



Máster en Zoología

**Formación de pareja basada en el Complejo Principal
de Histocompatibilidad (MHC) en el papamoscas
cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*)**



Autora: Cristina Camacho Rodríguez

Director: David Canal

Tutor: Javier Pérez-Tris



Universidad Complutense de Madrid
Máster en Zoología

**Formación de pareja basada en el Complejo Principal
de Histocompatibilidad (MHC) en el papamoscas
cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*)**

- Trabajo Fin de Máster -

Cristina Camacho Rodríguez

**Departamento de Biodiversidad, Ecología y Evolución.
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid**

Septiembre 2023

La autora:

El tutor:

Fdo.: _____

Fdo.: _____
Departamento y Centro

VºBº el director:

Fdo.: _____
Departamento y Centro

Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC
Departamento de Ecología Evolutiva

ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Dña. Cristina Camacho Rodríguez con NIF 45886066P, estudiante de Máster en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid en el curso 2022-2023, como autora del trabajo fin de máster titulado

Formación de pareja basada en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en el papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*)

y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyos tutores son:

David Canal y Javier Pérez-Tris

DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente. De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 15 de septiembre de 2023

Fdo.:

ÍNDICE

RESUMEN.....1

ABSTRACT.....1

INTRODUCCIÓN.....2

MATERIALES Y MÉTODOS.....5

RESULTADOS.....10

DISCUSIÓN.....16

CONCLUSIONES.....19

AGRADECIMIENTOS.....19

REFERENCIAS.....19

ANEXOS.....27

RESUMEN

Los mecanismos de formación de pareja son un tema central de estudio en biología evolutiva. Los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) juegan un papel esencial en la activación del sistema inmunológico de los vertebrados y, por tanto, podrían desempeñar funciones importantes durante la formación de pareja, debido a los beneficios genéticos que puede conferir a la descendencia. En este estudio, usando como especie modelo el papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*), un pequeño paseriforme migrador, se investigan los patrones de apareamiento social y en contextos extra pareja (EP) durante dos ciclos de reproducción consecutivos (2005 y 2006). El objetivo es testar si la formación de pareja en ambos contextos (social y extra pareja) está basada en la composición de MHC. Es decir, si los individuos basan su elección en la complementariedad genética de la pareja y/o intentar maximizar la diversidad genética de la prole emparejándose con machos con gran diversidad genética a nivel de MHC. Si la paternidad extra pareja es un mecanismo para eludir las restricciones de formación de la pareja social, además, sería esperable que las preferencias de las parejas sociales y extra pareja difieran. Para confirmar que el MHC es el rasgo bajo selección, independientemente de la composición genética general de los individuos, todos los individuos fueron genotipados con microsatélites supuestamente neutrales, usados como un proxy de la diversidad general a nivel de genoma, y los patrones de elección a nivel de estos marcadores también analizados. Encontramos que, socialmente, los individuos no se diferenciaron genéticamente de lo esperado por azar en ninguno de los dos años estudiados. En contextos EP, los machos extra pareja tuvieron más diversidad a nivel de genoma que lo esperado por azar en 2005, al contrario que en el año 2006, en el que también se halló que las parejas fueron más próximas genéticamente. Nuestros resultados sugieren, por tanto, que los mecanismos de formación de pareja son contexto dependiente, pudiendo variar entre los ámbitos sociales y extra pareja, así como en función de las condiciones ecológicas en el momento del emparejamiento.

Palabras clave: complejo principal de histocompatibilidad, selección sexual, formación de pareja, paternidad extra pareja, contexto-dependiente, complementariedad genética, buenos genes, heterocigosidad, papamoscas cerrojillo.

ABSTRACT

Mate choice mechanisms are a central topic of study in evolutionary biology. Major histocompatibility complex (MHC) genes play an essential role in activating the immune system

of vertebrates and, therefore, could play important functions during pair formation due to the genetic benefits they can confer on offspring. In this study, using the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*), a small migratory passerine, as a model species, the patterns of social mating and extra-pair (EP) contexts are investigated during two consecutive breeding seasons (2005 and 2006). We aim to test whether pair formation in both contexts (social and extra-pair) is based on the composition of MHC. That is, if individuals mated based on the genetic complementarity of the couple or try to maximize the genetic diversity of the offspring by mating with males with high genetic diversity at the MHC level. If extra-pair paternity is a mechanism for circumventing social formation constraints, we expect social and extra-pair pairing patterns to differ. To confirm that MHC is the trait under selection, regardless of the overall genetic composition of individuals, all individuals were genotyped with supposedly neutral microsatellites, used as a proxy for overall genome-wide diversity, and choice patterns at these markers were also analyzed. We found that, socially, individuals did not differ genetically from what was expected by chance in any of the two years studied. At extrapair contexts, extra-pair males had more diversity at a neutral level than expected by chance in 2005, unlike in 2006, in which it was also found that the pairs were more genetically close. Our results suggest, therefore, that pair formation mechanisms are context-dependent and can vary between social and extrapair settings, as well as depending on the ecological conditions at the time of pairing.

Keywords: major histocompatibility complex, sexual selection, mate choice, extrapair paternity, context-dependent, genetic complementarity, good genes, heterozygosity, pied flycatcher.

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de formación de pareja son un tema central de estudio en biología evolutiva (Milinski et al., 2005; Consuegra & Garcia de Leaniz, 2008; Eizaguirre et al., 2009; Agbali et al., 2010). A pesar de haber sido investigados durante décadas, aún son objeto de controversia, principalmente, por las dificultades que conlleva cuantificar costes y beneficios evolutivos del proceso de formación de pareja (Prokop et al., 2012; Forstmeier et al., 2014). Dificultades que son aún mayores debido a la ocurrencia de paternidad extra pareja (EPP, a partir de ahora) en muchos taxones (Coleman & Jones, 2011; Griffith et al., 2002; Uller & Olsson, 2008). La teoría de la selección sexual propone que el éxito reproductivo de los machos se maximiza apareándose con el número máximo de hembras posible, mientras que las hembras deberían seleccionar a parejas que proporcionen los mejores recursos o genes, proporcionando así

recursos directos o indirectos en la descendencia, respectivamente (Bateman, 1948). No obstante, la naturaleza de estos beneficios y cómo pueden mantenerse en la población aún son cuestiones discutidas (Kempenaers, 2007; Mays et al., 2008; Mays & Hill, 2004).

El complejo principal de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*, MHC de ahora en adelante) (Yamazaki et al., 1976) establece una parte muy importante del sistema inmune de los vertebrados. Se divide principalmente en dos grupos de genes, MHC clase I y clase II. Los genes de MHC clase I codifican proteínas intracelulares para alertar al sistema inmune de la presencia de un patógeno o péptido extraño en el interior de la célula. Los genes de MHC clase II presentan estas proteínas a las células T para desencadenar una respuesta inmune específica contra patógenos mayoritariamente extracelulares (Glynn, 1988; Janeway, 2001). Aunque existen genes del MHC en todos los vertebrados y su estructura molecular se encuentra conservada en mayor o menor medida, el número de loci y la extensión del polimorfismo de este pueden variar intra e interespecíficamente (Flajnik & Kasahara, 2001). Hay evidencia de que la composición de MHC puede evaluarse (in)directamente mediante rasgos dependientes de la condición (Jäger et al., 2007) o por el olfato (Milinski et al., 2005). Así, asumiendo que distintas combinaciones de alelos del MHC conducen a diferencias en la eficacia biológica, sería esperable que los individuos basen su formación de pareja en la composición del MHC con el objetivo de mejorar la eficacia biológica de la descendencia (Piertney & Oliver, 2006; Sommer, 2005)

Existen varias hipótesis sobre la formación de pareja en base a la composición genética, pero las más aceptadas son la hipótesis de “buenos genes” (Hamilton & Zuk, 1982) y la hipótesis de compatibilidad (Zeh & Zeh, 1996, 1997). De acuerdo con la hipótesis de buenos genes, las hembras podrían obtener ventajas al seleccionar compañeros que presenten alelos específicos o una diversidad genética (heterocigosidad) elevada. Esta selección mejoraría la eficacia biológica de la descendencia, por ejemplo, al conferir resistencia a un mayor rango de patógenos o mejor adaptabilidad a condiciones ambientales variables (Byers & Waits, 2006). Por otro lado, la hipótesis de compatibilidad genética propone que los individuos deberían seleccionar la composición genética de la pareja en función de la composición genética propia (Zeh & Zeh, 1996, 1997; Penn et al., 2002; Agbali et al., 2010). Así, por ejemplo, las hembras podrían preferir machos con un nivel intermedio de similitud genética, en lugar de un nivel máximo o mínimo (Juola & Dearborn, 2012). Ambas hipótesis, que no son mutuamente excluyentes, postulan que la hembra tiene la capacidad de valorar la calidad genética o compatibilidad de los machos candidatos, usando posiblemente múltiples señales. No obstante, estas teorías muestran una diferencia notable, ya que la hipótesis de buenos genes asume que todas las hembras en la población mostrarán preferencia por los mismos machos, mientras que, según la hipótesis de la

compatibilidad genética, las preferencias femeninas serán contingentes a su propio genotipo (Zeh & Zeh, 1996).

