machos.

Los rasgos morfológicos dinámicos son particularmente importantes en especies con un largo periodo de inversión parental, donde la evaluación continua de su pareja les permite a los individuos ajustar su inversión (Burley 1986, Saino *et al.* 2002). En el bobo de patas azules, el color de los patas es un rasgo dependiente de la condición altamente dinámico (Torres & Velando 2010). En un experimento de alimentación el color de las patas de cinco machos mantenidos por 48 horas sin comida cambió de azul aqua (típico de aves durante cortejo) a azul oscuro/opaco (aves en condición baja), luego cambiaron casi al color original cuando

fueron alimentadas hasta que recuperaron su masa original (Torres & Velando 2003); el color de las patas estuvo significativamente relacionado con el suministro de comida y el contenido de carotenoides. Las hembras de *S. nebouxii* apareadas con machos en condición baja disminuyeron su actividad de cortejo, sugiriendo que el color de las patas en los machos es una motivación para que las hembras se involucren en el cortejo.

Kiere & Drummond (2014) realizaron un análisis detallado del cortejo y cópula EP en *S. nebouxii* considerando a los tres individuos involucrados (hembra social, macho social, macho EP), para probar las predicciones clásicas de la teoría de buenos genes, la cual predice que las hembras apareadas con machos de baja calidad serán menos fieles, y por lo tanto buscarán cópulas EP con machos de mayor calidad (Griffith *et al.* 2002). Encontraron evidencia limitada para apoyar la teoría de buenos genes: la probabilidad de que una hembra copulara con un compañero EP incrementó a medida que este fue superior (con respecto al promedio de intensidad de color de las patas) a la pareja social de la hembra (lo esperado de acuerdo a la teoría de buenos genes), pero esta selectividad solo se observó cuando la pareja social también era atractiva. Estos resultados proporcionan el primer apoyo empírico para una menor selectividad por parte de la hembra social a la hora de buscar machos EP, sólo si su pareja social era poco atractiva pero solo fue significativo para el color de las patas, no se encontró evidencia que apoyara esta relación teniendo en cuenta otros parámetros como el éxito reproductivo, la edad relativa del macho o tamaño corporal. Es decir que

cuando las hembras son atractivas, son el sexo limitante y selectivo en las interacciones EP pero cuando las hembras son poco atractivas los machos EP asumen este rol.

2.2. Dispersión natal y reproductiva del bobo de patas azules

La dispersión y la filopatría influyen en los patrones de distribución espacial y temporal de los individuos dentro de las poblaciones (Greenwood & Harvey 1982) con consecuencias importantes para la dinámica y la genética de éstas (Jones *et al.* 1988, Lambin 1994), lo que se refleja a su vez en la evolución del comportamiento social. La limitada dispersión, típica de algunas aves marinas puede propiciar la cercanía espacial entre parientes. Este tipo de interacciones pueden tener consecuencias negativas (expresión de alelos recesivos deletéreos a través de la endogamia) o positivas (comportamiento cooperativo) para la adecuación individual (Waser 1983).

Datos demográficos de *S. nebouxii* en la colonia de Isla Isabel (Pacífico Mexicano) evidencian limitada dispersión natal (distancia entre el sitio donde eclosionaron y el primer sitio de anidación); las hembras anidaron en promedio 6.1 m más lejos de sus sitios natales que los machos (hembras 36.6 ± 1.4 m, machos 30.5 ± 1.7 m) (Osorio-Beristain & Drummond 1993). Adicionalmente los padres de los individuos evaluados también muestran una dispersión natal limitada. Existe evidencia de que la mayoría de sitios de anidación están agrupados en vecindarios, se sugiere que este nivel de filopatría está relacionado con la calidad y/o la familiaridad del sitio como beneficio a los individuos inexpertos. Kim *et al.* (2007a) examinaron el

movimiento de individuos entre sitios sucesivos de anidación (dispersión reproductiva) en el bobo de patas azules durante 13 temporadas (1993-2005). Encontraron que los individuos que conservaron sus parejas de años anteriores se dispersaron menos que aquellos que cambiaron de pareja; el fracaso en una temporada reproductiva asociado al cambio de pareja impulsa una mayor dispersión, indicando que los individuos tienen en cuenta su experiencia en las temporadas reproductivas previas para la ubicación del nido. Adicionalmente, la densidad poblacional afectó la dispersión; en años de alta densidad los machos y hembras se dispersaron más y los que anidaron tarde en la temporada tuvieron que dispersarse más para encontrar un lugar apropiado que aquellos que empezaron anidar temprano. La edad también está asociada a la dispersión reproductiva en esta especie, tanto machos como hembras se dispersaron menos en sus primeros 10-11 años de vida, pero incrementaron su dispersión conforme aumentó su edad, debido a que la senescencia podría estar limitando su habilidad para competir por parejas y territorios (Velandó *et al.* 2006). En esta misma colonia se caracterizó la filopatría a largo plazo del bobo de patas azules y sus consecuencias reproductivas usando registros longitudinales (8 años) en la ubicación de los nidos y el desempeño reproductivo de cientos de individuos (Kim *et al.* 2007b). La distancia entre el sitio actual de anidación y el primer sitio de anidación fue mayor que la distancia entre el sitio actual y el de la temporada previa en todas las clases de edad (3-8 años). Estas cortas dispersiones reproductivas sucesivas tendieron a mantener a los machos y a las hembras entre 19-28.9 y 22.5-30.5 m respectivamente de sus primeros sitios de anidación y con respecto a sus sitios natales, la distancia fue de 34.9-39.4 m para machos y 36.4-

42.2 m para hembras. Los individuos jóvenes buscan sitios adecuados para su primera reproducción y anidan cerca de este sitio de ahí en adelante.

Los patrones de dispersión y distribución espacial dentro de colonias puede revelar si los animales buscan o evaden a los parientes, dando una idea sobre los costos y beneficios asociados: competencia y/o cooperación por los hábitats, parejas y comida (West *et al.* 2002). En un estudio en el que se evaluó si la cooperación o competencia entre parientes está ocurriendo en una colonia de *S. nebouxii*, se analizaron los patrones espaciales de anidación entre hermanos (del mismo y de diferente sexo), y padres e hijos en la colonia de Isla Isabel, Pacífico Mexicano así como las consecuencias reproductivas (Drummond *et al.* 2010). El éxito reproductivo de machos y hembras no estuvo afectado por el hecho de que ambos, uno o ningún padre estuviera anidando en la colonia o que tan lejos estuvieran anidando padres e hijos. Tampoco se vio afectado por el hecho de que los hermanos reclutaron en el mismo año, el sexo solo fue importante en una combinación: los machos se dispersaron 13.1 m menos cuando el hermano anidando era una hembra que cuando era macho, se sugiere que la hermana puede ayudar a su hermano a establecer el territorio cercano a su sitio natal apoyándolo activamente o tolerándolo. Los patrones observados de éxito reproductivo no proporcionan evidencia de que exista cooperación entre parientes. Aunque la dispersión natal sesgada para las hembras puede funcionar para evadir parcialmente la endogamia, no existe evidencia de un ajuste facultativo a la dispersión natal para evadir el riesgo de aparearse con hermanos o padres.

Existe evidencia de que las diferentes islas (El Rancho, Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir) en las que se desarrolló este estudio fueron colonizadas en diferentes momentos (Goss 1888, Osorio-Tafall 1944, Castillo-Guerrero *et al.* 2013), por lo tanto el establecimiento de los vecindarios de parientes teniendo en cuenta la edad de la isla tendrá como consecuencia un mayor parentesco entre los individuos.

2.3 Dispersión entre colonias

Contrario a lo planteado por la hipótesis de que las aves marinas tropicales muestran grandes niveles de estructura poblacional genética (Friesen *et al.* 2007), en *S. nebouxii* existe evidencia de un alto flujo génico entre las colonias y poca diferenciación entre éstas a la largo de una amplia distancia geográfica (Taylor *et al.* 2011). Los marcadores neutrales (loci microsatélites) usados indican que la estructura genética poblacional de los bobos de patas azules es un orden de magnitud menor que en el bobo café *S. leucogaster* y el bobo de patas rojas *S. sula*, incluso a mayor escala geográfica, los bobos de patas azules muestran menor estructura genética poblacional que *S. leucogaster* (Morris-Pocock *et al.* 2010). Se sugiere que la menor diferenciación poblacional existente en los bobos de patas azules comparados con otros súlidos tropicales es debido a su relación con un ambiente de forrajeo impredecible, se alimentan de peces epipelágicos de aguas frías (p.e. anchovetas y sardinas) asociadas a corrientes de surgencia, los cuales no toleran las condiciones causadas por ciertos eventos oceanográficos y meteorológicos (ej. evento Niño) por lo tanto no están disponibles para las aves marinas que se alimentan de ellas durante estos períodos (Anderson 1989,

Ancona *et al.* 2012). La dependencia de estos ambientes de forrajeo durante la reproducción puede influenciar la dispersión entre colonias (Taylor *et al.* 2011).

Adicionalmente la recuperación de aves marcadas anidando en colonias diferentes a su sitio natal proporciona evidencia de intercambio entre colonias, Castillo-Guerrero & Mellink (2007) reportaron la presencia de 13 individuos originarios de la Isla Isabel (Nayarit) anidando en la colonia de Isla El Rancho (Sinaloa), ubicada aproximadamente 476 km al noroeste. El reclutamiento de estos individuos sucedió entre cuatro y siete años de edad, ligeramente superior a la edad reportada para los individuos que no abandonaron la Isla Isabel. Esta dispersión natal tan extensa era desconocida para esta especie.

2.4. Similitud genética entre miembros de la pareja en aves

En aves marinas, la alta filopatría y la anidación colonial puede incrementar el contacto con parientes en los sitios de reproducción y por lo tanto puede promover la endogamia (Rabouam *et al.* 2000, Cohen & Dearborn 2004). Debido a los altos costos de la endogamia, la evolución ha favorecido el desarrollo de mecanismos para evadir el apareamiento con parientes. Estos mecanismos pueden actuar activamente a través del reconocimiento de parientes (reconocimiento y evasión de parientes a la hora de seleccionar pareja o a través de las CEP) o pasivamente a través de la dispersión natal (Pusey & Wolf 1996, Szulkin & Sheldon 2008).

Hasta el momento, pocos estudios han investigado si la CEP puede representar una estrategia adaptativa para evitar las consecuencias negativas de aparearse con un individuo cercanamente emparentado (depresión por endogamia). Blomqvist *et al.* (2002) reportaron una relación positiva entre la ocurrencia de fertilizaciones EP y la similitud genética de los miembros de parejas sociales de tres especies de aves playeras (*Calidris mauri*, *Actitis hypoleuca* y *Charadrius alexandrinus*). En una ave marina colonial, la gaviota tridáctila (*Rissa tridactyla*) existe evidencia de que los individuos no escogen a su pareja social aleatoriamente con respecto al parentesco genético. Los individuos de las parejas reproductoras resultaron menos similares entre sí de lo que se esperaría por aleatoriedad (Mulard *et al.* 2009). Por otra parte, las parejas con mayor parentesco tuvieron menor éxito de eclosión que las parejas que eran genéticamente disímiles; el número promedio de pollos que eclosionaron fue menor en las parejas con mayor similitud genética (mayor probabilidad de producir pollos homocigotos *Phm*). Este patrón es consistente con las observaciones de costos potenciales de producir progenie homocigota, tales como la disminución en el éxito de eclosión y la supervivencia.

