

UCH-FC
DOC-B
M522
c.1

**EVOLUCIÓN DEL CANTO DE LIBERACION EN LAS ESPECIES
CHILENAS DEL GRUPO *spinulosus* (Amphibia:Bufonidae).**

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias
por

MARCO ANTONIO MÉNDEZ TORRES

Director de Tesis: Dr. Alberto Veloso.

Octubre, 2000



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

MARCO ANTONIO MÉNDEZ TORRES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Septiembre de 2000.

Director de Tesis:

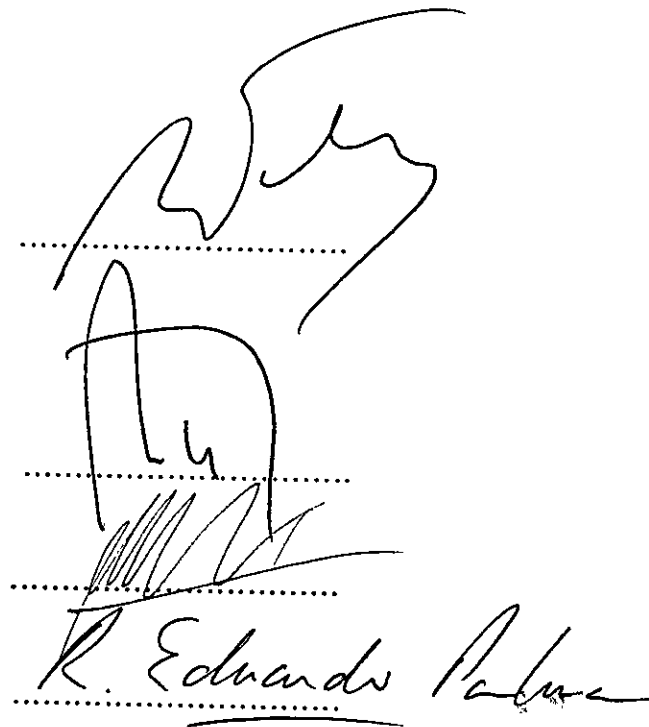
Dr. Alberto Veloso

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Rodrigo Medel

Dr. Mario Penna

Dr. Eduardo Palma



Handwritten signatures of the thesis director and the evaluation commission members. The signatures are written in black ink on a white background. The first signature is for Dr. Alberto Veloso, the second for Dr. Rodrigo Medel, the third for Dr. Mario Penna, and the fourth for Dr. Eduardo Palma. Each signature is written above a horizontal dotted line.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que colaboraron en la realización de esta Tesis:

Por su comprensión apoyo incondicional a mi tutor Dr. Alberto Veloso.

Por la asistencia en terreno y leal amistad a: Eliseo Vergara, Carezza Botto, Eduardo Soto, Enrique Pereyra, Michell Salaberry, Gonzalo Benavides, Andrés Sazo, Carmen Espoz, Mauricio Soto, Javier González y Andrés Hinojosa.

Por la asistencia y colaboración en el laboratorio a: Dr. Patricia Iturra, Nora Vergara, Natalia Lam, Soledad Cortez, Verónica Flores, Carlos Pino, Eduardo Soto y Eduardo Ravanal. A mis amigos de Alemania: Tomislav Domazet, Sebastian Steinfartz, Mathias Weller, Wim Damen, Hilary Dove y Eva Siegmund.

Agradezco además a los miembros de mi comisión por la revisión crítica del manuscrito y muy especialmente al Dr. Mario Penna por su constante ayuda y estímulo en la discusión en las distintas etapas de mi tesis. Finalmente agradezco a todos los miembros del Laboratorio de Ecofisiología por el grato ambiente en el que se desarrollaron mis estudios del programa de doctorado y por cierto, esta tesis.

Finalmente deseo agradecer a mi familia por su constante apoyo y a Talía por su amor y paciencia.

Esta tesis fue financiada por: 1) Beca CONICYT, 2) Beca DAAD, 3) Proyectos PGI-007 y PGI-004 y 4) FONDECYT 2960012.

INDICE DE MATERIAS

A. Páginas Preliminares	pág.
Página de título.....	i
Informe de aprobación	
Agradecimientos.....	ii
Índice de materias.....	iii
Lista de tablas.....	iv
Lista de figuras.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de anexos.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	xi
B. Páginas de Texto	
INTRODUCCIÓN.....	1
Materiales y métodos	
Análisis filogenético de las especies del grupo <i>spinulosus</i>	18
Análisis de atributos acústicos y morfológicos asociados al canto de liberación.....	27
Análisis filogenético de los caracteres asociados al canto.....	33
RESULTADOS	
Análisis filogenético de las especies del grupo <i>spinulosus</i>	37
Análisis de atributos acústicos y morfológicos asociados al canto de liberación.....	49
Análisis filogenético de los caracteres asociados al canto.....	70
DISCUSIÓN	
Análisis filogenético de las especies del grupo <i>spinulosus</i>	84
Los atributos acústicos del canto de liberación en las especies chilenas del grupo <i>spinulosus</i> : consideraciones morfológicas e históricas.....	88
CONCLUSIONES.....	102
BIBLIOGRAFÍA.....	103

LISTA DE TABLAS

1. Resumen de las especies, las localidades y el número de colección.....23
2. Detalle de los ejemplares analizados para los genes 12S y 16S.....24
3. Lista de caracteres evaluados en las señales acústicas en las especies del grupo *spinulosus*, *B. arenarum* y *B. variegatus*.....28
4. Detalle del material analizado para las correlaciones entre musculatura y canto..... 29
5. Detalle de los animales estudiados para estimar caracteres asociados a la laringe.....31
6. Matriz utilizada para la estimación filogenética a partir caracteres morfológicos.....37
7. Resumen de la información de las secuencias amplificadas para los genes 12S.....39
8. Comparación de los distintos análisis de Parsimonia efectuados para las distintas ...46
9. Comparación entre distintos métodos de reconstrucción filogenética.....48
10. Matriz de correlación de atributos acústicos y morfológicos entre las especies61
11. Matriz de correlación de atributos acústicos y morfológicos entre las especies del grupo *spinulosus*, *B. arenarum* y *B. variegatus*. Los valores corresponden a los residuos de la regresión entre cada variable y el tamaño corporal, sólo están presentes aquellas que resultaron ser significativas.....62
12. Resultados de los cinco primeros ejes de Componentes Principales de los.....64
13. Matriz de Clasificación generada a partir de un Análisis Discriminante66
14. Resultados de los cinco primeros ejes de Componentes Principales de los atributos morfológicos de la laringe medidos en las especies del grupo *spinulosus*, *B.arenarum* y *B. variegatus*.....68
15. Ajustes de Máxima Verosimilitud a la filogenia para los grupos de caracteres.....83

LISTA DE FIGURAS

1. Esquema de las mediciones morfométricas efectuadas en las especies del grupo <i>spinulosus</i> , <i>Bufo arenarum</i> y <i>Bufo variegatus</i>	21
2. Dos de los caracteres morfológicos usados en el análisis filogenético:.....	22
3. La hipótesis filogenética más parsimoniosa para 21 caracteres (morfología externa, osteología, cromosomas y conducta).....	39
4. La hipótesis filogenética más parsimoniosa para el gen 12S.....	40
5. Arbol de consenso obtenido de un análisis de bootstrap para el gen 16S.....	42
6. La hipótesis filogenética más parsimoniosa para el análisis combinado de los genes 12S-16S y el análisis de evidencia total.....	47
7. Comparación de los atributos acústicos en las especies del grupo <i>spinulosus</i> , <i>B. variegatus</i> y <i>B. arenarum</i>	51
8. Comparación de los elementos anatómicos de la laringe en las especies del grupo <i>spinulosus</i> , <i>B. variegatus</i> y <i>B. arenarum</i>	54
9. Comparación de la masa total asociada a la producción de canto para laringe en las especies del grupo <i>spinulosus</i> , <i>B. variegatus</i> y <i>B. arenarum</i>	55
10. Comparación de la musculatura torácica asociada a la producción de canto.	57
11. Representación gráfico de los atributos acústicos generado a partir de los un Análisis de Componentes Principales para las especies grupo.....	65
12. Agrupamiento generado a partir de los coeficientes canónicos obtenidos de un análisis discriminante sobre los atributos acústicos en las especies del grupo <i>spinulosus</i>	67

13. Agrupamiento generado a partir de los coeficientes canónicos obtenidos de un análisis discriminante sobre los atributos morfológicos asociados a la laringe.....	69
14. Volumen de Cartílago Aritenoide mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S).....	71
15. Volumen de Cartílago Aritenoide mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S).....	73
16. Volumen de Músculo Dilatador mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S).....	74
17. Volumen de Músculo Constrictor mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S).....	75
18. Volumen de Cuerda Vocal mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S).....	76
19. El carácter trill mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S).....	78
20. El carácter Pulsos Dobles mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S).....	79
21. El carácter Número de Pulsos mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S).....	80
22. El carácter Duración del canto mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	: Análisis de Componentes Principales.
AD	: Análisis Discriminante.
ANOVA	: Análisis de Varianza.
ANCOVA	: Análisis de Covarianza.
CI	: Índice de Consistencia.
ILD	: Incongruence Length Differences.
K2P	: Modelo de Kimura de dos parámetros.
ME	: Método de Minimum Evolution.
MP	: Método de Máxima Parsimonia.
ML	: Método de Máxima Verosimilitud.
NJ	: Neighbor Joining.
RI	: Índice de Retención.
Tprom	: Tiempo promedio.
Tr	: Transiciones.
Tv	: Transversiones.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.-

- a) Lista de caracteres morfométricos analizados.
- b) Detalle de las polarizaciones efectuadas para la partición no molecular.

Anexo 2.- Secuencias obtenidas para las especies del grupo *spinulosus*, *B. arenarum* y *B. variegatus*, para los genes mitocondriales 12S y 16S. El símbolo: (.) indica identidad con la primera secuencia, mientras que el símbolo:(-), indica delección (gap). Las flechas indican el inicio y fin de cada secuencia (12S o 16S).

Anexo 3.- Sección transversal de la laringe de *Bufo atacamensis*. Se detallan las estructuras medidas en la laringe para las comparaciones a nivel morfológico entre las especies estudiadas

RESUMEN

Entender como múltiples factores afectan la evolución de complejos funcionales tales como los cantos, corresponde a un problema escasamente abordado. Si bien, se ha demostrado que distintas fuerzas selectivas afectan la evolución de los cantos, debido a que no todos los caracteres son moldeados por selección natural, la inclusión en estos estudios de una perspectiva comparada que incorpore el efecto de restricciones de tipo filogenéticas y morfológicas en la expresión de estas señales, resulta un elemento necesario para un adecuado entendimiento de este fenómeno.

Las especies del grupo *spinulosus* se caracterizan por carecer de canto nupcial, y poseer canto de liberación. Dada la naturaleza evolutivamente conservada del canto de liberación, se postula que éste debería mostrar un correlato estricto con la filogenia del grupo. En cuanto a la relación entre los caracteres acústicos (parámetros del canto) y los estructuras morfológicas de la laringe, se postula que existirá un desacople evolutivo entre ambos grupos de caracteres.

Tres distintas particiones de caracteres fueron utilizadas para establecer la hipótesis de relaciones filogenéticas del grupo *spinulosus*: datos morfológicos, el gen 12S y el gen 16S. La partición morfológica no mostró una resolución al interior del grupo interno. En tanto que, ambas particiones moleculares mostraron una buena resolución. El análisis combinado de los genes 12S y 16S y el de evidencia total (todas las particiones consideradas conjuntamente) mostraron la misma topología y valores semejantes de bootstrap e Índice de decaimiento (*Bremer support*). La hipótesis filogenética más parsimoniosa, utilizando *Bufo arenarum* y *Bufo variegatus* como grupos externos, fue: (*arenarum*, (*variegatus*, (*rubropunctatus*, ((*chilensis*, *atacamensis*), (*spinulosus*, *papillosus*)))).

El análisis univariado y multivariado de los caracteres acústicos que componen el canto de liberación, mostró diferencias significativas entre las especies. En cambio, para las estructuras morfológicas de la laringe, se encontró que no existieron diferencias significativas, siendo la única excepción el carácter ancho de cuerda vocal. El análisis

multivariado de las estructuras de la laringe, no mostró diferencias significativas entre las especies. Los fenogramas, hechos a partir de los coeficientes canónicos de un análisis discriminante, tanto para los caracteres acústicos y los morfológicos de la laringe, mostraron una topología similar a la obtenida a partir del análisis filogenético. Esto sugiere la existencia de un correlato entre la filogenia, señales acústicas y morfología de la laringe.

El mapeo de los parámetros acústicos y morfológicos de la laringe, utilizando el algoritmo de Máxima Parsimonia, mostró que, en general, cada carácter evoluciona de modo independiente, no asociándose a cambios específicos en un clado particular. Entre las especies del grupo *spinulosus*: *B. atacamensis* y *B. chilensis*, presentaron el mayor número de caracteres plesiomórficos.

El mapeo de los parámetros acústicos y morfológicos de la laringe, bajo el algoritmo de Máxima Verosimilitud, hechos sobre los valores obtenidos de un análisis de Componentes Principales, mostró que los caracteres acústicos y los caracteres morfológicos de la laringe, evolucionan de modo independiente y que ambos grupos de caracteres, no se relacionan en sus tasas de cambio evolutivo con eventos de especiación.

ABSTRACT

How multiple factors combine to influence the evolution of functionally complex phenotypes such the call, is a problem poorly understood. Although, it has been demonstrated how different selective forces affect the evolution of acoustical signals, because not all call features are shaped by natural selection, therefore the inclusion of historical and morphological constraints in the expression of these signals, is a necessary element, in order to understand the evolution of acoustical signals.

Species from the *spinulosus* group toads have no mating call but present release call. Considering that release call is evolutionary conservative, the release call would be a perfect matching with the phylogeny of this group and acoustical and morphological characters of larynx would be uncoupled in the pattern of evolution.

Three different partitions were used to establish a phylogenetic hypothesis of chilean species belonging to the *spinulosus* group: morphological, 12S gene and 16S gene partitions. The morphological analysis does not show resolution in the ingroup. Molecular partitions (12S and 16S) show little conflict between them, and good resolution, with strong support for each node. The combined analyses of molecular (12S-16S) and total evidence (all partitions treated together) showed identical topologies with high values of bootstrap as well as Decay Index (*Bremer support*). The phylogenetic hypothesis obtained, using *Bufo arenarum* and *Bufo variegatus* as outgroup, was: (*arenarum*, (*variegatus*, (*rubropunctatus* ((*chilensis*, *atacamensis*), (*spinulosus*, *papillosus*))))).

Univariate and multivariate analyses of acoustical characters show significant differences among species. On the other hand, univariate analysis of larynx characters shows no differences among species, with the exception of the vocal cord volume. Multivariate analysis of larynx morphology shows no differences among the species studied. Acoustical and morphological characters phenograms using from canonical coefficients of discriminant analysis, show in both cases a similar topology to that

obtained with phylogenetic analysis, suggest that acoustical signals, larynx morphology and phylogeny are coupled.

In general, characters mapped in the phylogeny using Máximum Parsimony shows that the evolution of acoustical and morphological characters, did not follow a trend associated to a particular clade. Among all species of this group, *B. atacamensis* and *B. chilensis* showed the highest number of plesiomorphic characters.

Characters mapped in the phylogeny using Maximum likelihood analysis suggests that acoustical and morphological characters evolved independently and their evolution rates are not correlated with speciation events.

INTRODUCCION

El género *Bufo* es un género cosmopolita que en Sudamérica presenta un patrón de distribución asociado con la geomorfología y paleoclimatología del continente (Blair, 1972; Vellard, 1959). Duellman & Schulte (1992) reconocen para Sudamérica, ocho mayores tendencias evolutivas dentro del género *Bufo*: el grupo *granulosus*, el grupo *marinus*, el grupo *typhonius*, el grupo *guttatus*, el grupo *veraguensis*, el grupo *crucifer*, el grupo *vallicep* y el grupo *spinulosus*.

