



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**  
**Biología Evolutiva**

**Efecto de las combinaciones de edad parental en las crías de *Sula nebouxii*:  
un enfoque genético**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**Verónica Lizbeth González Valdez**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau**  
**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Hugh Drummond Durey**  
**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Antonio González Rodríguez**  
**IIES, UNAM**

**Ciudad de México, Abril, 2018**



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**  
**Biología Evolutiva**

**Efecto de las combinaciones de edad parental en las crías de *Sula nebouxii*:  
un enfoque genético**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**Verónica Lizbeth González Valdez**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
**COMITÉ TUTOR: Dr. Hugh Drummond Durey**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
**COMITÉ TUTOR: Dr. Antonio González Rodríguez**  
IIES, UNAM

**Ciudad de México, Abril, 2018**



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**, de la alumna **GONZÁLEZ VALDEZ VERÓNICA LIZBETH** con número de cuenta **516011938** con la tesis titulada: **"EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE EDAD PARENTALES EN LAS CRÍAS DE *Sula nebouxii*: UN ENFOQUE GENÉTICO"**, bajo la dirección del **DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU**:

Presidente:	DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Vocal:	DRA. LYNNA MARIE KIERE
Secretario:	DR. HUGH DRUMMOND DUREY
Suplente:	DRA. KATHERINE RENTON
Suplente:	DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a, 21 de marzo de 2018

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## *Agradecimientos Institucionales*

Gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada durante el periodo del 01 de agosto de 2015 al 31 de julio de 2017 (No. de becario 583231) y a CONACYT (#255826) por su apoyo en ciencia básica a la investigación.

Agradezco profundamente al Dr. Daniel I. Piñero Dalmau por el gran apoyo y su enorme paciencia brindada durante la maestría.

A mi comité tutor integrado por:

Dr. Hugh Drummond Durey

Dr. Antonio González Rodríguez

## *Agradecimientos personales*

Quiero agradecer a mis padres Ezequiel y Leticia, por el inmenso amor y apoyo que me han brindado siempre; por los consejos y su infinita motivación al emprender esta nueva aventura.

A mis hermanos- Eduardo, Ezequiel y Daniel, por estar conmigo siempre, por las risas y las peleas; por ser un ejemplo a seguir y hacer más amena la travesía. A mi abue por preocuparse siempre por mí y preguntarme ¿y cuándo acabas?

A Yessica Sánchez (La ñoña) por haber compartido tantos momentos felices juntas, por la paz en los momentos de colapso académico y personal, y por haberse convertido no solo en mi amiga sino en una hermana. A Elo Torres, por cuidarme y obligarme a tener hábitos y por ser una maravillosa amiga ¡Son las mejores!

A mis amigos: Alex Flores, Chris, Azalea, Gus, Raquel, Tania, Nancy, Alfredo, Madisson, Dante, Aldo, Alex Martínez, Óscar, Ale Ramos y Lynna, por su maravillosa amistad, la convivencia, los regaños, fiestas, bromas, ideas raras y terapias grupales.

A mis compañeros de molecular y conducta, por las enseñanzas y apoyo. Al mal del puerco y a la Dra. Alicia Mastretta por las sugerencias y su buena actitud siempre

A mi tutor el Dr. Daniel Piñero Dalmau, por abrirme las puertas de su laboratorio, por la infinita paciencia, por soportarme en todos los momentos de estrés, por apoyarme en cada momento, pero, sobre todo, por guiarme en todo este camino, y mostrarme que la vida es mejor con una sonrisa.

Al Dr. Hugh Drummond Durey, por aceptarme en su grupo de trabajo, por sus enseñanzas y sus comentarios durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Tania García Garduño, por todo el apoyo brindado en el laboratorio, por su gran disposición y enseñanzas, por su amabilidad y por ser una persona increíble, ¡te extrañaré!

A la Dra. Cristina Rodríguez por el apoyo y disposición, además de sus consejos de redacción durante la realización de todo este proyecto.

A mi jurado, la Dra. Ella Vázquez, Dr. Hugh Drummond, la Dra. Katherine Renton, el Dr. Antonio González Rodríguez y la Dra. Lynna Marie Kiere, por su contribución en la elaboración de esta tesis.

**GRACIAS A TODOS...**

## Índice

Resumen	6
Introducción	8
<i>Variación por conducta extra- pareja</i>	10
<i>Especie de estudio</i>	12
Objetivos	13
Materiales y métodos	14
Resultados	17
Discusión	20
APÉNDICE A	30
APÉNDICE B	31
APÉNDICE C	32
APÉNDICE D	33

## *Lista de figuras y cuadros*

- Figura 1.* Foto aérea de Isla Isabel. 14
- Figura 2.* Diversidad genética) de los padres y sus volantones en las diferentes 17  
combinaciones de edad: Heterocigosis observada ( $H_O$ ), Heterocigosis esperada ( $H_E$ )  
e Índice de Endogamia ( $F_{IS}$ ).
- Cuadro 1.* Frecuencia de SNPs en crías analizadas con diferencias en los niveles de 18  
heterocigosidad positivas y negativas entre cuatro comparaciones.
- Cuadro 2.* Diferencias en los niveles de heterocigosidad en familias con crías extra- 19  
pareja.

## *Resumen*

En organismos silvestres los efectos de la edad parental en la calidad de las crías se desconocen casi por completo. Análisis de los efectos de las edades parentales en los bobos patas azules (*Sula nebouxii*), encontraron que, las crías de dos padres jóvenes ( $\leq 8$  años) o dos padres viejos ( $\geq 13$  años), presentaron una baja viabilidad (probabilidad de ser adultos reproductivos), mientras que los volantones de un padre joven y un padre viejo presentaron una alta viabilidad. Una posible explicación es que las hembras podrían seleccionar a sus parejas para incrementar la heterocigosidad ( $H_e$ ) de las crías. Con más de 30 años de datos en los bobos de patas azules de Isla Isabel y el método tunable Genotyping by Sequencing (tGBS) evaluamos si: (i) Con un padre joven y otro viejo, el nivel de heterocigosidad de las crías es mayor que con dos padres jóvenes o dos padres viejos (ii) los padres extra pareja aumentan la heterocigosidad de las crías y (iii) las crías extra pareja tienen mayor heterocigosidad que las crías sociales. Contrario a las predicciones, los niveles de heterocigosidad no aumentaron en las crías de un padre joven y un padre viejo. Adicionalmente, encontramos una mayor diferencia en la heterocigosidad de los machos extra-pareja que de los machos sociales cuando se compararon con las hembras de forma pareada. Y finalmente, un mayor nivel de heterocigosidad en las crías extra-pareja que en las crías sociales. Los resultados de este estudio muestran por primera vez un efecto de la paternidad extra pareja en los niveles de heterocigosidad de las crías y señalan la importancia de considerar otras explicaciones (e.g. inversión parental, “buenos genes”, mutaciones no sinónimas) sobre el efecto de la combinación de edades de los padres en la viabilidad de las crías.