El albatros de las Galápagos *Phoebastria irrorata*, es un ave marina colonial que presenta niveles altos de PEP en la que se puso a prueba la hipótesis de similitud genética (Huyvaert & Parker 2010). Estos autores encontraron un pequeño efecto de la similitud genética entre los padres, entre menor parentesco mayor fue el éxito de eclosión. Sin embargo, la evasión de la endogamia no fue explicación suficiente para la alta frecuencia de PEP encontrada en esta especie (17% de las

154 familias evaluadas). En otra especie de albatros *Diomedea exulans*, se evaluó a partir de datos genéticos y demográficos, si la ocurrencia de paternidad extrapareja confería beneficios a las hembras, como evitar la endogamia o aumentar la adecuación de los pollos (Jouventin *et al.* 2007). El parentesco genético entre parejas sociales fue similar al de parejas escogidas al azar en la población, así como los niveles de heterocigosidad y tasas de supervivencia fueron similares entre pollos intrapareja y extrapareja. Estos resultados combinados con la ausencia de búsqueda de CEP por parte de las hembras, sugieren que no existe un beneficio aparente para estas ni para su descendencia. La elevada frecuencia de PEP (10.7%) puede ser explicada por el sesgo en la proporción sexual debido a la mayor mortalidad de las hembras, los machos que pierden a sus parejas (viudos o divorciados) buscan CEP forzadas como estrategia para incrementar su éxito reproductivo a largo plazo. En paseriformes se ha realizado una mayor cantidad de estudios en los que se evalúa la hipótesis de similitud genética. En algunos de estos estudios se ha encontrado una asociación positiva entre la similitud genética de la pareja social y la ocurrencia de paternidad extrapareja (Masters *et al.* 2003, Foerster *et al.* 2003, Tarvin *et al.* 2005, Suter *et al.* 2007, Szulkin *et al.* 2009, Varian-Ramos & Webster 2012), mientras que en otros casos la similitud genética no se relaciona con la presencia de PEP (Charmantier *et al.* 2004, Schmoll *et al.* 2005).

2.5. Análisis de paternidad en aves marinas

A la fecha, menos del 10% de las especies de aves marinas (450 especies) han sido estudiadas para determinar las tasas de PEP (Quillfeldt *et al.* 2011),

evidenciando que en general este grupo de aves presenta PEP en baja frecuencia ($\leq 10\%$) (Petrie & Kempenaers 1998). Sin embargo, se pueden resaltar algunos casos extremos como el del cormorán *Phalacrocorax carbo* con PEP de hasta el 16.1% (Piertney *et al.* 2003), la gaviota cabecinegra *Larus ridibundus* con 20% de PEP (Ležalová-Pialková 2011), el petrel azul de pico delgado *Pachyptila belcheri* con 20.1% (Quillfeldt *et al.* 2011) y el albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) con valores de PEP que oscilaron entre 16.9% y 25% (Huyvaert *et al.* 2000, 2006).

La familia Sulidae perteneciente al orden Suliformes (Chesser *et al.* 2010), exhibe características típicas de las aves marinas incluidas tasas bajas de CEP (Bennett & Owens 2002, Griffith *et al.* 2002, Westneat & Stewart 2003). En el bobo de patas azules solo se ha realizado una evaluación genética de paternidad usando loci microsatélites en la colonia de Isla Isabel, México (Ramos *et al.* 2014), estos autores analizaron si la estructura de hábitat estaba relacionado con la probabilidad de PEP, encontraron que 48 de 453 (10.6%) familias genotipadas tuvieron uno o más pollos EP (41 tuvieron 1 pollo EP y 7 dos pollos EP). La PEP fue más común en nidos ubicados en áreas donde los obstáculos para la locomoción estuvieron más dispersos, la PEP incrementó en dirección norte, justo en donde la densidad de obstáculos alrededor de los nidos (dentro de los 5m del nido de la hembra) declinaba. Los obstáculos en la cercanía del nido de un bobo probablemente hacen más difícil que los machos EP potenciales se acerquen y puedan darse las interacciones EP, ya que al tratar de evitar los obstáculos

pueden salir heridos y también por las agresiones de otros machos que están cuidando sus territorios. En otras especies del género se ha evaluado la paternidad genética usando análisis de huella genética, Baumgarten *et al.* (2001) realizaron observaciones de campo y aplicaron análisis de bandas compartidas para investigar el sistema reproductivo del bobo café (*Sula leucogaster*) y el bobo enmascarado (*Sula dactylatra*) en colonias de anidación en la costa de Brasil. No encontraron evidencia molecular de fertilización EP o parasitismo de nidada en seis familias del bobo enmascarado. Sin embargo, no pudieron evaluar la ocurrencia de este comportamiento en el bobo café ya que el patrón de bandas presentó un valor muy bajo de diversidad genética. Por su parte, Anderson & Boag (2006) analizaron la ocurrencia de PEP en el bobo de Nazca (*S. granti*) en la Isla Española (Galápagos) usando análisis de bandas compartidas en un locus múltiple (multilocus). Sus resultados no evidencian PEP en 26 nidadas de la especie, los únicos tres casos de patrones de bandas anómalos fueron atribuidos a la degradación del ADN e incertidumbre sobre el verdadero macho de la pareja en el momento de capturarlo para tomar las muestras de sangre. Baião & Parker (2009) evaluaron la paternidad en 14 familias del bobo de patas rojas (*S. sula*) que anidaban en la Isla Genovesa (Galápagos) usando análisis de bandas compartidas de minisatélites. No encontraron ninguna evidencia de paternidad EP en esta población, ya que todas las bandas de la descendencia pudieron ser asignadas a sus padres putativos con bastante certeza. Estos resultados sugieren que las diferencias en sitios de anidación (única especie de bobo que anida en árboles) y tamaño de la nidada (1 solo huevo) con respecto a sus congéneres no influye en las tasas de PEP.

3. JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA

Las explicaciones para la presencia de CEP en aves han sido propuestas en términos de la relación costo/ beneficio para ambos sexos. En las últimas décadas ha sido muy debatido en aves monógamas si la evasión de la homocigosis es un beneficio que buscan obtener las hembras a través de CEP para aumentar la variabilidad de su progenie en rasgos relacionados con la adecuación (Kempnaers *et al.* 1996, Castele *et al.* 2003). En aves marinas ha sido muy poco estudiada esta relación, de forma específica en el género *Sula* se han realizado evaluaciones de paternidad genética usando análisis de bandas compartidas, sin considerar el parentesco entre los miembros de la pareja social. En el bobo de patas azules *S. nebouxii* se han reportado valores de CEP cercanos al 50% en la colonia de Isla Isabel (Osorio-Beristain & Drummond 1998), y valores de PEP del 11% (Ramos *et al.* 2014) en esta misma colonia. El presente estudio busca aportar información sobre el sistema de apareamiento de esta especie en tres colonias del Pacífico Mexicano usando loci microsatélites, los cuales tienen mejor resolución que el análisis de huella digital con minisatélites, para evaluar si la conformación de parejas genéticamente similares está influenciada por la edad aproximada de la colonia (relacionada con el nivel de consolidación de vecindarios de parientes), así como si el parentesco genético entre la pareja social afecta la presencia de PEP.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar si la edad aproximada de la colonia (relacionado con el nivel de consolidación de vecindarios de parientes) en tres colonias de *S. nebouxii* determina la formación de parejas genéticamente similares y una mayor incidencia de productos extrapareja en esta especie.

4.2. Objetivos específicos

Comparar la diversidad genética de individuos de *S. nebouxii* en tres colonias (Isla El Rancho, Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir) y evaluar si los valores encontrados son consistentes con la edad aproximada de la colonia (relacionado con el nivel de consolidación de vecindarios de parientes)

Determinar si el parentesco genético entre la pareja social y adultos en general de *S. nebouxii* anidando en tres colonias (Isla El Rancho, Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir) se relaciona con la edad aproximada de la colonia (relacionado con el nivel de consolidación de vecindarios de parientes).

Determinar la paternidad genética de la progenie de las familias de *S. nebouxii* pertenecientes a las colonias de El Rancho, Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir para evaluar la frecuencia de paternidad extrapareja.

5. HIPÓTESIS

La filopatría y la anidación colonial incrementan las probabilidades de apareamiento con parientes cercanos (endogamia). Con base en lo anterior, se espera que en las colonias establecidas hace más tiempo (relacionado con el nivel de consolidación de vecindarios de parientes) la diversidad genética sea menor, mientras que el parentesco promedio y la probabilidad de encontrar un polluelo extrapareja sean mayores.

Por tanto, se espera que los adultos reproductores de la colonia en isla El Rancho, establecida recientemente tengan un menor grado de parentesco y una mayor diversidad genética (colonia fundada por pocos migrantes no emparentados y de origen desconocido) debido a su establecimiento reciente. De acuerdo a esto todos los pollos serán hijos de la pareja social a diferencia de aquellos reproduciéndose en las colonias de Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir en las cuales ha transcurrido suficiente tiempo para que se establezcan vecindarios familiares, es decir sucesivas generaciones anidando en cercanía (ciclo de vida 15-20 años, reclutamiento 3-6 años, Osorio-Beristain & Drummond 1993) y exista mayor probabilidad de apareamiento entre individuos emparentados.

6. ÁREA DE ESTUDIO.

Este estudio se realizó en tres colonias del bobo de patas azules en el Golfo de California: El Rancho, Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir (Fig. 1). La Isla

El Rancho (25°10'N, 108°23'W) se localiza en la parte norte de la Bahía de Santa María-La Reforma (González-Medina *et al.* 2009), con una superficie de 380 ha en 2011 (Castillo-Guerrero *et al.* 2014 Manuscrito aceptado) y una altitud que oscila entre uno y seis metros. Esta isla tiene una franja periférica de marisma (*Salicornia* sp., cobertura <20%, altura máx. 30 cm) y mangle dulce (*Rhizophora mangle*, cobertura <3%, altura máx. 80 cm), posterior a la zona de marisma, incluye dunas de arena cubiertas de deditos (*Sesuvium verrucosum*) y zacate salado (*Distichlis spicata*). La parte central de la isla El Rancho forma un cinturón de dunas con un máximo de seis metros de altura. Esta colonia fue establecida recientemente (principios del 2000, Castillo-Guerrero *et al.* 2013) y se caracteriza por una tasa crecimiento poblacional acelerado, con 600 parejas en 2003 y más de 3000 parejas en 2012 (Castillo-Guerrero *et al.* 2013), se reportó una densidad de 0.26 nidos/m² para la temporada de 2011-2012.