El grupo *spinulosus* se encuentra restringido a la parte sur de la Cordillera de los Andes, distribuyéndose desde las altas montañas de Perú, por el altiplano boliviano y en Chile por las regiones montañosas de Antofagasta y Tarapacá y desde esta última región hacia el Sur por la región cordillerana chileno-argentina desde los 1000-1200 m hasta los 5000 m, llegando hasta el paralelo 43 de latitud Sur, en la región de bosque austral frío. Duellman & Schulte (1992) reconocen para el grupo *spinulosus* trece especies, de las cuales seis habitan en Chile: *B. atacamensis* Cei, 1961, *B. chilensis* Tschudi, 1838 *B. rubropunctatus* Guichenot, 1848, *B. spinulosus* Wiegmann, 1835, *B. papillosus* Philippi, 1902 y *B. variegatus* (Ghünter, 1870). La distribución geográfica de *B. atacamensis* (tierra típica Vallenar), corresponde a las zonas desértica y mediterránea, sobreponiéndose con *B. chilensis* en la región mediterránea. Esta última se sobrepone a su vez, con *B. rubropunctatus* (tierra típica Valdivia) en esta misma región. La especie *B. spinulosus* se extiende desde el Altiplano de Perú y Bolivia hasta la Araucanía en una distribución "cis-trans" entre Chile y Argentina. Esta especie presenta una distribución disyunta, puesto que existen poblaciones en las quebradas y altiplano del Norte Grande (Lat. 18°-20°)

separadas por el desierto de Atacama de las poblaciones de los valles centrales y del valle longitudinal de Chile Central. *B. papillosus* habita la cordillera de los Andes por sobre los 1000 m, desde la Araucanía hasta Aysén, habitando también en la zona argentina. En tanto que *B. variegatus* (tierra típica Magallanes) se distribuye entre las zonas oceánicas y andinas, hasta los 1500 m, desde la Araucanía hasta Aysén, habita en ambientes húmedos y fríos asociados a bosques de *Nothofagus* en Chile y Argentina. Esta especie ha sido descrita como un extremo de variación morfológica dentro de las especies sudamericanas (Cei, 1972), razón por la cual se la ha excluido del grupo *spinulosus*, colocándola en un grupo aparte (Martin, 1972a; Gallardo; 1962), sin embargo, un estudio acabado que respalde esta afirmación no existe.

¿Corresponde el grupo *spinulosus* a un grupo monofilético?:

El establecimiento de la monofilia de un grupo corresponde a un paso necesario para realizar estudios comparados que evalúen características adaptativas entre las especies (Harvey y Pagel, 1991). El grupo *spinulosus* ha sido propuesto como un grupo monofilético principalmente por su cráneo estrecho y otras características craneales que lo separa de los otros grupos sudamericanos (Blair, 1972; Cei, 1980; Duellman y Schulte, 1992). Sin bien, esta caracterización diferencia al grupo *spinulosus* de los otros grupos, estos rasgos no aportan información acerca de las relaciones al interior del grupo.

Los estudios taxonómicos en el grupo *spinulosus* han sido realizados desde el prisma de la Escuela de Clasificación Evolutiva (sensu Wiley, 1981). Estos se han enfocado a estudiar distintos caracteres por separado: la existencia de compatibilidad genética entre las especies (Blair, 1972); características del canto de las especies *B. chilensis*, *B. spinulosus* y *B. atacamensis* (Penna y Veloso, 1981; Penna y col, 1986); la correspondencia entre el

canto y el sistema auditivo en *B. chilensis*, *B. spinulosus* y la especie argentina *Bufo arenarum*, del grupo *marinus* (Penna y col, 1990). Hasta ahora, el único estudio en el grupo *spinulosus* en que se han considerado mas de un tipo de caracteres, corresponde al de Mezey (1979). Esta autora analiza desde el punto de vista fenético caracteres morfológicos y cariotípicos para poblaciones de *B. atacamensis*, *B. chilensis* y *B. spinulosus*. Mezey (1979) encuentra que existe una alta afinidad entre estas tres especies al ser comparadas con *B. arenarum*. El análisis de caracteres morfológicos mostró que existía mayor similitud entre *B. chilensis* y *B. atacamensis* que entre estas con *B. spinulosus*. Este hecho, es concordante con la sugerencia de Cei (1972, 1962), quien postuló que existiría una separación precoz de *B. spinulosus* de las otras dos especies, y que *B. atacamensis* habría derivado de poblaciones de *B. chilensis* de la estepa central de Chile. Estas diferencias también se expresan al analizar los cariotipos de estas especies, mostrando que existen diferencias en la ubicación de la región organizadora del nucleolo (NOR) de los cromosomas separando a *B. arenarum* y *B. spinulosus* (par cromosómico 11) y *B. chilensis* y *B. atacamensis* (cromosoma 7). Mezey (1979) también realiza estudios de compatibilidad genética, mediante cruzamientos y estudio de híbridos, encontrando que existe una alta afinidad genética entre las especies del grupo *spinulosus* y menor entre éstas y *Bufo arenarum*. Si bien, Mezey (1979) no analiza a las otras dos especies del grupo *B. rubropunctatus* y *B. papillosus*. Es posible, considerando tanto evidencia morfológica (Cei, 1972; Mezey, 1979), cromosómica (Blair, 1972; Mezey, 1979) y de comportamiento (Penna y Veloso, 1981; Penna y col, 1990) postular la idea de que el grupo *spinulosus* podría corresponder a un grupo monofilético.

Hasta ahora el grupo *spinulosus* no ha sido evaluado desde la óptica de la Escuela Sistemática Filogenética (Henning, 1966) por lo que la evaluación de este grupo desde el

punto de vista cladista corresponde a un punto prioritario en esta tesis. Desde esta perspectiva es posible generar una hipótesis filogenética de relaciones dentro del grupo *spinulosus*:

Con *B. rubropunctatus* como el grupo más antiguo dando origen a dos grupos: *chilensis-atacamensis* y *spinulosus-papillosus* y *B. variegatus* como un grupo lejanamente emparentado (primer outgroup).

Adicionalmente, se utilizará como segundo outgroup a la especie del grupo *marinus* *B. arenarum*, este procedimiento de basa en los trabajos de Mezey (1979) y en el trabajo de Maxson (1984) basado en albúminas, que establece que el grupo hermano del grupo *spinulosus* corresponde a *B. marinus*, grupo al que pertenece *B. arenarum*.

La hipótesis filogenética propuesta se fundamenta en el escenario propuesto por Duellman (1979) quien postula que las especies del grupo *Bufo spinulosus* con el aparentemente primitivo *B. variegatus* corresponderían a un grupo primariamente andino confinado a zonas frías temperadas de Sudamérica. Para Duellman (1979) el centro de origen del grupo correspondería a la zona sur de la Patagonia y la presencia en el resto del continente se explicaría por posterior migración hacia el Norte. Este mismo autor plantea que la herpetofauna andina se originó por invasiones separadas desde las tierras bajas, de modo que los grupos faunísticos sureños estarían compuestos por inmigrantes a la región andina y por inmigrantes tardíos de la selva austral y la Patagonia. En este modelo los eventos de dispersión y especiación están estrechamente asociados al levantamiento andino y con las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno.

Evolución de señales acústicas

En muchas especies de vertebrados e invertebrados los machos producen un rango de señales acústicas cuyas funciones son: atracción de hembras, defensa de territorios y/o el rechazo de otros machos, tanto interespecíficos como intraespecíficos. Entre la amplia gama de señales, las señales acústicas son usadas tanto por vertebrados como invertebrados.

Las señales de vocalización son fundamentales en la conducta reproductiva de muchas especies de anuros (Gerhardt, 1994). El significado adaptativo, de este tipo de conducta es clara, para el macho se relaciona con aumentar la probabilidad de contactar una hembra y reproducirse. Para la hembra se relaciona tanto con la identificación de machos de la misma especie, como una forma de evitar la hibridación (Blair, 1972), como con la selección de aquel macho que garantice una reproducción efectiva (Ryan, 1988). En este contexto, las señales del canto corresponderían a una conducta importante para garantizar aislamiento reproductivo.

En los anuros los machos adultos de la mayoría de las especies producen señales de comunicación auditiva que pueden ser agrupadas en el término canto de aviso ("advertisement call") (Gerhardt, 1994). En *Bufo*, estas señales están generalmente relacionadas ya sea con el canto nupcial ("mating call"), producido para atraer hembras, o con el canto de liberación ("release call"), que se produce por la identificación de individuos del mismo sexo (Martin, 1972b). Como señala este último autor el canto nupcial en muchas especies de *Bufo*, no tiene una definición funcional, sino una definición contextual: "la vocalización más comúnmente dada, en una agregación reproductiva, por un adulto macho sin estimulación táctil ". A pesar, de lo anterior, es claro que las diferencias entre canto nupcial y canto de liberación, son de índole funcional y se relacionan principalmente con: a)

el receptor de la señal (hembra o macho, respectivamente) y b) con el propósito (atracción o rechazo, respectivamente).

Cada vocalización puede ser caracterizada en términos cuantitativos utilizando métodos estándar de análisis acústico, las medidas son por lo tanto, objetivas y repetibles eliminando problemas de subjetividad, asociados a diferencias entre observadores (Martin, 1972; Ryan, 1988a, 1988b). En una especie, el canto muestra un patrón consistente que puede ser medido en cada individuo y puede ser caracterizado por una serie de parámetros energéticos y periódicos estándar como: el largo del canto, los pulsos, la frecuencia dominante, tasa de canto, amplitud del canto entre otros. De este modo, la variación en estos parámetros ha sido usada para realizar comparaciones tanto entre poblaciones de una misma especie (Sullivan y Wagner, 1988; Sullivan y Malmos, 1994; Gerhardt, 1994; McClelland y col, 1998) o a nivel interespecífico (Wilczynski y col. , 1993; Cocroft y Ryan, 1995; Ryan y Rand, 1995 McClelland y col, 1997).

Factores que afectan la evolución de señales acústicas.-

Costos y beneficios.- Desde la perspectiva de los modelos de optimización se ha planteado que los animales tienen costos y beneficios asociados a las conductas de forrajeo o reproducción. Dos tipos de costos reproductivos han sido examinados en la literatura en relación con la emisión de señales: el gasto energético y el riesgo de depredación (Ryan y col, 1983). Ryan y col. (1982) estudiando el anfibio *Physalaemus pustulosus* observaron una reducción en el riesgo de depredación en los machos por el hecho de cantar en coros, sugiriendo que ligado a esta conducta habría un incremento en el éxito reproductivo. Si bien, existen medidas indirectas del costo reproductivo como pérdida de peso durante la reproducción (Wells, 1978), el más fiel estimador del costo asociado al canto corresponde a

las mediciones de la tasa de consumo de oxígeno. Bucher y col (1982), Ryan y col (1983) y Ryan (1985) evaluaron el gasto metabólico del canto en *Physalaemus pustulosus* mostrando que el gasto era de 1.13 ml O₂ h⁻¹. Los trabajos de Taigen y Wells (1985) y Taigen y col. (1985) sobre los anfibios *Hyla versicolor* e *Hyla crucifer* muestran valores de 1.70 ml O₂ h⁻¹ y 1.51 ml O₂ h⁻¹ respectivamente. Si se evalúa el gasto del canto en función del metabolismo en reposo (metabolismo canto/ metabolismo en reposo), se observa que los valores oscilan entre 5.5 en *Physalaemus pustulosus* a 21.6 veces en *Hyla crucifer*, claramente la actividad de canto tiene un costo alto. Esto se verifica, también, si se comparan otras conductas, por ejemplo, el metabolismo máximo en ejercicio para *Hyla versicolor* oscila entre 1 y 1.2 ml O₂ h⁻¹, mientras que el gasto asociado al canto se concentra entre 0.9 a 1.8 ml O₂ h⁻¹ (Taigen y Wells; 1985). Se ha demostrado además, que la actividad de canto, es a su vez mantenida casi absolutamente por metabolismo aeróbico (Ryan y col. ,1985; Taigen y Wells, 1985) y dado que, finalmente, como señala Ryan (1988a), una parte importante de la energía metabólica invertida en la producción de canto es pérdida y no incorporada en el signo, la energética entonces, corresponde claramente a un factor limitante en la producción de canto nupcial.

De acuerdo a Ryan (1988a) existen cuatro factores potenciales que pueden determinar la eficiencia del acople acústico: reconocimiento específico, selección sexual, bioacústica ambiental y sensibilidad del receptor.

1) Morfología.- Entre los factores que afectarían la producción de canto el tamaño corporal ha sido frecuentemente reportado (Martin, 1972b; Ryan y Brenowitz, 1985; Ryan, 1988; entre otros). Martin (1972b) postula que la divergencia evolutiva de la frecuencia dominante del canto nupcial es complicada e involucra cambios en la respuesta a la selección de tamaño

corporal, como también a la selección del canto. Factores selectivos directos podrían operar a través de cambio en la masa fibrosa de la cuerda vocal, a través por ejemplo, de la evolución alométrica del tamaño de la laringe. Cambios en la presión del aire pulmonar durante la vocalización podrían a su vez, producir cambios en la resonancia (saco vocal) o cambios en la cavidad de la boca. Este autor sugiere que una alta heterogeneidad en el canto nupcial resultaría principalmente debido a selección indirecta mediada por tamaño corporal y selección directa sobre la frecuencia del canto nupcial (Martin. 1972b). Si bien, esta posibilidad resulta atractiva, Brown y Littlejohn (1972) estudiando el grupo del *B. americanus* no encuentran una relación consistente entre tamaño corporal y este parámetro en el canto de liberación, por lo que para este grupo no se podría hablar de selección indirecta ligada a tamaño corporal. De cualquier modo, es claro que el problema de variación en las señales es complejo, e involucra varios factores actuando conjuntamente que requieren desde explicaciones morfológicas hasta bioacústicas.

Se ha planteado que existiría un desacople entre la longitud de onda de la señal y el tamaño de la estructura resonadora. Esto se hace particularmente cierto para vertebrados que se caracterizan por señales de frecuencia baja (Ryan, 1985; 1988a). Otro ejemplo de desacople es mostrado por Martin (1972b) para *Bufo cognatus* especie en la que el saco vocal es un radiador más que un resonador, hecho que disminuye las posibilidades de una comunicación óptima. Dada la importancia de la señal emitida para garantizar el éxito reproductivo, resulta paradójico la existencia de este desacople, debido a que se ha demostrado que aquellos machos que emiten señales acústicas con más energía son seleccionados por las hembras, por tanto, es posible postular que un incremento de energía

se corresponde con una mayor atracción para las hembras (Wells y Schwartz, 1984; Ryan, 1985).

2) Selección Sexual. - El entendimiento de cómo las preferencias de las hembras afectan la evolución de las señales en los machos, ha sido la preocupación de las últimas décadas en biología evolutiva (Ryan y Rand, 1995). En estos trabajos, se ha visto cómo las preferencias de las hembras definen cambios en la expresión de las señales y como estos estudios son adscritos a distintos tipos de modelos (de desventaja (*handicap*), de calidad genética (*good gene*), de fuga (*runaway*)); para una revisión ver Ryan, 1998). Ryan y Rand (1995) plantean para el grupo del *Physalaemus pustulosus*, un modelo alternativo al que se refieren como: explotación sensorial (sensory exploitation), en el que los machos producirían cambios en sus cantos que son previos al evento de selección de las hembras. Independiente del modelo que explique la variación en los atributos en el canto, es claro que la selección de la hembra modifica su expresión y que este es uno de los factores mejor documentados en anfibios, aves e insectos (Ryan, 1985; Shaw, 1999). Algunos de los caracteres que se han descrito como variables en función de las preferencias de las hembras son: duración del canto, frecuencia dominante, tasa de pulsos (para una revisión ver Gerhardt, 1988).

3) Atenuación Ambiental. - Respecto de la evolución de señales acústicas, resulta interesante la relación existente entre la señal a emitir y la atenuación ambiental. Ryan y Brenowitz (1985) mostraron en algunos hábitats que sonidos emitidos por insectos pueden producir un decrecimiento de la frecuencia dominante en aves. Ryan (1985) propone que para *P. pustulosus* existiría una selección ambiental para emitir cantos con frecuencias bajas, dado que se atenúan menos rápidamente, mientras que desde el punto de vista morfológico las frecuencias altas son las radiadas con mayor intensidad. De este modo, las propiedades

acústicas del medio y la morfología estarían en conflicto. Penna y Solis (1998), demuestran para especies de anfibios del bosque temperado de Chile que existe una carencia de relaciones óptimas entre las propiedades del hábitat, en cuanto a la transmisión de sonidos, y la estructura espectral de los cantos de estas especies. En otro trabajo, Ryan y Wilczynsky (1991) demostraron para el anuro *Acris crepitans*, que distintas poblaciones modifican los parámetros acústicos de sus cantos en función del hábitat, al comparar los cantos producidos en ambientes abiertos y boscosos. Este hecho, muestra que en la dinámica de las señales de comunicación interviene en grado importante el componente ambiental y sugiere que las respuestas de los emisores debieran mostrar un alto grado de plasticidad.