**Palabras clave:** Combinación de edad, paternidad extra-pareja, heterocigosidad, tGBS.

## *Abstract*

In animal species, the effects of parental ages in the offspring quality are almost completely unknown. Analyses about the effects of parental age in blue-footed booby (*Sula nebouxii*) have found that fledglings with two young parents ( $\leq 8$  years) or two old parents ( $\geq 13$  years) were least likely to become breeders, whereas fledglings with one young parent and one old parent were most likely to do so. These studies have proposed among other hypotheses, that females could select their partners to increase offspring heterozygosity. With more than 30 years of data in blue-footed booby (*Sula nebouxii*) of Isla Isabel, and tunable Genotyping by Sequencing (tGBS) we tested if: (i) with one young parent and one old parent increase heterozygosity levels of offspring than with two young parents or two old parents, (ii) the extra-pair sires increase heterozygosity in their offspring and (iii) extra pair chicks are more heterozygous than the social chicks. Contrary to predictions, the heterozygosity levels of chicks did not increase with one young parent and one old parent. Additionally, we found, a larger difference in heterozygosity when compared to females in extra-pair males than social males in a pairwise fashion and an increased heterozygosity in extra-pair chicks. Our findings show for the first time an effect of extra-pair couples on the heterozygosity levels of fledglings and considered other effects (e.g. parental investment, “good genes”, and nonsynonymous mutations) about the effects of parental age combinations on viability of fledglings.

**Keywords:** age combination, extra-pair paternity, heterozygosity, tGBS.

## *Introducción*

Se han desarrollado modelos teóricos que sugieren que en especies animales las hembras deberían de aparearse preferentemente con machos de mayor edad (Kokko, 1997, 1998), cuya sobrevivencia demuestra que portan genes de alta calidad para heredarlos a su descendencia (Brooks & Kemp, 2001; Manning, 1985). No obstante, existen también argumentos que sugieren una asociación negativa con la edad de la pareja; se ha visto, por ejemplo, que los gametos de la línea germinal pueden sufrir un deterioro con la edad, principalmente en los machos, disminuyendo posiblemente el éxito reproductivo e incurriendo en costos para la progenie, como una mayor probabilidad de presentar defectos en el nacimiento (Beck & Promislow, 2007; Hamatani et al., 2004; Johnson & Gemmell, 2012; Preston et al., 2015).

Si bien en muchas especies de animales las hembras suelen optar por aparearse con machos de mayor edad (Avent, Price, & Wedell, 2008; Thanda et al., 2013; Verspoor, et al., 2015), las consecuencias adaptativas de dicha preferencia se conocen poco. Por un lado, la investigación empírica acerca de los efectos de la edad de los padres sobre la calidad de las crías se ha enfocado principalmente en la biología reproductiva de humanos y en unos cuantos estudios con animales bajo condiciones de laboratorio. Por otra parte, la evidencia experimental y en algunas especies silvestres, categorizan a los individuos en jóvenes o viejos, ya que desconocen la edad exacta de los padres y las parejas suelen ser analizadas por separado, sin considerar el efecto de ambos padres. No es de sorprender entonces, que los efectos adaptativos de las distintas combinaciones de las edades de los padres sean en gran medida desconocidos.

Estudios sobre los efectos de la edad en poblaciones silvestres (e.g. mariposas, peces y tortugas) y de laboratorio (e.g. escarabajos, moscas y ratones) muestran que las madres viejas suelen producir crías con un mayor de éxito de eclosión (Lind et al., 2015), mayor tamaño al nacer (Bogdanova et al., 2006; Halle et al., 2015; Kindsvater et al., 2012; Paitz et al., 2007), una carga parasitaria menor, aunque con una mayor mortalidad en etapas tempranas (Al-Lawati & Bienefeld, 2009) y un acortamiento en sus ciclos de vida (Ducatez et al., 2012; Lind et al., 2015). Por otro lado, las crías de padres viejos suelen ser más viables en estado de huevo (Krishna M, 2012), aunque pueden crecer más lentamente (Ducatez et al., 2012; Nikola et al., 2004) y presentar capacidades de aprendizaje reducidas (García-Palomares et al., 2009).

El único estudio acerca de los efectos de la edad en una especie de vida silvestre que ha abarcado el intervalo completo de edades de los dos sexos, realizado en el bobo de patas azules (*Sula nebouxii*, familia Sulidae), encontró que la combinación de las edades parentales es determinante para la viabilidad de las crías (Drummond & Rodríguez, 2015). En la población de esta especie en Isla Isabel, Nayarit, las crías de dos padres jóvenes ( $\leq 8$  años) o dos padres viejos ( $\geq 13$  años) presentaron una viabilidad baja (i.e. probabilidad de llegar a ser adultos reproductivos), mientras las crías de un padre joven (hembra o macho) y un padre viejo, presentaron una viabilidad alta (Drummond & Rodríguez, 2015). En este estudio se propuso que los mecanismos hipotéticos que podrían explicar dicho patrón eran las variaciones dependientes de las edades de los padres en: (i) la inversión parental, (ii) la variación en la heterocigosidad de las crías (medida de variación genética, que se obtiene de la proporción de genotipos diploides con dos alelos diferentes, Hedrick 2011 p.33) y/o (iii) la calidad genética heredada a las crías. De éstos, quizás el más probable es un mecanismo genético, dado que las hembras con parejas de edad similar son las que más crías extra-pareja produjeron en esta población (Ramos et al., 2014b), indicando que posiblemente inciden en la infidelidad, para controlar la combinación de edades de los padres biológicos de las crías. Los padres extra-pareja contribuyen genes a la progenie y no aportan cuidado parental (Drummond & Rodríguez, 2015).

Durante décadas se ha sugerido que, en poblaciones animales, las hembras podrían estar seleccionando a sus parejas con el fin de aumentar la diversidad genética de la progenie (Brown, 1997). Crías con alta variabilidad genética suelen presentar una supervivencia mayor en condiciones de estrés, un mayor tamaño corporal (Forcada & Hoffman, 2014), una mayor inmunocompetencia, alta resistencia a patógenos (Hawley et al., 2005), y una mayor probabilidad de reclutarse a la población reproductiva (Hansson & Westerberg, 2002; Markert et al., 2004). Además, en poblaciones que enfrentan numerosas fluctuaciones ambientales los individuos suelen presentar niveles altos de variabilidad genética (Ellner & Hairston, 1994).

En las aves insulares, la selección sobre las cohortes suele variar porque las condiciones ecológicas cambian drásticamente por fenómenos oceanográficos como el Niño (i.e. aguas más cálidas, menor productividad primaria). En particular, en el bobo de patas azules, el régimen alimenticio (e.g. éxito de forrajeo, ingesta de alimentos, suministro a las crías) y la reproducción (e.g. reduce el tamaño de puesta, el éxito de eclosión de las crías y el crecimiento de los polluelos) se impactan severamente (ver Ancona et. al., 2011). Ante este

escenario, podría ser que la heterocigosidad de las crías sea mayor cuando los padres difieren en edad de manera significativa, debido a que, al provenir de cohortes distintas, ambos padres han enfrentado diferentes regímenes de selección (Drummond & Rodríguez, 2015).

### *Variación por conducta extra- pareja*

Existe otro factor importante que puede influir en la heterocigosidad de las crías, la conducta extra-pareja. Aproximadamente el 90% de las aves tienen un sistema de apareamiento socialmente monógamo (Lack, 1968), donde una hembra y un macho mantienen un lazo social durante al menos un evento reproductivo. Por décadas, se supuso que las aves eran social y genéticamente monógamas, pero con la aparición de las herramientas moleculares que permiten realizar análisis de paternidad se encontró que, en la mayoría de las aves, es común que una o más crías de un nido, sean hijos de un macho diferente a la pareja social (Griffith et al., 2002).