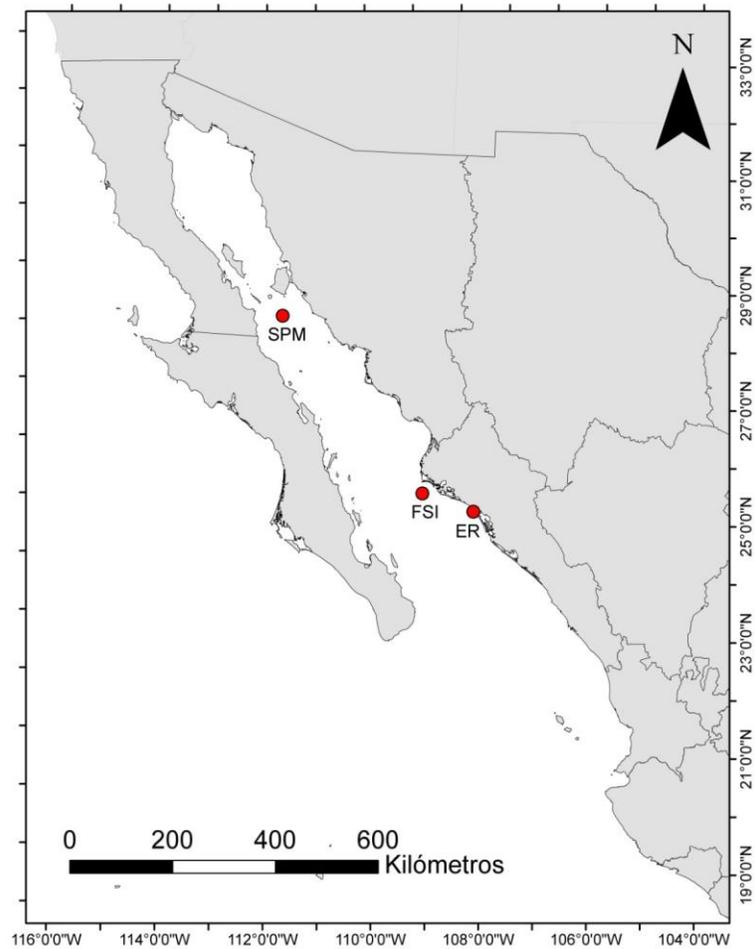


Figura 1. Ubicación geográfica de las tres colonias del bobo de patas azules (*Sula nebouxi*) muestreadas en el presente estudio (Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM).

El Farallón de San Ignacio (25° 26' N, 109° 22' W) es un pequeño islote desprovisto de vegetación, localizado en la parte suroriental del Golfo de California, a 36 km de la costa de Topolobampo, en el norte de Sinaloa (Fig. 1). Esta isla tiene una altitud de 103 msnm, con un área aproximada de 16 ha (Samaniego-Herrera *et al.* 2009). En la cima hay una planicie de unas 3.5 ha

rodeada por acantilados en la cual se encuentran anidando la mayoría de parejas de bobos de patas azules. La densidad máxima reportada para esta colonia es de 0.60 nidos/m² (Guevara-Medina *et al.* 2008). Desde hace aproximadamente 70 años se han registrado súlidos en la isla y se han estimado 5000 parejas reproductoras, la mayoría de ellos *S. nebouxii* (Osorio-Tafall 1944).

La isla San Pedro Mártir (28°23' N, 112°20' W) es una roca desértica de 1.9 km² en la que se han registrado 110'000 individuos de bobo de patas azules anidando. Después de las colonias de la costa de Perú, esta es la colonia más grande de la especie (Tershy & Bresse 1997b), en donde anidan entre enero y julio cubriendo la parte superior de la isla con una densidad aproximada de 0.02-0.06 nidos/m² (Tershy *et al.* 1992, 1997b). Es la isla más aislada del Golfo de California, se ubica a 50 km del continente y la península de Baja California, y a 43 km de distancia de la isla más cercana (Fig. 1). La isla está rodeada por acantilados escarpados, no posee playas arenosas y pocos lugares de anclaje. Entre 1885 y 1888, San Pedro Mártir estuvo habitado por 135 mineros de guano y sus familias, lo que ocasionó que la mayoría de aves marinas anidando abandonaran la isla temporalmente. Sin embargo, el impacto a mayor escala fue la introducción de roedores como la rata negra (*Rattus rattus*), lo cual puede haber influenciado la composición específica y el éxito reproductivo de las aves marinas (Tershy *et al.* 1992, Tershy *et al.* 1997a). Los primeros reportes de *S. nebouxii* anidando en esta colonia son de finales del siglo XIX, con aproximadamente mil parejas reproductoras (Goss 1888).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Trabajo de campo

Cada uno de los miembros de 70 familias (ambos adultos de la pareja social y los pollos de su correspondiente nido) fueron muestreados para el análisis genético. El sexo de los adultos fue determinado a partir de sus vocalizaciones, la forma de la pupila y tamaño corporal (Nelson 1978). Tanto a los adultos como a los pollos (4-5 semanas de edad), se les extrajeron 50 μ L de sangre de la vena braquial, la cual fue almacenada en un tubo con 450 μ L de buffer de lisis (EDTA tetrasódica 100mM, Tris 100 mM, NaCl 10 mM y SDS 1%, **Anexo 1**). La isla El Rancho (ER) se visitó durante la temporada reproductiva del bobo de patas azules de diciembre de 2011 a mayo de 2012, en donde se recolectaron 94 muestras (24 familias completas). Para el Farallón de San Ignacio (FSI), la visita se realizó en Febrero de 2013 y se obtuvieron 96 muestras (26 familias completas), mientras que la colonia de San Pedro Mártir (SPM) se visitó en enero y abril de 2013, logrando recolectar 53 muestras (17 familias completas).

7.2. Fase de laboratorio

7.2.1. Extracción del ADN y evaluación de su calidad

El ADN genómico se obtuvo a partir de 150 μ L de la mezcla de sangre-anticoagulante siguiendo las instrucciones del protocolo de extracción de ADN a partir de sales-proteinasas K (Aljanbi & Martínez 1997), detallado en el **Anexo 2**. La calidad y cantidad de ADN fueron evaluadas por electroforesis en geles de agarosa al 1.7%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL). Se utilizó un

marcador de peso molecular (100 pb DNA size standard Invitrogen™) para determinar la concentración relativa del material genético extraído y se diluyeron las muestras para obtener una concentración de entre 15 y 25 ng/μL.

7.2.2. Control de calidad y condiciones óptimas para la amplificación de los microsatélites

Se escogieron nueve loci microsatélites reportados previamente para *Sula nebouxii*, cinco de ellos (BOOB-RM3-D07, BOOB-RM4-E10, BOOB-RM4-F11, BOOB-RM4-G03, BOOB-RM2-F07) desarrollados a partir de individuos de la especie en Isla Isabel, México (Faircloth *et al.* 2009), los cuatro restantes (SV2A-047, SV2A-053, SV2B-138, SV2A-026) fueron desarrollados a partir de *Sula variegata* de Lobos de Tierra, Perú (Taylor *et al.* 2010). Este grupo de microsatélites fueron probados en dos muestras (macho y hembra) del bobo de patas azules con el objeto de optimizar las condiciones de amplificación y evaluar los niveles de polimorfismo (número de alelos y poder informativo). Todas las amplificaciones fueron realizadas a partir de 15-25 ng/μL de ADN en un volumen total de 15 μL de una mezcla de reacción con una concentración 10 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTP's y 0.5 U de Taq DNA Polimerasa recombinante (Invitrogen™). Para la amplificación de todos los loci se utilizó el mismo perfil de temperatura optimizado (**Anexo 3**). Los cebadores utilizados para el PCR fueron modificados para seguir el protocolo de etiquetado universal fluorescente (Shimizu *et al.* 2002). El cebador “forward” de cada locus fue etiquetado en el extremo 5' con una secuencia universal (M13), lo que permitió al cebador “reverse” generar en el amplicon la cadena complementaria a la de un

segundo cebador “forward” marcado como un fluorocromo específico (6-FAM[®], VIC[®], PET[®] o NED[®], Applied Biosystems). De esta forma los amplicones pueden ser marcados con el fluorocromo adecuado para que las amplificaciones puedan ser detectadas en un secuenciador automático.

Con el fin de asegurar que las condiciones de PCR fueran homogéneas, se realizó una mezcla de cada reacción de cada microsatélite para todas las muestras y se emplearon placas de PCR de 96 pozos. Con respecto al número total de muestras genotipadas (N=243), se incluyeron 11 controles negativos por locus y 17 muestras duplicadas por locus que permitieran detectar la presencia de contaminación cruzada y evaluar la reproducibilidad en la amplificación y el genotipado, respectivamente. El éxito de la amplificación de las placas se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, usando la mitad del volumen de reacción (7 µL). De acuerdo con la intensidad de los productos de PCR marcados con fluorocromos, se realizaron diluciones buscando homogenizar la intensidad de la señal fluorescente durante el subsecuente análisis automatizado de fragmentos. Como paso final, los productos de amplificación marcados con los diversos fluorocromos fueron mezclados y enviados a un laboratorio comercial, donde se realizó el análisis de los fragmentos, separando los productos de PCR con base en su peso molecular mediante una electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism[®] 3100 (Applied Biosystems). El tamaño de los alelos se estimó usando como referencia un marcador de peso molecular que se agregó a cada muestra durante la electroforesis capilar (GeneScan[™] 600[®] LIZ, Applied Biosystems).

Se utilizaron dos mezclas de productos de PCR para el análisis de genotipado en el secuenciador automático para los individuos de la Isla El Rancho (Tabla 1), estas combinaciones se realizaron de acuerdo al tamaño, en la primera de ellas (Sune I) se incluyeron cuatro loci y en la segunda mezcla (Sune II) se incluyeron cinco loci. Para los individuos de San Pedro Mártir y Farallón de San Ignacio se realizaron tres mezclas (Sune I, Sune II y Sune III) cada una de estas incluyó tres loci (Tabla 1), en todos los casos se corroboró que la intensidad de la señal fuera la adecuada y que no hubiera traslape en el tamaño de los mismos.

Tabla 1. Mezcla de productos de PCR utilizadas en cada colonia detallando el fluorocromo, tamaño alélico y nombre de la mezcla para cada uno de los nueve loci microsatélites de *S. neboxii*.

Colonia		Loci (Fluorocromo)	Tamaño alélico	Mezcla
Isla El Rancho		BOOB-RM3-D07 (FAM)	325-399	Sune I
		BOOB-RM4-E10 (VIC)	251-267	
		SV2A-026 (VIC)	346-358	
		BOOB-RM4-G03 (PET)	167-197	Sune II
		BOOB-RM4-F11 (VIC)	287-307	
		SV2B-138 (VIC)	330-360	
		SV2A-047 (PET)	291-299	
		SV2A-053 (FAM)	304-330	
	BOOB-RM2-F07 (NED)	389-397		
Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir		BOOB-RM4-F11 (VIC)	287-307	Sune I
		SV2B-138 (VIC)	330-360	
		SV2A-053 (FAM)	304-330	
		BOOB-RM4-E10 (VIC)	251-267	Sune II
		BOOB-RM4-G03 (PET)	167-197	
		SV2A-047 (PET)	291-299	
		BOOB-RM3-D07 (FAM)	325-399	Sune III
		BOOB-RM2-F07 (NED)	389-397	
	SV2A-026 (VIC)	346-358		

7.3. Fase de gabinete

7.3.1. Genotipado

Los tamaños de los alelos fueron determinados con la ayuda del programa GeneMarker Versión 2.2 (SoftGenetics LLC), en el cual se pueden visualizar y analizar los archivos digitales de los electroferogramas. La lectura del tamaño de los alelos fue realizada de forma independiente por dos personas, comparando posteriormente los registros para evaluar la consistencia en la asignación de los alelos. En aquellos casos donde las muestras mostraron picos con baja intensidad en los electroferogramas o no hubo unanimidad en las lecturas, se realizó una reamplificación para obtener de nuevo el genotipo.