El avance de las técnicas moleculares ha ampliado la comprensión del rol de los genes del MHC en la selección de la pareja (Baratti et al., 2012; Huchard et al., 2013; Rekdal et al., 2019). Algunos estudios han asociado la formación de pareja con alelos del MHC específicos (Griggio et al., 2011), con la diversidad del MHC del macho (Richardson et al., 2005), con la similitud genética de la pareja (Forsberg et al., 2007; Schwensow et al., 2008; Eizaguirre et al., 2009; Juola & Dearborn, 2012; Bichet et al., 2014), o no encontraron evidencia de formación de pareja basada en MHC (Westerdahl, 2004). Sin embargo, el impacto de este sistema en la selección sexual no se encuentra claramente definido, especialmente en taxones como los paseriformes, donde el MHC a menudo exhibe duplicaciones de genes y pseudogenes. Adicionalmente, la existencia de EPP en las aves en general y paseriformes en particular (Griffith et al., 2002), si bien proporciona una buena oportunidad para examinar los beneficios genéticos de la formación de pareja, también le añade complejidad a este panorama. La existencia de paternidad con parejas distintas a la pareja social (parejas extra-pareja, EP, de ahora en adelante) puede constituir una estrategia para eludir las limitaciones de la formación inicial de la pareja y mejorar la calidad genética de la descendencia (Akçay & Roughgarden, 2007; Forstmeier et al., 2014), de modo que los patrones de formación de EP podría solapar o ser diferente de los patrones de formación de pareja social. Por ejemplo, el MHC podría mediar la elección de individuos con los que tener EPP, pero no la elección de pareja social. No obstante, el papel del MHC en la ocurrencia de EPP ha sido escasamente investigada (Bichet et al., 2014; Gohli et al., 2013; Juola & Dearborn, 2012; Richardson et al., 2005), por lo que la función evolutiva del sistema en la formación de pareja aún está lejos de ser totalmente entendida. Además, la mayoría de los estudios han investigado el MHC a nivel de alelos (revisado en Bernatchez & Landry, 2003) y estos pueden no ser tan buenos indicadores de la capacidad de los individuos para hacer frente a múltiples patógenos. Esto es porque la diversidad funcional tanto dentro de los loci (grado de heterocigosidad) como entre los loci puede jugar un papel significativo en la respuesta inmune (Schwensow et al., 2019). Así, un enfoque más eficiente para estudiar las consecuencias de la diversidad del MHC en la respuesta inmune es la agrupación de alelos en supertipos en base a su similitud (Naugler & Liwski, 2008) y considerar estos supertipos como la unidad de selección (Sette & Sidney, 1998; Reche & Reinherz, 2007).

En este estudio se investigan los patrones de apareamiento social y extra pareja durante dos ciclos de reproducción consecutivos (2005 y 2006) con el objetivo de testar si la formación de pareja en dichos contextos está basada en la composición de MHC. Para ello, se usa como especie de estudio el papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*, Pallas 1764), un paseriforme migrador transahariano de pequeño tamaño. La existencia de EPP es común en la especie, con

porcentajes de crías extra pareja que varían entre el 4 al 24% en las poblaciones europeas (Rätti et al., 2001) y, que se encuentran en torno al 20% en la población de estudio (Canal et al., 2012). Así, el papamoscas cerrojillo se erige como una especie idónea para explorar los mecanismos subyacentes en la formación de pareja. En concreto, predijimos i) una formación de pareja no aleatoria basada en la composición MHC de los individuos en contextos sociales y/o EP. ii) Socialmente, las hembras podrían basar su elección en la complementariedad genética de la pareja o intentar maximizar la diversidad genética de la prole emparejándose con machos con gran diversidad genética a nivel de MHC. iii) Si la paternidad EP es un mecanismo para eludir las restricciones de elección social, esperamos que las preferencias de pareja sociales y EP difieran. Para confirmar que el MHC es el rasgo bajo selección, independientemente de la composición genética general de los individuos, todos los individuos fueron genotipados con microsatélites supuestamente neutrales (usados como un proxy de la diversidad general a nivel de genoma) y los patrones de elección a nivel de estos marcadores también analizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especie de estudio y trabajo de campo

El papamoscas cerrojillo es una especie que exhibe dimorfismo sexual en la época de cría, cuando el macho presenta un plumaje negro y blanco, que tras la muda otoñal pasa a ser marrón similar a las hembras. Ambos sexos tienen distintivas manchas blancas en la cola y las alas (Lundberg & Alatalo, 1992). Realiza la invernada en la zona subtropical del oeste de África, y en los períodos reproductivos se establece en Europa occidental, oriental y suroeste de Siberia, predominantemente en bosques húmedos de robles y coníferas donde es muy frecuente encontrar agujeros naturales en los troncos de los árboles (Lundberg & Alatalo, 1992). Los machos de esta especie llegan a las áreas de reproducción antes que las hembras (Potti & Montalvo, 1991a; Canal et al., 2012), establecen un territorio e intentan atraer a una hembra (Lundberg & Alatalo, 1992).

El estudio se llevó a cabo en época de reproducción durante los años 2005 y 2006 como parte de un estudio a largo plazo (iniciado en 1984) de una población de papamoscas cerrojillo que cría en cajas nidos en la localidad de La Hiruela, Madrid (ca. 41°4'42" N, 3°25'55" W, 1200-1300m a.s.l.). El protocolo de campo se ha descrito detalladamente en otros trabajos (Canal et al., 2011; Camacho et al., 2013). Todas las cajas nido se revisaron de manera regular para determinar la fecha de puesta, el tamaño de esta (normalmente entre 5-6 huevos), la fecha de eclosión y el número de volantones. Las aves adultas se capturaron con trampas colocadas en las cajas nido cuando alimentaban a las crías. Los adultos capturados fueron marcados de manera individual

con una anilla metálica numerada, pesados, se dató su edad y se tomaron varias medidas morfométricas (ej. longitud de tarso, ala). Los pollos fueron anillados, medidos (longitud del tarso) y pesados a los 13 días de edad. Se tomaron muestras de sangre de todos los individuos mediante punción en la vena braquial. Las muestras de sangre se conservaron en etanol y, posteriormente, fueron guardadas en congeladores.

Análisis de paternidad

El conjunto de datos para este trabajo incluyó 45 y 44 parejas reproductoras en los años 2005 y 2006 respectivamente. El ADN de las muestras de sangre se extrajo con cloruro de litio (Sambrook et al., 1989). Todos los individuos se genotiparon con 15 microsatélites f3-60, f1-25 (Abercrombie et al., 2009), fhy 216, fhy 237, fhy 301, fhy 304, fhy 310, fhy 329, fhy 339, fhy 356, fhy 361, fhy 401, fhy 444, fhy 466 and fhy 236 (Leder et al., 2008). Los análisis de paternidad para detectar relaciones extra-pareja se realizaron en CERVUS 3.0 (Marshall et al., 1998) mediante el uso de un método de máxima verosimilitud. Se consideró que un macho era el padre genético cuando tenía una puntuación LOD (logaritmo natural de la verosimilitud) con un pollo mayor que el valor crítico (que se calcula con CERVUS a través de simulaciones de análisis de parentesco) y un 95% de confianza. Un pollo se considera procedente de cópulas extra-pareja cuando el padre más probable no era el padre social, es decir, el macho capturado cebando en el nido (más detalles sobre los protocolos moleculares y características de los loci y análisis asociados en Canal et al., 2011, 2014). En este estudio se detectaron 19 y 12 nidos con pollos procedentes de cópulas extra-pareja en 2005 y 2006 respectivamente.

Genotipado del MHC clase II

Los 144 individuos (72 machos y 72 hembras) también se examinaron a nivel de los genes del MHC clase II B. Estos genes codifican una de las subunidades de las moléculas dímeras del MHC clase II B que juegan un papel crítico en la vigilancia del entorno extracelular. Los individuos fueron genotipados en el segundo exón de esta familia multigénica, ya que codifica la parte de la ranura de unión al antígeno más relacionada con los procesos de coevolución patógeno-huésped. Se utilizaron los Primers MHCIIFiHy-E2CF y MHCIIFiHy-E2CR, ubicados en la unión intrón-exón 2, por lo que se pudo amplificar toda la región codificante del exón 2 (270 pb; más detalles en Canal et al., 2010).