Para los machos, obtener paternidad extra conlleva un beneficio adaptativo, ya que incrementa su número de crías, y pueden obtener más parejas sexuales, sin necesidad de realizar un cuidado parental, lo que se conoce como principio de Bateman. Para las hembras, es menos claro el beneficio adaptativo, ya que están limitadas al número de huevos que producen (Bateman, 1948). El participar en conductas extra-pareja puede generar altos costos para ambos sexos, incluyendo: la exposición a enfermedades y represalias del macho social al descubrir la "infidelidad" (e.g. agresión, reducción del cuidado parental e infanticidio; ver Forstmaier 2014). La aparente paradoja de la infidelidad de las hembras frente a los elevados costos, despertó gran interés y se publicaron numerosos estudios sobre la función, costos y beneficios de la conducta extra-pareja.

Para las hembras, la infidelidad podría ser un mecanismo para corregir un error en la selección de su pareja social, o una oportunidad para favorecer ciertos rasgos en el padre genético de los que carece su pareja social. Se han propuesto diversas hipótesis funcionales, para tratar de explicar la conducta extra-pareja (EP), las cuales pueden englobarse en dos grupos: (a) las hipótesis de beneficios directos, que proponen que la conducta EP es adaptativa para que las hembras incrementen su propia supervivencia y/o su éxito reproductivo, por ejemplo, adquiriendo regalos nupciales o evitando infertilidad, y (b) las

hipótesis de beneficios indirectos, que sugieren que las hembras adquieren beneficios genéticos para sus crías. Las hipótesis de beneficios indirectos incluyen: (i) “*buenos genes*”, donde la contribución genética del macho extra incrementa la sobrevivencia, el atractivo o la habilidad competitiva de las crías y (ii) la *compatibilidad genética* (evasión de endogamia), donde la hembra elige machos con genotipos distintos al suyo (con menor parentesco a ella, “más compatibles”) que al combinarse genéticamente, incrementan la heterocigosidad de las crías (Forstmeier et al., 2014; Kiere et al., 2016; Akçay & Roughgarden, 2007).

Los marcadores moleculares son una buena herramienta para el análisis de diversidad genética en las poblaciones. En los bobos de Isla Isabel, las evaluaciones de la heterocigosidad (con loci de microsatélites), se han abordado solamente en términos de compatibilidad genética (donde la combinación de los genotipos materno y paterno incrementa la variación genética en las crías), como una posible explicación para la conducta extra pareja de las hembras. Sin embargo, hasta ahora, no se ha encontrado un incremento en la heterocigosidad en las crías (Kiere et al. 2016). Es posible que, para estudios dentro de una misma población, el efecto de la heterocigosidad deba ser medido con herramientas moleculares más sensibles, con un mayor número de marcadores en múltiples loci que reflejen la heterocigosidad de todo el genoma (Canalí et al. 2014) o detectando la heterocigosidad en loci o genes específicos que presenten una cierta funcionalidad adaptativa (Hansson et al. 2002; Szulkin et al 2009).

Las herramientas de secuenciación de siguiente generación (SSG), se han utilizado de manera recurrente para el estudio de procesos evolutivos en aves, incluyendo, diversidad genética, estructura poblacional y patrones de diversificación (Toews et al., 2016). La SSG permite generar millones de secuencias de manera simultánea, teniendo acceso a miles de marcadores genéticos polimórficos (e.g SNPs, por sus siglas en inglés Single Nucleotide Polymorphisms) a un costo relativamente bajo. Una técnica en particular, Genotyping by Sequencing (GBS), que pertenece a la familia RAD-seq (Restriction Site Association DNA Sequencing) y cuya característica principal es el uso de enzimas de restricción para realizar cortes en sitios sensibles a metilación, permite obtener una submuestra del genoma. Esta técnica se utiliza principalmente para genomas de gran tamaño o para organismos no modelo, para los que no se cuenta con un genoma de referencia secuenciado (Andrews et al., 2016).

### *Especie de estudio*

El bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) puede vivir más de 20 años y tiene bajas tasas de mortalidad. Forman parejas socialmente monógamas, aunque presenta crías extra pareja en aproximadamente el 11% de los nidos (Ramos et al., 2014a). La etapa reproductiva de machos y hembras comienza cerca de los cuatro años; aunque algunos individuos pueden reproducirse desde los dos años (Drummond et al., 2003). Anidan muy cerca del sitio donde nacieron y ponen de uno a tres huevos, en intervalos de cuatro días, por cada evento reproductivo (Drummond et al., 1986; Nelson, 1978). Ambos padres realizan el cuidado parental, desde la incubación hasta que las crías son independientes. Los bobos alcanzan su mayor éxito reproductivo a los diez años; posteriormente comienza la senescencia reproductiva en ambos sexos, con afectaciones en la línea germinal de los machos (Velandó et al., 2011) y reducción en la calidad de los huevos producidos por las hembras (Beamonte-Barrientos et al., 2010).

La colonia de bobos de patas azules que anida en Isla Isabel se ha monitoreado desde 1989, mediante la observación y marcaje individual de volantones con anillos metálicos (Drummond et al., 2003). Actualmente, se conocen datos de historia de vida como edad, identidad, parentesco e historia reproductiva de aproximadamente el 90% de los individuos reproductivos de la zona de estudio.

## Objetivos

Los objetivos principales de esta tesis fueron evaluar: (i) si existe un efecto de las combinaciones de edad de los padres de bobos patas azules (*Sula nebouxii*) en la variabilidad genética medida como heterocigosidad en sus crías y (ii) si la paternidad extra pareja afecta los niveles de heterocigosidad de las crías. Con base en información de más de 30 años de monitoreo en la población de bobos patas azules de Isla Isabel, combinado con análisis genómicos y genéticos, se pusieron a prueba las siguientes hipótesis (H):

**H1:** Las combinaciones de edades de los padres afectan los niveles de heterocigosidad de las crías.

*Predicción:* Con un padre (hembra o macho) joven y otro viejo, los niveles de heterocigosidad de las crías serán mayores que con dos padres jóvenes o dos padres viejos.

**H2:** Las hembras consiguen padres extra para aumentar los niveles de heterocigosidad de sus crías.

*Predicción 1:* Los niveles de heterocigosidad entre macho y hembra es mayor entre una hembra y su extra-pareja, que entre ella y su pareja social.

*Predicción 2:* Los machos extra-pareja tienen niveles de heterocigosidad mayores que los machos sociales.

*Predicción 3:* Las crías extra-pareja tienen mayores niveles de heterocigosidad que sus medios hermanos no-extra-pareja.

## *Materiales y métodos*

### *Área de estudio y colecta de sangre*

En Isla Isabel, México (21° 52'N, 105° 54' W), durante el 2011, entre los meses de febrero y mayo (Fig. 1), fueron capturadas 424 familias completas (padres y crías) de bobos de patas azules. De cada integrante de la familia, se colectaron 75 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de sangre de la vena braquial, que se almacenó en 1 ml de solución amortiguadora (1.0 M Tris: 0.5 M EDTA: 5.0 M NaCl: 10% SDS) (ver detalles en Ramos et al., 2014b). Dichas muestras se utilizaron para evaluar los niveles de heterocigosidad: 1) por combinaciones de edad y 2) en nidadas con crías extra-pareja.



**Figura 1.** Foto aérea de Isla Isabel. Localizado frente a Nayarit, es el sitio de reproducción de aproximadamente 1 500 –2 000 parejas de bobos patas azules.