Un caso, particular de atenuación ambiental, puede constituir el efecto de otros machos en coros sobre canto nupcial de un macho. Esto ha sido descrito para *Acris crepitans blanchardi* por Wagner (1989), quien muestra como machos de esta especie modifican la tasa de pulsos en función de los machos que se encuentran cantando en su vecindad. En el esquema presentado este factor se ha denominado como Contexto Social.

4) Filogenia.- El análisis de los caracteres dentro de un marco filogenético explícito (Hennig, 1966; Wiley, 1981) provee una metodología para distinguir entre factores causales contemporáneos e históricos (Brooks y McLennan, 1991; McLennan, 1991, Miles y Dunham, 1993; Harvey y Pagel, 1991). Desde el punto de vista histórico, al establecer el estado de un carácter y relacionarlo con la ocurrencia de un régimen selectivo particular, se posibilita el identificar el contexto en el que un estado de un carácter aparece y su relación con una característica ambiental particular (Baum y Larson, 1991). El uso de la filogenia, además, permite estimar el número de eventos evolutivos independientes, y evita la generación de conclusiones erróneas basadas en inferencias estadísticas impropias,

producidas al tratar las especies como entidades independientes, cuando éstas están relacionadas por historia. El análisis filogenético, entonces, previene que se confundan efectos históricos con efectos actuales (Brooks y McLennan, 1991; Felsenstein, 1985). A pesar de que esta aproximación constituye un protocolo de análisis utilizado ampliamente, el uso de este protocolo para el análisis de caracteres ecológicos y fisiológicos ha sido más bien escaso en la literatura (Huey y Bennet, 1987; Lauder, 1990; Losos, 1990, 1994; Dial y Grismer, 1992).

En anuros, la comparación de caracteres del canto desde el punto de vista filogenético es relativamente reciente (Nelson, 1973; Ryan y Drewes, 1990; Emerson y Boyd; 1999; Sullivan y Malmos, 1994; Cocroft, 1994; Cocroft y Ryan, 1995). En estos trabajos el canto ha sido usado en *Microhylidos* como único elemento en la construcción de filogenias (Nelson, 1972) o en *Hylidos* ha estado asociado con el uso de caracteres morfológicos, inmunológicos y conductuales en la construcción de la filogenia del grupo (Cocroft, 1994). De particular importancia, resulta el trabajo de Cocroft y Ryan (1995) en el que se estudian los patrones de evolución del canto en *Hylidae* y *Bufo*nidae, encontrando que para la primera familia existe un patrón más conservativo para los caracteres ligados a la morfología del canto, mientras aquellos ligados a la conducta y fisiología del canto son menos conservativos. Para bufónidos, no se encontró tasas de divergencia distintas entre caracteres fisiológicos, conductuales y morfológicos. Un hecho interesante, es que para ambos grupos los caracteres más conservados son los morfológicos, en tanto que los caracteres más divergentes son los fisiológicos. Lo que está de acuerdo con la sugerencia de Ryan (1988a) que los caracteres morfológicos son más conservados que los ligados a conducta o fisiología. En resumen, un entendimiento acabado sobre la evolución de las

señales acústicas es complicado, pues está influenciado por factores próximos (tamaño corporal, variación clinal, depredación, fisiología, parásitos, selección sexual) y factores históricos (filogenia) (ver esquema).

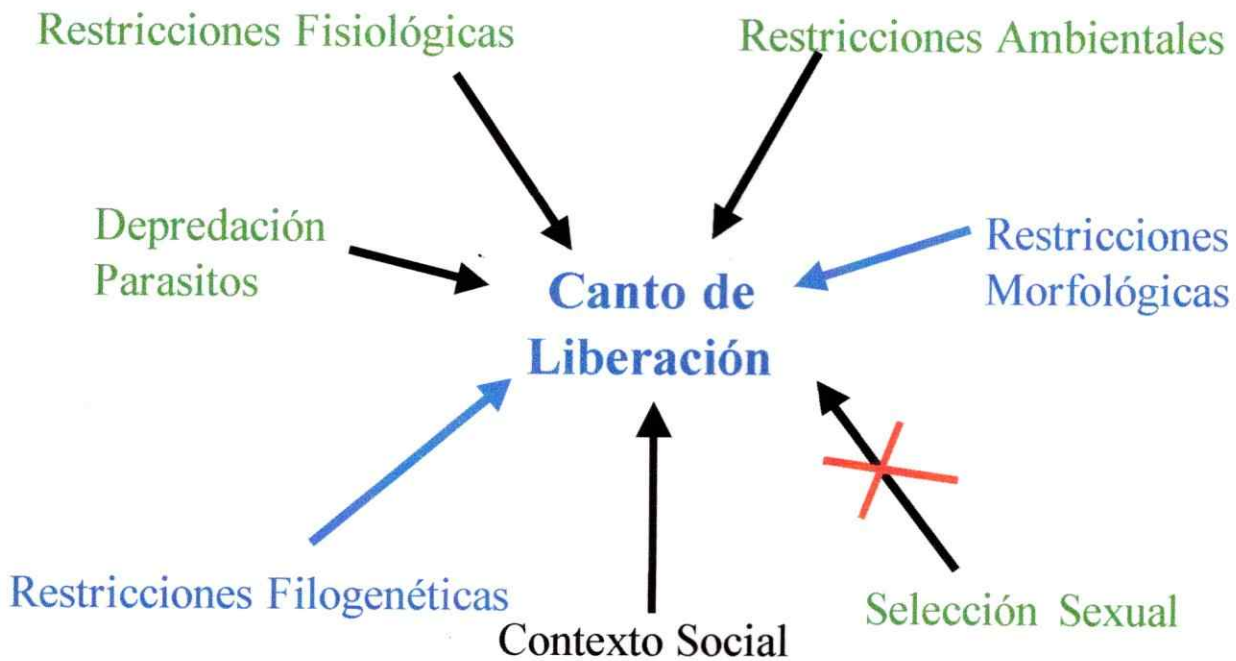
Estudio de la vocalización en las especies del género *Bufo*: el canto de liberación y los factores que modelan su evolución.-

Las investigaciones desarrolladas sobre el origen y vocalización en las especies del género *Bufo* han estado focalizadas particularmente en el canto nupcial, mientras que el canto de liberación ha sido poco estudiado. La función del canto nupcial ha sido estudiada por Gerhardt (1981,1982,1987) para hylidos y, por Ryan para *Physalaemus pustulosus* (1988a; 1995). En estos estudios, se ha evidenciado que este carácter muestra un alto grado de especie-especificidad, siendo clave para garantizar la homoselección. Sin embargo, la divergencia evolutiva del canto nupcial es de difícil interpretación y podría involucrar cambios en la respuesta a la selección natural en el tamaño corporal como también a la selección sexual actuando sobre el canto. En contraste, el canto de liberación no ha recibido similar atención dentro del género, a pesar de la evidente importancia que puede tener esta señal para evitar la hibridización (Brown y Littlejohn, 1972) y para la identificación eficaz de la pareja al momento del amplexo (Marco y col, 1998; Howard y Young, 1998). En este último sentido, es que se ha sugerido que el canto de liberación sería importante para especies en las cuales el evento de reproducción se produce a altas densidades, pues correspondería a una señal que como resultado garantizaría una reproducción eficaz, dada la rápida respuesta de reconocimiento y rechazo que oscila entre 6 s para *B. alvarius* y 3-4 s para *B. americanus* (Blair y Petrus, 1954; Howard y Young; 1988). En el contexto de dar valor adaptativo a este tipo de canto, Brown y Littlejohn (1972), han postulado que la rápida

respuesta de objeción dada por el canto de liberación, podría ser energéticamente ventajoso, de lo anterior, se desprende que, para este tipo de canto, no existirían restricciones energéticas. Brown y Littlejohn (1972) sugieren además, que dada la baja variabilidad intraespecífica detectada en especies del grupo del *Bufo americanus* en algunos parámetros del canto de liberación, este carácter sería útil para realizar estudios filogenéticos, pues reflejaría de mejor modo la filogenia. Adicionalmente, dado que este tipo de canto, no involucra selección mediada por la hembra, sino que corresponde, en bufónidos, a una señal de comunicación entre machos, es posible pensar que ésta debiera ser una señal conservada. Finalmente, dado que el canto de liberación corresponde a una señal de contacto, no sería esperable que la atenuación ambiental sea un factor determinante en la evolución de esta señal. Lo anterior, nos lleva a pensar que en términos de los factores que podrían afectar a la señal, el canto de liberación presenta para un análisis comparativo, evidentes ventajas en comparación al canto nupcial, ya que sólo serían importantes factores como la filogenia y las restricciones morfológicas asociadas a las estructuras que producen el canto (laringe, musculatura torácica; ver Esquema). De este modo, dada la naturaleza conservada del canto de liberación y la aparente ausencia de los factores determinantes en los cambios de las señales acústicas tradicionalmente descritos para el canto nupcial (selección - sexual, atenuación ambiental), es posible predecir que el canto de liberación debiera estar correlacionada con la filogenia de las especies. Debo enfatizar, que si bien las otras fuentes de variación, no han sido descritas como afectando el canto de liberación, esto no implica necesariamente que estas no afecten a la conducta en estudio. Sin embargo, es probable, que si hay efectos, éstos no se manifiesten en la misma magnitud descrita para el canto nupcial,

dadas las consideraciones anteriores. Por lo tanto para efectos de esta tesis me centraré sólo en las fuentes: morfológicas y filogenéticas.

ESQUEMA



Esquema de los factores descritos que podrían afectar la evolución del Canto de Liberación. En azul se representan los factores estudiados en la presente tesis.

El canto de liberación en el grupo *spinulosus*

Las especies del grupo *spinulosus* carecen de las señales de vocalización a distancia (Martin, 1972b). De este modo, las especies del grupo no emiten canto nupcial y carecen de saco vocal. Debido a esto su vocalización ha sido considerada como un canto de liberación (Martin, 1972b; Penna y Veloso, 1981; Penna y col, 1986; Penna y col, 1990).

Penna y Veloso (1981) caracterizaron el canto de liberación en *B. chilensis*, *B. atacamensis* y *B. spinulosus*, encontrando diferencias en los parámetros temporales que permitían diferenciar a las especies. Penna y Veloso (1981) reportan que los amplexos homosexuales tienen una duración promedio de 6 s mientras que los heterosexuales duran en promedio 6 horas, lo que apoyaría la afirmación de Brown y Littlejohn (1972) sobre el ahorro energético y respaldar la idea de la importancia de esta señal para especies de reproducción explosiva, en que el evento de reproducción ocurre en pocos días y con miles de individuos simultáneamente en un mismo sitio.

Penna y col (1990) han analizado la correlación entre el sistema auditivo y el emisor de la señal de liberación para el canto de liberación de las especies del grupo *spinulosus* y para el canto nupcial y de liberación en la especie argentina *B. arenarum*, una especie con sistema de comunicación a distancia. En este trabajo los autores encuentran que existe una mayor similitud entre los umbrales auditivos entre *B. arenarum* y *B. chilensis*, y una correspondencia entre el tamaño y la sensibilidad de la papila basilar entre *B. arenarum* y *B. spinulosus*. Este hecho, sugiere que la evolución de los sistemas receptor-emisor para este grupo, se encuentra bajo distintas presiones de selección, pues si bien, el sistema emisor que produce el canto nupcial en *B. arenarum* debiera ser objeto de una amplia presión

selectiva, el sistema auditivo podría no estar bajo una presión selectiva similar, al encontrar valores similares en los umbrales auditivos entre *B. arenarum*, (con canto nupcial) y *B. spinulosus* (sin canto nupcial).

La ausencia de canto nupcial y la presencia de canto de liberación, hace a las especies del grupo *spinulosus*, un grupo ideal para investigar si, el canto de liberación muestra un correlato estricto con la filogenia, y si el sistema emisor (laringe) muestra un acople con las señales emitidas (cantos) en este grupo de especies o si ambos sistemas evolucionan en forma independiente. De este modo, en esta tesis, se evaluará para las especies chilenas del grupo *spinulosus*, las siguientes hipótesis:

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1) El canto de liberación en este grupo mostrará un correlato estricto con la filogenia.
- 2) En este grupo el sistema emisor (laringe) y las señales producidas (cantos) evolucionan de modo distinto mostrando un desacople.

OBJETIVOS

De acuerdo a lo anterior los objetivos de la presente tesis son:

- 1) Analizar en las especies del grupo *spinulosus*, en *Bufo variegatus* y en *B. arenarum* distintos tipos de caracteres (morfológicos, morfométricos, cariológicos, DNA).
- 2) Establecer con el análisis de los caracteres una hipótesis de relaciones filogenéticas para el grupo *spinulosus*.
- 3) Estudiar desde el punto de vista morfológico las relaciones entre el tipo de canto y la estructura del sistema emisor de las distintas especies (laringe) en las especies del grupo *spinulosus*.
- 4) Establecer si existe un correlato entre la filogenia de las especies y los atributos acústicos y morfológicos de la laringe en las especies del grupo *spinulosus*.
- 5) Investigar la existencia de acople evolutivo entre los caracteres del canto y los caracteres de la laringe en las especies del grupo *spinulosus*.

MATERIALES Y METODOS

1) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS ESPECIES CHILENAS DEL GRUPO *spinulosus*.

Para la estimación de las relaciones filogenéticas de las especies chilenas del grupo *spinulosus* se realizaron dos tipos de análisis: **no molecular** (caracteres morfológicos, cromosómicos, un carácter conductual) y **moleculares** (genes ribosomales: 12S y 16S). Se realizaron análisis por separado y combinando los distintos caracteres en un solo análisis en la búsqueda de una hipótesis filogenética más robusta. En todos los análisis se usó como grupo externo *B. arenarum*, una especie del grupo *marinus*, y *B. variegatus*. La elección de *B. arenarum* como grupo externo se hizo basada en Mezey (1979), quien encontró un grado importante de afinidad genética entre esta especie y las especies *B. chilensis*, *B. spinulosus* y *B. atacamensis*, y en el trabajo de Maxson (1994), autora que utilizando distancias genéticas a partir de albúminas encontró que *B. spinulosus* correspondía al grupo hermano de *B. marinus*, especie relacionada con *B. arenarum*. Para *Bufo variegatus*, los trabajos de Cei (1972, 1980) y Martin (1972a) sugieren que esta especie corresponde al grupo hermano de las especies del grupo *spinulosus*.

I.- Análisis No Molecular. -

Se analizó la morfología externa en material preservado perteneciente a las siguientes colecciones: Colección Herpetológica del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (DBGUCH), Colección del Museo de Zoología de la Universidad de Concepción (IZUC), Colección del Instituto de Zoología de la Universidad Austral de Chile (IZUA). Los detalles del material analizado se resumen en la Tabla 1. El análisis morfológico consideró tanto caracteres cualitativos como caracteres cuantitativos (morfométricos). Para el análisis morfométrico se realizó un total de 17 mediciones (Fig. 1). Todas las mediciones fueron hechas por la misma persona, utilizando un Vernier Mitutoyo marcado en unidades mínimas de 0.05 mm. Se realizaron ANCOVAs para establecer si existían diferencias entre las especies entre los caracteres estudiados, en todas las comparaciones se utilizó el tamaño corporal como covariable.

Para efectuar comparaciones osteológicas, dos ejemplares por especie fueron analizados, con la excepción de *B. rubropunctatus* donde solo se estudió un espécimen. Para este tipo de análisis se estudio principalmente caracteres asociados al cráneo y la cintura escapular (Fig. 2). La nomenclatura siguió a Cei (1980) y a Escariz (1967).

Los análisis cromosómicos fueron realizados siguiendo técnicas estándares (Session, 1996). Estos análisis utilizaron la constricción secundaria como carácter. Los análisis fueron complementados con los trabajos de Formas (1980) y Blair (1972).

Finalmente, como carácter conductual se utilizó la presencia de reflejo hipnótico. Este carácter descrito por Cei (1972, 1980) no mostró un grado importante de variación en las especies estudiadas, estando presente sólo en *B. spinulosus* y en *B. arenarum*. Un resumen del material analizado se adjunta en la Tabla 3.