7.3.2. Control de calidad del genotipado

Los errores en el genotipado pueden deberse a baja concentración en el templado de ADN (Wandeler *et al.* 2003), misma que resulta en la detección de un solo alelo en el caso de los heterocigotos (Miller & Waits 2003). Estos errores también pueden ocurrir debido a la amplificación preferencial de alelos pequeños y por lo tanto el alelo más grande no se amplifica con la misma intensidad. Adicionalmente, ciertos errores durante la amplificación por PCR pueden generar nuevos alelos debido a descenso en la concentración de la polimerasa o contaminación, estos tartamudeos de la polimerasa son comunes en los loci dinucleótidos dificultando la diferenciación entre homocigotos y heterocigotos (Shinde *et al.* 2003). Finalmente cuando existen mutaciones en ciertas posiciones del cebador, puede que algunos alelos no se amplifiquen (alelos nulos) los cuales pueden interpretarse como falsos homocigotos (Shaw *et al.* 1999). El programa

Microchecker v.2.2.3 ayuda a identificar errores en el genotipado debido a alelos nulos, dominancia de alelos pequeños (pérdida de alelos grandes) y pérdida de repeticiones completas debido a tartamudeos de la polimerasa, producido por la formación de un bucle con errores de apareamiento entre el ADN de interés y el cebador. A partir de genotipos multilocus este programa puede discriminar si existe efecto Wahlund (deficiencia de heterocigotos) y desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg debido a la presencia de alelos nulos, proporcionando también indicios de errores tipográficos (Oosterhout *et al.* 2004).

Los programas MSTools v.3.1.1 (Park 2001) y Genalex 6.5 (Peakall & Smouse 2012) se utilizaron para identificar la presencia de individuos con genotipos incompletos o alelos raros, detectar muestras duplicadas o genéticamente idénticas, así como para calcular frecuencias alélicas y estadísticos de diversidad genética (Park 2001). El programa Gimlet v.1.3.3 (Valière 2002) se utilizó para estimar diversos parámetros de las muestras genotipadas (frecuencias alélicas, heterocigosidad, probabilidad de identidad y tamaño poblacional). La probabilidad de identidad (PI) es el estadístico más usado para cuantificar el poder que un marcador microsatélite tiene para discriminar entre dos individuos, por lo tanto se calculó este valor para cada locus y el valor de PI multilocus correspondiente al producto acumulativo de los PI individuales ordenados jerárquicamente. Se efectuaron los protocolos de control de calidad para los nueve loci microsatélites empleados con el objeto de obtener el conjunto de marcadores con la mayor resolución, que garantizaran un buen desempeño de los estimadores y que

minimizaran la probabilidad de introducir errores y sesgo en los análisis posteriores.

7.3.3. Diversidad genética

La diversidad genética en datos diploides (p.e. marcadores microsatélites) se expresa como la heterocigosidad. Se calculó la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) bajo las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus, así como otros parámetros genéticos de las colonias muestreadas como frecuencias alélicas, número único de alelos por colonia y número promedio de alelos por colonia utilizando los programas Genalex v6.5 (Peakall & Smouse 2006) y MsToolsv.3.1.1 (Park 2001).

7.3.4. Parentesco entre parejas sociales y entre el total de adultos de ER, FSI y SPM.

Se utilizó la herramienta Trio-ML del programa COANCESTRY (Wang 2010), para estimar coeficientes de parentesco de acuerdo al principio de máxima verosimilitud el cual tiene en cuenta cuantos alelos comparten dos individuos pero pondera la influencia de estos alelos de acuerdo a su frecuencia de la población. Con estos datos se calcularon el promedio, la desviación estándar y la moda de los coeficientes de parentesco entre las parejas sociales y los adultos en general para cada una de las colonias estudiadas con el objeto de evaluar si el nivel de parentesco entre los miembros de la pareja social, es mayor o menor al esperado por el azar (parentesco promedio de todos los adultos).

7.3.5. Asignación de paternidad

Se usó el programa GIMLET v1.3.3 (Valière 2002) para realizar el análisis de paternidad en las familias de *S. nebouxii* de las tres colonias. Este programa permite calcular el parentesco basado en la herencia mendeliana de alelos de padres a hijos. Para cada descendiente potencial, el programa evalúa la herencia de los alelos de otros dos individuos en el archivo (padre y madre social), se considera como padre genético al macho de la pareja social si comparte al menos un alelo de cada locus con el pollo. Se pueden configurar el número máximo de incompatibilidades es decir el número que corresponde a la cantidad de locus que no concuerdan entre padre e hijo. Para este caso se fijó este valor en 0, lo que significa que entre el padre biológico y sus productos no debe existir inconsistencia para ningún locus.

Se calculó el éxito de asignación de paternidad para cada colonia como el número de pollos a las cuales se les pudo asignar ambos padres con respecto al número total de pollos. Aquellos pollos que no pudieron ser asignados a una pareja de reproductores debido a incongruencias en uno o más loci, se evaluaron con más detalle mediante un análisis de exclusión parental de uno o ambos padres. De esta forma se determinó si se podría tratar de un evento de paternidad extrapareja o si la falla en la asignación parental fue resultado de errores de muestreo (p.e. etiquetado de muestra, asignación equivocada de alguno de los individuos a alguna familia). De acuerdo a los principios de herencia mendeliana se esperaba encontrar valores del coeficiente de parentesco iguales o mayores a 0.5 en caso de que el padre social fuera el padre genético del pollo.

8. RESULTADOS

8.1. Genotipado de los individuos

Con el conjunto de 9 microsatélites optimizados (Tabla 2) para individuos del bobo de patas azules de la Isla El Rancho (ER), Farallón de San Ignacio (FSI) y San Pedro Mártir (SPM) se obtuvieron los genotipos multilocus completos de 243 individuos.

Tabla 2. Descripción del panel de loci microsatélites que fueron optimizados y empleados en el análisis genético del bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) en el presente estudio (Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM, NA: Número de alelos) (Faircloth *et al.* 2009 y Taylor *et al.* 2010).

Secuencia	GenBank	ER	FSI	SPM	NA
BOOB-RM3-D07	FJ587394	18	19	16	15
BOOB-RM4-E10	FJ587461	7	6	4	5
BOOB-RM4-F11	FJ587469	5	6	5	5
BOOB-RM4-G03	FJ587472	5	4	6	5
SV2A-047	GU167929	3	3	5	5
SV2A-053	GU167930	9	9	8	9
SV2B-138	GU167931	9	10	10	10
SV2A-026	GU167932	3	4	2	6
BOOB-RM2-F07	FJ587350	5	3	3	3

8.2. Tasa de error

Los controles negativos no mostraron productos de amplificación (11/11) y los tamaños de los alelos fueron asignados congruentemente para las réplicas (17/17) dentro y entre las lecturas independientes de los observadores. Adicionalmente, no se detectó exceso de homocigotos (frecuencia de clase de homocigotos observados y esperados por locus, $p > 0.05$), lo que indica que no existe evidencia de la presencia de alelos nulos, exclusión alélica o tartamudeo de la polimerasa. Por lo tanto la tasa de error estimada fue de cero, lo que consecuentemente indica una confiabilidad del 100% en el genotipado y garantiza una estimación insesgada de los coeficientes de parentesco, una correcta asignación de la paternidad genética en el bobo de patas azules.

8.3. Índices de diversidad molecular

El número medio de alelos (6.6 ± 4.3) y número de alelos únicos fueron más bajos en la colonia de San Pedro Mártir. En tanto las colonias de Farallón San Ignacio (7.1 ± 5.1) e Isla El Rancho (7.1 ± 4.6) presentaron valores promedio de alelos similares y una cantidad ligeramente superior de alelos únicos. La frecuencia del alelo más común varió desde 0.79 a 0.89 (Tabla 3). Los nueve loci microsatélites fueron polimórficos y mostraron una heterocigosidad promedio global de 0.65 ± 0.20 , con el valor menor observado en la colonia El Rancho (0.66 ± 0.18) y el valor mayor en San Pedro Mártir (0.79 ± 0.04 ; Tabla 3). El marcador con mayor heterocigosidad observada fue el BOOB-RM3-D07 (0.90) y el de menor heterocigosidad fue SV2A-026 (0.20; Tabla 3), lo que es congruente con el número de alelos y la distribución de sus frecuencias.

Tabla 3. Índices descriptivos de diversidad genética a nivel global y de población en colonias del bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) en el Golfo de California: Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM. **N**= Número de individuos muestreados por colonia, **a** = Número promedio de alelos por locus, **U** = Número de alelos únicos por colonia, **F**= Frecuencia alelo más frecuente, **H_e** y **H_o**= Heterocigosidad esperada y observada (Nei 1978).

Población	Edad Colonia	N	a	U	F	H _e	H _o
Global	NA	243	8.6±5.6	NA	NA	0.67±0.18	0.65±0.20
ER	< 20 años	94	7.1±4.6	7	0.79	0.68±0.17	0.66±0.18
FSI	>70 años	96	7.1±5.1	5	0.81	0.65±0.18	0.66±0.25
SPM	>120 años	53	6.6±4.3	4	0.89	0.66±0.02	0.79±0.04

8.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg

De los 9 microsatélites optimizados, la mayoría de los loci se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, es decir que no había diferencias significativas entre la heterocigosidad esperada y la observada. De las 27 pruebas realizadas (9 loci en 3 poblaciones), sólo una resultó significativa ($p < 0.05$), correspondiente al loci **Sv2A-053** para la Isla El Rancho (Tabla 4). Aunque este desequilibrio generalmente se evidencia por un exceso de homocigotos, típico de la presencia de alelos nulos, al no encontrar evidencias de la presencia de alelos nulos para este locus, se decidió incluirlo en los análisis subsecuentes.

Tabla 4. Valores de heterocigosidad observada y esperada para los 9 loci microsatélites del bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) optimizados para individuos de tres colonias del Golfo de California: Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM, los valores con asterisco (*) mostraron desviaciones significativas del equilibrio H-W (Prueba Chi-Cuadrado).

LOCUS	ER		FSI		SPM	
	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o
BOOB-RM3-D07	0.90	0.90	0.91	0.85	0.91	0.89
BOOB-RM4-E10	0.75	0.72	0.70	0.65	0.73	0.85
BOOB-RM4-F11	0.61	0.66	0.53	0.57	0.61	0.72
BOOB-RM4-G03	0.71	0.71	0.64	0.59	0.73	0.74
SV2A-047	0.58	0.63	0.53	0.39	0.59	0.47
SV2A-053	0.77*	0.6*	0.83	0.91	0.74	0.75
SV2B-138	0.86	0.88	0.81	0.77	0.85	0.91
SV2A-026	0.34	0.27	0.31	0.20	0.20	0.15
BOOB-RM2-F07	0.59	0.60	0.61	0.53	0.60	0.49
Media ± DE	0.68 ±	0.66 ±	0.65 ±	0.61 ±	0.66 ±	0.66 ±
	0.17	0.18	0.18	0.22	0.20	0.25

8.5. Probabilidad de Identidad

La probabilidad de identidad (PI) representa la probabilidad de encontrar dos individuos con genotipos idénticos, se presentan valores de PI acumulada (sumatoria acumulativa de PI proporcionada por cada locus). Los valores de PI fueron bajos para los individuos de las tres colonias utilizando el conjunto de 9 loci microsatélites, tanto para hermanos completos como para individuos no

emparentados, la posibilidad de encontrar individuos idénticos es poco probable (Tabla 5). Considerando todas las colonias en un análisis global, se obtuvo un valor de PI de 3.1×10^{-4} (1 en 3250) para hermanos completos y de 3.24×10^{-9} (1 en 310 millones) para individuos no emparentados (Tabla 5). En general se evidencia que el nivel de resolución del conjunto de marcadores utilizados es muy alto y que la variabilidad que presenta es suficiente para poder discriminar a nivel individual.