### *Selección de muestras*

Para determinar los niveles de heterocigosidad (*He*) de las crías por combinación de edad, se ubicó la identidad y edad de los padres de cada nidada con la base de datos del Laboratorio de Conducta Animal del Instituto de Ecología, UNAM. Se seleccionaron nidadas con padres de edad conocida: jóvenes ( $J \leq 4$  años,) y viejos ( $V \geq 12$  años); y se evaluaron cuatro diferentes combinaciones de edad: Joven-Joven ( $J_{\text{♀}}/J_{\text{♂}}$ ), Joven-Viejo ( $J_{\text{♀}}/V_{\text{♂}}$ ), Viejo-Joven ( $V_{\text{♀}}/J_{\text{♂}}$ ) y Viejo-Viejo ( $V_{\text{♀}}/V_{\text{♂}}$ ). Posteriormente, se evaluaron los niveles de *He* de 28 crías de padres con diferentes combinaciones:  $J_{\text{♀}}/J_{\text{♂}}$  ( $n = 7$ ),  $J_{\text{♀}}/V_{\text{♂}}$ , ( $n = 8$ ),  $V_{\text{♀}}/J_{\text{♂}}$  ( $n = 5$ ) y  $V_{\text{♀}}/V_{\text{♂}}$  ( $n = 8$ ).

Se evaluaron 10 nidadas que tuvieran crías extra pareja (con genotipos previamente identificados con 10 loci de microsatélites, ver Ramos 2011), contrastando los niveles de *He* entre la hembra y su pareja social con la *He* entre la hembra y su extra pareja. Además, se compararon los niveles de *He* del macho social con el macho EP. Adicionalmente, se contrastaron los niveles de *He* de las crías EP con las crías sociales agregando, para este análisis, 3 nidadas que tuvieran crías sociales y crías EP (en un mismo nido), ya que solamente 7 de las 10 nidadas presentaban ambas crías.

### *Genotyping by Sequencing*

Para los 114 individuos evaluados, se realizó la extracción de ADN con el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (APÉNDICE A). La integridad y el peso molecular se confirmaron con electroforesis en gel de agarosa. Se cuantificó la concentración de ADN con Qubit 3.0 (Qubit-Life Technologies) y se verificó la pureza con el equipo Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). Finalmente, se homogeneizaron todas las muestras a una concentración mínima de 30 ng/ $\mu\text{L}$  y se enviaron al laboratorio DATA2bio (Iowa, USA). Dicho laboratorio, preparó las librerías genómicas, genotipó y realizó el ensamblado de Novo y el llamado de los SNPs, con el método tunable Genotyping by Sequencing (tGBS®) en un secuenciador Ion Proton, con las enzimas NspI y BfuCI (APÉNDICE B).

### *Diversidad genética y estimación de niveles de heterocigosidad*

Se calcularon diversos estimadores de diversidad genética para los padres y las crías con la librería *hierfstat* (Goudet, 2005), en R v 3.3.2. Estos incluyeron la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), la heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) y el índice de fijación o endogamia ( $F_{IS}$ ). Adicionalmente, se realizaron Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), de manera exploratoria, para detectar posibles subgrupos dentro de la población utilizando el paquete *SNPRelate* (Zheng et al., 2012) mediante R Studio 3.3.2.

Se calcularon los niveles de heterocigosidad para las crías de cada combinación de edad y en familias con crías extra-pareja, con ayuda de la librería *hierfstat* (Goudet, 2005), en R Studio 3.3.2. *Hierfstat* evalúa los SNPs de un grupo de individuos y calcula la heterocigosidad promedio para cada SNP (Excoffier et al. 2006; Helyar et al 2011). La significancia estadística fue determinada a partir de pruebas de  $X^2$ .

En este análisis se utilizaron 12 918 SNPs; tomando como supuesto de que la heterocigosidad en un SNP era igual entre los grupos (i.e. heterocigosidad del SNP<sub>1</sub>  $J_{\varphi}/J_{\delta}$  = heterocigosidad SNP<sub>1</sub>  $J_{\varphi}/V_{\delta}$ ), se calculó la diferencia en los niveles de heterocigosidad entre los grupos de individuos y se obtuvieron las frecuencias de heterocigosidad. Finalmente, se calculó la distancia aproximada entre los SNPs (i.e. tamaño de alineamiento/ número total de SNPs:  $420\,065\,111/12\,918 = 32\,517$  pares de bases), para determinar si existía dependencia entre los datos.

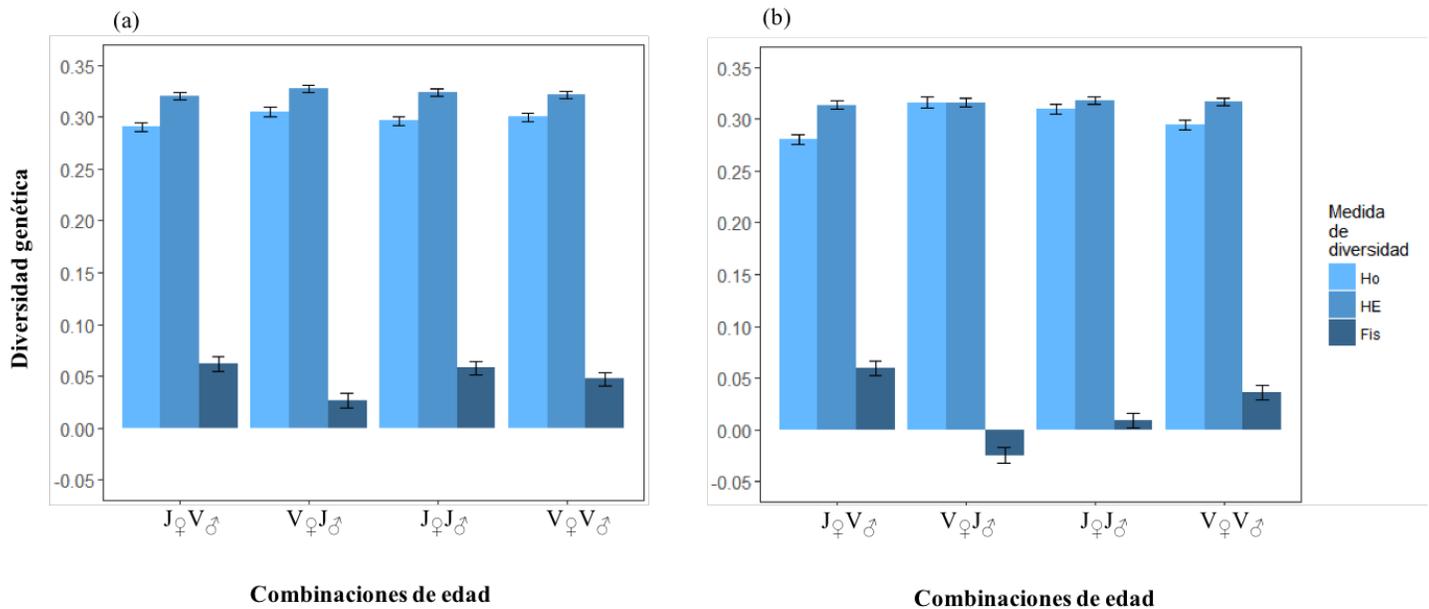
## Resultados

### Genotyping by Sequencing

Con la secuenciación tGBS, se generaron 763.5 millones de secuencias procesadas (con un promedio de 5.9 millones por muestra) y 12 918 SNPs que se utilizaron en las evaluaciones de diversidad genética y niveles de heterocigosidad por combinación de edad y en nidadas con crías extra-pareja.