II Análisis Molecular. -

- a) Extracción de DNA.- Para las especies del grupo *spinulosus* y para *B. arenarum* y *B. variegatus* se extrajo DNA genómico a partir de muestras de hígado, fijadas en alcohol absoluto, utilizando Chelex 100 (Walsh y col., 1991). Un total de 24 animales fue analizado. Para cada especie se incorporó material de distintas localidades, a excepción de *B. rubropunctatus*, especie en la que sólo se dispuso de un ejemplar (Tabla 2).

Figura 1

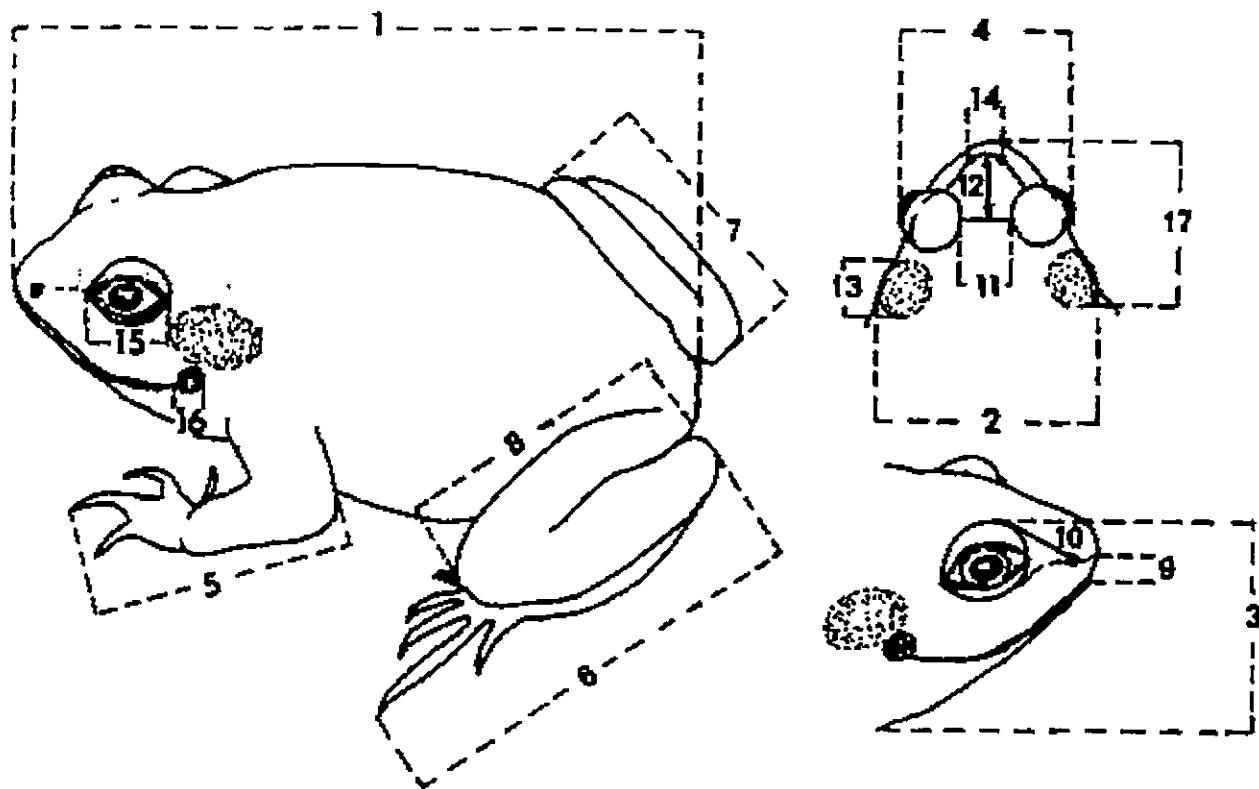


Figura 1.- Esquema de las mediciones morfométricas efectuadas en las especies del grupo *spinulosus*, *Bufo arenarum* y *Bufo variegatus*. Para una definición de los caracteres ver Anexo 1.

Figura 2

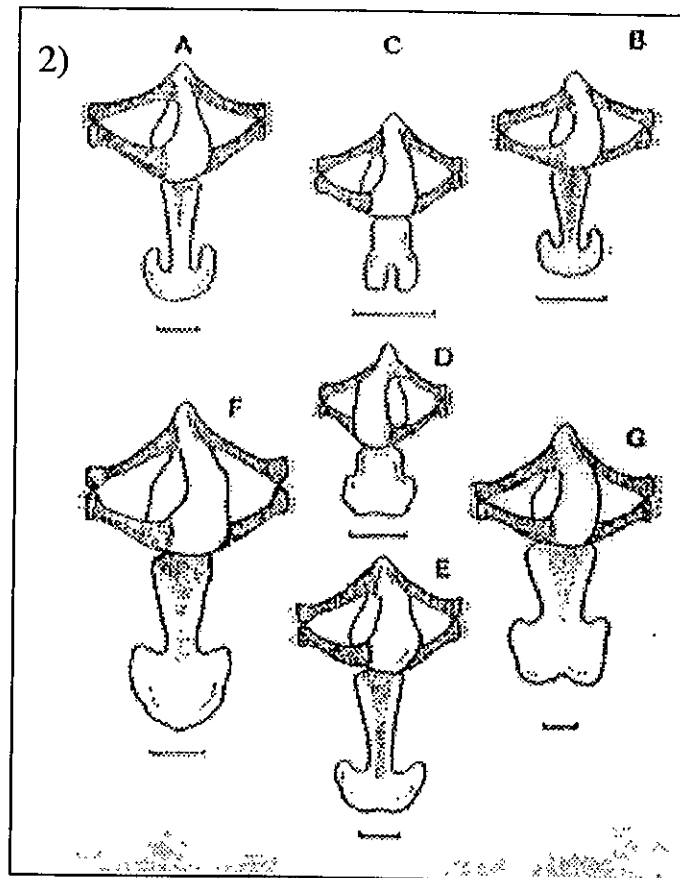
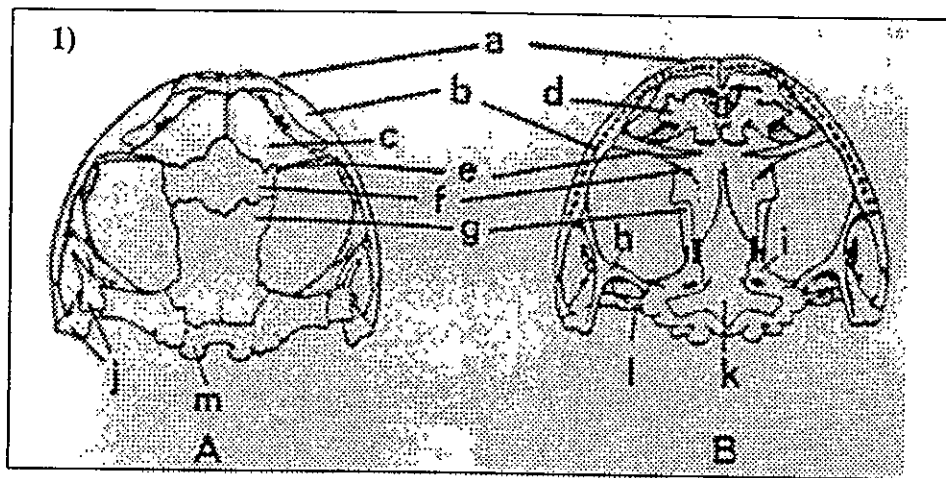


Figura 2.- Dos de los caracteres morfológicos usados en el análisis filogenético: 1) Caracteres craneales, para detalles de las estructuras descritas desde "a" a "k", ver Cei (1980) y 2) Cintura Pectoral (A: *Bufo spinulosus*; C: *Bufo rubropunctatus* ; D: *B. variegatus* y E: *B. arenarum*). La terminología de caracteres sigue a Cei (1980).

Tabla 1

	Localidad	Colección	Nº de colección
<i>Bufo spinulosus</i>	Lagunillas	DBGUCH	1,2,3,5,6,7,8,9,10,11.
	San Pedro	DBGUCH	1, 4,15,17,21,22.
	El Tatio	DBGUCH	7,9, 14, 41,13,14,16,22,23,38,41,50.
	Farellones	DBGUCH	190,197,299,305,320, 327.
	Putre	DBGUCH	298, 303, 713.
	Azapa	DBGUCH	375,376,535,611,650,722,723, 724,725.
	Lauca	DBGUCH	605,606,709,727.
	Zapahuira	DBGUCH	536, 537, 538.
	Parinacota	DBGUCH	596, 597, 977, 978,979, 980, 981.
	Quebrada Jerez	DBGUCH	2074, 2075, 2076, 2093, 2097, 2102.
	Baños Morales	DBGUCH	1406.
<i>Bufo atacamensis</i>	Pajonales	DBGUCH	2078,2156,2165,2168.
	Paposo	DBGUCH	2089, 2111, 2112, 2113, 2123, 2124,2141, 2142, 2145, 2162, 2163.
	Bandurrias	DBGUCH	2092, 2099, 2101, 2114,
	Finca Chañaral	DBGUCH	2260, 2261, 2262, 2264, 2266, 2269, 2274, 2278.
	Socos	DBGUCH	2078.
<i>Bufo chilensis</i>	Quebrada de la Plata	DBGUCH	1,2, 3, 4, 6.
	La Dehesa	DBGUCH	272, 302,315,316, 2096, 2101.
	Melipilla	DBGUCH	902.
	La Ligua	DBGUCH	1072, 1073, 1075, 1076, 1077, 1083, 1084, 1086, 1087, 1090, 1091, 1092, 1093, 1148.
	Curacaví	DBGUCH	2089.
	Quebrada de Córdoba	DBGUCH	1163.
<i>Bufo papillosus</i>	Volcán Antuco	CIZUC	1109, 1149, 1150, 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1158,1159.
	Malleco	CIZUC	1115
<i>Bufo rubropunctatus</i>	Ramadilla	CIZUC	1020, 4289, 4343, 4549, 4840, 4841, 5218, 5227, 5240, 5242, 5265.
	Volcán Puntagudo	CIZUC	1307
	Lo Barros	CIZUC	1295, 1296, 1297,1299.
<i>Bufo variegatus</i>	Volcán Llaima	IZUA	97, 98, 99.
	Volcán Antuco	IZUA	1304.
	La Picada	IZUA	1386.
	Antillanca	IZUA	1552, 1553, 1555, 1556, 1557, 1758, 1759.
	Puerto Edén	DBGUCH	2326, 2327, 2328, 2329, 2334.
<i>Bufo arenarum</i>	Mendoza	DBGUCH	2101, 2103, 2150, 2151, 2152, 2246, 2247, 2249, 2251.

Tabla 1 .- Resumen de los ejemplares analizados para los análisis morfométricos y cariológicos en las especies del grupo *spinulosus*. Se detallan las especies, las localidades y el número de colección. En este trabajo se utilizó material de tres colecciones: Colección Herpetológica del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (DBGUCH); Colección del Museo de Zoología de la Universidad de Concepción (IZUC) y Colección del Museo de Zoología de la Universidad Austral de Chile (IZUA).

Tabla 2

Especie	Número de animales muestreados	Localidades
<i>B. atacamensis</i>	4 (2078, 2123, 2171, 2348)	Paposo, Pajonales, Quebrada los Sapos,
<i>B. chilensis</i>	3 (2154, 2412, 2412)	Quilicura, Curacaví, Talca.
<i>B. papillosus</i>	4 (2374, 2383, 2418, 2423)	Laguna del Laja
<i>B. rubropunctatus</i>	1 (s/n)	Chubut (Argentina)
<i>B. spinulosus</i>	6 (1, 2132, 2174, 2400, 2155, 2157).	Tatio, Peine, Portillo.
<i>B. variegatus</i>	3 (1712, 2409, 2417)	Campos de Hielo, Puerto Edén
<i>B. arenarum</i>	3 (2100, 2333, 2346)	Mendoza (Argentina)

Tabla 2.- Detalle de los ejemplares analizados para los genes 12S y 16S. Se representa entre paréntesis el número de colección del ejemplar.

a) Amplificación y Secuenciación de DNA.- Se amplificaron dos regiones de los genes ribosomales mitocondriales 12S y 16S. Para el gen 12S se utilizó los partidores descritos por Kocher y col. (1989): L1091 (5'-AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT-3') y H1478 (5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT -3'). Para el gen 16S se utilizó los partidores descritos por Palumbi y col. (1991): 16Sar: (5'CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') y 16Sbr: (5'- CCG GTCTG AACTC AGATC ACGT -3'). Reacciones de PCR para genes 12S y 16S, fueron realizadas utilizando ambos partidores, bajo las siguientes condiciones: treinta y cinco ciclos de: 95°C por 30 s, 55°C por 45 s, 72°C por 45 s y finalmente 10 min de extensión a 72°C. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen de 50µl (1 µl de cada primer (20µM), 5µl buffer Taq Buffer 10X (Perkin Elmer), 5µl dNTPs, 1 µl de templado (56-70 ng DNA/µl), 0.4 µl Taq Polimerasa (Perkin Elmer) y 36.6 µl de agua destilada). Los productos de la reacción fueron corridos en geles de agarosa (1.2%) y se usó

Bromuro de Etidio para su visualización. Los productos de PCR fueron purificados usando filtros Ultrafree (Millipore, Bedford, MA, USA) y posteriormente fueron usados para la reacción de secuenciación, utilizando 1 μ l de templado y el Kit Big Dye Reaction (Perkin Elmer, Weiterstadt, Germany) según las instrucciones del fabricante. Se corrieron dos reacciones por muestra utilizando un solo primer en cada una, esto permitió el secuenciar el mismo sector de DNA en ambas direcciones de modo independiente. Los productos de esta reacción fueron analizados en un secuenciador ABI™ 377 (Perkin Elmer). Las muestras resultantes fueron alineadas primero visualmente y posteriormente utilizando la opción CLUSTAL W (Thompson y col., 1994), disponible en el grupo de programas Sequencer Navigator (Perkin Elmer).

b) Análisis Filogenético:

El análisis filogenético para la partición no molecular fue realizado usando PAUP*4 b para Windows (Swofford, 1999) y la opción de Máxima Parsimonia. Todos los caracteres fueron tratados como no ordenados. Los análisis realizados involucraron el uso de peso diferencial de caracteres en aproximaciones sucesivas, utilizando las opciones: TBR, random addition=100 y constraints, para mantener a *Bufo arenarum* y *B. variegatus* fuera del grupo interno. Las hipótesis más parsimoniosas fueron evaluadas utilizando dos criterios: su soporte estadístico mediante Bootstrap con 1000 réplicas y el Índice de Decaimiento (*Bremer support*; Bremer, 1994) utilizando para esta finalidad el programa AutoDecay 4.0 (Eriksson, 1998).

Para la partición molecular, la estimación de las relaciones filogenéticas fue realizada utilizando los siguientes programas : PAUP*4b (Windows y Mac) y MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 1.2; Kumar y col. 1993). Los análisis fueron

realizados utilizando diferentes métodos de construcción de árboles: Máxima Parsimonia, Neighbor Joining (opción:Kimura 2P), Minimum Evolution (opción Logdet), Máxima Verosimilitud (HKY85). Para Máxima Parsimonia se utilizó las opciones: Tribisection and reconnection (TBR), ACCTRAN y peso diferencial de transiciones v/s transversiones (1:1 o 1:2), todos los caracteres fueron tratados como no ordenados. El programa MEGA fue utilizado para realizar la estimación de la filogenias usando sólo transversiones. Para cada árbol se evaluó la significancia estadística de cada nodo utilizando bootstrap (1000 réplicas; PAUP*4b) e Índice de decaimiento (*Bremer Support*; Bremer, 1994), en este caso el programa Autodecay 4.0 (Eriksson, 1998) fue utilizado para realizar las estimaciones de soporte para cada nodo (*Bremer support*).

El análisis conjunto de las particiones siguió a Bull y col (1993) y Huelsenbeck y col (1996). Los diferentes conjuntos de datos fueron analizados primero separadamente. Posteriormente los datos moleculares fueron analizados en forma conjunta (12S y 16S) y finalmente se realizó un tercer análisis en que se creó una sola matriz con todos los caracteres (evidencia total). Cada combinación de caracteres (partición) fue evaluada en su heterogeneidad utilizando el Test de Incongruencia (ILD, *Incongruence Length Differences*; Farris, 1994). Para esto se usó la opción disponible en PAUP*4 b (Swofford,1999).