Tabla 5. Valores de probabilidad de identidad multilocus (producto acumulativo de la PI proporcionada por cada locus) para individuos emparentados y no relacionados de acuerdo a la información de 9 loci microsatélites en el bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) de tres colonias del Golfo de California: Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM (**N**= Número total de individuos genotipados por colonia, **PI_{NE}** = PI acumulada para individuos no emparentados, **PI_{HC}** = PI acumulada para hermanos completos).

COLONIA	PI _{NE}	PI _{HC}	N
ER	3.24×10^{-9}	6.48×10^{-4}	94
FSI	7.69×10^{-9}	9.03×10^{-4}	96
SPM	3.07×10^{-9}	7.61×10^{-4}	53
Todas las poblaciones	3.24×10^{-9}	3.1×10^{-4}	243

8.6. Grado de similitud genética entre los miembros de las parejas

El parentesco promedio para las parejas sociales y todos los adultos de las tres colonias mostraron valores muy cercanos al cero. De hecho el cero está incluido en sus intervalos de confianza y fue el valor que más se repitió en estos

parámetros. Es decir que los individuos analizados no comparten prácticamente ningún alelo por ascendencia, tanto a nivel de pareja social como a nivel de la colonia, y la probabilidad de que se formen parejas del mismo grupo familiar es muy baja (Tabla 6).

Tabla 6. Coeficientes de parentesco genético de las parejas sociales y adultos en general de bobo de pata azules (*Sula nebouxii*) en el Golfo de California: Isla El Rancho ER, Farallón de San Ignacio FSI, San Pedro Mártir SPM. Los coeficientes están basados en el estimador Trio-ML (**N**= Número de duplas de individuos a los cuales se les estimó el parentesco).

Colonias	Pareja Social		Todos los adultos	
	Media ± DE	N	Media ± DE	N
ER	0.061±0.113	24	0.056±0.096	1176
FSI	0.064±0.081	26	0.061±0.104	1326
SPM	0.044±0.12	27	0.057±0.082	488

8.7. Paternidad de los polluelos

En la Isla El Rancho se asignó de forma exitosa la paternidad completa en 23 de 24 familias, con un promedio de pollos por nido de 1.7 ± 0.6 . El éxito de asignación de paternidad fue 97.7%, es decir que en 42 de 43 casos el genotipo del pollo, concuerda con el genotipo de sus padres sociales en los 9 loci microsatélites. En promedio el parentesco genético entre padres e hijos fue de 0.52 ± 0.07 , es decir que cada uno de los padres está aportando al menos un alelo por locus y siguen el patrón de herencia mendeliana. Se encontraron incongruencias en uno o más loci con uno o ambos padres sociales en una familia, la cual se evaluó con más detalle

para decidir si era posible excluir a uno o ambos padres putativos. Debido a que la presencia de tres loci con inconsistencias difícilmente pudiera ser explicada por mutaciones simultáneas o la presencia de alelos nulos para estos loci, se excluyó a ambos padres. Estas inconsistencias pudieran ser reflejo de un evento de adopción (1/24, 4.2%), ya que en esta colonia las adopciones son relativamente frecuentes (8.13-11.4 %) durante las temporadas de 2006 y 2007 (Castillo Guerrero *et al.* 2013).

En la colonia de Farallón de San Ignacio, se asignó correctamente la paternidad en 22 de 26 familias analizadas (promedio de pollos por nido 1.6 ± 0.5). El éxito de asignación de paternidad fue del 90.69%, es decir que 39 de 43 pollos fueron correctamente asignados a ambos padres. El parentesco genético promedio entre padres e hijos fue del 0.50 ± 0.07 , corroborando que la asignación de paternidad estuviera de acuerdo a la herencia mendeliana. Para un total de cuatro familias no se pudo asignar la paternidad completa y estos casos fueron revisados para decidir si se excluían del análisis. En dos casos las incongruencias se encontraron en 4 a 6 loci para la madre y el padre social, por lo tanto ambos padres se excluyeron como padres genéticos, estas incongruencias pueden explicarse como posibles adopciones (2/26, 7.7%), estos eventos son relativamente comunes en Farallón de San Ignacio (1.47-11.34%, Castillo-Guerrero *et al.* 2013). En los otros dos casos sólo se excluyó a uno de los padres de la pareja social como progenitores de los pollos en cuestión, en un caso se concluyó que la incongruencia era con el padre (3 loci) y en el otro caso solo con la madre (2 loci),

no se descarta que estas incongruencias puedan estar asociadas a un error de muestreo al momento de capturar a los miembros de la familia.

Para la colonia de San Pedro Mártir se determinó la paternidad completa en 15 de 17 familias (1.1 ± 0.3 pollos por nido). El éxito de asignación de la paternidad fue de 89.47%, teniendo en cuenta que en esta colonia 17 de 19 pollos no mostraron incongruencias con sus padres biológicos en ninguno de los 9 loci analizados. Aquellos casos en que no se pudo determinar la paternidad, se revisaron con más detalle para decidir si era posible excluir a uno o ambos padres putativos. En el primer caso, los dos pollos no correspondían con los padres sociales (2 loci), por lo tanto se excluyeron ambos padres sociales como padres biológicos, los cuales pueden deberse a posible adopción sin embargo se desconoce la tasa aproximada de adopción para San Pedro Mártir. En el segundo caso, la familia solo tenía un pollo el cual mostraba inconsistencias con la madre social (tres loci) y se atribuyó a un error de muestreo (captura de la hembra social equivocada). El valor promedio de parentesco entre padres e hijos fue de 0.50 ± 0.07 , apoyando la correcta asignación de los polluelos a sus padres sociales siguiendo el patrón de herencia mendeliana.

9. DISCUSIÓN

Este estudio presenta las primeras inferencias con respecto al parentesco y la paternidad genética en tres colonias del bobo de patas azules *S. nebouxii* usando la información derivada de loci microsatélites polimórficos. A diferencia de otros

estudios realizados en sùlidos para evaluar el sistema de apareamiento, se usaron marcadores con mayor resoluci3n, sin errores asociados al genotipado que pudieran sesgar las frecuencias alélicas, y por tanto las estimaciones derivadas de estas. Es importante mencionar que la probabilidad de encontrar individuos idénticos en la muestra fue muy baja. Por lo tanto se puede afirmar que las relaciones de parentesco pueden ser estimadas de forma confiable. En general este panel de loci posee las características idóneas para evaluar de forma precisa el sistema de apareamiento de esta especie.

9.1 Diversidad Genética

En este estudio se observaron valores de heterocigosidad promedio superiores al 60% para las colonias de Isla El Rancho, Farall3n de San Ignacio y San Pedro Mártir, con un recorrido de 0.15 a 0.91. Esto significa que existe una alta variabilidad genética medida en términos de heterocigosidad para estos grupos, misma que refleja un riesgo mínimo de depresi3n endogámica y la ausencia de eventos demográficos de reducci3n poblacional tales como cuellos de botella recientes o un evento fundador (Burke & Bruford 1987, Triggs *et al.* 1992). Las especies con una alta diversidad genética tienen un menor riesgo de sufrir depresi3n por endogamia, su adecuaci3n puede aumentar a trav3s de los beneficios de la heterosis y un mayor potencial evolutivo (Sherwin & Moritz 2000).

Estos valores de diversidad concuerdan con los reportados para la colonia del bobo de patas azules en Isla Isabel, México (0.60-0.87, Faircloth *et al.* 2009) y en

varias colonias del Pacífico oriental tropical (0.46-0.84) analizadas para determinar el patrón biogeográfico de la especie (Taylor *et al.* 2011). Adicionalmente los autores no encontraron diferencias genéticas significativas en comparaciones pareadas entre colonias (F_{ST}), dentro de las cuales se incluyeron tres colonias en el Golfo de California: Isla El Rancho, Farallón de San Ignacio e Isla San Ildefonso (Taylor *et al.* 2011). La ausencia de estructura genética (débil) entre colonias del bobo de patas azules puede ser explicada por un potencial alto de dispersión. Sus hábitats de forrajeo (presas principales peces epipelágicos de aguas frías) son dependientes de los sistemas de surgencia, que a su vez se ven afectados por eventos oceanográficos de mesoescala (ENOS), lo que los diferencia de otros súlidos tropicales que no dependen de estos sistemas para su alimentación (Anderson 1989).

En colonias del bobo de Nazca *Sula granti* ubicadas en el Archipiélago de las Galápagos, se han reportado valores de diversidad (0.19-0.81) similares a los encontrados en el presente estudio usando el mismo conjunto de marcadores moleculares (Levin & Parker 2012). Sin embargo, a pesar de que hubo consistencia en los valores de heterocigosidad observada en el presente estudio y evaluaciones previas, se encontraron algunos valores bajos de diversidad genética en ciertos loci. Es posible que lo anterior se deba a que se utilizaron marcadores que fueron diseñados para el bobo de Perú *S. variegata* (Taylor *et al.* 2010). Se ha demostrado que el uso de loci microsatélites heterólogos, puede conducir a

diferencias artificiales debido a bajo polimorfismo en especies no focales (Brandström & Ellegren 2008).

De acuerdo con la hipótesis planteada en el presente trabajo, se esperaba encontrar una mayor diversidad genética en la colonia El Rancho. Esta es la colonia reproductiva más recientemente ocupada por la especie y exhibe una tasa de crecimiento acelerada debido al reclutamiento de individuos e inmigración de colonias cercanas (Castillo-Guerrero y Mellink 2007); pasando de un total de 600 parejas reproductivas en 2003 a más de 3000 parejas en 2012 (Castillo-Guerrero *et al.* 2013). Sin embargo no se encontraron diferencias en la diversidad genética entre los individuos de esta colonia y aquellas colonias con un tiempo estimado de establecimiento mayor: San Pedro Mártir y Farallón de San Ignacio, en los cuales se esperaba que los vecindarios estuvieran más consolidados y se reflejara en sus valores de diversidad genética.

La dispersión de individuos a gran distancia puede interrumpir la acumulación de diferencias genéticas entre poblaciones, incluso si la filopatría es alta como es el caso de esta especie. Se ha reportado que en *S. nebouxii* la fidelidad al sitio natal no es absoluta, siete machos y seis hembras marcados en Isla Isabel durante la fase de volantones anidaron a 476 km de su colonia natal en Isla El Rancho durante 2003-2006, y por lo menos cuatro de ellos lo hicieron de forma repetitiva (Castillo-Guerrero & Mellink 2007). Esta dispersión introduce nuevos alelos en las colonias y promueve un considerable flujo de genes entre estas. Dado que el

movimiento efectivo de tan solo un individuo por generación entre colonias sería suficiente para homogeneizar la variación genética en marcadores neutrales (Wright 1931; Mills & Allendorf 1996), esta dispersión puede ser parcialmente responsable de la débil estructura poblacional que muestran las colonias del bobo de patas azules. A la vez, al haber un potencial de depresión endogámica tan reducido, la ausencia de PEP podría deberse a que no se requiera como estrategia recurrente para evadir las consecuencias negativas del apareamiento entre parientes (Huyvaert & Parker 2010).