### Diversidad genética y análisis de heterocigosidad

Los análisis de diversidad genética de los padres y sus crías mostraron una heterocigosidad observada ( $H_O$ ) de 0.28 a 0.31, una heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) de 0.32 y valores de  $F_{IS}$  cercanos a cero (-0.035-0.07; Fig. 2), siendo  $V_{\text{♀}}/J_{\text{♂}}$ , la combinación con menor endogamia en padres y volantones. Los análisis exploratorios con PCA (APÉNDICE C) no mostraron subgrupos claramente diferenciados dentro de la población.



**Figura 2.** Diversidad genética ( $SE = Standard\ error$ ) de los padres (a) y sus volantones (b) en las diferentes combinaciones de edad: Heterocigosidad observada ( $H_O$ ), Heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) e Índice de Endogamia ( $F_{IS}$ ).

Contrario a la predicción, no se encontró evidencia de una mayor heterocigosidad en las crías de un padre joven y un padre viejo que en las crías de dos padres jóvenes o dos padres viejos (Cuadro 1, Apéndice D).

**Cuadro 1.** Frecuencia de SNPs en 28 crías con diferencias en los niveles de heterocigosidad positivas y negativas entre las combinaciones de edad. El tamaño de muestra se muestra entre paréntesis.

Comparación de niveles de heterocigosidad en crías de pares de adultos	Sitios He totales	Promedio	Frecuencia de diferencias		$X^2$	$p$
			Positivas	Negativas		
Crías de:						
J♀V♂ (8)	9 092	0.28				
V♀J♂ (5)	8 310	0.31				
J♀J♂ (7)	9 588	0.30				
V♀V♂ (8)	9 446	0.29				
Comparación de crías de:						
J♀V♂ + V♀J♂ vs J♀J♂ + V♀V♂			11 197	11 526	4.763	0.02

En las familias con paternidad extra pareja (PEP), la diferencia entre el nivel de heterocigosidad de una hembra y su macho extra pareja fue mayor que la diferencia entre la hembra y su macho social ( $X^2 = 11.218$ ,  $p < 0.001$ ); y los machos EP mostraron mayor heterocigosidad que los machos sociales ( $X^2 = 30.257$ ,  $p < 0.001$ ). Finalmente, las crías EP tuvieron mayor heterocigosidad que las crías sociales ( $X^2 = 4.652$ ,  $p = 0.031$ ) ver Cuadro 2.

*Cuadro 2. Diferencias en los niveles de heterocigosidad en 10 familias con crías extra-pareja y crías sociales.*

Comparación:	Frecuencia de diferencias		$X^2$	$p$
	Positivas	Negativas		
<b>a) Parejas</b>				
Hembra +Macho social vs	5320	5366		
Hembra + Macho extra-pareja	5169	5712	11.218	<0.001
<b>b) Machos</b>				
Macho social vs macho extra-pareja	5029	5596	30.257	<0.001
<b>c) Crías</b>				
Crías sociales vs crías extra-pareja	5473	5701	4.652	0.031

## Discusión

En esta tesis exploré si ciertas combinaciones de edades y la paternidad extra-pareja aumentan la heterocigosidad de las crías. Contrario a la predicción principales, los niveles de heterocigosidad de las crías no se incrementan cuando tienen un padre joven y uno viejo. Adicionalmente, los machos EP tienen mayor heterocigosidad que los machos sociales y finalmente, las crías EP tienen niveles más altos de heterocigosidad que las crías sociales.

Los análisis de diversidad genética mostraron una heterocigosidad observada ( $H_O$ ) de 0.28 a 0.31, una heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) de 0.32 y valores de  $F_{IS}$  bajos (-0.035-0.07). Esto podría indicar una variabilidad genética alta en la población, comparada con otras especies de aves como: en *Centropus urophasianus*,  $H_e = 0.18-0.30$  (Oyler-McCance et al., 2015), en *Chloephaga rubidiceps*,  $H_e = 0.16-0.19$  (Kopuchian et al., 2016), o *Uria lomvia*,  $H_e = 0.1$  (Tigano et al., 2017). Las especies con una alta variabilidad genética pueden tener un menor riesgo de depresión por endogamia y mayor sobrevivencia al enfrentarse con ambientes heterogéneos (Ellner & Hairston, 1994).

Los bobos de patas azules, a pesar de ser una especie altamente filopátrica, presentó algunos valores negativos de endogamia ( $F_{IS}=0.035$ ). Los valores negativos de  $F_{IS}$  pueden ser un reflejo de apareamientos preferenciales entre individuos genéticamente diferentes o de un posible flujo genético entre las islas. Los análisis de reproducción intracolonia sugieren que la fidelidad de los bobos a sus sitios de anidación no es absoluta (Kim, Torres, Domínguez, & Drummond, 2007; Taylor, Maclagan, Anderson, & Friesen, 2011); aunque la dispersión reproductiva entre colonias es poco conocida. Algunos volantones anillados en Isla Isabel se han detectado anidando en otras islas, a varios cientos de km de su colonia natal (Espinoza, 2014). Este movimiento de individuos entre islas podría introducir variabilidad genética a la población ya que un solo individuo por generación entre colonias bastaría para homogeneizar las poblaciones e introducir variación genética (Mills & Allendorf, 1996; Wright, 1931).

Al evaluar las crías de padres con diferentes combinaciones de edad, contrario a las predicciones, los niveles de heterocigosidad no se incrementaron en las crías de un padre joven y un padre viejo. Es posible que el efecto predicho en los niveles de heterocigosidad se refleje sólo en sitios particulares del genoma (SNPs no sinónimos); o que el incremento en la viabilidad de las crías al combinarse las edades de los padres, se deba a otros

mecanismos propuestos como la variación en calidad genética de las crías o por la inversión parental dependiente de la edad de los padres (Drummond et al. 2015).

Dado el enorme interés que durante décadas se ha generado por las cópulas extra-pareja y sus beneficios, evalué si la paternidad EP afecta las heterocigosis de las crías, encontrando que los machos extra pareja tienen mayor heterocigosidad que los machos sociales y la heterocigosidad de las crías EP es mayor que la de las crías sociales. La existencia de paternidad EP en otras especies se ha asociado con la amplia variación en los rasgos de los machos como la edad, la condición y la expresión de ornamentos (Forstmeier et al., 2014). En los bobos de patas azules las hembras son más selectivas con el macho EP entre más atractivo sea el macho social (Kiere et al., 2014), posiblemente ganando padres más atractivos u obteniendo beneficios indirectos para las crías (apoyando la hipótesis de “buenos genes”). En *Carpodacus mexicanus* la respuesta inmune aumenta con la heterocigosidad (Hawley et al.2005), por lo que es de esperarse que en las crías de bobos aumente la respuesta inmune cuando tienen niveles de heterocigosidad mayores.