Se realizó pirosecuenciación bidireccional en un pirosecuenciador 454/ GS-FLX (Roche). Antes de la pirosecuenciación, cada individuo fue marcado con los GS Junior Titanium Fusion Primers, una cola universal (proporcionada por Roche) y un MID (identificador individual) de 10 pb que permite asignar secuencias dentro de los individuos (estructura de primers: 5'- GS Junior Titanium Fusion Primers -Tag - Cola universal - Primers *Ficedula hypoleuca* - amplicones - 3'). Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µL que contenían 1x tampón suministrado por el fabricante (Bioline), 2.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de cada dNTP, 1 U de Taq Polimerasa, 0.2 µM de cada primer, 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), 10 µg de albúmina sérica bovina (BSA) (Amersham Corp.) y 25 ng de ADN como plantilla. Las amplificaciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 23 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a una temperatura de hibridación de 56°C y 40 segundos a 72°C, más una extensión final de 10 minutos a 72°C. Las PCRs se corrieron con un número reducido de ciclos y tiempos de elongación prolongados para disminuir el riesgo de formación de quimeras (Lenz y Becker 2008). Para obtener una cuantificación precisa de los productos de PCR, el ADN se cuantificó por fluorometría y se usó el kit de ensayo Quant-iT Picogreen dsDNA (Invitrogen, San Diego, CA). Los amplicones se agruparon en cantidades aproximadamente equimolares, se purificaron mediante AMPure, se amplificaron mediante amplificación clonal basada en emulsión (emPCR) y se secuenciaron. La purificación, amplificación y secuenciación se llevaron a cabo con los protocolos proporcionados por Roche.

Cuando se aplican tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, es común obtener un gran número de artefactos. Por lo tanto, se llevó a cabo un protocolo por etapas (similar al descrito en Garamszegi et al., 2018) para distinguir los alelos reales de los artefactos. En primer lugar, se eliminaron las variantes que no coincidían con el tamaño de alelo esperado, aparecían una única vez dentro del conjunto de secuencias y/o se encontraron en menos de dos individuos de la población (Galan et al., 2010; Sepil et al., 2012). Segundo, se excluyeron los individuos con baja cobertura, <200 lecturas, que es el doble del número mínimo estimado de secuencias requeridas para genotipificar de manera confiable el número de loci expresados (n=6) encontrados en la especie de estudio (Galan et al., 2010; Sepil et al., 2012). Tercero, se utilizó el software GENEIOUS (Kearse et al., 2012) para filtrar las quimeras que se originaron por recombinación in vitro entre alelos verdaderos (Lenz & Becker, 2008; Galan et al., 2010). Para ello, las secuencias se agruparon dentro de los individuos por similitud, lo que permitió detectar fácilmente las quimeras, ya que típicamente aparecen en forma de pequeños grupos de secuencias entre los dos grandes grupos de secuencias correspondientes a los alelos putativos que las originan. En cuarto lugar, se tradujeron las secuencias para verificar que fueran funcionales (por ejemplo, sin codones de parada) y se comprobó visualmente que las variantes estuvieran ubicadas en sitios polimórficos. Cuando las secuencias de nucleótidos diferían debido a sustituciones sinónimas, se

consideró que eran los mismos alelos. Por último, los genotipos de 12 individuos se duplicaron (es decir, se amplificaron en PCR independientes, se secuenciaron con códigos de barras distintos y se analizaron a ciegas), y no se encontró discrepancias entre sus genotipos. Además, la cobertura y el número de alelos encontrados en un individuo no estuvieron relacionados (correlación de Pearson: $r=0.11$, $p=0.12$), lo que sugiere que, en conjunto, los resultados obtenidos tras el genotipado son fiables. Dicho esto, es posible que aun queden algunos artefactos entre las secuencias incluso después de realizar todos los pasos anteriores. Sin embargo, es improbable que los artefactos sesguen las conclusiones obtenidas, ya que, por ejemplo, es razonable suponer que individuos con paternidad extra-pareja no tienen más probabilidades de generar artefactos que los demás.

Además del número de alelos, también se estimó el número de supertipos (agrupaciones de alelos basados en su similitud funcional) de cada individuo. Para agrupar los alelos en supertipos se siguió el método descrito por Doytchinova & Flower (2005). De forma breve, se identificaron las regiones que corresponden a los sitios de unión de antígenos (ABS), los cuales son secuencias codificantes que se caracterizan por estar bajo selección positiva, lo que resulta en un exceso de sustituciones no sinónimas (dN) sobre las sinónimas (dS). Las relaciones dN/dS se determinaron en MEGA 4.1 a través de un método Nei-Gojobori modificado con corrección de Jukes-Cantor, se corroboraron estadísticamente con pruebas Z en MEGA 4.1. Tras la identificación de los sitios con selección positiva, cada aminoácido fue descrito por cinco variables que representan propiedades físico-químicas involucradas en las regiones de unión de péptidos en un locus específico o en una serie de loci: z1 (hidrofobicidad) z2(volumen estérico), z3 (polaridad), z4 y z5(efectos electrónicos). La matriz de datos resultante se sometió a un análisis de agrupamiento por el método de k-means. Finalmente, en la población de estudio se detectaron 14 supertipos.

Estimaciones de la diversidad genética individual y similitud entre individuos

Como medidas a nivel de genoma de diversidad genética individual, se usó la homocigosidad por loci (HL, en la que tener valores elevados implica mayor homocigosis) ya que, en poblaciones abiertas, esta estimación se correlaciona mejor con la homocigosidad en todo el genoma que otros estimadores de heterocigosidad (Aparicio et al., 2006). Como medida de diversidad genética individual a nivel de MHC, se utilizó el número de supertipos de cada individuo (Naugler & Liwski, 2008).

A nivel de parejas, se estimó el grado de similitud genética a nivel de genoma entre individuos (coeficiente de relatedness) con el programa ML-Relate (Kalinowski et al., 2006). A nivel MHC, se calculó un índice basado en la proporción de supertipos, (PD supertipos, en

adelante) compartidos entre las parejas (supertipos compartidos frente a supertipos no compartidos). Para ello se usó la fórmula $PD = V_{ab}/(F_a + F_b)$ donde V_{ab} es el número total de supertipos en la pareja (los supertipos compartidos se cuentan como 1), F_a y F_b son el número de supertipos en el individuo a y b respectivamente ($PD=0$ significa que no hay supertipos compartidos entre las parejas (Strandh et al., 2012).

Análisis estadísticos

Primero investigamos si la formación de pareja sociales y extra-pareja es aleatoria o, por el contrario, se basa en características genéticas. Para ello, utilizamos un procedimiento de remuestreo (bootstrapping) para construir una distribución de cada estimador genético (HL, número de supertipos, PD supertipos, y relatedness), utilizando los datos de la población real. Los remuestreos se replicaron 1000 veces y se realizaron con reemplazamiento e independientemente para cada año de estudio. En cada réplica se constituyó aleatoriamente el mismo número de parejas muestreadas en el año analizado (45 parejas en 2005 y 44 parejas en 2006) a partir del grupo de individuos de la población de ese año. A continuación, se calcularon las medias de los estimadores genéticos tanto de las parejas de reproducción reales como de las obtenidas en cada simulación (es decir, 1000 medias por cada año). Después, las medias de las réplicas se ordenaron de menor a mayor y se determinó la posición que toma la media real en relación a las obtenidas en las réplicas. Este proceso se repitió para cada estimador genético. Podría suceder que las parejas se forman en base un nivel intermedio de similitud. En ese caso, la media de las parejas no sería significativa, pero las parejas reales tendrían una varianza menor que la encontrada en las réplicas. Para analizar esta posibilidad, además de la media, se analizó la varianza de cada estimador genético respecto a las distribuciones generadas por bootstrapping.

Para crear las distribuciones aleatorias en contextos extra-pareja se usaron estimadores genéticos individuales (HL del macho, número de supertipos del macho) y de parejas (PD supertipos y relatedness) mientras que, para el contexto social, solo se usaron estimadores genéticos a nivel de pareja (PD supertipos y relatedness). Esto se debe a que nuestra base de datos está constituida completamente por parejas que criaron en cajas nido, por tanto, no había ningún individuo capturado que no tuviese pareja social.

Además del bootstrapping, para explorar los mecanismos de elección extra-pareja, realizamos tres análisis adicionales usando las estimas de similitud genética a nivel de pareja: 1) Utilizamos pruebas de t-student pareadas para comparar directamente las estimaciones de similitud genéticas (relatedness y PD a nivel supertipos) del macho social y el macho extra-pareja respecto a una hembra focal. 2) Comparamos si la media y varianza de esos estimadores genéticos del grupo de machos sociales diferían de las del grupo de machos extra-pareja con pruebas de t-

student y pruebas de Levene, respectivamente. 3) Analizamos si las hembras con y sin EPP diferían en su parentesco genético con sus parejas sociales. Para ello, usamos un modelo lineal generalizado (GLM, distribución binomial) con la probabilidad de tener EPP en un nido (0,1) como variable dependiente, los estimadores genéticos de la pareja (relatedness y PD supertipos) e individuales (HL y supertipos) como variables explicativas y el año como factor fijo (para tener en cuenta el papel de la heterogeneidad ambiental entre los dos años de estudio en los casos de EPP). Por último, corrimos un modelo lineal generalizado (GLM, distribución binomial) para 4) analizar si la probabilidad de obtener EPP (0-1) estaba relacionada con su diversidad genética individual del macho extra-pareja. En este modelo, se incluyeron las estimaciones genéticas individuales (HL y supertipos) como variables explicativas y el año como factor fijo.