9.2 Parentesco Genético

El parentesco genético entre los individuos de parejas sociales y entre todas las posibles parejas de adultos en las tres colonias evaluadas de *S. nebouxii* fueron bajos (cerca de cero). Los valores promedio de parentesco encontrados en estas colonias fueron similares a los valores teóricos de parentesco esperados para primos en segundo grado (R_{xy} : 1/32, Wang 2010). Demostrando que los adultos reproductores en estas tres colonias no son parientes cercanos (padres, hijos y hermanos), por lo que la probabilidad de que una pareja social se encuentre emparentada es muy baja. Los coeficientes de parentesco de las parejas sociales analizadas en el presente trabajo, resultan similares a los encontrados en parejas sociales del albatros errante *D. exulans* (0.04 ± 0.03) (Jouventin *et al.* 2007) y algunas aves playeras (0.06 ± 0.12) (Blomqvist *et al.* 2002), cuyas crías eran producto de cópulas intrapareja. En estas especies, el valor de parentesco genético se incrementó considerablemente (*D. exulans* 0.15 ± 0.07 ,

aves playeras 0.06 hasta 0.59) cuando los pollos provenían de eventos de cópula extrapareja.

Los individuos del bobo de patas azules evaluados en este estudio comparten pocos alelos por ascendencia y sus valores de parentesco promedio están lejos de aquellos que exhiben las especies que usan la PEP como estrategia para evitar endogamia.

A pesar de que la alta filopatría y la anidación colonial pueden promover la endogamia, algunos autores sugieren que la relación entre la distancia de dispersión con respecto a la densidad de anidación hace que el apareamiento entre parientes no sea tan frecuente en aves marinas coloniales (Huyvaert & Anderson 2004, Kim *et al.* 2007a). Para el bobo de nazca *Sula granti*, se ha sugerido que la cercanía entre parientes no es suficiente para propiciar la endogamia. La distancia promedio entre nidos en esta especie es de 2.7 m (Anderson 1993) y que los reclutas que establecen su nido teniendo cuenta la mediana de dispersión natal (machos 26 m y hembras 105 m), estarían entre 10 y 39 sitios de anidación de su nido natal respectivamente. Dado que los adultos establecidos muestran baja dispersión reproductiva, los hijos estarían por lo menos a 10 nidos de distancia de su madre y las hijas al menos 39 nidos de distancia de su padre, mientras que hermanas y hermanos estarían separados al menos por 29 nidos. Por lo tanto los parientes cercanos en esta especie estarían separados por un número considerable de lugares de anidación, haciendo que la endogamia sea poco probable (Huyvaert & Anderson 2004).

Se esperaba encontrar parejas formadas por individuos emparentados en las colonias relativamente más antiguas como San Pedro Mártir y Farallón de San Ignacio (>100 años), con respecto a la colonia El Rancho que es más reciente (<20 años). Considerando que esta especie es longeva (15-20 años) y los individuos se reclutan a la población reproductiva entre los 3-6 años de edad (Osorio-Beristain & Drummond 1993) y con una elevada fidelidad al sitio donde nacieron (Osorio-Beristain & Drummond 1993, Kim *et al.* 2007a), existe la posibilidad de que se formaran parejas con individuos emparentados en las colonias donde los vecindarios de parientes estuvieran más consolidados (relativo a la edad aproximada de la colonia). Sin embargo, los resultados indican que el grado de parentesco genético entre las parejas es bajo, sin diferencias entre colonias a pesar de la alta filopatría. No se encontró relación entre el tiempo de establecimiento de las colonias relacionado a la conformación de parejas sociales genéticamente relacionadas.

A pesar de que el método empleado para evaluar el parentesco en el presente estudio es bastante sensible, y por lo tanto detectaría con certeza apareamiento entre parientes en dado caso de que existiera, es importante mencionar que tradicionalmente se han empleado otras metodologías como el monitoreo de los intentos reproductivos a largo plazo (marcaje-recaptura) (Wooler *et al.* 1992), los cuales proporcionan información valiosa sobre el potencial de endogamia en una población. Considerando aves marinas coloniales (similar al sistema de limitada dispersión natal y reproductiva de *S. nebouxii*) se han encontrado valores bajos

de parentesco. Por ejemplo en la Pardela cenicienta *Calonectris diomedea*, una especie que exhibe alta filopatría natal y reproductiva (Thibault 1993), solo se reportaron dos casos de apareamiento entre parientes cercanos (madre-hijo) de un total de 710 juveniles marcados en un estudio de 14 años (Rabouam *et al.* 1998). En el charran común *Sterna hirundo* un ave marina filopátrica (aprox. 57% individuos reclutan en su colonia natal, Becker *et al.* 2008) se usó información de individuos marcados (n = 3338) para construir un pedigrí que abarcaba 16 años (1992-2007) y sólo se encontró un pollo de padres relacionados (parentesco = 0.125) (Ludwig & Becker 2012). Es decir que la filopatría natal y reproductiva en estas especies de aves marinas coloniales no está promoviendo las relaciones reproductivas entre individuos cercanamente emparentados y que tanto las evaluaciones genéticas como de marcaje y recaptura no evidencian este proceso.

9.3 Paternidad Genética

Se encontró evidencia de un posible caso de paternidad extrapareja en el bobo de patas azules de un total de 96 pollos (~1% PEP) de tres colonias reproductivas del Golfo de California. Estos valores son bajos con respecto a los valores reportados recientemente en dos vecindarios de anidación de *S. nebouxii* en la colonia de Isla Isabel (~11% PEP, Ramos *et al.* 2014). Por el contrario, se asemejan más a lo reportado para especies de aves marinas del mismo género: el bobo café *S. leucogaster*, el bobo de patas rojas *S. sula*, el bobo de Perú *S. variegata* y el bobo de nazca *S. granti* en colonias de las Islas Galápagos (Ecuador) y Brasil en los cuales no se reportan presencia de productos EP (PEP 0%, Baumgarten *et al.* 2001, Anderson & Boag 2006, Baião & Parker 2009). Revisiones sobre la

variación en la frecuencia de PEP en poblaciones naturales de aves sugieren que las conclusiones de estos estudios usualmente difieren entre especies cercanamente emparentadas, entre poblaciones de la misma especie e incluso para misma población a lo largo del tiempo (revisión Petrie & Kempenaers, 1998).

La limitada PEP en las tres colonias evaluadas podría ser explicada por la efectividad de las estrategias de vigilancia de la pareja, en esta especie se ha evidenciado que las cópulas con compañeros EP promueven la competencia espermática (cópulas intrapareja más frecuentes), estrategias de vigilancia de la pareja incrementando las horas de presencia en el nido a medida que se acerca el período fértil (Osorio-Beristain & Drummond 1998, Pérez-Staples y Drummond 2005) y tácticas de certeza de paternidad (Osorio-Beristain y Drummond 2001). De forma particular en la colonia de Isla Isabel (México) se ha reportado que entre 38-100% de las hembras del bobo de patas azules se involucran en cortejo EP y 33-56% copulan con machos EP en algún momento previo al periodo previo a la puesta (Osorio-Beristain & Drummond 1998; Pérez-Staples & Drummond 2005), como consecuencia de este comportamiento se ha encontrado que 11% de los pollos evaluados no fueron engendrados por el macho social (Ramos *et al.* 2014), esta colonia al parecer representa un caso único dentro del género *Sula*, ya que no se ha encontrado PEP en otros estudios. Esta colonia comprende 20'800 m² de una zona densa de bosque de manzana de playa (*Crataeva tapia*) lo que podría representar un hábitat con mayores posibilidades de escapar a la vigilancia de la pareja social, a diferencia del tipo de hábitat encontrado en las colonias evaluadas en este estudio, zonas rocosas o arenosas donde la vegetación es reducida o

prácticamente inexistente en algunos casos (Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir), aumentando la visibilidad de la pareja social. Adicionalmente debe tenerse en cuenta que en Isla Isabel todos los nidos han sido marcados y mapeados cada año, y todos los volantones y reproductores han sido marcados con anillos de metal desde 1989, es considerablemente alto el esfuerzo de muestreo prolongado a diferencia de las otras colonias donde muy pocos individuos se han marcado, los esfuerzos se han dado de forma puntual y no han estado reforzados por programas de monitoreo a largo plazo.

De acuerdo a lo planteado en las hipótesis de este trabajo, se esperaba encontrar diferencias en la diversidad genética y grado de parentesco de las parejas sociales entre las colonias. Sin embargo se encontraron valores homogéneos de alta diversidad genética, parentesco entre individuos reducido y paternidad extrapareja limitada, cumpliendo las predicciones planteadas por la hipótesis de similitud genética (Baja Similitud Pareja Social, PEP poco probable Blomqvist *et al.* 2002). El tiempo de establecimiento relacionado con la consolidación de vecindarios de parientes de las colonias reproductivas evaluadas no estuvo relacionado con la probabilidad de encontrar pollos extrapareja en el bobo de patas azules.

10. CONCLUSIONES

1. La diversidad genética medida a partir de marcadores neutrales del bobo de patas azules en las tres colonias evaluadas (Isla El Rancho, Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir) fue muy similar, con valores superiores al 60%. No se

encontraron indicios de que el tiempo transcurrido para la consolidación de vecindarios influya en la heterocigosidad.

2. El nivel de parentesco genético en las parejas sociales y adultos en edad reproductiva (no pareja) de *S. nebouxii* en Isla El Rancho, Farallón de San Ignacio y San Pedro Mártir es bajo e indica que estas colonias tienen poco riesgo de sufrir depresión por endogamia a pesar de que la alta filopatría promueve la consolidación de vecindarios.

3. En la muestra analizada de pollos de bobo de patas azules se encontró un posible caso de fertilización extrapareja, a pesar de que las CEP ocurren con una frecuencia relativamente alta. Es posible que las estrategias de vigilancia de la pareja y competencia espermática por parte del macho social sean altamente efectivas.

4. Los valores de diversidad altos y parentesco genético reducido fueron congruentes con la ausencia de paternidad extrapareja en el bobo de patas azules *S. nebouxii*, de acuerdo a lo esperado bajo el supuesto de la hipótesis de similitud genética (Blomqvist *et al.* 2002).