2) ANALISIS DE ATRIBUTOS ACUSTICOS Y MORFOLÓGICOS ASOCIADOS AL CANTO DE LIBERACION.

a) Análisis de señales acústicas.

Se analizaron grabaciones hechas entre los años 1977-1979 y material recolectado entre los años 1996-1999. La tabla 5 resume el material analizado para el canto de liberación. Para obtener el canto de liberación, se manipuló a los animales presionando suavemente en los flancos a los machos, situación que produce el canto de liberación en forma espontánea en estas especies. Las grabaciones fueron realizadas utilizando una grabadora Uher 4000 Report IC, con una velocidad de 19 cm/s y un micrófono Uher m 517 o una grabadora Sony Profesional Sony Walkman TCD-5M utilizando una cinta TDK SA90 y un micrófono Shure Prologue. Las grabaciones fueron posteriormente digitalizadas usando un computador Power Macintosh 7100 y el programa Signalyze ®, a una tasa de captura de 22000 puntos por dato. Para todas las especies en cada canto se analizó la frecuencia dominante (Hz), tasa de pulsos (s), duración del canto (s), tiempo promedio de pulsos (s), número de pulsos por canto, tasa de pulsos (pulsos/s) y número de pulsos dobles (Tabla 3). Para cada macho se analizó entre seis a doce cantos, excepto en el caso de la frecuencia dominante y la frecuencia promedio de *Bufo chilensis*, en que se analizaron cinco cantos por cada individuo. Se llevó un registro del tamaño corporal de los animales, utilizando un Vernier Mitutoyo (0.01 mm precisión). En cada grabación la temperatura fue determinada. En el caso de *B. chilensis* y *B. atacamensis* se midió la temperatura del aire (18-19°C, respectivamente), mientras que en las otras especies se midió la temperatura de cada animal, utilizando una termocupla Sensortek Modelo BAT-12. En estas

grabaciones la temperatura de los animales fue de 16 ± 2 °C. Dado que no fue posible el encontrar material vivo y que no se disponía de grabaciones de *B. rubropunctatus*, esta especie no fue incluida en los análisis de señales acústicas.

Los datos de los registros fueron analizados utilizando el programa SYSTAT 6.0.1 para Windows 95 (Wilckinson, 1996) y el programa STATISTICA 6.0 (StaffSoft. Inc, 1997 para Windows). Para comparar cada carácter del canto entre especies se utilizó análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) con el tamaño corporal como covariable. Finalmente, una prueba *a posteriori* de Tukey fue usada para establecer entre cuales especies se observaron las diferencias. Todos los atributos acústicos fueron analizados conjuntamente utilizando Análisis de Componentes Principales (ACP), una matriz de varianza-covarianza, y posteriormente Análisis Discriminante (AD). Con los coeficientes canónicos derivados de este ultimo análisis se generó un agrupamiento que permitió asignar la variación multivariada a cada especie.

Tabla 3

1) Duración (s) :	Tiempo desde el inicio hasta el final del canto.
2) Pulsos :	Número total de pulsos por canto.
3) Tasa de pulsos:	Número total de pulsos dividido por la duración total.
4) Tiempo promedio de pulsos:	Promedio de la duración de todos los pulsos de un canto.
5) Pulsos dobles:	Número de pulsos dobles producidos por canto.
6) Frecuencia Dominante (Hz):	Frecuencia del canto con la mayor energía.
7) Rendimiento:	Cuociente entre el largo de un pulso y el intervalo entre el final de un pulso y el comienzo del siguiente pulso. El valor corresponde a la sumatoria total para un canto.

Tabla 3.- Lista de caracteres evaluados en las señales acústicas en las especies del grupo *spinulosus* , *B. arenarum* y *B. variegatus*.

b) Análisis de caracteres morfológicos asociados al canto.

Para las especies estudiadas se realizó dos tipos de análisis. El primer análisis consideró los músculos asociados a la producción del canto de liberación junto con la relación de tamaño de la laringe en las distintas especies. Con esta finalidad se procedió a seccionar en material fresco los músculos abdominales, oblicuo externo y la laringe (incluyendo cartílago). Posteriormente, tanto la musculatura como la laringe fueron pesadas (peso fresco) utilizando una balanza analítica ANDER-120A. Estas mediciones fueron estandarizadas utilizando el peso de cada animal. El detalle de los animales utilizados se resume en la Tabla 4. Las laringes fueron fijadas en formalina al 10% para su análisis posterior.

Tabla 4

ESPECIE	Rango de tamaño (mm)	Laringe-Cartílago	Músculo Oblicuo Externo	Músculo Abdominal	Nº de Colección
<i>B. arenarum</i>	87.5 - 67.6	7	7	6	2344, 2345, 2346, 2130, 2131, 2339, 2150.
<i>B. spinulosus</i>	35.9 - 81.3	9	9	5	2074, 2104, 2128, 2130, 2135, 2248, 2332, 2338, 2386,
<i>B. atacamensis</i>	55.5 - 69.4	6	6	6	2113, 2145, 2165, 2347, 2348, 2352.
<i>B. chilensis</i>	69 - 100	4	4	3	2271, 2272, 2387
<i>B. variegatus</i>	27.8 - 30.1	2	2	1	2327, 2334
<i>B. papillosus</i>	70	1	1	1	2383

Tabla 4. - Detalle del material analizado para las correlaciones entre musculatura y canto.

Las laringes extraídas fueron procesadas según el siguiente protocolo:

- 1) Lavado en agua corriente por tres horas.
- 2) Solución de EDTA 10% pH 7.0 por 48 horas.
- 3) Lavado en Agua Corriente por dos horas.
- 4) Batería de Deshidratación: Etanol 50 % por toda la noche, Etanol 70 % por 45 min, Etanol I 95 % por 60 min, Etanol II 95 % por 60 min, Etanol 95 %-Butanol por 60 min, Butanol I por 60 min, Butanol II por 60 min, Butanol III por toda la noche.
- 5) Para la impregnación las laringes fueron colocadas en Histosec (Merck) por toda la noche, y cambiadas a nuevos recipientes conteniendo Histosec (Merck). Este procedimiento se repitió tres veces y posteriormente las muestras fueron incluidas en el molde.
- 7) Se realizaron cortes histológicos de cada laringe (cada 20 μ m). Cada 10 cortes (una sección) se tomaron cinco cortes para montar, los otros cinco fueron desechados, en el caso de *B. variegatus* dado que las laringes eran pequeñas se procedió a seccionar toda la laringe.
- 8) Con la finalidad de distinguir musculatura de cartílago, los cortes histológicos fueron teñidos utilizando una solución de Hematoxilina-Floxina, y luego se montaron para obtener preparaciones permanentes (ver Anexo 3).

Para analizar los cortes histológicos, se tomaron fotografías de cada corte usando una lupa estereoscópica Nikon y una cámara Nikon Modelo FX-35DX. Cada sección fue fotografiada a un aumento de 0.66X y en cada fotografía se incluyó una escala para efectuar las mediciones correspondientes. La película que se usó fue Ilford PAN-50. Cada fotografía fue posteriormente escaneada utilizando el Programa Adobe PhotoShop 5.0.

El análisis de la laringe consideró un total de catorce animales (Tabla 5). En cada corte se analizó: Músculo Dilatador, Músculo Constrictor, Cartílago Aritenoide, Cartílago Cricoide y las Cuerdas Vocales. Las mediciones consideraron el área de cada estructura, para lo cual se usó como referencia la escala presente en cada corte (4.2 mm). Para estimar el área de cada estructura se utilizó el programa ImageTool 2.0. (Wilcox y col., 1995). Para cada medición se consideró el perímetro de las áreas relevantes de cada corte, cada medición fue hecha tres veces, y se registró el promedio para cada estructura. Las mediciones fueron hechas a intervalos de 20 μm . No se midieron todos los cortes, sino que se seleccionó cada 200 μm tres cortes, estos valores fueron considerados como representativos de la sección de 200 μm .

Tabla 5

Espece	Número de animales analizados	Número de colección
<i>B. atacamensis</i>	4	2142 (Paposo), 2145 (Paposo), 2347 (Paposo), 2140 (Pajonales).
<i>B. chilensis</i>	2	2271 (Quilicura), 2272 (Quilicura).
<i>B. spinulosus</i>	3	2332 (Vilama), 2338 (Vilama), 2386 (Portillo)
<i>B. papillosus</i>	1	2388 (Laguna del Laja)
<i>B. arenarum</i>	3	2074, 2332 y 2346 (Mendoza, Argentina)
<i>B. variegatus</i>	1	2334 (Puerto Edén)

Tabla 5.- Detalle de los animales estudiados para estimar caracteres asociados a la laringe. Para cada animal analizado se detalla su número de Colección y en paréntesis la localidad de procedencia.

Para las estimación de los volúmenes totales de cada estructura se utilizó la formula descrita por McClelland y col. (1996):

$$V_{total} = \sum_{i=0}^{n+1} v_{corte} = \sum_{i=0}^{n+1} T \frac{\sqrt{(A_i)(A_{i+1})} + A_i + A_{i+1}}{3}$$

donde i corresponde al índice de corrida de cada corte, i es el primer corte con un área medible, n es la ultima placa con estructura a medir presente, A_i es el área de la estructura (en mm^2) en una sección, A_{i+1} es el área de la estructura en la siguiente sección medida y T es la distancia entre las dos secciones ($200\mu m$). Esta fórmula para el volumen del fustrum no descansa en el supuesto de que el área a medir de cada placa debe ser igual, en orden a calcular el volumen exactamente (McClelland y col., 1996).

El análisis estadístico de estas muestras involucró Análisis de Varianza utilizando y análisis de correlación de Pearson utilizando los datos de canto de cada especie y los datos de morfología de la laringe y musculatura asociada. En todos los análisis se utilizó el programa SYSTAT 6.0. En aquellas variables que mostraron una influencia significativa del tamaño corporal se analizó la variación residual. De esta manera, el efecto del tamaño corporal fue removido, los residuos fueron obtenidos mediante análisis de regresión entre la variable de interés y el tamaño corporal. Para las correlaciones de Pearson entre el canto y las estructuras morfológicas asociadas se analizó las medias de cada variable, de este modo se obtuvo un valor por especie para todas las variables. El sentido, de estos análisis corresponde a analizar en detalle la variación en los atributos medidos en cada

especie, buscando relaciones entre pares de caracteres. Junto a este tipo de análisis, se realizó un análisis multivariado de componentes principales y función discriminante. Con este análisis se asoció toda la variabilidad existente en unos pocos vectores ("eigenvalues"), los que fueron usados para efectuar comparaciones entre las especies, tanto a nivel estadístico (discriminante) como a nivel filogenético (ver sección mapeo de caracteres).

3) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS CARACTERES ASOCIADOS AL CANTO.

Dos tipos de análisis fueron realizados para dar cuenta de la evolución de las señales acústicas. El primero involucró el mapeo de los distintos caracteres en la filogenia, utilizando el programa MacClade 3.1 (Maddison y Maddison, 1992). En este análisis se utilizó la filogenia originada a partir del análisis de Máxima Parsimonia de los genes 12S, 16S y los caracteres no moleculares. Sobre esta filogenia se mapearon los caracteres asociados al canto.

El segundo tipo de análisis correspondió a un análisis multivariado de dos grupos de caracteres: los asociados a la señal acústica y los asociados a la laringe. El objetivo de este análisis fue analizar la relación existente entre las señales acústicas, las estructuras asociadas al canto (laringe) y la filogenia, en el marco de distintas hipótesis de cambio evolutivo. Con esta finalidad, se realizó una comparación cualitativa entre las similitudes fenéticas asociadas al canto entre las especies evidenciadas a través del análisis de agrupamientos y la filogenia de las especies. Para explorar las posibles fuentes de cambio se procedió a evaluar tres modelos de cambio evolutivo en función de la filogenia (Mooers y col., 1999). Los modelos seleccionados corresponden a **cambios asociados a**

especiación, en que los cambios son más probables de originarse si están ligados a eventos de especiación (por ej. caracteres asociados a selección sexual); **Cambios asociados a la diferenciación genética entre las especies**, en que la tasa de cambio de los caracteres está fuertemente ligada a la variación genética entre las especies y **cambios no históricos**, en este último modelo los cambios entre especies hermanas no son más probables de ser más similares que dos especies tomadas al azar (Mooers y col, 1999). De este modo, es posible investigar que modelo describe en mejor forma la evolución de cada grupo de caracteres. Con esta finalidad se procedió a estimar a partir de la matriz de los genes 12S y 16S, la hipótesis filogenética de Máxima Verosimilitud utilizando esta vez el programa PHYLIP (version 3.4; Felsenstein, 1993) y las opciones de Máxima Verosimilitud con reloj molecular (DNAMLK tree) y Máxima Verosimilitud sin reloj molecular (DNML tree). En ambos casos se usaron los mismos parámetros (tasa de transiciones:transversiones 2:1, frecuencias empíricas, una categoría de sustitución). En ambos análisis se excluyó a *B. rubropunctatus*, debido a que no se disponía de información sobre los caracteres a evaluar para esta especie. Ambas filogenias mostraron la misma topología y similares valores de probabilidad (DNAMLK: Ln Likelihood = -2329.77341; DNAML: Ln Likelihood = -2325.70334), y fueron similares a las obtenidas utilizando PAUP*4b (Swofford, 1999) para todas las especies. Dado que no existieron mayores diferencias entre ambas topologías y que no fue posible objetar la hipótesis de reloj molecular, se seleccionó la filogenia obtenida con DNAML para posteriores análisis.

El análisis de evolución de caracteres consideró dos fuentes de información: los cantos y las estructuras morfológicas relacionadas con la producción de canto (laringe). Con esta finalidad para cada set de caracteres se utilizaron las medias. Con estos valores,

se realizó un Análisis de Componentes Principales, sobre una matriz de correlación. Todos los valores fueron hechos positivos adicionando el mínimo valor a cada eje. Con estos valores se procedió a calcular la filogenia esperada para el modelo de cambio asociado a especiación. En este caso se utilizó el programa para estimar filogenias usando caracteres continuos CONTLM del paquete de programas PHYLIP, que calcula una filogenia utilizando caracteres continuos. Finalmente se aplicó el programa FIT.EXE (Mooers y col., 1999) para evaluar el ajuste de cada modelo con los datos obtenidos para cada set de caracteres. Este programa utiliza la filogenia y los caracteres de interés y calcula las probabilidades (Maximum Likelihood) para cada modelo. En este caso dos hipótesis son consideradas distintas si se obtiene un valor de diferencia de log "likelihood" de aproximadamente siete veces entre ellas (Edwards, 1992; Mooers y col., 1999). A pesar de que existe una variedad de métodos para la reconstrucción de caracteres ancestrales desde la perspectiva de evolución de caracteres continuos (**Máxima Verosimilitud:** Felsenstein, 1973; Schluter, 1995, Schluter y col., 1997; **Método de Contrastes Independientes:** Garland y col., 1992; **Autoregresion y Generalized least squares (GLS):** Martin, 2000) y la evidente dicotomía entre buscar correlaciones con una causa putativa o explicaciones causales en la investigación de la evolución de los caracteres continuos, he seleccionado el método de Mooers y col. (1999), debido a: a) la ventaja de contrastar la relación existente entre filogenia y modelos explícitos de cambio evolutivo (por ej. Modelo de especiación) de caracteres complejos, b) la posibilidad de comparar distintos grupos de caracteres en relación a la filogenia, c) y asumiendo que existe una correlación en las tasas de cambio entre caracteres moleculares y morfológicos (Omland, 1997), la posibilidad de explicar la correlación observada con modelos de evolución y

fijación de novedades evolutivas como: Deriva genética en grandes poblaciones, modelos de especiación, entre otros (Para una revisión ver Pagel, 1999).

RESULTADOS

1) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS ESPECIES CHILENAS DEL GRUPO *spinulosus*.

I.- Análisis No Molecular.- Con toda la información disponible se construyó una matriz con un total de cuarenta y un caracteres. Muchos de los caracteres evaluados no mostraron variación en el grupo interno, por lo que fueron excluidos del análisis. El número final de caracteres correspondió a 21. El detalle de los caracteres y las polarizaciones realizadas se resume en el Anexo 1.