Previo a interpretación de cualquier modelo se realizaron estadísticos diagnósticos de distribución de residuos para evitar resultados erróneos debidos a artefactos estadísticos. Los resultados de estos no indicaron ninguna desviación evidente de los supuestos de los modelos lineales. Para realizar el bootstrapping se usó la función de muestreo con reemplazo en R versión 4.0.3 (R Core Team 2020). Para las pruebas pareadas se utilizó el paquete car (3.1-0) (Weisberg & Fox, 2011) los modelos lineales se usó el paquete lme4 (versión 1.1-30) (Bates et al., 2015), y para los gráficos el paquete ggplot2 (versión 3.4.2) (Wickham, 2009).

En total, se realizaron 48 tests para investigar la formación de parejas sociales y extra-pareja (en cada contexto se consideraron 2 años de estudio y la media y varianza de 4 estimadores genéticos, así como test pareados, Levene y GLM). Por ello, para evaluar la estructura de dependencias y descartar falsos positivos, se aplicó la corrección de Benjamini-Yekutieli a todos los test (Benjamini & Yekutieli, 2001). Tras ello, el nivel de significación se ajustó a $p < 0.011$.

RESULTADOS

Valores reales y distribuciones aleatorias (bootstrapping)

Tras aplicar la corrección de Benjamini-Yekutieli, ni las medias ni las varianzas de las parejas sociales difirieron en ninguno de los parámetros genéticos respecto a lo esperado por azar en ninguno de los años estudiados (tabla 1). No obstante, en el contexto de la paternidad extra-pareja, la media del HL de los machos fue significativamente más alta (es decir, machos más homocigotos) que la esperada por azar en el año 2005, mientras que, en 2006, encontramos lo contrario, ya que los machos extra-pareja tuvieron una mayor heterocigosidad (HL) y un coeficiente de relatedness menor que el esperado por azar. Respecto a las varianzas, en 2005, los

machos extra-pareja tuvieron una mayor varianza en la heterocigosidad que lo esperado por azar. En 2006, la varianza en el coeficiente de relatedness y proporción de supertipos compartidos con los machos extra-pareja fue menor de lo esperado por azar, pero la varianza en el número de supertipos del macho extra pareja fue mayor de lo esperado.

Tabla 1: Resultado del remuestreo (1000 réplicas) con reemplazo para los años 2005 y 2006 tanto en contextos de formación de pareja social como extra-pareja. Posición de la media y varianza real de cada estimador genético respecto a las obtenidas en las réplicas y p valor asociado. HL (homocigosidad neutral a nivel individual), PD supertipos (proporción de supertipos de MHC compartidos), relatedness (grado de similitud genética neutral entre individuos) y supertipos (número de supertipos compartidos). Los resultados significativos después de la corrección de Benjamini-Yekutieli ($p < 0.011$) se muestran en negrita con un asterisco (*).

	Medias						Varianzas					
	2005			2006			2005			2006		
	Valor	Pos.	P	Valor	Pos.	P	Valor	Pos.	P	Valor	Pos.	P
Parejas sociales												
Relatedness	0.035	837	0.163	0.057	87	0.087	0.003	824	0.176	0.011	36	0.036
PD supertipos	0.683	905	0.095	0.703	338	0.338	0.005	820	0.18	0.004	961	0.039
Extra pareja												
Relatedness	0.028	958	0.042	0.02	999	0.001*	0.002	945	0.055	0.001	1000	0.001*
PD supertipos	0.693	683	0.317	0.686	847	0.153	0.01	18	0.018	0.003	997	0.003*
HL Macho	0.211	1	<0.001*	0.134	1000	<0.001*	0.014	1	<0.001*	0.005	912	0.088
Supertipos Macho	6.692	347	0.347	6	970	0.03	1.731	278	0.278	2.75	1	<0.001*

Parejas sociales y extra pareja

Los test pareados no mostraron diferencias significativas entre los machos sociales y extra-pareja en la media o varianza de ninguno de los parámetros genéticos analizados, ya sea a nivel individual o de similitud genética entre parejas, ni en ninguno de los dos años estudiados (tabla 2).

Tabla 2: Test de la T y test de Levene que analizan las diferencias genéticas entre el macho y hembra social y extra-pareja, en los años 2005 y 2006. HL (homocigosidad neutral a nivel individual), PD supertipos (proporción de supertipos de MHC compartidos), relatedness (grado de similitud genética neutral entre individuos) y supertipos (número de supertipos compartidos). Para más detalles ver la sección de métodos. Los resultados significativos después de la corrección de Benjamini-Yekutieli ($p < 0.011$) se muestran en negrita con un asterisco (*).

	t-student			Levene		
2005	t	df	p	F	df	Pr(>F)
Relatedness Pareja Social vs. Pareja EPP	0.732	25	0.471	0.754	1	0.389
HL Macho social vs Macho EPP	0.258	27	0.799	0.879	1	0.353
HL Hembra social vs. Hembra EPP	-1.762	28	0.089	0.07	1	0.792
PD supertipos Pareja Social vs. Pareja EPP	-0.252	14	0.805	0.127	1	0.724
Supertipos Macho social vs. Macho EPP	-0.343	18	0.736	0.729	1	0.398
Supertipos Hembra social vs. Hembra EPP	-1.044	25	0.306	2.048	1	0.158
2006						
Relatedness Pareja Social vs. Pareja EPP	1.697	16	0.109	3.039	1	0.091
HL Macho social vs Macho EPP	-0.127	16	0.901	1.146	1	0.292
HL Hembra social vs. Hembra EPP	-0.821	14	0.425	0.089	1	0.768
PD supertipos Pareja Social vs. Pareja EPP	1.25	10	0.234	0.607	1	0.444
Supertipos Macho social vs. Macho EPP	-0.329	11	0.748	0.444	1	0.511
Supertipos Hembra social vs. Hembra EPP	0.512	8	0.622	0.227	1	0.638

Modelos lineales generalizados

Se llevaron a cabo dos GLM con el objetivo de profundizar en la comprensión de la dinámica de formación de pareja, tanto dentro del contexto social como extra-pareja. Los análisis revelaron que las hembras con y sin EP no presentaron diferencias significativas en términos de parentesco genético con sus respectivas parejas sociales, ni tampoco estuvieron relacionadas con los estimadores genéticos individuales del macho social (ver tabla 3.1). Desde la perspectiva del macho social, los resultados de este modelo implican que perder paternidad en el nido no estuvo relacionado con sus características genéticas (HL y número de supertipos de MHC). La probabilidad de adquirir EPP (tabla 3.1) de los machos tampoco estuvo relacionada con su diversidad genética individual. Sin embargo, en el segundo modelo (tabla 3.2) se encontró un efecto marginalmente significativo del año, indicando una menor incidencia de EPP en el año 2006.

Tabla 3.1: Modelo lineal generalizado que analiza la probabilidad de tener paternidad extra-pareja en un nido (0,1) como variable dependiente. En este modelo se incluyeron las estimaciones genéticas de la pareja como PD supertipos (proporción de supertipos de MHC compartidos) y relatedness (grado de similitud genética neutral entre individuos), y las individuales como HL (homocigosidad neutral a nivel individual) y supertipos (número de supertipos compartidos) como variables explicativas y el año como factor fijo. Los resultados significativos después de la corrección de Benjamini-Yekutieli ($p < 0.011$) se muestran en negrita con un asterisco (*).

Variables predictoras	Estimador	Std. Error	z value	P
Intercepto	-368.00	101.00	-0.004	0.997
HL macho	-5.52	8.04	-0.687	0.492
Supertipos macho	0.67	1.43	0.465	0.642
PD supertipos	37.80	44.50	0.848	0.396
Relatedness	-23.30	35.50	-0.658	0.511
Año	18.40	5010.00	0.004	0.997

Tabla 3.2: Modelo lineal generalizado que analiza la probabilidad de ganar paternidad extra-pareja (0,1) de los machos. En este modelo se incluyeron las estimaciones genéticas individuales como HL del macho (homocigosidad neutral a nivel individual) y supertipos del macho (número de supertipos compartidos) como variables explicativas y el año como factor fijo. Los resultados significativos después de la corrección de Benjamini-Yekutieli ($p < 0.011$) se muestran en negrita con un asterisco (*).