Sin embargo, en las décadas pasadas, se han suscitado numerosos debates sobre el efecto de la heterocigosidad individual en términos de adecuación, ya que no existe un patrón claro. Por un lado, se han encontrado efectos positivos de la heterocigosidad con cantos más elaborados (mayor atractivo), mayor tamaño corporal o una menor carga parasitaria, pero en otros estudios no apoyan este patrón (Akçay & Roughgarden, 2007). Estos estudios han sido severamente cuestionados bajo el argumento del tamaño de muestra o por el bajo número de marcadores moleculares utilizados (Kempnaers, 2007). Aunque este trabajo no evalúa correlaciones entre la heterocigosidad y la adecuación o supervivencia de los individuos, por primera vez, permite dilucidar con el uso de miles de marcadores moleculares, un efecto más claro de la paternidad extra pareja en los niveles de heterocigosidad de las crías a nivel genómico.

Los efectos encontrados resaltan la importancia de continuar explorando a los individuos de esta población para determinar el mecanismo que podría incrementar la viabilidad de las crías, o examinar si los niveles de heterocigosidad se incrementan en SNPs específicos del genoma (y no de manera global) para determinar si influyen en la supervivencia o en la adecuación de los individuos.

### *Notas éticas*

Este estudio fue realizado con el permiso y soporte de las autoridades mexicanas incluidos: la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos naturales (SEMARNAT) con el permiso (SGPA/DGVS/08333/10) para coleccionar muestras de sangre y el Parque Nacional de Isla Isabel.

## *Literatura citada*

- Al-Lawati, H., & Bienefeld, K. (2009). Maternal Age Effects on Embryo Mortality and Juvenile Development of Offspring in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102(5), 881-888.  
doi: 10.1603/008.102.0514
- Akçay, E. & Roughgarden, J. (2007) Extra-pair paternity in birds: Review of the genetic benefits. *Evol. Ecol. Res.* **9**, 855–868.
- Ancona, S., Sanchez-Colon, S., Rodriguez, C., & Drummond, H. (2011). El Nino in the warm tropics: local sea temperature predicts breeding parameters and growth of blue-footed boobies. *J Anim Ecol*, 80(4), 799-808.  
doi: 10.1111/j.1365-2656.2011.01821.x
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17, 81. doi: 10.1038/nrg.2015.28
- Avent, T. D., Price, T. A. R., & Wedell, N. (2008). Age-based female preference in the fruit fly *Drosophila pseudoobscura*. *Animal Behaviour*, 75(4), 1413-1421.  
doi: 10.1016/j.anbehav.2007.09.015
- Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity (Edinb)*, 2(Pt. 3), 349-368.
- Beamonte-Barrientos, R., Velando, A., Drummond, H., & Torres, R. (2010). Senescence of maternal effects: aging influences egg quality and rearing capacities of a long-lived bird. *Am Nat*, 175(4), 469-480. doi: 10.1086/650726
- Beck, C. W., & Promislow, D. E. (2007). Evolution of female preference for younger males. *PLoS One*, 2(9), e939. doi: 10.1371/journal.pone.0000939
- Bogdanova, M. I., Nager, R. G., & Monaghan, P. (2006). Does parental age affect offspring performance through differences in egg quality? *Functional Ecology*, 20(1), 132-141.  
doi: 10.1111/j.1365-2435.2006.01088.x
- Brooks, R., & Kemp, D. J. (2001). Can older males deliver the good genes? *Trends Ecol Evol*, 16(6), 308-313.
- Brown, J. L. (1997). A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behavioral Ecology*, 8(1), 60-65. doi: 10.1093/beheco/8.1.60

- Canal, D., Serrano, D., & Potti, J. (2014). Exploring heterozygosity-survival correlations in a wild songbird population: contrasting effects between juvenile and adult stages. *PLoS One*, 9(8), e105020. doi: 10.1371/journal.pone.0105020
- Drummond, H., González, E., & Osorno, J. L. (1986). Parent-offspring cooperation in the blue-footed booby (*Sula nebouxii*): social roles in infanticidal brood reduction. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19(5), 365-372. doi: 10.1007/bf00295710
- Drummond, H., & Rodriguez, C. (2015). Viability of Booby Offspring is Maximized by Having One Young Parent and One Old Parent. *PLoS One*, 10(7), e0133213. doi: 10.1371/journal.pone.0133213
- Drummond, H., Torres, R., & Krishnan, V. V. (2003). Buffered development: resilience after aggressive subordination in infancy. *Am Nat*, 161(5), 794-807. doi: 10.1086/375170
- Ducatez, S., Baguette, M., Stevens, V. M., Legrand, D., & Freville, H. (2012). Complex interactions between paternal and maternal effects: parental experience and age at reproduction affect fecundity and offspring performance in a butterfly. *Evolution*, 66(11), 3558-3569. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01704.x
- Ellner, S., & Hairston, N. G. (1994). Role of Overlapping Generations in Maintaining Genetic Variation in a Fluctuating Environment. *The American Naturalist*, 143(3), 403-417.
- Espinoza, C. F. (2014). Parentesco genético entre los miembros de la pareja social y la presencia de paternidad extrapareja en el bobo de patas azules *Sula nebouxii*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Excoffier, L. & Heckel, G. (2006). Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat. Rev. Genet.* 7, 745.
- Forcada, J., & Hoffman, J. I. (2014). Climate change selects for heterozygosity in a declining fur seal population. *Nature*, 511, 462. doi: 10.1038/nature13542
- Forstmeier, W., Nakagawa, S., Griffith, S. C., & Kempenaers, B. (2014). Female extra-pair mating: adaptation or genetic constraint? *Trends Ecol Evol*, 29(8), 456-464. doi: 10.1016/j.tree.2014.05.005
- Garcia-Palomares, S., Pertusa, J. F., Minarro, J., Garcia-Perez, M. A., Hermenegildo, C., Rausell, F., Tarin, J. J. (2009). Long-term effects of delayed fatherhood in mice on

postnatal development and behavioral traits of offspring. *Biol Reprod*, 80(2), 337-342.  
doi: 10.1095/biolreprod.108.072066

Goudet, J. (2005). hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 184-186.

doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x

Grant, P. R., & Grant, B. R. (2016). Introgressive hybridization and natural selection in Darwin's finches. *Biological Journal of the Linnean Society*, 117(4), 812-822. doi: 10.1111/bij.12702

Griffith, S. C., Owens, I. P. F., & Thuman, K. A. (2002). Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology*, 11(11), 2195-2212. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01613.x

Halle, S., Nowizki, A., & Scharf, I. (2015). The consequences of parental age for development, body mass and resistance to stress in the red flour beetle. *Biological Journal of the Linnean Society*, 115(2), 305-314. doi: 10.1111/bij.12501

Hamatani, T., Falco, G., Carter, M. G., Akutsu, H., Stagg, C. A., Sharov, A. A., & Ko, M. S. (2004). Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet*, 13(19), 2263-2278. doi: 10.1093/hmg/ddh241

Hansson, B., & Westerberg, L. (2002). On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol Ecol*, 11(12), 2467-2474.

Hawley, D. M., Sydenstricker, K. V., Kollias, G. V., & Dhondt, A. A. (2005). Genetic diversity predicts pathogen resistance and cell-mediated immunocompetence in house finches. *Biol Lett*, 1(3), 326-329. doi: 10.1098/rsbl.2005.0303

Helyar, S. J., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M. I., Ogden, R., Limborg, M. T., Cariani, A., Maes, G. E., Diopere, E., Carvalho, G. R. and Nielsen, E. E. (2011). Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 123-136.