Tabla 6

<u>ESPECIES/CARACTERES</u>	1										2									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Bufo spinulosus</i>	1	0	0	1	1	0	1	0	0	2	2	0	1	0	1	1	2	0	1	0
<i>Bufo atacamensis</i>	1	0	0	2	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>Bufo chilensis</i>	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	0	1	1	1
<i>Bufo rubropunctatus</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	2	2	?	1	0	0	1	1	0	1
<i>Bufo papillosus</i>	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	2	1	?	1	1	0	1	1
<i>Bufo variegatus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Bufo arenarum</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	2	0	?	1	0	1	1	1	1

Tabla 6- Matriz utilizada para la estimación filogenética a partir de caracteres morfológicos, cromosómicos y conductuales en las especies chilenas del grupo *spinulosus*, *B. variegatus* y *B. arenarum*. Los caracteres con su estado indeterminado se representan con el símbolo "?".

II.- Resultados del Análisis Filogenético de caracteres no moleculares.-

Se realizaron distintos análisis para estos datos, desde tratar a todos los caracteres con igual peso hasta establecer peso diferencial de caracteres. El análisis con igual peso de todos los caracteres no mostró ser resolutivo para las especies del grupo *spinulosus*. Por otra parte, al establecer peso diferencial de los caracteres se obtuvo un mejor nivel de resolución. En este análisis se asignó un mayor peso al carácter constricción secundaria con peso tres, a los caracteres esqueléticos con peso dos, y a los restantes once caracteres con peso uno. Con este procedimiento se obtuvo solo un árbol mas parsimonioso (Largo: 64 pasos; Índice de Consistencia (CI): 0.57; RI:0.30, excluyendo caracteres no informativos). Sin embargo, en este árbol, sólo se obtuvo resolución para *B. rubropunctatus*, especie que se separa de las otras especies del grupo interno (Fig. 3). Un análisis de Bootstrap de 1000 réplicas evidenció que el soporte para esta separación no es muy robusto (58%; Fig. 3). Por lo que la información derivada del análisis no molecular fue bastante limitada al no permitir la resolución de las otras especies del grupo interno.

III.- Análisis Molecular

Entre los dos genes amplificados se obtuvo un total de 1025 pares de bases nucleotídicas (453 para el gen 12S y 570 para el gen 16S), las secuencias alineadas se muestran en el Anexo 2. En general ambos genes mostraron un grado similar de variación y de sitios informativos desde el punto de vista de la parsimonia y una proporción similar de A-T (Tabla 7).

Figura 3

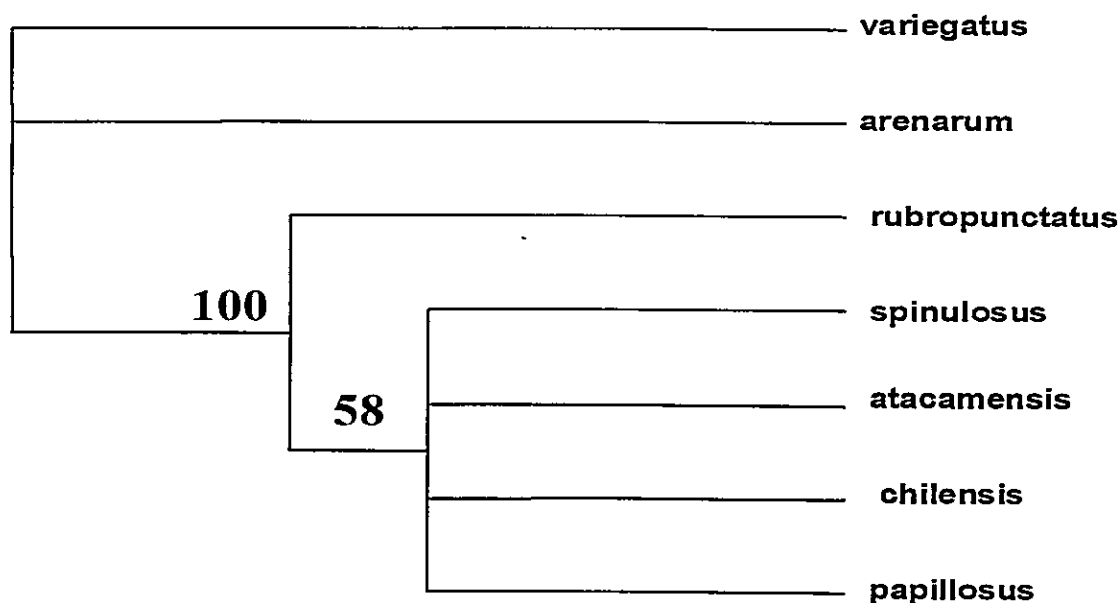


Figura 3.- La hipótesis filogenética más parsimoniosa para 21 caracteres (morfología externa, osteología, cromosomas y conducta) analizados en el grupo de especies chilenas del grupo *spinulosus*. Sobre cada nodo se representa el valor de bootstrap (1000 réplicas).

Tabla 7

Gen	% de sitios variables	% de sitios informativos	N° de sitios amplificados	% A+T
12S	22.29	4.36	4.53	57.2
16S	14.6	5.06	572	56.0

Tabla 7.- Resumen de la información de las secuencias amplificadas para los genes 12S y 16S, se representa el porcentaje de sitios variables para cada gen, el porcentaje de sitios informativos para Análisis de Parsimonia, número total de bases amplificadas y finalmente la proporción de A y T encontradas.

Análisis Gen 12S.- El análisis del gen 12S para MP con igual peso de transiciones y tranversiones encontró un solo árbol más parsimonioso (Largo: 150; CI: 0.92; RI: 0.58; excluyendo caracteres no informativos). Un segundo análisis con una proporción de transiciones y tranversiones de 2:1, mostró un solo árbol más parsimonioso (Largo: 58 pasos; CI: 0.75; RI: 0.61, excluyendo caracteres no informativos; Figura 4) y presentó la misma topología que en el primer análisis. El análisis de bootstrap mostró altos grados de resolución para el clado *spinulosus-papillosus* (81%) , para el clado que agrupa a *spinulosus*, *papillosus*, *chilensis* y *atacamensis* (85%), en tanto que la separación entre *rubropunctatus* y las otras especies de grupo *spinulosus* no fue robusta (59%). Por otra parte el Índice de Decaimiento mostró valores entre 1 y 2 (Figura 4). El árbol resultante

Figura 4

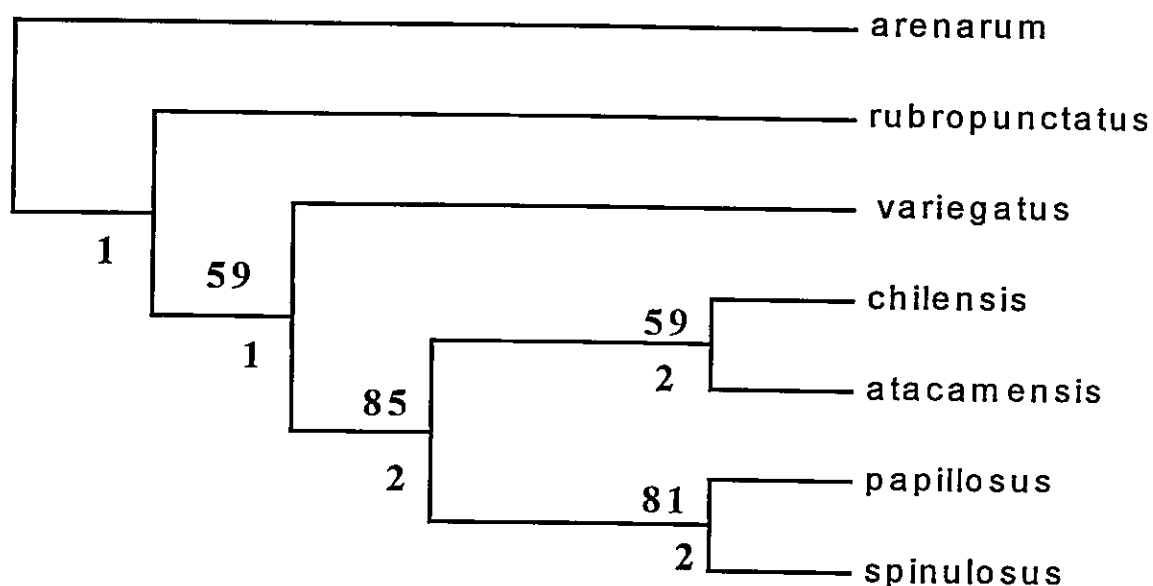


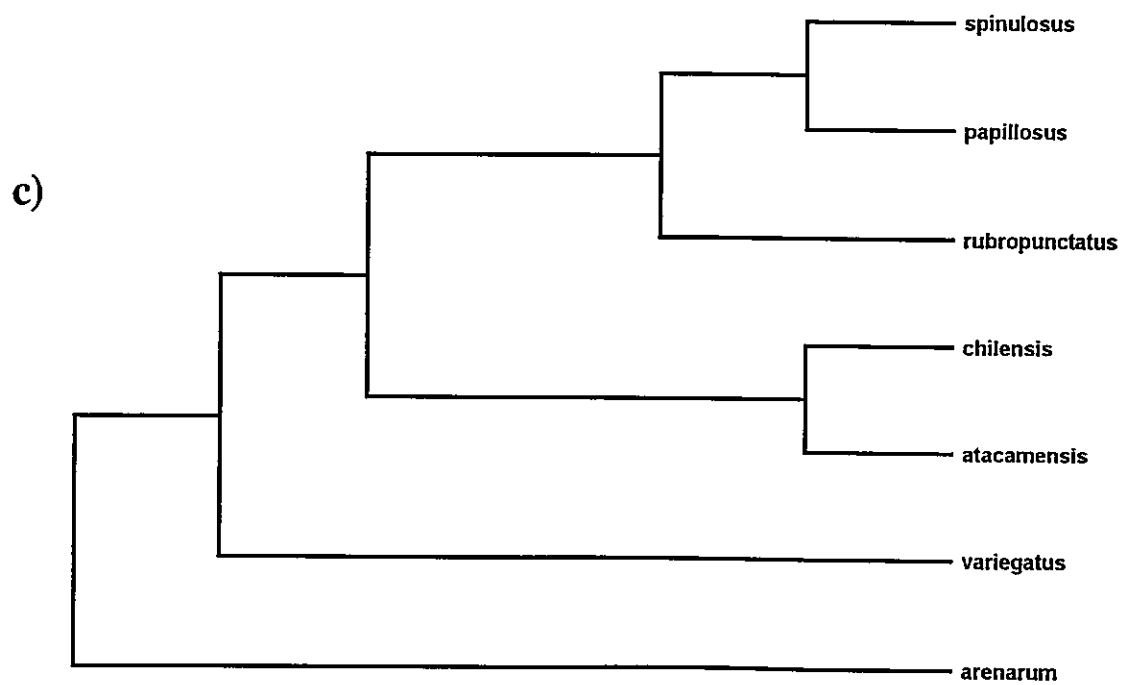
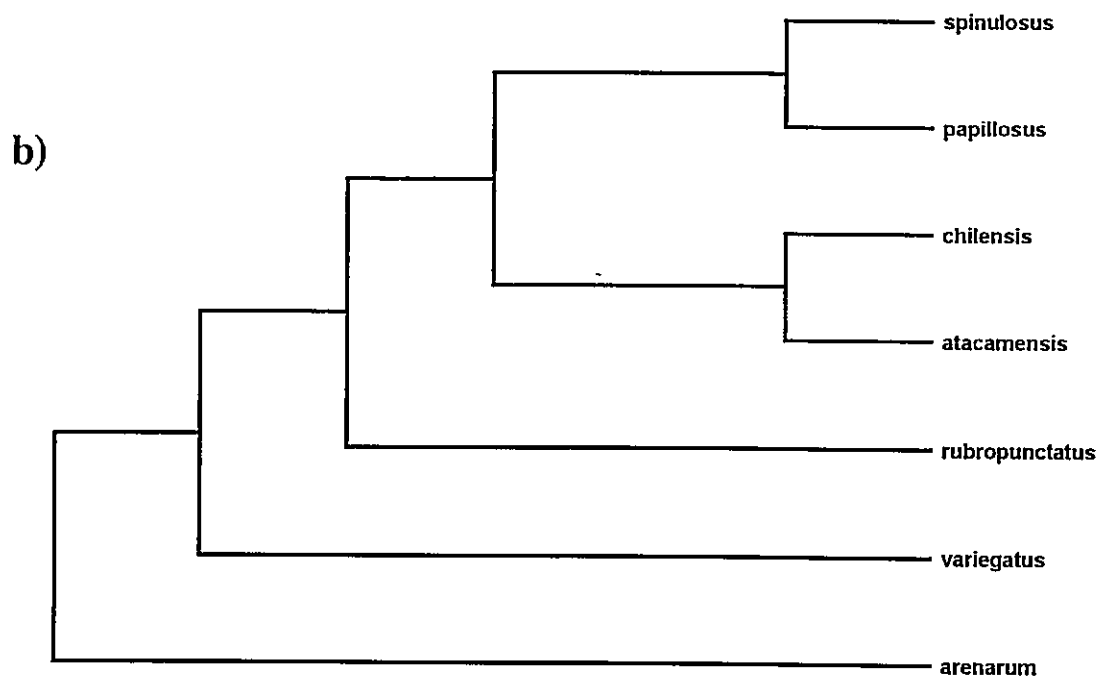
Figura 4.- La hipótesis filogenética más parsimoniosa para el gen 12S. Sobre cada nodo se representa el valor de bootstrap (1000 réplicas) y bajo cada nodo se muestra el Índice de decaimiento (*Bremer support*).

muestran que *B. chilensis* y *B. atacamensis* corresponden a especies hermanas, y que *B. spinulosus* y *B. papillosus* constituye su grupo hermano, siendo *B. variegatus* el grupo hermano de ambos clados. La especie *B. rubropunctatus* se ubica en este árbol como especie hermana a todas las especies restantes, mientras que *B. arenarum* aparece la especie más basal.

Por otro lado, tanto los análisis de ML con un tipo de sustitución (F81) y dos tipos de sustitución (HKY 85) mostraron la misma topología que el análisis de MP, pero mostraron menores valores de bootstrap para cada nodo (Tabla 8). El análisis de ME (opción Logdet) mostró la misma topología pero los valores de bootstrap para cada nodo fueron superiores (Tabla 3). Finalmente el análisis de NJ con la opción K2P mostró nuevamente la misma topología y similares valores de soporte estadístico para cada nodo al análisis de MP.

Análisis Gen 16S.- El análisis del gen 16S para MP con igual peso de transiciones y tranversiones encontró dos árboles igualmente parsimoniosos (Largo: 54; CI: 0.74; RI: 0.63; excluyendo caracteres no informativos). Un segundo análisis con una proporción de transiciones y tranversiones de 2:1, mostró nuevamente dos árboles más parsimoniosos (Largo: 58 pasos; CI: 0.75; RI:0.61, excluyendo caracteres no informativos; Figura 5b y 5c) y presentó la misma topología que en el primer análisis. El análisis de bootstrap, sin embargo, mostró un mayor grado de soporte para el segundo grupo de árboles. En este se obtiene un 100 % para el clado *spinulosus-papillosus*, un 67 % para el clado *chilensis* y *atacamensis* y un 87% par el clado que agrupa a *spinulosus*, *papillosus*, *chilensis* *atacamensis* y *rubropunctatus*, en tanto que la separación entre esta última y las otras especies del grupo *spinulosus* no fue sustentada desde el punto de vista estadístico (Figura

Figura 5 (continuación)



Análisis Conjunto Genes 12S-16S.- Un segundo tipo de análisis correspondió al análisis conjunto de los genes 12S y 16S. El análisis de MP tratando con igual peso transiciones y tranversiones arrojó dos arboles igualmente parsimoniosos (Largo: 443 pasos; CI: 0.905; RI: 0.567), ambos con la misma topología encontrada para el gen 16S (Figura 5b y 5c). En ambos árboles sólo se observó diferencias en la posición de *B. rubropunctatus*, estando unido al clado *spinulosus-papillosus* en uno de los arboles y en el otro apareciendo basal a las otras especies del grupo *spinulosus*. Por otro lado, el análisis MP utilizando un peso diferencial de transiciones-tranversiones 1:2, mostró un solo árbol más parsimonioso (Largo: 162 pasos, CI: 0.74; RI: 0.567; Figura 6), en este árbol aparece *B. rubropunctatus* como especie basal al grupo *spinulosus*, aunque su respaldo estadístico es bajo (56%). La topología obtenida con el análisis de MP fue similar para los análisis ML, ME y NJ, aunque sólo en este último se observó respaldo estadístico para *B. rubropunctatus* (52 %, Tabla 8), como grupo hermano de las otras especies del grupo *spinulosus*. Con relación al análisis de MP, al considerar el sustento a cada clado a través del Índice de decaimiento (*Bremer support*), se observó un considerable aumento para cada nodo, en comparación al ofrecido al analizar las particiones 12S y 16S por separado.