Variables predictoras	Estimador	Std. Error	z value	P
Intercepto	1958.843	1033.188	1.896	0.058
HL macho	3.088	2.981	1.036	0.300
Supertipos macho	0.356	0.208	1.715	0.086
Año	-0.979	0.515	-1.899	0.058

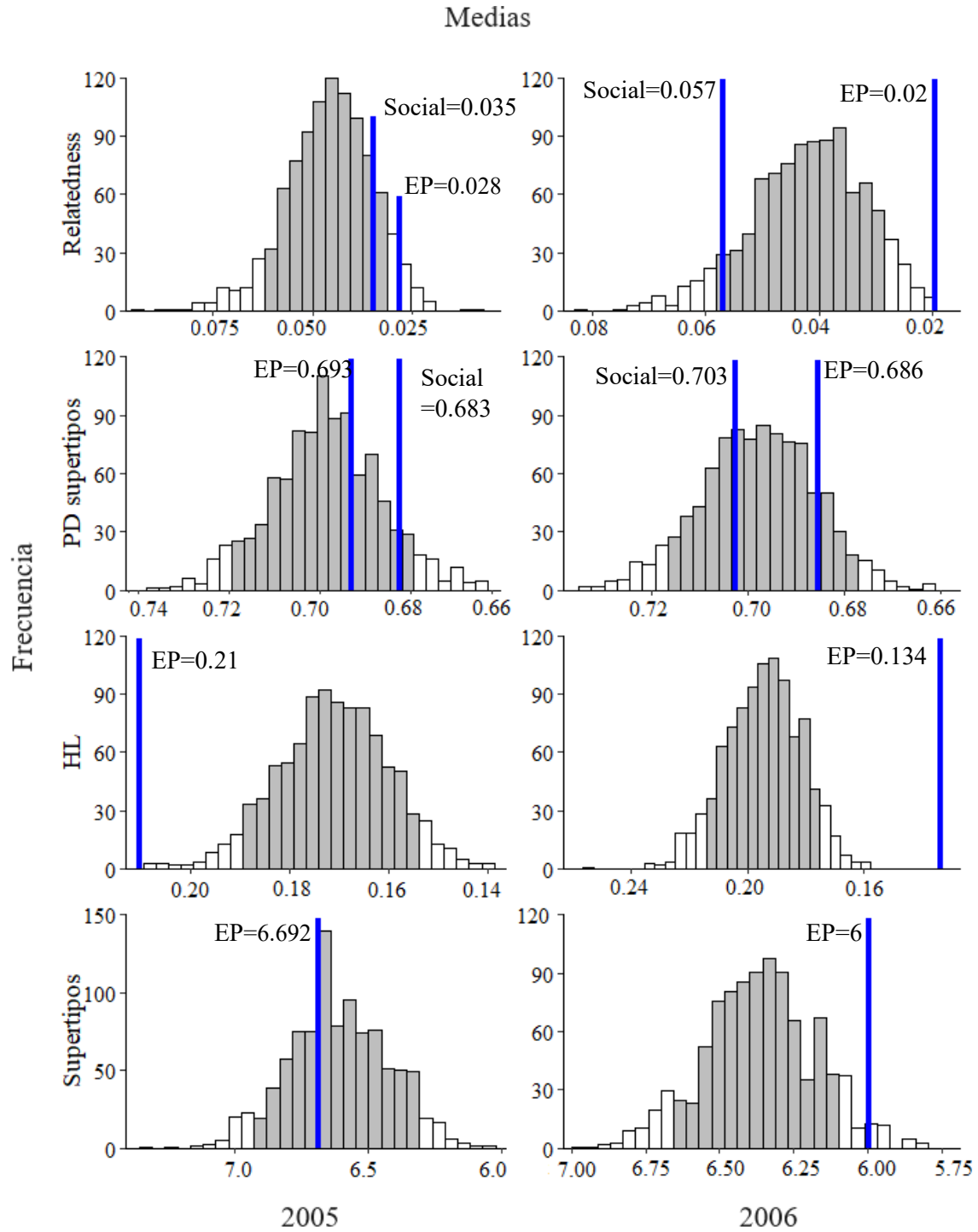


Figura 1: Histograma de las medias de los parámetros genéticos obtenidos tras un remuestreo (1000 réplicas) con reemplazo para los años 2005 y 2006 tanto en contextos de formación de pareja social como extra-pareja. Posición de la media y varianza real de cada estimador genético respecto a las obtenidas en las réplicas y p valor asociado. HL (homocigosidad neutral a nivel individual), PD supertipos (proporción de supertipos de MHC compartidos), relatedness (grado de similitud genética neutral entre individuos) y supertipos (número de supertipos compartidos). Nótese que para HL y supertipos (estimadores individuales) no se hace el bootstrapping del contexto social (ver texto principal).

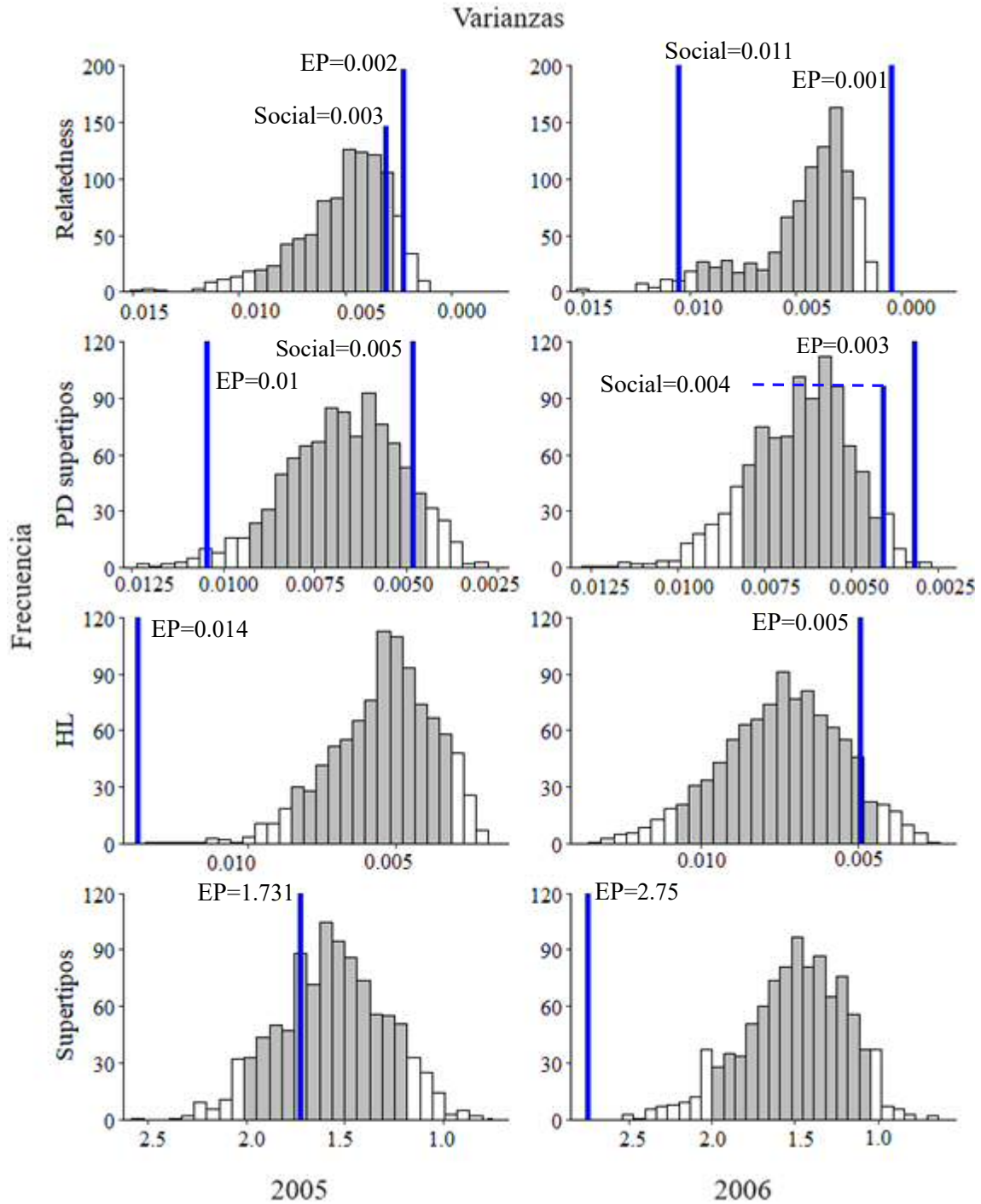


Figura 2: Histograma de las varianzas de los parámetros genéticos obtenidos tras un remuestreo (1000 réplicas) con reemplazo para los años 2005 y 2006 tanto en contextos de formación de pareja social como extra-pareja. Posición de la media y varianza real de cada estimador genético respecto a las obtenidas en las réplicas y p valor asociado. HL (homocigosidad neutral a nivel individual), PD supertipos (proporción de supertipos de MHC compartidos), relatedness (grado de similitud genética neutral entre individuos) y supertipos (número de supertipos compartidos). Nótese que para HL y supertipos (estimadores individuales) no se hace el bootstrapping del contexto social (ver texto principal).

DISCUSIÓN

Durante dos temporadas reproductivas investigamos en una población natural de papamoscas cerrojillo si los patrones de emparejamiento estaban relacionados con las características genéticas de los individuos a distintos niveles (MHC y loci neutrales) y contextos (social y extra-pareja). Los patrones de emparejamiento difirieron tanto entre contextos como entre años. A diferencia de los patrones sociales, los emparejamientos extra-pareja variaron en diversos estimadores genéticos respecto a lo esperado por azar. Entre años, los patrones a nivel extra-pareja también variaron, ya que, por ejemplo, los machos extra-pareja fueron menos diversos de lo esperado por azar en 2005, mientras que, en 2006, fueron más diversos. En general, parece que el MHC tiene un papel menor comparado con la diversidad genética global de los individuos (estimada mediante loci neutrales) en los patrones de emparejamiento tanto social como a nivel extra-pareja.