11. LITERATURA CITADA

- Aljanbi S & Martinez I** (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692–4693.
- Ancona S, Calixto-Albarrán I & Drummond H** (2012) Effect of El Niño on the diet of a specialist seabird, *Sula nebouxii*, in the warm eastern tropical Pacific. *Marine Ecology Progress Series* 462: 261–271.
- Anderson DJ** (1989) Differential responses of boobies and other seabirds in the Galápagos to the 1986–87 El Niño-Southern Oscillation event. *Marine Ecology Progress Series* 52: 209–216.
- Anderson DJ** (1993) Masked booby (*Sula dactylatra*). En: Poole A & Gill F. (eds) *Birds of North America*, No.73. The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, and American Ornithologists' Union, Washington DC. Pp. 1-16.
- Anderson DJ & Boag P** (2006) No extra-pair fertilization observed in Nazca booby (*Sula granti*) Broods. *Wilson Journal of Ornithology* 118:244–247.
- Avise JC** (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York. 511 pp.
- Baião P & Parker PG** (2009) No evidence of extra-pair fertilization in Red-footed boobies (*Sula sula*). *Waterbirds* 32:179-182.
- Baumgarten M, Kohlrausch A, Miyaki C, Ochotorena de Freitas T & Mellender de Araujo A** (2001) DNA fingerprinting and parentage in Masked (*Sula dactylatra*) and Brown (*S. leucogaster*) boobies. *Ornitologia Neotropical* 12:319–326.
- Becker PH, Ezard THG, Ludwigs JD, Sauer-Gurth H & Wink M** (2008) Population sex ratio shift from fledging to recruitment: consequences for demography in a philopatric seabird. *Oikos* 117: 60- 68.
- Beecher M & Beecher I** (1979) Sociobiology of Bank swallows: reproductive strategy of the male. *Science* 205:1282-1285.
- Bennett P & Owens I** (2002) *Evolutionary Ecology of Birds: Life History, Mating Systems and Extinction*, Oxford University Press, Oxford. 220 pp.
- Birkhead TR & Møller AP** (1992) *Sperm competition in birds: Evolutionary causes and consequences*, Academic Press, London. 282 pp.
- Blomqvist D, Andersson M, Küpper C, Cuthill I, Kis J, Lanctot R, Sandercock B, Székel T, Wallander J & Kempnaers B** (2002) Genetic similarity between mates and extra-pair parentage in three species of shorebirds. *Nature* 419:613-615.
- Brandström M & Ellegren H** (2008) Genome-wide analysis of microsatellite polymorphism in chicken circumventing the ascertainment bias. *Genome Research* 18:881–887.
- Burke T & Bruford MW** (1987) DNA fingerprinting in birds. *Nature* 327:149–152.
- Burley N** (1986) Sexual selection for aesthetic traits in species with biparental care. *American Naturalist* 127:415–445.
- Castele T Van de, Galbusera P & Matthysen F** (2001) A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology* 10:1539–1549.

- Castele T Van de, Galbusera P, Schenck T & Matthysen E** (2003) Seasonal and lifetime reproductive consequences of inbreeding in the Great tit *Parus major*. *Behavioral Ecology* 14:165–174.
- Castillo-Guerrero JA, Mellink E & Aguilar A** (2005) Bigamy in the Blue-footed booby and the Brown Booby. *Waterbirds* 28:399-401.
- Castillo-Guerrero JA & Mellink E** (2007) Long-Distance natal dispersal in Blue-footed boobies. *Waterbirds* 30:268-270.
- Castillo-Guerrero JA, González-Medina E & Mellink E** (2013) Adoption and infanticide in an altricial colonial seabird, the Blue-footed booby: the roles of nest density, breeding success, and sex-biased behavior. *Journal of Ornithology* 155:135-144.
- Castillo-Guerrero JA, González-Medina E & Fernández G.** Manuscrito aceptado. Seabird Colonies of the small Islands of Bahía Santa María-La Reforma, Sinaloa, Mexico. *Waterbirds*.
- Charlesworth D & Charlesworth B** (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:237–268.
- Charlesworth B & Charlesworth D** (1999) The genetic basis of inbreeding depression. *Genetical Research* 74: 329–340.
- Charmantier A, Blondel J, Perret P & Lambrechts MM** (2004) Do extra-pair paternities provide genetic benefits for female Blue tits *Parus caeruleus* ? *Journal of Avian Biology* 35: 524-532.
- Chesser R, Banks R, Barker F, Cicero C, Dunn J, Kratter A, Lovette I, Rasmussen P, Remsen J, Rising J, Stotz D & Winker K** (2010) Fifty-first supplement to the American Ornithologists' Union Check-List of North American Birds. *Auk* 127:726-744.
- Clutton-Brock T & Sheldon BC** (2010) Individuals and populations: the role of long-term, individual-based studies of animals in ecology and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 562–573.
- Cohen LB & Dearborn DC** (2004) Great Frigatebirds, *Fregata minor*, choose mates that are genetically similar. *Animal Behavior* 68: 1229–1236.
- Davies NB** (1991) Mating systems. En: Krebs JR & Davies NB (eds.). *Behavioral ecology, an evolutionary approach*. Blackwell, UK. Pp. 263-294.
- Drummond H, Gonzalez E & Osorno JL** (1986) Parent-offspring cooperation in the Blue-footed booby (*Sula nebouxii*). *Behavioral Ecology & Sociobiology* 19: 365-372.
- Drummond H, Torres R, Rodríguez-Juarez C & Kim SY** (2010) Is kin cooperation going on undetected in marine bird colonies?. *Behavior Ecology and Sociobiology* 64:647–655.
- Faircloth B, Ramos A, Drummond H & Gowaty PA** (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci from Blue-footed boobies (*Sula nebouxii*). *Conservation Genetics* 1:159–162.
- Foerster K, Delhey K, Johnsen A, Lifjeld JT & Kempenaers B** (2003) Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. *Nature* 425:714–717.
- Frankham R** (1997) Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* 78: 311–327.

- Friesen VL, Burg TM & McCoy KD** (2007) Mechanisms of population differentiation in seabirds. *Molecular Ecology* 16:1765–1785.
- Girman D, Mills M, Geffen E & Wayne R** (1997) A molecular genetic analysis of social structure, dispersal, and interpack relationships of the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 40:187–198.
- González-Medina E, Castillo-Guerrero JA & Mellink E** (2009) Relación entre las características de los huevos y del sitio de anidación, con el éxito reproductivo de la Gaviota reidora (*Leucophaeus atricilla*) en la isla El Rancho, Sinaloa durante la temporada 2007. *Ornitología Neotropical* 20:553–564.
- Goss NS** (1888) New and rare birds found breeding on the San Pedro Mártir Isle. *Auk* 5:240-244.
- Greenwood PJ & Harvey PH** (1982) The natal and breeding dispersal of birds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13:1–21.
- Griffith S, Owens P & Thuman K** (2002) Extrapair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* 11:2195-2212.
- Guerra M & Drummond H** (1995) Reversed sexual size dimorphism and parental care : minimal division of labour in the Blue-footed booby. *Behavior* 132 (7-8):479-496.
- Guevara-Medina M, Castillo-Guerrero JA y González-Bernal MA** (2008) Presencia y abundancia de aves de la isla Farallón de San Ignacio, Sinaloa. *Huitzil* 9(2):20-28.
- Hughes C** (1998) Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: A revolution results. *Ecology* 79:383-389.
- Huyvaert KP & Anderson DJ** (2004) Limited dispersal by Nazca boobies *Sula granti*. *Journal of Avian Biology* 35:46–53.
- Huyvaert KP, Anderson DJ, Jones T, Duan W & Parker PG** (2000) Extra-pair paternity in Waved albatrosses. *Molecular Ecology* 9:1415–1419.
- Huyvaert KP, Anderson DJ & Parker PG** (2006) Mate opportunity hypothesis and extrapair paternity in Waved albatrosses (*Phoebastria irrorata*). *Auk* 123:524-536.
- Huyvaert KP & Parker PG** (2010) Extra-pair paternity in Waved albatrosses: genetic relationships among females, social mates and genetic sires. *Behaviour* 147:1591-1613.
- Jeffreys AJ, Wilson V & Thein SL** (1985) Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature* 316:76-79.
- Jones WT, Waser PM, Elliott LF, Link NE & Bush BB** (1988) Philopatry, dispersal, and habitat saturation in the Banner-tailed kangaroo rat, *Dipodomys spectabilis*. *Ecology* 69:1466–1473.
- Jouventin P, Charmantier A, Dubois MP, Jarne P & Bried J** (2007) Extra-pair paternity in the strongly monogamous Wandering albatross *Diomedea exulans* has no apparent benefits for females. *Ibis* 149:67-78.
- Keller L & Waller D** (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* 17:230–241.

- Kempnaers B, Adriaensen F, van Noordwijk A & Dhondt A** (1996) Genetic similarity, inbreeding and hatching failure in Blue tits: are unhatched eggs infertile? .Proceedings of the Royal Society of London B 263:179–185.
- Kiere LM & Drummond H** (2014) Extrapair behaviour reveals flexible female choosiness and mixed support for classic good genes in Blue-footed boobies. *Animal Behaviour* 95: 145-153.
- Kim SY, Torres R, Rodríguez C & Drummond H** (2007a) Effects of breeding success, mate fidelity and senescence on breeding dispersal of male and female Blue-footed boobies. *Journal of Animal Ecology* 76:471–479.
- Kim SY, Torres R, Dominguez CA & Drummond H** (2007b) Lifetime philopatry in the Blue-footed booby: a longitudinal study. *Behavioral Ecology* 18: 1132–1138.
- Kruuk LEB, Sheldon BC & Merila J** (2002) Severe inbreeding depression in Collared flycatchers (*Ficedula albicollis*). *Proceedings of the Royal Society of London B*. 269: 1581–1589.
- Lack D** (1968) *Ecological Adaptations for Breeding in Birds*. Methuen and Company, London. 409 pp.
- Lambin X** (1994) Natal philopatry, competition for resources, and inbreeding avoidance in Townsend's voles (*Microtus townsendii*). *Ecology* 75:224–235.
- Levin II & Parker PG** (2012) Philopatry drives genetic differentiation in an island archipelago: comparative population genetics of Galapagos Nazca boobies (*Sula granti*) and Great frigatebirds (*Fregata minor*). *Ecology and Evolution* 2: 2775–2787
- Ležalová-Pialková R** (2011) Molecular evidence for extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in the Black-headed gull. *Journal of Ornithology* 152:291–295.
- Lynch M** (1988) Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology & Evolution*. 5:584–599.
- Ludwig S & Becker PH** (2012) Immigration prevents inbreeding in a growing colony of a long-lived and philopatric seabird. *Ibis* 154: 74–84.
- Masters B, Hicks B, Johnson L & Erb L** (2003) Genotype and extra-pair paternity in the House wren: a rare-male effect?. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270:1393–1397.
- Mills LS & Allendorf FW** (1996) The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology* 10: 1509–1518.
- Miller CR & Waits LP** (2003) The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 100:4334–4339.
- Milligan BG** (2003) Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 1:1153-1167.
- Morris-Pocock JA, Steeves TE, Estela FA, Anderson DJ & Friesen VL** (2010) Comparative phylogeography of Brown (*Sula leucogaster*) and Red-footed boobies (*S. sula*): the influence of physical barriers and habitat preference on gene flow in pelagic seabirds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 883–896.