Análisis de Evidencia Total.- El análisis filogenético de MP utilizando todos los caracteres (ambas particiones), tratando a todos los caracteres con similar peso disponible arrojó un solo árbol más parsimonioso (Largo: 132 pasos, CI: 0.65; RI: 0.48). Un segundo análisis en que se trató a las transiciones-transversiones con un peso 1:2 arrojó también un solo árbol (Largo: 201 pasos, CI: 0.70; RI: 0.5). Este último árbol evidenció la misma topología que la partición 12S-16S, y aunque valores de soporte de bootstrap fueron levemente inferiores, en comparación a la partición molecular. Sin embargo, al comparar los índices de decaimiento (*Bremer support*) se observó valores similares entre ambas particiones (Figura 6; Tabla 8). Este árbol mostró además sustento estadístico para la separación de *B. rubropunctatus*, mientras que el primer análisis no lo mostró (Tabla 8).

La Tabla 9 resume los resultados para el análisis de las distintas particiones para Máxima Parsimonia. Se puede observar que, en general, a pesar de la existencia de un mayor número de caracteres para las particiones moleculares, estas presentan un porcentaje notablemente menor de caracteres filogenéticamente informativos. Sin embargo, las particiones moleculares muestran valores de índices de retención mayores que los presentados por los datos morfológicos. Esto se mantiene para los análisis de MP de los genes 12S-16S conjunto y de evidencia total. Finalmente, el análisis a través del ILD test, mostró que es posible combinar los caracteres moleculares en una sola matriz, pero que la combinación entre caracteres moleculares y morfológicos (evidencia total), sugiere que existe un grado importante de conflicto entre los datos morfológicos y los moleculares.

Tabla 8

Partición	Número de caracteres	% de Caracteres Informativos	C. I.	R.I.	Número de arboles	ILD test (p > 0.05)
Morfología	21	85.7	0.57	0.30	1	-
12S	453	5.07	0.75	0.61	1	-
16S	572	6.29	0.76	0.62	2	-
12S-16S	1025	5.75	0.74	0.57	1	0.53
Evidencia Total	1046	7.36	0.70	0.50	1	0.01

Tabla 8- Comparación de los distintos análisis de Parsimonia efectuados para las distintas particiones evaluadas en búsqueda de una hipótesis filogenética para las especies chilenas del grupo *spinulosus*.

Contrastación de distintos métodos de Construcción filogenética.- La Tabla 9 resume la información acerca del desempeño de distintos métodos de reconstrucción filogenética en la estimación de las relaciones filogenéticas de las especies chilenas del grupo *spinulosus*. Se puede observar que, en general, independiente del método de reconstrucción usado se mantienen los clados *spinulosus-papillosus* y *chilensis-atacamensis*, la única excepción corresponde a las estimaciones de Máxima Parsimonia a partir de datos morfológicos. Esta tabla muestra además, que los valores de respaldo estadístico (bootstrap) son altos para estos dos clados, siendo considerablemente más bajos para la separación entre *B. rubropunctatus* y las otras especies del grupo interno. En relación a este último punto, sólo MP y NJ muestran valores de soporte para el análisis de las particiones 12S-16S y de evidencia total.

Figura 6

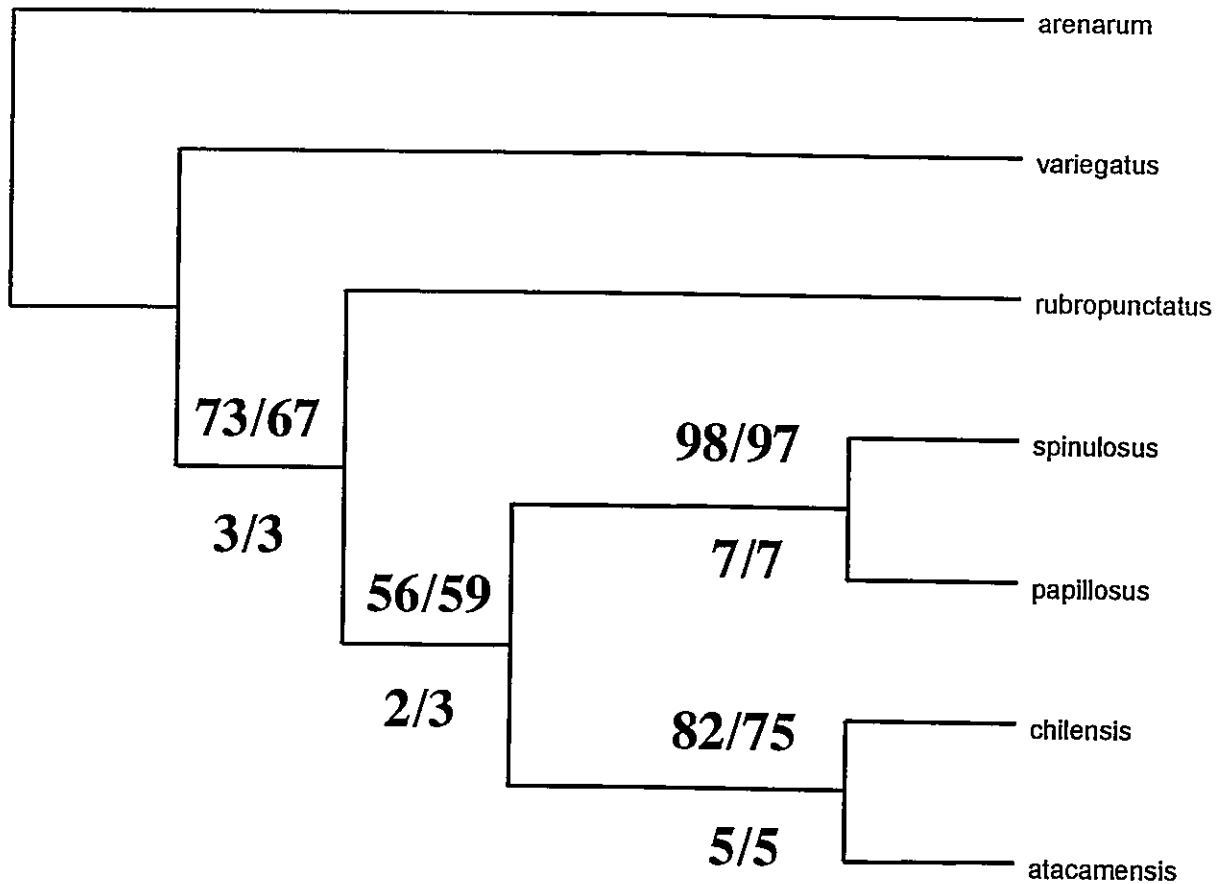


Figura 6.- La hipótesis filogenética más parsimoniosa para el análisis combinado de los genes 12S-16S y el análisis de evidencia total resultante de combinar la evidencia molecular (12S-16S) y la evidencia morfológica-conductual. Sobre cada nodo se representa el valor de bootstrap (1000 réplicas) y bajo cada nodo el valor de soporte para cada nodo (*Bremer support*). El valor de la derecha corresponde a la partición 12S-16S y el de la izquierda al resultante de la evidencia total.

Tabla 9

Partición	Método		Nodos ¹			
			A	B	C	D
Morfología	MP	Sin Peso			58	100
		Peso			51	100
Molecular		Tv:Tr²				
12S	MP	1:1	78	55		
		1:2	81	59		59
	ML	1:1	80			
		1:2	97	72		79
	ME	logdet	84			
		Kimura 2P	88	60		
16S	MP	1:1	99	67		63
		1:2	100	67		87
	ML	1:1	99	58		
		1:2	99	60		63
	ME	logdet	88			
		Kimura 2P	90			
12S-16S	MP	1:1	99	80		76
		1:2	98	82	56	73
	ML	1:1	99	70		76
		1:2	94	71		84
	ME	logdet	100	94		80
		Kimura 2P	100	95	52	81
Combinado						
	MP	1:1	97	63		66
		1:2	97	75	59	67

Tabla 9.- Comparación entre distintos métodos de reconstrucción filogenética (Máxima Parsimonia (MP), Maximum Likelihood (ML), Minimun Evolution (ME) y Neighbor Joining (NJ)) para las distintas particiones de datos. Se detalla los valores de bootstrap para cada nodo, sólo se representan los valores superiores al 50 %.

1.- Nodo A: (*spinulosus, papillosus*);

Nodo B: (*chilensis, atacamensis*);

Nodo C: ((*rubropunctatus*(*spinulosus, papillosus*) (*chilensis, atacamensis*);

Nodo D: (((*rubropunctatus*(*spinulosus, papillosus*) (*chilensis, atacamensis*), *arenarum, variegatus*).

2.- Tv:Tr: Proporción de transversiones versus transiciones.

2) ANÁLISIS DE ATRIBUTOS ACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS ASOCIADOS AL CANTO DE LIBERACION.

Análisis Univariado

a) Análisis de señales acústicas.- El análisis de varianza de medidas repetidas mostró la existencia de diferencias entre las especie en la mayoría de los atributos medidos (Figura 7). Las mayores diferencias se dieron entre las especies del grupo *spinulosus* y los grupos externos *B. arenarum* y *B. variegatus*, siendo en esta última especie donde se aprecian una alta diferenciación (ver por ejemplo: Tiempo promedio (Tprom), Tasa de Pulsos, Duración del canto). Al interior del grupo *spinulosus* sólo en el clado *atacamensis-chilensis* se observó el carácter **pulsos dobles** (Fig. 7a). Sin embargo, los valores encontrados resultaron ser mayores para el outgroup *B. arenarum* (9.84 pulsos dobles por canto) a las dos especies anteriores (0.3-3.1 pulsos dobles por canto). De modo similar, el carácter **Duración del canto** muestra los mayores valores para *B. atacamensis*, *B. chilensis* y *B. arenarum* (Fig. 7b), mientras que en las restantes especies el canto de liberación dura menos de 1.5 segundos. En relación al carácter **Número de pulsos**, nuevamente se aprecia una diferenciación entre *B. chilensis*, *B. atacamensis* y *B. arenarum* y las otras especies (Fig. 7c), produciendo mas pulsos por canto. Se debe recalcar, que para este parámetro los pulsos dobles son contados como un pulso, eliminando la posibilidad de sesgo metodológico en esta medida. En un estado intermedio se ubica *B. variegatus* (6.8 pulsos por canto), mientras que *B. spinulosus* y *B. papillosus* producen $5.4 (\pm 1.8)$ y $4.3 (\pm 0.12)$ pulsos por canto respectivamente. Un atributo que mostró un patrón interesante corresponde a **Tprom**, carácter que mide el tiempo promedio de duración de cada pulso para un canto. Para este parámetro *B. variegatus* se

diferencia claramente de las otras especies con pulsos extremadamente cortos (0.011 ± 0.01 s, Fig. 7d), mientras que *B. spinulosus* y *B. papillosus* muestran para este carácter los pulsos más largos (0.14 ± 0.03 y 0.16 ± 0.08 s respectivamente). Para el carácter **Tasa de pulsos**, *B. variegatus* presenta la mayor cantidad de pulsos por segundo (83.61 ± 3.17) mientras que en las otras especies los valores oscilan entre 4 y 5 pulsos por segundo, evidenciando una alta homogeneidad en este parámetro (Fig. 7e). A pesar, de la enorme diferencia observada entre *B. variegatus* y las otras especies, éstas no resultaron significativas al controlar por tamaño corporal en un análisis de medidas repetidas ($p < 0.09$). Para el carácter **Rendimiento** (Duty), que es una razón entre la sumatoria de duración de pulsos dividido por el tiempo sin señal (silencio) en un canto, se observa que sólo *B. arenarum* presenta valores inferiores a 0.3 (Fig. 7f), en tanto *B. spinulosus* y *B. papillosus* presentan los mayores valores, siendo superiores a 0.6. Con relación a la Frecuencia Dominante, *B. variegatus* presenta los valores más altos oscilando alrededor de 1800 Hz mientras que para las otras especies este valor se encuentra entre 1000 y 1200 Hz. Sin embargo, estas diferencias se deben a un efecto de tamaño corporal, pues no resultan significativas al controlar por esta variable.

b) Análisis de caracteres morfológicos asociados al canto.

1.1.- Laringe.- El análisis de las estructuras anatómicas de la laringe no mostró alta variación a nivel interespecífico, resultando el **Volumen de Cuerda Vocal** la única estructura en que se encontraron diferencias significativas (ANOVA: $F = 13.798$, $p < 0.006$, g.l.: 5,1; Fig. 8e). Para esta variable, *B. spinulosus* presentó comparativamente el menor **Volumen de Cuerda Vocal** (0.095 ± 0.012 mm³), mientras para las otras especies