Johnson, S. L., & Gemmill, N. J. (2012). Are old males still good males and can females tell the difference? Do hidden advantages of mating with old males off-set costs related to fertility, or are we missing something else? *Bioessays*, 34(7), 609-619. doi: 10.1002/bies.201100157

- Kempnaers, B. (2007). Mate Choice and Genetic Quality: A Review of the Heterozygosity Theory *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 37, pp. 189-278): Academic Press
- Kiere, L. M., Ramos, A. G., & Drummond, H. (2016). No evidence that genetic compatibility drives extra-pair behavior in female blue-footed boobies. *Journal of Avian Biology*, 47(6), 871-879. doi: 10.1111/jav.01061
- Kim, S.-Y., Torres, R., Domínguez, C. A., & Drummond, H. (2007). Lifetime philopatry in the blue-footed booby: a longitudinal study. *Behavioral Ecology*, 18(6), 1132-1138. doi: 10.1093/beheco/arm091
- Kindsvater, H. K., Rosenthal, G. G., & Alonzo, S. H. (2012). Maternal size and age shape offspring size in a live-bearing fish, *Xiphophorus birchmanni*. *PLoS One*, 7(11), e48473. doi: 10.1371/journal.pone.0048473
- Kokko, H. (1997). Evolutionarily stable strategies of age-dependent sexual advertisement. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41(2), 99-107. doi: 10.1007/s002650050369
- Kokko, H. (1998). Good genes, old age and life-history trade-offs. *Evolutionary Ecology*, 12(6), 739-750. doi: 10.1023/a:1006541701002
- Kopuchian, C., Campagna, L., Di Giacomo, A. S., Wilson, R. E., Bulgarella, M., Petracci, P., McCracken, K. G. (2016). Demographic history inferred from genome-wide data reveals two lineages of sheldgeese endemic to a glacial refugium in the southern Atlantic. *Journal of Biogeography*, 43(10), 1979-1989. doi: 10.1111/jbi.12767
- Krishna M, S. H., Hegde S. (2012). Offspring of Older Males are Superior in *Drosophila bipectinata*. *Zoological Studies* 51, 72-84.
- Lind, M. I., Berg, E. C., Alavioon, G., Maklakov, A. A., & Blanckenhorn, W. (2015). Evolution of differential maternal age effects on male and female offspring development and longevity. *Functional Ecology*, 29(1), 104-110. doi: 10.1111/1365-2435.12308
- Manning, J. T. (1985). Choosy females and correlates of male age. *Journal of Theoretical Biology*, 116(3), 349-354. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(85\)80273-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(85)80273-3)
- Markert, J. A., Grant, P. R., Grant, B. R., Keller, L. F., Coombs, J. L., & Petren, K. (2004). Neutral locus heterozygosity, inbreeding, and survival in Darwin's ground finches (*Geospiza fortis* and *G. scandens*). *Heredity (Edinb)*, 92(4), 306-315. doi: 10.1038/sj.hdy.6800409
- Mills, L. S., & Allendorf, F. W. (1996). The One-Migrant-per-Generation Rule in Conservation and Management. *Conservation Biology*, 10(6), 1509-1518.

doi: 10.1046/j.1523-1739.1996.10061509.x

Nelson, B. (1978). *The Sulidae: Gannets and Boobies*: University of Aberdeen.

Nikola, T., Darka, Š., & Vesna, S. (2004). The short-term and long-term effects of parental age in the bean weevil (*Acanthoscelides obtectus*). *Evolutionary Ecology*, 18(2), 187. doi: 10.1023/B:EVEC.0000021090.51851.bd

Oyler-McCance, S. J., Cornman, R. S., Jones, K. L., & Fike, J. A. (2015). Genomic single-nucleotide polymorphisms confirm that Gunnison and Greater sage-grouse are genetically well differentiated and that the Bi-State population is distinct. *The Condor*, 117(2), 217-227. doi: 10.1650/CONDOR-14-174.1

Paitz, R. T., Harms, H. K., Bowden, R. M., & Janzen, F. J. (2007). Experience pays: offspring survival increases with female age. *Biology Letters*, 3(1), 44-46. doi: 10.1098/rsbl.2006.0573

Preston, B. T., Saint Jalme, M., Hingrat, Y., Lacroix, F., & Sorci, G. (2015). The sperm of aging male bustards retards their offspring's development. *Nat Commun*, 6, 6146. doi: 10.1038/ncomms7146

Ramos, A. G., Nunziata, S. O., Lance, S. L., Rodríguez, C., Faircloth, B. C., Gowaty, P. A., & Drummond, H. (2014a). Habitat structure and colony structure constrain extrapair paternity in a colonial bird. *Animal Behaviour*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.07.003>

Ramos, A. G., Nunziata, S. O., Lance, S. L., Rodríguez, C., Faircloth, B. C., Gowaty, P. A., & Drummond, H. (2014b). Habitat structure and colony structure constrain extrapair paternity in a colonial bird. *Animal Behaviour*, 95, 121-127. doi: 10.1016/j.anbehav.2014.07.003

Szulkin, M., Bierne N, David P. (2010). Heterozygosity–fitness correlations: a time for reappraisal. *Evolution* 64, 1202–1217. doi: /10.1111/j.1558-5646.2010.00966.x

Taylor, S. A., Maclagan, L., Anderson, D. J., & Friesen, V. L. (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(5), 883-893. doi: 10.1111/j.1365-2699.2010.02445.x

Thanda Win, A., Kojima, W., Ishikawa, Y., & Tregenza, T. (2013). Age-Related Male Reproductive Investment in Courtship Display and Nuptial Gifts in a Moth, *Ostrinia scapularis*. *Ethology*, 119(4), 325-334. doi: 10.1111/eth.12069

- Tigano, A., Shultz, A. J., Edwards, S. V., Robertson, G. J., & Friesen, V. L. (2017). Outlier analyses to test for local adaptation to breeding grounds in a migratory arctic seabird. *Ecology and Evolution*, 7(7), 2370-2381.  
doi: 10.1002/ece3.2819
- Toews, D. P. L., Brelsford, A., Grossen, C., Milá, B., & Irwin, D. E. (2016). Genomic variation across the Yellow-rumped Warbler species complex. *The Auk*, 133(4), 698-717. doi: 10.1642/AUK-16-61.1
- Velando, A., Noguera, J. C., Drummond, H., & Torres, R. (2011). Senescent males carry premutagenic lesions in sperm. *J Evol Biol*, 24(3), 693-697.  
doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02201.x
- Verspoor, R. L., Cuss, M., & Price, T. A. R. (2015). Age-based mate choice in the monandrous fruit fly *Drosophila subobscura*. *Animal Behaviour*, 102, 199-207. doi: 10.1016/j.anbehav.2015.01.024
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian Populations. *Genetics*, 16(2), 97-159.
- Zheng, X., Levine, D., Shen, J., Gogarten, S. M., Laurie, C., & Weir, B. S. (2012). A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics*, 28(24), 3326-3328.  
doi: 10.1093/bioinformatics/bts606