- Møller AP** (1992) Frequency of female copulations with multiple males and sexual selection. *American Naturalist* 139: 1089–1101
- Mulard H, Danchin E, Talbot S, Ramey A, Hatch SA, White JF, Helfenstein F & Wagner R** (2009). Evidence that pairing with genetically similar mates is maladaptive in a monogamous bird. *Evolutionary Biology* 9:147.
- Nei M** (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590.
- Nelson J** (1978) *The Sulidae: Gannets and boobies*. London. Oxford University Press.
- Oosterhout C, Hutchinson W, Wills D & Shipley P** (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538.
- Osorio-Beristain M & Drummond H** (1993) Natal dispersal and deferred breeding in the Blue-footed booby. *Auk* 110:234-239.
- Osorio-Beristain M & Drummond H** (1998) Non-aggressive mate guarding by the Blue-footed booby: a balance of female and male control. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43:307–315.
- Osorio-Beristain M & Drummond H** (2001) Male boobies expel eggs when paternity is in doubt. *Behavioral Ecology* 12:16–21.
- Osorio-Beristain M, Pérez-Staples D & Drummond H** (2006) Does Booby egg dumping amount to quasi-parasitism? *Ethology* 112:625–630.
- Osorio-Tafall BF** (1944) La expedición del M. N. "Gracioso" por aguas del extremo Noroeste Mexicano. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 3: 331-360.
- Park SD** (2001) Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Tesis de Doctorado. University of Dublin.
- Peakall R & Smouse PE** (2012) GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Pérez-Staples D & Drummond H** (2005) Tactics, effectiveness and avoidance of mate guarding in the Blue-footed Booby (*Sula nebouxii*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59:115–123.
- Petrie M & Kempnaers B** (1998) Extra-pair paternity in birds explaining variation between species and populations. *Trends in Ecology and Evolution* 13:52-58.
- Peters J, Queller D, Imperatriz-Fonseca V, Roubik D & Strassmann J** (1999) Mate number, kin selection and social conflicts in Stingless bees and honeybees. *Proceedings of the Royal Society of London B* 266:379–384.
- Piertney SB, Carss DN & Goostrey A** (2003) Population variation in the frequency of extra-pair paternity in the Great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Vogelwelt* 124 (Suppl):149–155.
- Pusey A & Wolf M** (1996) Inbreeding avoidance in animals. *Trends in Ecology and Evolution* 11:201–206.
- Queller D, Strassman J & Hughes C** (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution* 8:285–288.

- Quillfeldt P, Masello J & Segelbacher G** (2011) Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology* 152:367-373.
- Rabouam C, Thibault JC & Bretagnolle V** (1998) Natal philopatry and close inbreeding in Cory's Shearwater (*Calonectris diomedea*). *Auk* 115:483–485.
- Rabouam C, Bretagnolle V, Bigot Y & Periquet G** (2000) Genetic relationships of Cory's Shearwater: parentage, mating assortment, and geographic differentiation revealed by DNA fingerprinting. *Auk* 117: 651–662.
- Ramos AG, Nunziata SO, Lance SL, Rodríguez C, Faircloth BC, Gowaty PA** (2014) Habitat structure and colony structure constrain extrapair paternity in a colonial bird. *Behaviour* 95:121-127.
- Saino N, Ferrari RP, Martinelli R, Romano M, Rubolini D, Møller AP** (2002) Early maternal effects mediated by immunity depend on sexual ornamentation of the male partner. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269:1005–1009.
- Samaniego-Herrera A, Aguirre-Muñoz A, Howald G, Félix-Lizárraga M, Valdez-Villavicencio J, González-Gómez R, Méndez-Sánchez F, Torres-García F, Rodríguez-Malagón M & Tershy BR** (2009) Eradication of Black Rats from Farallón de San Ignacio and San Pedro Mártir islands, Gulf of California, Mexico. En: Damiani CC & Garcelon DK (eds.). *Proceedings of the 7th California Islands Symposium* (February 5 – 8, 2008) Institute for Wildlife Studies, Oxnard, California. Pp. 337–347.
- Schmoll T, Quellmalz A, Dietrich V, Winkelş W, Epplen J & Lubjuhn T** (2005) Genetic similarity between pair mates is not related to extrapair paternity in the socially monogamous Coal tit. *Animal Behaviour* 69:1013-1022.
- Shaw PW, Pierce GJ & Boyle PR** (1999) Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the Veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 8:407–417.
- Sherwin WB & Moritz C** (2000) Managing and monitoring genetic erosion. En: Young AG & Clarke GM (eds.). *Genetics, demography and viability of fragmented populations*, Cambridge University Press, .Cambridge, UK. Pp. 9–34.
- Shimizu M, Osaka N, Shimada T, Nagahata T, Iwasaki H, Nagai H, Shiba T & Emi M** (2002) Universal fluorescent Labeling (UFL): Method for Automated Microsatellite Analysis. *DNA Research* 9:173-178.
- Shinde D, Lai YL, Sun FZ & Arnheim N** (2003) Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. *Nucleic Acid Research* 31:974–980.
- Suter SM, Keiser M, Feignoux R & Dietrich R Meyer** (2007) Reed bunting females increase fitness through extra-pair mating with genetically dissimilar males. *Proceedings of the Royal Society of London B* 274:2865-2871.
- Szulkin M & Sheldon BC** (2008) Dispersal as a means of inbreeding avoidance in a wild bird population. *Proceedings of the Royal Society of London B* 275: 703–711.

- Szulkin M, Zelazowski P, Nicholson G, Sheldon BC** (2009) Inbreeding avoidance under different null models of random mating in the Great tit. *Journal of Animal Ecology* 78:778–788.
- Tarvin K, Webster MS, Tuttle EM & Pruett-Jones S** (2005) Genetic similarity of social mates predicts the level of extrapair paternity in Splendid fairy-wrens. *Animal Behaviour* 70:945–955.
- Taylor SA, Morris-Pocock J, Sun Z & Friesen VL** (2010) Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151:525–528.
- Taylor SA, Maclagan L, Anderson DJ & Friesen VL** (2011) Could specialization to cold-water upwelling systems influence gene flow and population differentiation in marine organisms? A case study using the Blue-footed booby, *Sula nebouxii*. *Journal of Biogeography* 38:883–893.
- Tautz D** (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17:6463–6471.
- Tershy BR, Breese D, Angeles A, Cervantes AM, Mandujano HM, Hernández E & Córdoba A** (1992). Natural History and Management of Isla San Pedro Mártir. Reporte sin publicar. Conservation International-México, 59-A. México. 83 pp.
- Tershy BR, Breese D & Croll DA** (1997a) Human perturbations and conservation strategies for San Pedro Mártir Island, Gulf of California, México. *Environmental Conservation* 24:261–270.
- Tershy BR & Breese D** (1997b) The birds of San Pedro Mártir Island, Gulf of California. *Western Birds* 28: 96-107.
- Thibault JC** (1993) Natal philopatry in the Cory's Shearwater (*Calonectris diomedea diomedea*) on Lavezzi Islands, Corsica. *Colonial Waterbirds* 16:77-82.
- Torres R & Velando A** (2003) A dynamic trait affects continuous pair assessment in the Blue-footed booby, *Sula nebouxii*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:62-72.
- Torres R & Velando A** (2010) Color in a Long-Lived Tropical Seabird: Sexual Selection in a Life-History Context. En: Macedo R (ed.). *Advances in The Study of Behavior*. Academic Press, Burlington. Pp. 155-188
- Triggs SJ, Williams MJ, Marshall SJ & Chambers GK** (1992) Genetic structure of Blue Duck (*Hymenolaimus malacorhynchos*) populations revealed by DNA fingerprinting. *Auk* 109: 80–89.
- Valiére N** (2002) GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2:377–379.
- Varian-Ramos CW & Webster MS** (2012) Extrapair copulations reduce inbreeding for female Red-backed fairy-wrens *Malurus melanocephalus*. *Animal Behaviour* 83:857-864.
- Vassart G, Georges M, Monsieur R, Brocas H, Lequarre AS & Christophe D** (1987) A sequence in M-13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* 235:683-684.
- Velando A & Torres R** (2005) Male preference for female foot colour in the socially monogamous Blue-footed booby *Sula nebouxii*. *Animal Behaviour* 69: 59–65.

- Velando A, Drummond H & Torres R** (2006) Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London B* 273:1443–1448.
- Wandeler P, Smith S, Morin PA, Pettifor RA & Funk SM** (2003) Patterns of nuclear DNA degeneration over time — a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology* 12:1087–1093.
- Wang J** (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160:1203–1215.
- Wang J** (2007) Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetical Research* 89:135–153.
- Wang J** (2010) COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analyzing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11:141-145.
- Waser NM** (1983) Sex, mating systems, inbreeding, and outbreeding. En: *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding*. Thornhill NW (ed.) University of Chicago, Chicago Press, Chicago. Pp. 173–199.
- West SA, Pen I, Griffin AS** (2002) Cooperation and competition between relatives. *Science* 296:72–75.
- Westneat DF, Sherman PW & Morton ML (1990)** *The ecology and evolution of extrapair copulations in birds*, Current Ornithology, New York, USA. 362 pp.
- Westneat DF & Stewart IR** (2003) Extrapair paternity in birds: Causes, correlates and conflicts. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:365-396.
- Wooller RD, Bradley JS & Croxall JP** (1992) Long-term population studies of seabirds. *Trends in Ecology and Evolution* 7:111-114.
- Wright S** (1931) Evolution in Mendelian population. *Genetics* 16: 97–159.
- Wright S** (1977) *Evolution and the Genetics of Populations. Experimental Results and Evolutionary Deductions*. University of Chicago Press, Chicago, USA. pp.97-159.

ANEXOS

ANEXO 1. Buffer de Lisis para muestras de sangre.

1. 76.04 g de EDTA-Na₄ (conc. final 100mM)
2. 24.22 g de Tris (conc. final 100mM)
3. 1.17 g de NaCl (conc. final 10mM)
4. 20 g SDS (conc. final 1% pes/vol)
5. aforar a 2 litros con agua destilada y ajustar el pH a 8.0 con HCl

ANEXO 2. Protocolo de extracción de ADN con sales-Proteinasa K.

1. A cada individuo se le extrajo 50 μ l de sangre de la vena braquial la cual se vertió en un tubo de 500 μ l de anticoagulante
2. Aproximadamente 250 μ l de la mezcla sangre-anticoagulante se le agregaron 400 μ l de solución de sales, 40 μ L de SDS 20%, 8 μ l de Proteinasa K con una concentración de 20mg/L.
3. Asegurarse que los tubos estén perfectamente tapados e incubarlos a una temperatura entre 55°C y 65°C hasta que el tejido se digiera (2 horas).
4. Añadir 300 μ l de NaCl 6M, agitar el vortex durante 30 segundos e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 10'000xg por 30 minutos.
6. En un tubo limpio se recuperaron 600 μ l del sobrenadante de la mezcla, evitando acarrear el debris del fondo.
7. Agregar 650 μ l de isopropanol al 99%, tapar el tubo, agitar vigorosamente durante algunos segundos e incubar a -70°C por 10 minutos.
8. Se centrifugó a 12'000xg por 15 minutos, decantando posteriormente el alcohol.
9. Agregar 500 μ l de etanol al 70% y centrifugar 12,000xg por 5 minutos.
10. Decantar de nuevo el alcohol y dejar secando los tubos abiertos e invertidos sobre el papel secante durante 5 minutos.
11. Secar en la centrifuga al vacío a 55-60°C por 15 minutos.
12. Resuspender el ADN en 30 μ l de solución amortiguadora de almacenamiento.
13. Las muestras de DNA se preservaron a -20°C para su posterior procesamiento.

ANEXO 3. Programa de Termociclado Sune003 para la amplificación de 9 loci microsatélites de *S. neboxii* en el presente estudio.

Temperatura(°C)	Segundos	Repeticiones
94	240	1
94	15	25
55	25	25
70	25	25
95	15	8
52	25	8
70	25	8
70	720	1
15	Inf.	