Nuestros resultados sugieren que los mecanismos que gobiernan los patrones de formación de pareja son contexto dependientes (Schmoll, 2011). Factores ecológicos, como la sincronía reproductiva, han sido tradicionalmente sugeridos como principales impulsores de la formación de pareja, especialmente en contextos de paternidad extra-pareja (Stutchbury & Morton, 1995; Westneat & Sherman, 1997). Estudios previos sugieren que la sincronía reproductiva puede aumentar la tasa de encuentro entre posibles parejas y así facilitar la formación de pareja (Stutchbury & Morton, 1995), mientras que otros sugieren lo contrario, es decir, que la sincronía puede limitar la formación de pareja al reducir el tiempo efectivo para encontrar machos y compararlos (Canal et al., 2012). En el papamoscas cerrojillo, donde las hembras visitan y comparan varios machos antes del apareamiento (Slagsvold & Dale, 1996), el nivel de sincronía en el periodo de apareamiento debería afectar los costes de búsqueda de machos y limitar la elección de las hembras. Así, por ejemplo, las hembras que llegan más tarde a los territorios de cría deberían afrontar una mayor limitación a la hora de emparejarse que las que llegan antes de la migración. Esto se debe a que el número de machos sin pareja disminuirá más rápido en etapas intermedias que al principio de la temporada, cuando la mayoría de los machos están sin pareja y el grueso de hembras reproductoras están aún llegando de la migración (Kokko et al., 2006; Canal et al., 2012). Los dos años de estudio (2005 y 2006) exhibieron una sincronía reproductiva muy diferente (Canal et al., 2012). En concreto, el ciclo reproductivo del año 2006 exhibió un alto grado de sincronía en comparación con el año 2005. La alta sincronía llevó a una menor probabilidad de ocurrencia de paternidad extra-pareja durante el año 2006 y, probablemente, también afectó también a los patrones de formación de dichas parejas (Canal et al., 2012), explicando los patrones dispares encontrados entre años. La existencia de grupos genéticos dentro de la población también podría limitar el emparejamiento con el individuo preferido (Bichet et al., 2014). La dispersión natal en nuestra población es baja (en promedio, 600 m para las hembras y

445 m para los machos; (Potti & Montalvo, 1991b) y, por tanto, es posible que la existencia de individuos relacionados en el vecindario afecte la expresión de las preferencias de formación de pareja de las hembras de manera diferente entre años.

En concordancia con trabajos previos, nuestros resultados indican que los mecanismos de formación de la pareja social y a nivel extra-pareja son diferentes (Stutchbury & Morton, 1995; Hasselquist & Sherman, 2001). En concreto, encontramos diferencias en los estimadores genéticos analizados (HL, relatedness, PD supertipos y supertipos, discutido más adelante en el texto) respecto a lo esperado por azar en contextos extra-pareja, pero no en contextos sociales, apoyando así la idea de que tener paternidad extra-pareja puede ser una estrategia adaptativa para eludir las limitaciones experimentadas durante el periodo de elección social (Akçay & Roughgarden, 2007; Westneat & Stewart, 2003).

Los resultados revelan que el MHC parece tener un papel menos importante en los patrones de emparejamiento en comparación con los loci neutrales, que fueron usados como un proxy de la heterocigosidad a nivel de genoma de los individuos. A “nivel de genoma” y extra-pareja los patrones de formación de pareja difieren entre los dos años de estudio. En el año 2005, a nivel de microsatélites, los machos más homocigotos ganan paternidad extra-pareja, sin embargo, las parejas también se forman con machos con una complementariedad genética mayor a nivel de estos marcadores. Esto concuerda con distintas hipótesis que afirman que una mayor diversidad genética puede tener costes como, por ejemplo, asociados a depresión por exogamia (Frankham et al., 2011). El año 2006 parece ser un escenario totalmente distinto en el que se prioriza una menor similitud a nivel de genoma entre individuos, es decir, los machos EP están menos relacionados entre sí con las hembras con las que tienen pareja EP, además, estos machos también son más diversos y más heterocigotos a nivel de genoma que lo esperado por azar. Aunque no se ha analizado en la población de estudio, estos patrones de formación de pareja podrían traducirse en una menor endogamia, y, por tanto, favorecer la aptitud biológica de la descendencia, entre otras cosas reduciendo la posibilidad de expresar mutaciones perjudiciales (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Además, los machos extra-pareja tuvieron una menor varianza en la proporción de supertipos compartidos con las hembras con las que tienen pareja EP, lo que significa que las parejas EP una similitud de MHC parecida. Este resultado podría sugerir que las hembras realizaron una elección similar a nivel de MHC. Sin embargo, dado que un resultado similar se encontró con los estimadores neutrales, es presumible que machos con un nivel parecido de similitud a nivel global del genoma también tengan un nivel parecido de similitud a nivel MHC. En 2006, también se encontró una mayor varianza en el número (que no proporción; discutido anteriormente) de supertipos compartidos con los machos EP respecto a lo esperado por azar, lo que sugiere que las hembras se emparejan con machos dispares en el número de supertipos (algunos con un número bajo y otros elevado de supertipos). Este resultado es

opuesto y, a priori, parece contradecir el obtenido en la proporción de supertipos compartidos, donde la varianza de los machos EP fue menor que la esperada por azar. Una posible explicación es que las parejas EP se estarían formando con individuos muy dispares en el número de supertipos para poder priorizar una menor varianza en la similitud genética neutral entre individuos. Teniendo en cuenta lo anterior, nuestros resultados sugieren la posibilidad de que el emparejamiento no aleatorio en base a MHC en contextos EP pueda beneficiar a la descendencia a través de genotipos con más heterocigosidad, que además tienen supertipos muy diferentes entre sí.

Es importante resaltar que los emparejamientos resultantes no necesariamente concretan las preferencias individuales de forma íntegra (Schmoll et al., 2005; O'Brien & Dawson, 2007; Moreno et al., 2013). Es decir, lo que observamos constituye el producto final de una serie de interacciones, las cuales pueden no capturar, en mayor o menor grado, las preferencias reales de los individuos implicados. Por ejemplo, el macho genéticamente deseado/óptimo para el apareamiento podría no estar disponible (Hasselquist & Sherman, 2001). De manera similar, debido a la naturaleza observacional de nuestro estudio, no podemos concluir si los patrones obtenidos se deben a una elección femenina o a mayor inversión o habilidades competitivas de los machos que consiguen paternidad extra-pareja en otros nidos. Por ese motivo, a lo largo del trabajo hemos hablado de “*formación* de pareja” en lugar de “*elección* de pareja”. Por otro lado, nuestros resultados mostraron algunas discrepancias aparentemente desconcertantes entre los análisis y medidas genéticas utilizadas. Por ejemplo, las parejas en contextos de paternidad extra-pareja mostraron una mayor diferencia a lo esperado por azar en la media y en la homocigosidad neutral (HL) y una mayor varianza en el número de supertipos compartidos para el año 2006. Sin embargo, los test pareados entre parejas sociales y extra-pareja no mostraron diferencias genéticas entre ellos. Esto no es un resultado inesperado, puesto que la concordancia entre ambos análisis (es decir, parejas EP vs. parejas aleatorias y parejas EP vs. parejas sociales reales) solo puede surgir cuando, para un parámetro dado, los valores sociales y de parejas extra-pareja son opuestos y se ubican en ambos extremos significativos de la distribución aleatoria (figuras 1 y 2). Por último, hay que tener en cuenta, que en este trabajo hemos analizado los patrones de formación de pareja en base al MHC II. Así, no es descartable que, en la población de estudio, los patrones de emparejamiento a nivel social y/o extra-pareja estén influenciados por los genes de MHC clase I, que, por ejemplo, están relacionados con la resistencia a parásitos con graves consecuencias en la eficacia biológica individual como los de la malaria aviar (Sepil et al., 2013).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que las características genéticas de las parejas sociales no difirieron de las esperadas por azar, mientras que los patrones de formación extra-pareja estuvieron determinados por características genéticas neutrales (usadas como un proxy de la características a nivel global del genoma) de los individuos. A nivel extra-pareja, los mecanismos variaron entre años (por ejemplo, patrones que favorecen la homocigosis en 2005 y la diversidad en 2006), aunque parece que el papel del MHC fue menor en comparación al explicado por loci neutrales. En general, nuestros resultados son compatibles con la idea que tener paternidad extra-pareja es una estrategia para eludir las limitaciones experimentadas durante el periodo de formación de pareja social, aunque una mayor inversión o habilidades competitivas de los machos extra-pareja podrían explicar los patrones encontrados.

En la dinámica de formación de pareja, es imperativo considerar no solo las variables genéticas, sino también el contexto situacional en el cual se desarrollan estas interacciones (variables ambientales, fechas de llegada de los individuos a la zona de cría). Futuras investigaciones podrían beneficiarse de un enfoque multiescalar que incorpore tanto parámetros ambientales (temperatura, humedad, lluvias, entre otros) como otros factores potencialmente relevantes (como son la sincronidad de la temporada reproductiva, esfuerzo necesario para obtener recursos, entornos de alto estrés vs. de bajo estrés). Con esto, es importante seguir investigando teniendo en cuenta estas interacciones multifactoriales para desentrañar los mecanismos de elección de pareja.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis tutores por darme la oportunidad de realizar este trabajo. A David, por su paciencia y comprensión. A mi familia, amigos y compañeros de este máster, por acompañarme en el camino. Y, como siempre, a la Ciencia.