## *Apéndice*

## *APÉNDICE A*

### *Protocolo de extracción DNeasy Blood & Tissue Kit*

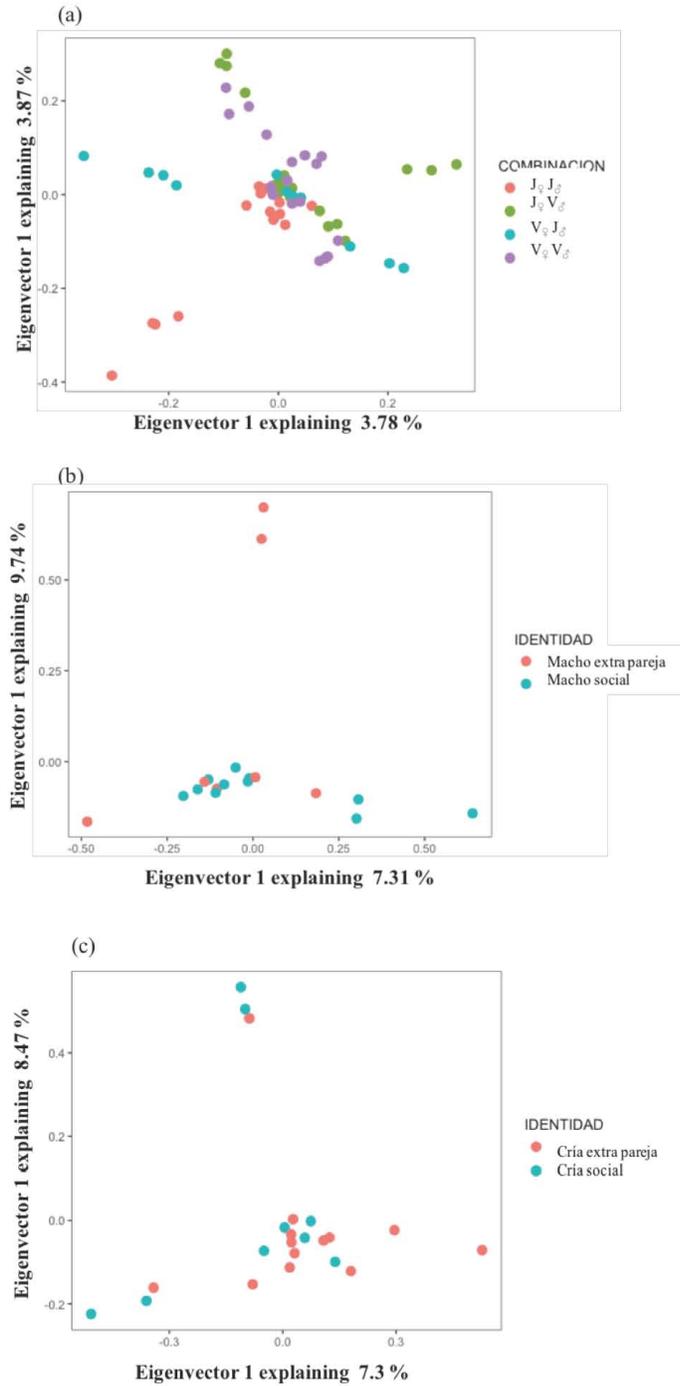
1. Agregar 100  $\mu\text{L}$  en una columna de ADN mini Spin, 200  $\mu\text{L}$  de Buffer AL, 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K, 180  $\mu\text{L}$  de PBS, e incubar a 56 °C durante 8 horas.
2. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de Buffer AL, 200  $\mu\text{L}$  de Etanol (95%), mezclar en un vortex, y centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto.
3. Eliminar el sobrenadante, cambiar la columna a un tubo colector nuevo y agregar 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW1, centrifugar durante 1 minuto a 8,000 rpm.
4. Cambiar a un nuevo tubo colector, agregar 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW2 y centrifugar durante 3 minutos a 14,000 rpm.
5. Transferir la columna a un tubo eppendorf y eluir el DNA con 100  $\mu\text{L}$  de Buffer AE, incubar 1 min a temperatura ambiente (15-25 °C) y centrifugar 1 minuto a 8,00 rpm.
6. Repetir el paso 5 pero con 50  $\mu\text{L}$  de Buffer AE, para incrementar la cantidad de ADN colectado.

## APÉNDICE B

### *Procesamiento de muestras*

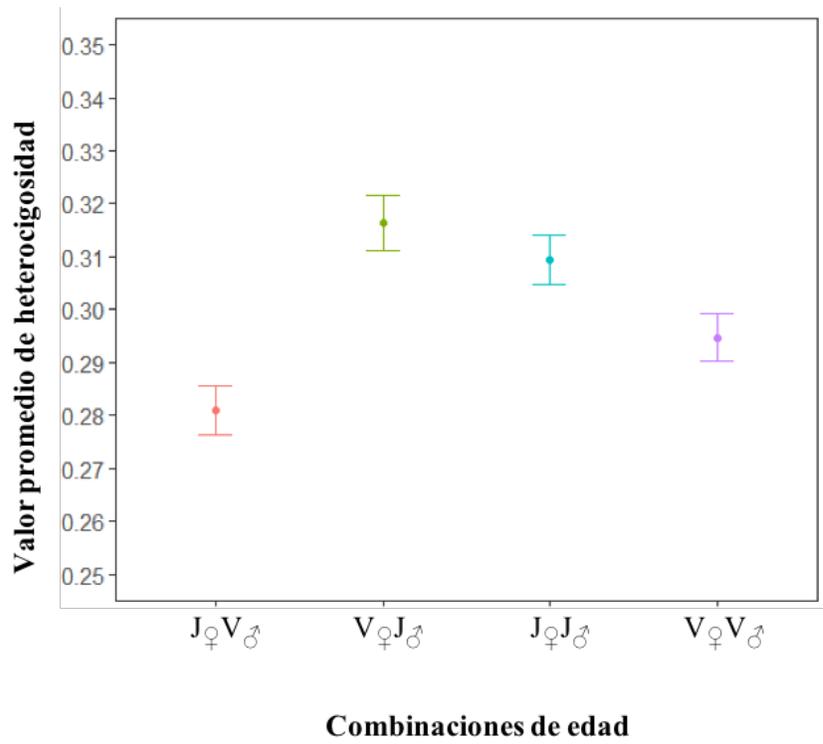
Se obtuvieron 609 millones de lecturas crudas. Los adaptadores de las secuencias crudas se removieron con *Seqclean* ([sourceforge.net/projects/seqclean](http://sourceforge.net/projects/seqclean)) en PHYTON. Posteriormente, las lecturas se sometieron a diversos filtros de calidad: (1) se eliminaron las 3 primeras y últimas pb, (2) se descartaron las lecturas con <50bp de longitud, (3) solo se conservaron las lecturas con más de 15 PHRED score de calidad ( $\leq 3\%$  tasa de error). Los datos limpios fueron condensados en clusters con *CD-HIT-45*, y se corrigieron errores de secuenciación con el software *Fiona* (Schulz et al. 2014). Posteriormente, se elaboró una secuencia consenso de 195.6 Mb con el software *diginorm* (Brown et al. 2012). Una vez limpiadas las secuencias, alinearon con la secuencia consenso con el software *GSNAP* (Wu et al., 2010). Y finalmente, se realizó el llamado de los SNPs con un MAF= 0.08 (Minor Allele Frequency, por sus siglas en inglés) y un MCR de 50 (Minimum Call Rate, por sus siglas en ingles).

## APÉNDICE C



**Figura 3.** Análisis de componentes principales (a) para las combinaciones de edades de los padres, (b) para los machos sociales y extra pareja y (c) para las crías sociales y crías extra pareja, sin mostrar en ninguno de los casos, agrupaciones diferenciadas en los individuos evaluados.

## APÉNDICE D



**Figura 4.** Sitios heterocigotos promedio de crías con padres con diferentes combinaciones de edad ( $n=12,832$  SNPs. IC 95%).