REFERENCIAS

- Agbali, M., Reichard, M., Bryjová, A., Bryja, J., & Smith, C. (2010). Mate choice for nonadditive genetic benefits correlate with MHC dissimilarity in the rose bitterling (*Rhodeus ocellatus*). *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 64(6), 1683-1696. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00961.x>
- Akçay, E., & Roughgarden, J. (2007). Extra-Pair Parentage: A New Theory Based on Transactions in a Cooperative Game. *Evolutionary Ecology Research*, 9(11), 1223-1243.

- Aparicio, J. M., Ortego, J., & Cordero, P. J. (2006). What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? *Molecular Ecology*, 15(14), 4659-4665. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03111.x>
- Baratti, M., Dessì-Fulgheri, F., Ambrosini, R., Bonisoli-Alquati, A., Caprioli, M., Goti, E., Matteo, A., Monnanni, R., Ragionieri, L., Ristori, E., Romano, M., Rubolini, D., Scialpi, A., & Saino, n. (2012). MHC genotype predicts mate choice in the ring-necked pheasant *Phasianus colchicus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(8), 1531-1542. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02534.x>
- Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/hdy.1948.21>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1-48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Benjamini, Y., & Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *The Annals of Statistics*, 29(4), 1165-1188. <https://doi.org/10.1214/aos/1013699998>
- Bernatchez, L., & Landry, C. (2003). MHC studies in nonmodel vertebrates: What have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*, 16(3), 363-377. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00531.x>
- Bichet, C., Penn, D. J., Moodley, Y., Dunoyer, L., Cellier-Holzem, E., Belvalette, M., Grégoire, A., Garnier, S., & Sorci, G. (2014). Females tend to prefer genetically similar mates in an island population of house sparrows. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 47-47. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-47>
- Byers, J. A., & Waits, L. (2006). Good genes sexual selection in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16343-16345. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608184103>
- Camacho, C., Canal, D., & Potti, J. (2013). Nonrandom dispersal drives phenotypic divergence within a bird population. *Ecology and Evolution*, 3(14), 4841-4848. <https://doi.org/10.1002/ece3.563>
- Canal, D., Alcaide, M., Anmarkrud, J. A., & Potti, J. (2010). Towards the simplification of MHC typing protocols: Targeting classical MHC class II genes in a passerine, the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *BMC Research Notes*, 3(1), 236. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-236>
- Canal, D., Jovani, R., & Potti, J. (2012). Multiple mating opportunities boost protandry in a pied flycatcher population. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(1), 67-76. <https://doi.org/10.1007/s00265-011-1253-8>

- Canal, D., Potti, J., & Dávila, J. A. (2011). Male phenotype predicts extra-pair paternity in pied flycatchers. *Behaviour*, 148(5/6), 691-712.
- 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.
- Charlesworth, D., & Charlesworth, B. (1987). Inbreeding Depression and Its Evolutionary Consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 237-268. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001321>
- Coleman, S. W., & Jones, A. G. (2011). Patterns of multiple paternity and maternity in fishes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(4), 735-760. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01673.x>
- Consuegra, S., & Garcia de Leaniz, C. (2008). MHC mediated mate choice increases parasite resistance in salmon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1641), 1397-1403. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0066>
- Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2005). In Silico Identification of Supertypes for Class II MHCs1. *The Journal of Immunology*, 174(11), 7085-7095. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7085>
- Eizaguirre, C., Yeates, S. E., Lenz, T. L., Kalbe, M., & Milinski, M. (2009). MHC based mate choice combines good genes and maintenance of MHC polymorphism. *Molecular Ecology*, 18(15), 3316-3329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04243.x>
- Flajnik, M. F., & Kasahara, M. (2001). Comparative genomics of the MHC: Glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity*, 15(3), 351-362. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00198-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00198-4)
- Forsberg, L. a., Dannewitz, J., Petersson, E., & Grahn, M. (2007). Influence of genetic dissimilarity in the reproductive success and mate choice of brown trout – females fishing for optimal MHC dissimilarity. *Journal of Evolutionary Biology*, 20(5), 1859-1869. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01380.x>
- Forstmeier, W., Nakagawa, S., Griffith, S. C., & Kempenaers, B. (2014). Female extra-pair mating: Adaptation or genetic constraint? *Trends in Ecology & Evolution*, 29(8), 456-464. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.05.005>
- Frankham, R., Ballou, J. D., Eldridge, M. D. B., Lacy, R. C., Ralls, K., Dudash, M. R., & Fenster, C. B. (2011). Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 25(3), 465-475. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01662.x>
- Galan, M., Guivier, E., Caraux, G., Charbonnel, N., & Cosson, J.-F. (2010). A 454 multiplex sequencing method for rapid and reliable genotyping of highly polymorphic genes in

- large-scale studies. *BMC Genomics*, 11(1), 296. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-296>
- Garamszegi, L. Z., Zagalska-Neubauer, M., Canal, D., Blázi, G., Laczi, M., Nagy, G., Szöllösi, E., Vaskuti, É., Török, J., & Zsebök, S. (2018). MHC-mediated sexual selection on birdsong: Generic polymorphism, particular alleles and acoustic signals. *Molecular Ecology*, 27(11), 2620-2633. <https://doi.org/10.1111/mec.14703>
- Gilles, M. (2023, julio 20). *The smell of flycatchers*. British Ornithologists' Union. <https://bou.org.uk/blog-gilles-pied-flycatcher-smell/>
- Glynn, L. E. (1988). Natural history of the major histocompatibility complex. Jan Klein, John Wiley and Sons: New York. 775 pages, £90.75 (1986). *Cell Biochemistry and Function*, 6(3), 222-222. <https://doi.org/10.1002/cbf.290060321>
- Gohli, J., Anmarkrud, J. A., Johnsen, A., Kleven, O., Borge, T., & Lifjeld, J. T. (2013). Female promiscuity is positively associated with neutral and selected genetic diversity in passerine birds. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 67(5), 1406-1419. <https://doi.org/10.1111/evo.12045>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01613.x>
- Griggio, M., Biard, C., Penn, D. J., & Hoi, H. (2011). Female house sparrows «count on» male genes: Experimental evidence for MHC-dependent mate preference in birds. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 44-44. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-44>
- Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites? *Science (New York, N.Y.)*, 218(4570), 384-387. <https://doi.org/10.1126/science.7123238>
- Hasselquist, D., & Sherman, P. W. (2001). Social mating systems and extrapair fertilizations in passerine birds. *Behavioral Ecology*, 12(4), 457-466. <https://doi.org/10.1093/beheco/12.4.457>
- Huchard, E., Baniel, A., Schliehe-Diecks, S., & Kappeler, P. (2013). MHC-disassortative mate choice and inbreeding avoidance in a solitary primate. *Molecular Ecology*, 22(15), 4071-4086. <https://doi.org/10.1111/mec.12349>
- Jäger, I., Eizaguirre, C., Griffiths, S. W., Kalbe, M., Krobbach, C. K., Reusch, T. B. H., Schaschl, H., & Milinski, M. (2007). Individual MHC class I and MHC class IIB diversities are associated with male and female reproductive traits in the three-spined stickleback. *Journal of Evolutionary Biology*, 20(5), 2005-2015. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01366.x>
- Janeway, C. (Ed.). (2001). *Immunobiology: The immune system in health and disease ; [animated CD-ROM inside]* (5. ed). Garland Publ. [u.a.].

- Juola, F. A., & Dearborn, D. C. (2012). Sequence-based evidence for major histocompatibility complex-disassortative mating in a colonial seabird. *Proceedings: Biological Sciences*, 279(1726), 153-162.
- Kalinowski, S. T., Wagner, A. P., & Taper, M. L. (2006). ml-relate: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 576-579. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kempenaers, B. (2007). *Mate Choice and Genetic Quality: A Review of the Heterozygosity Theory*. 37, 189-278. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(07\)37005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(07)37005-8)
- Kokko, H., Gunnarsson, T. G., Morrell, L. J., & Gill, J. A. (2006). Why do female migratory birds arrive later than males? *Journal of Animal Ecology*, 75(6), 1293-1303. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2006.01151.x>
- Leder, E. H., Karaïskou, N., & Primmer, C. R. (2008). Seventy new microsatellites for the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca* and amplification in other passerine birds. *Molecular Ecology Resources*, 8(4), 874-880. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02096.x>
- Lenz, T. L., & Becker, S. (2008). Simple approach to reduce PCR artefact formation leads to reliable genotyping of MHC and other highly polymorphic loci—Implications for evolutionary analysis. *Gene*, 427(1-2), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.09.013>
- Lundberg, A., & Alatalo, R. V. (1992). *The Pied Flycatcher*. Poyser.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7(5), 639-655. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x>
- Mays, H. L., Albrecht, T., Liu, M., & Hill, G. E. (2008). Female choice for genetic complementarity in birds: A review. *Genetica*, 134(1), 147-158. <https://doi.org/10.1007/s10709-007-9219-5>
- Mays, H. L., & Hill, G. E. (2004). Choosing mates: Good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(10), 554-559. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.018>
- Milinski, M., Griffiths, S., Wegner, K. M., Reusch, T. B. H., Haas-Assenbaum, A., & Boehm, T. (2005). Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12), 4414-4418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408264102>

- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Abercrombie, L. G., Anderson, C. M., Baldwin, B. G., Bang, I. C., Beldade, R., Bernardi, G., Boubou, A., Branca, A., Bretagnolle, F., Bruford, M. W., Buonamici, A., Burnett, R. K., Canal, D., Cárdenas, H., Cautlet, C., Chen, S. Y., Chun, Y. J., Cossu, C., ... Yuan, J. S. (2009). Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources database 1 January 2009-30 April 2009. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1375-1379. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02746.x>
- Moreno, J., Martínez, J. G., González-Braojos, S., Ruiz-de-Castañeda, R., Cantarero, A., & Sánchez-Tójar, A. (2013). Extra-pair matings, context-dependence and offspring quality: A brood manipulation experiment in pied flycatchers. *Behaviour*, 150(3-4), 359-380.
- Naugler, C., & Liwski, R. (2008). An evolutionary approach to major histocompatibility diversity based on allele supertypes. *Medical Hypotheses*, 70(5), 933-937. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.09.015>
- O'Brien, E. L., & Dawson, R. D. (2007). Context-Dependent Genetic Benefits of Extra-Pair Mate Choice in a Socially Monogamous Passerine. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(5), 775-782.
- Penn, D. J., Damjanovich, K., & Potts, W. K. (2002). MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11260-11264. <https://doi.org/10.1073/pnas.162006499>
- Piertney, S. B., & Oliver, M. K. (2006). The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, 96(1), 7-21. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800724>
- Potti, J., & Montalvo, S. (1991a). Male colour variation in Spanish Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Ibis*, 133(3), 293-299. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1991.tb04572.x>
- Potti, J., & Montalvo, S. (1991b). Return rate age at first breeding and natal dispersal of Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca* in central Spain. *Ardea*, 79, 419-428.
- Prokop, Z. M., Michalczyk, Ł., Drobniak, S. M., Herdegen, M., & Radwan, J. (2012). Meta-analysis suggests choosy females get sexy sons more than «good genes». *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 66(9), 2665-2673. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01654.x>
- Rätti, O., Lundberg, A., Tegelström, H., & Alatalo, R. V. (2001). No Evidence for Effects of Breeding Density and Male Removal on Extrapair Paternity in the Pied Flycatcher. *The Auk*, 118(1), 147-155. <https://doi.org/10.1093/auk/118.1.147>
- Reche, P. A., & Reinherz, E. L. (2007). Prediction of peptide-MHC binding using profiles. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 409, 185-200. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-118-9_13
- Rekdal, S. L., Anmarkrud, J. A., Lifjeld, J. T., & Johnsen, A. (2019). Extra-pair mating in a passerine bird with highly duplicated major histocompatibility complex class II:

- Preference for the golden mean. *Molecular Ecology*, 28(23), 5133-5144.
<https://doi.org/10.1111/mec.15273>
- Richardson, D. S., Komdeur, J., Burke, T., & von Schantz, T. (2005). MHC based patterns of social and extra-pair mate choice in the Seychelles warbler. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 272(1564), 759-767.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2004.3028>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schmoll, T. (2011). A review and perspective on context-dependent genetic effects of extra-pair mating in birds. *Journal of Ornithology*, 152(1), 265-277.
<https://doi.org/10.1007/s10336-011-0683-4>
- Schmoll, T., Dietrich, V., Winkel, W., Epplen, J. T., Schurr, F., & Lubjuhn, T. (2005). Paternal Genetic Effects on Offspring Fitness Are Context Dependent within the Extrapair Mating System of a Socially Monogamous Passerine. *Evolution*, 59(3), 645-657.
- Schwensow, N., Castro Prieto, A., Wachter, B., & Sommer, S. (2019). Immunological MHC supertypes and allelic expression: How low is the functional MHC diversity in free-ranging Namibian cheetahs? *Conservation Genetics*, 20. <https://doi.org/10.1007/s10592-019-01143-x>
- Schwensow, N., Eberle, M., & Sommer, S. (2008). Compatibility counts: MHC-associated mate choice in a wild promiscuous primate. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 275(1634), 555-564. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1433>
- Sepil, I., Lachish, S., Hinks, A. E., & Sheldon, B. C. (2013). Mhc supertypes confer both qualitative and quantitative resistance to avian malaria infections in a wild bird population. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 280, 20130134-20130134.
- Sepil, I., Moghadam, H. K., Huchard, E., & Sheldon, B. C. (2012). Characterization and 454 pyrosequencing of Major Histocompatibility Complex class I genes in the great tit reveal complexity in a passerine system. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 68.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-68>
- Sette, A., & Sidney, J. (1998). HLA supertypes and supermotifs: A functional perspective on HLA polymorphism. *Current Opinion in Immunology*, 10(4), 478-482.
[https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(98\)80124-6](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(98)80124-6)
- Slagsvold, T., & Dale, S. (1996). Disappearance of Female Pied Flycatchers in Relation to Breeding Stage and Experimentally Induced Molt. *Ecology*, 77(2), 461-471.
<https://doi.org/10.2307/2265622>
- Sommer, S. (2005). Major Histocompatibility Complex and Mate Choice in a Monogamous Rodent. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58(2), 181-189.

- Strandh, M., Westerdahl, H., Pontarp, M., Canbäck, B., Dubois, M.-P., Miquel, C., Taberlet, P., & Bonadonna, F. (2012). Major histocompatibility complex class II compatibility, but not class I, predicts mate choice in a bird with highly developed olfaction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1746), 4457-4463. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1562>
- Stutchbury, B. J., & Morton, E. S. (1995). The Effect of Breeding Synchrony On Extra-Pair Mating Systems in Songbirds. *Behaviour*, 132(9-10), 675-690. <https://doi.org/10.1163/156853995X00081>
- Uller, T., & Olsson, M. (2008). Multiple paternity in reptiles: Patterns and processes. *Molecular Ecology*, 17(11), 2566-2580. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03772.x>
- Weisberg, S., & Fox, J. (2011). An R Companion to Applied Regression. En Sage.
- Westerdahl, H. (2004). No evidence of an MHC-based female mating preference in great reed warblers. *Molecular Ecology*, 13(8), 2465-2470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02238.x>
- Westneat, D. F., & Sherman, P. W. (1997). Density and extra-pair fertilizations in birds: A comparative analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41(4), 205-215. <https://doi.org/10.1007/s002650050381>
- Westneat, D. F., & Stewart, I. R. K. (2003). Extra-Pair Paternity in Birds: Causes, Correlates, and Conflict. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 365-396. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132439>
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>
- Yamazaki, K., Boyse, E. A., Miké, V., Thaler, H. T., Mathieson, B. J., Abbott, J., Boyse, J., Zayas, Z. A., & Thomas, L. (1976). Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *The Journal of Experimental Medicine*, 144(5), 1324-1335. <https://doi.org/10.1084/jem.144.5.1324>
- Zeh, J. A., & Zeh, D. W. (1996). The Evolution of Polyandry I: Intragenomic Conflict and Genetic Incompatibility. *Proceedings: Biological Sciences*, 263(1377), 1711-1717.
- Zeh, J. A., & Zeh, D. W. (1997). The evolution of polyandry II: Post-copulatory defenses against genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1378), 69-75. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0010>

ANEXO I

Tabla complementaria 1: Test de la T y test de Levene entre pareja social y pareja extra pareja, individuo social e individuo extra pareja, realizados para los dos años de estudio en conjunto (2005 y 2006). HL (homocigosidad neutral a nivel individual), PD supertipos (proporción de supertipos de MHC compartidos), relatedness (grado de similitud genética neutral entre individuos), supertipos (número de supertipos compartidos). Para más detalles ver la sección de métodos.

Datos de los dos años en conjunto	t-student			Levene		
	t	df	p	F	df	Pr(>F)
Relatedness Pareja Social vs. Pareja EPP	1.517	42	0.137	2.393	1	0.126
HL Macho social vs Macho EPP	0.163	44	0.871	0.072	1	0.789
HL Hembra social vs. Hembra EPP	-1.885	43	0.066	0.044	1	0.835
PD supertipos Pareja Social vs. Pareja EPP	0.666	25	0.511	0.582	1	0.449
Supertipos Macho social vs. Macho EPP	-0.484	30	0.632	1.268	1	0.264
Supertipos Hembra social vs. Hembra EPP	-0.773	34	0.445	2.079	1	0.153

ANEXO II

Glosario de términos

- EPP: paternidad extra pareja.
- EP: (pareja) extra pareja.
- Relatedness: grado de similitud genética neutral entre individuos.
- HL: homocigosidad neutral por loci.
- Supertipos (supertypes): número de supertipos compartidos.
- PD supertipos (PD supertypes): proporción de supertipos compartidos.