Figura 7

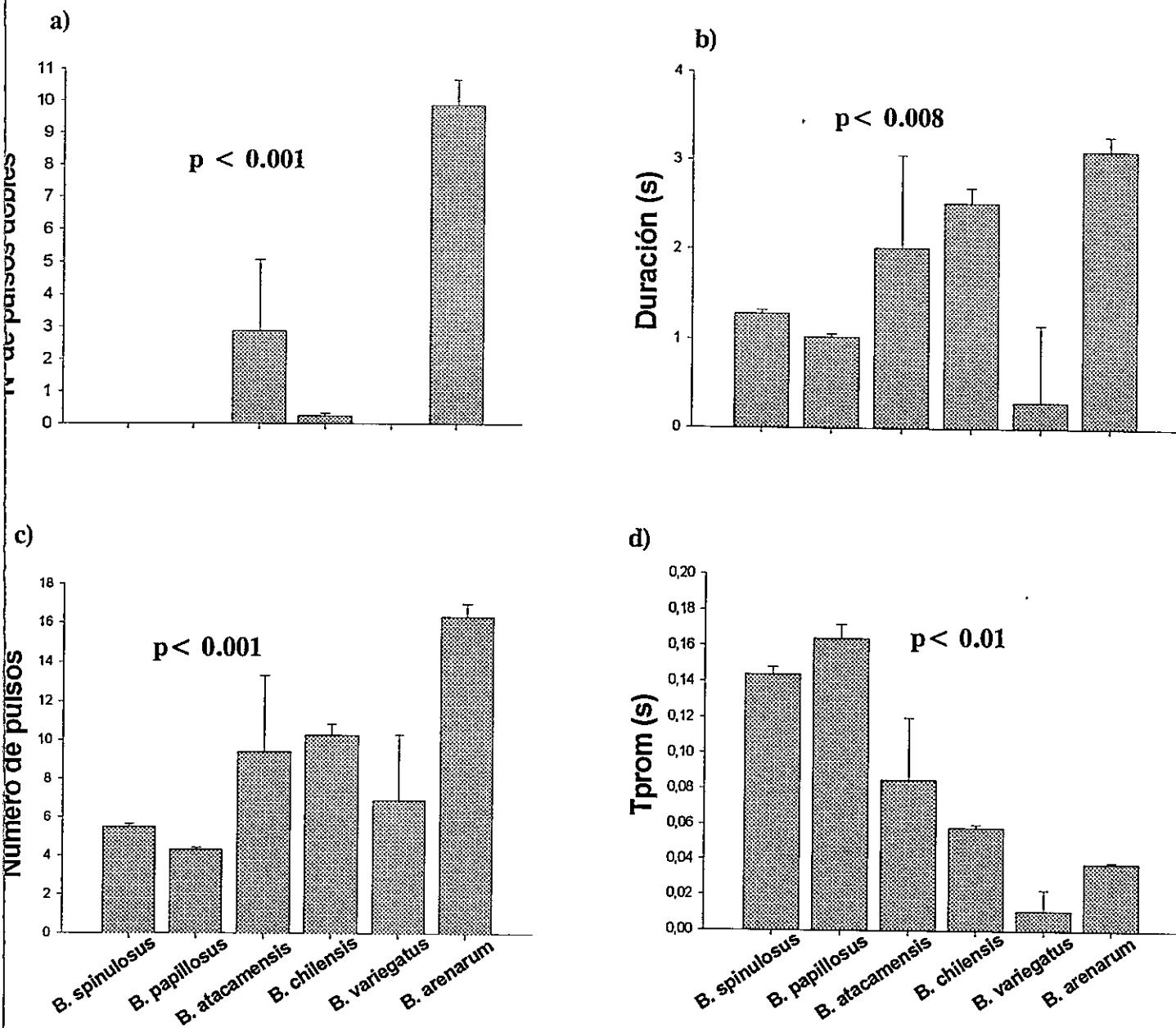
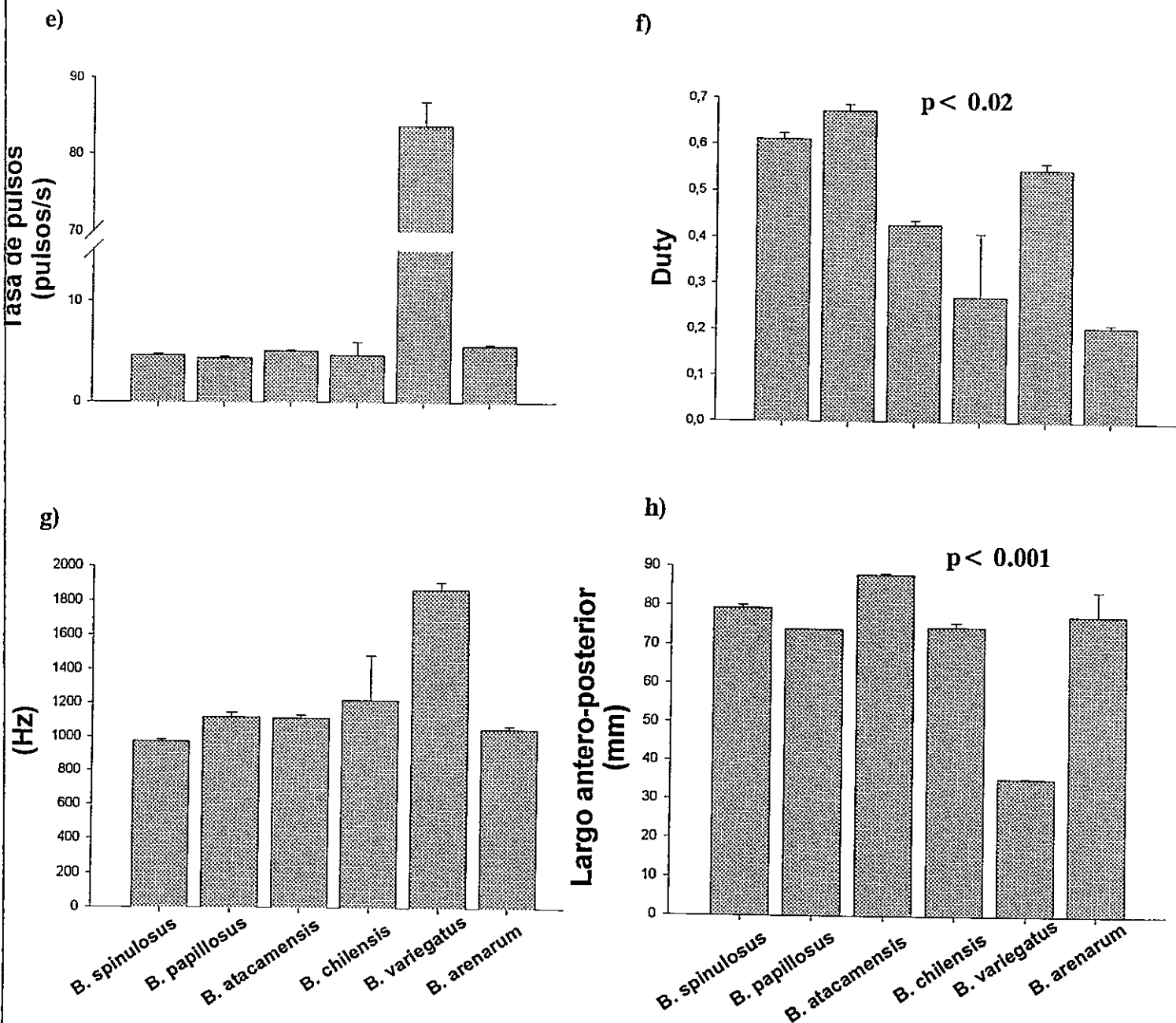


Figura 7.- Comparación de los atributos acústicos en las especies del grupo *spinulosus*, *B. variegatus* y *B. arenarum*. a) Número de pulsos dobles, b) Duración del canto, c) Número de pulsos, d) Tiempo promedio, e) Tasa de pulsos, f) Rendimiento (Duty cycle), g) Frecuencia Dominante (Hz) y h) Largo antero-posterior. Se representa la media \pm un error standard.

Figura 7 (continuación)



muestran valores similares. A diferencia del Volumen de Cuerda Vocal, en el Largo de la Cuerda Vocal (Fig. 8f), para *B. spinulosus* no se observa una reducción de esta estructura, mostrando valores similares a las otras especies, lo que sugiere diferencias anatómicas en la forma de su cuerda vocal en comparación con las restantes. Se observó que los Cartílagos Aritenoide y Cricoide, presentaron los mayores volúmenes para *B. arenarum* (Fig. 8a y 8b, respectivamente), mientras que en las especies del grupo *spinulosus*, *B. atacamensis* y *B. chilensis* mostraron los mayores volúmenes de estas estructuras (Fig. 8a y 8b). En relación a los Músculos Dilatador y Constrictor, *B. variegatus* presentó los menores valores (21.31mm^3 y 27.94mm^3 , respectivamente; Fig. 8c y 8d). Por otra parte, *B. papillosus* presentó los mayores volúmenes para estas estructuras (86.94mm^3 y 153.21mm^3 , respectivamente). Sin embargo, al corregir por tamaño corporal, no se detectaron diferencias significativas entre las especies (ANCOVA; Dilatador: $F=1.764$, g.l.=5,1, $p=0.239$; Constrictor: $F=0.496$, g.l.=5,1, $p=0.771$).

Al comparar la masa total asociada al canto, considerando tanto laringe y cartílago en forma conjunta en función del peso total de cada organismo, se observó que *B. arenarum* presentó la mayor masa, seguido de *B. atacamensis* y *B. chilensis*, mientras que las restantes especies mostraron valores similares (Fig. 9). Estas diferencias resultaron ser significativas (ANCOVA; $F=8.514$; $p<0.001$; g.l.:3,1). Debo destacar, que para estos análisis se excluyó a *B. papillosus* por disponer sólo de un valor.

Figura 8

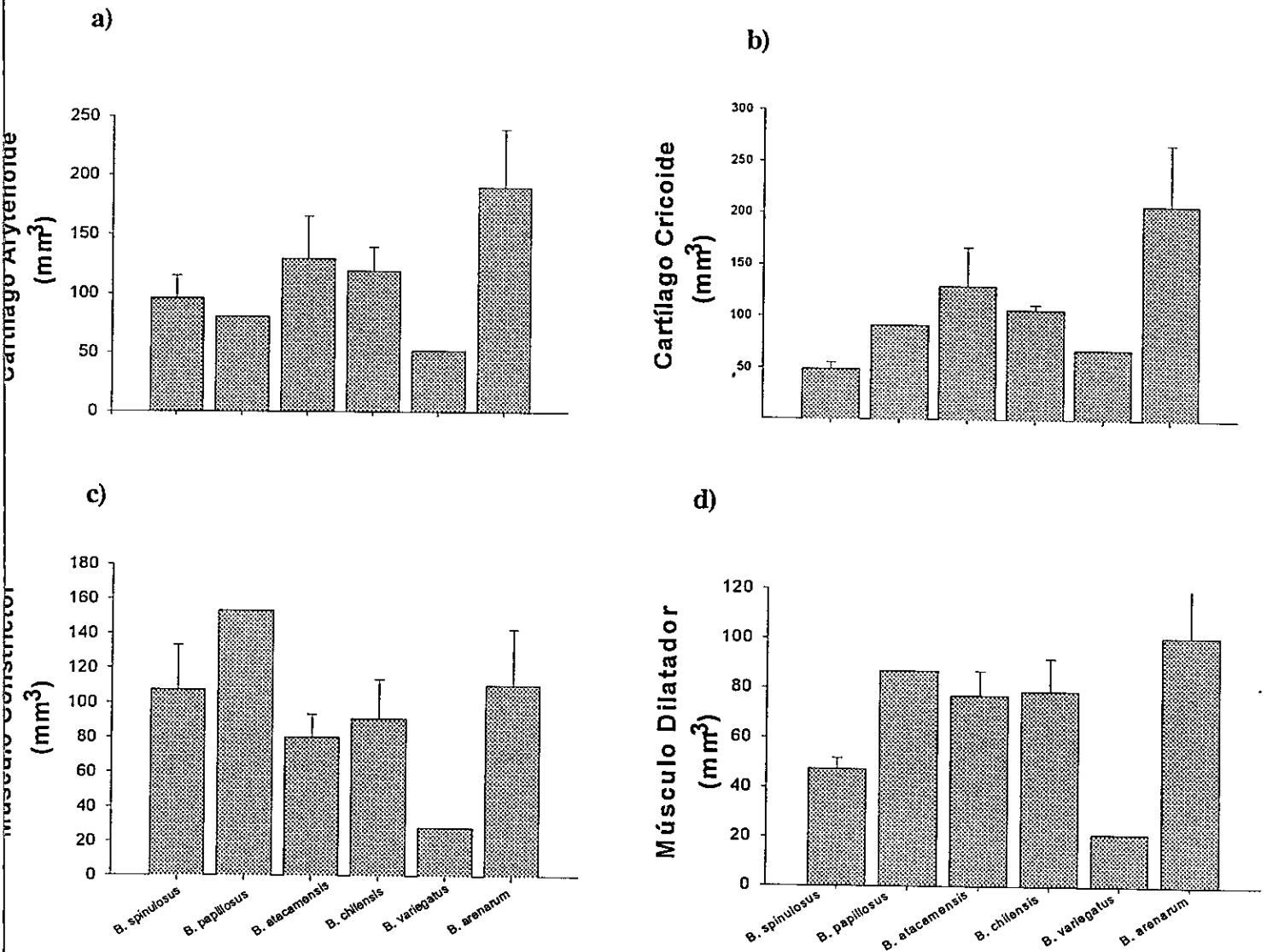


Figura 8.- Comparación de los elementos anatómicos de la laringe en las especies del grupo *spinulosus*, *B. variegatus* y *B. arenarum*. a) Cartilago Aritenoide, b) Cartilago Cricoide, c) Músculo Constrictor, d) Músculo Dilatador, e) Cuerda Vocal y f) Largo Cuerda Vocal. Se representa la media +/- un error standard.

Figura 8 (continuación)

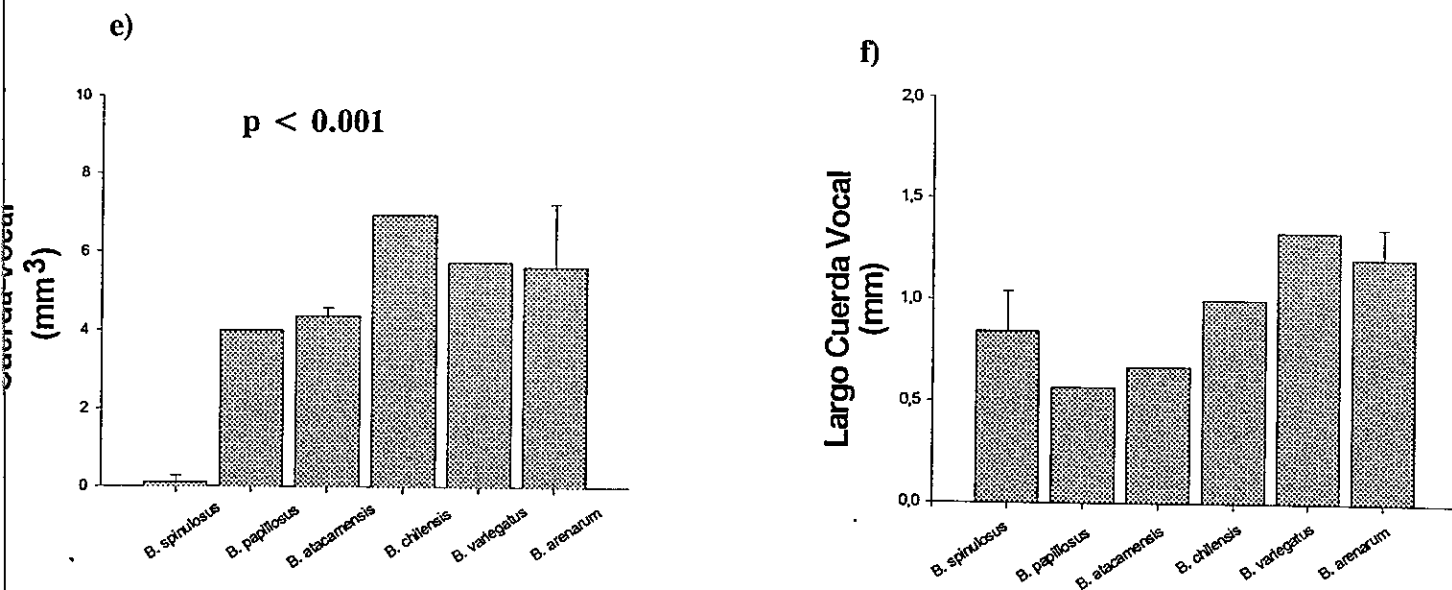


Figura 9

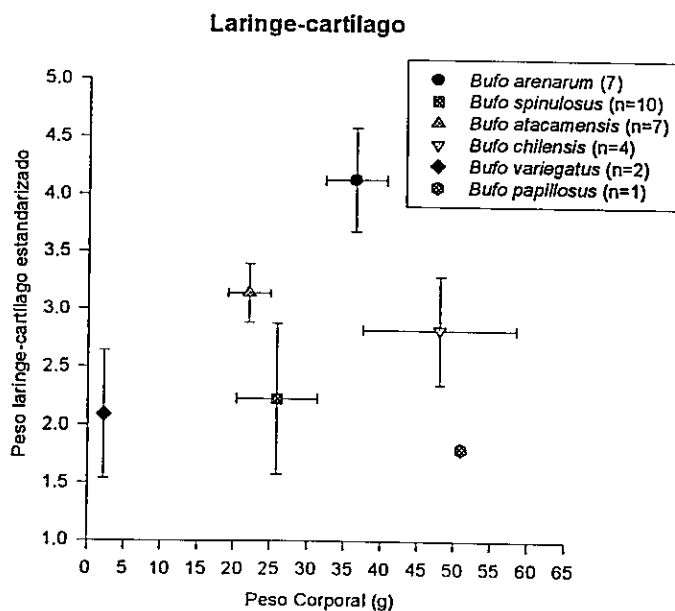


Figura 9.- Comparación de la masa total asociada a la producción de canto para laringe en las especies del grupo *spinulosus*, *B. variegatus* y *B. arenarum*. Se grafica la masa estandarizada de laringe y cartílago para cada especie (peso laringe/peso del animal; media \pm e.s.).

1.2.- Musculatura Torácica.- en relación a la musculatura torácica, se evidenció un patrón distinto en función de las estructuras consideradas. Por ejemplo, la **musculatura oblicua externa** mostró la existencia de dos grupos claramente distintos, por un lado *B. spinulosus* y *B. atacamensis* con una masa muscular menor y el grupo restante con valores mayores aunque semejantes entre sí (Fig. 10a). Dentro de segundo grupo, se observa que la especie *B. variegatus* presentó una masa muscular proporcionalmente mayor para su tamaño corporal, separándose claramente de *B. arenarum*, *B. chilensis* y *B. papillosus*. Estas tendencias, sin embargo, no resultaron ser significativamente distintas (ANOVA, $F=1.727$; $p=0.211$; g.l.:3,13). En relación a la **musculatura abdominal**, se observó la existencia de tres agrupaciones (fig. 10b). En la primera agrupación se encuentra *B. arenarum* y *B. atacamensis*, que presenta los mayores valores de masa abdominal. Le siguen *B. chilensis* y *B. spinulosus* con valores intermedios y finalmente en la tercera agrupación las restantes especies. Ninguna de estas diferencias no resultaron ser significativamente distintas (ANOVA, $F=0.89$; $p=0.448$; g.l.:4,21). Cabe destacar, que en los ANOVAs efectuados no se consideró para musculatura abdominal a *B. papillosus* y *B. variegatus* por presentar sólo un valor similar. Una excepción se hizo en el caso de la musculatura oblicua externa, en que se excluyó a *B. papillosus*.

Figura 10

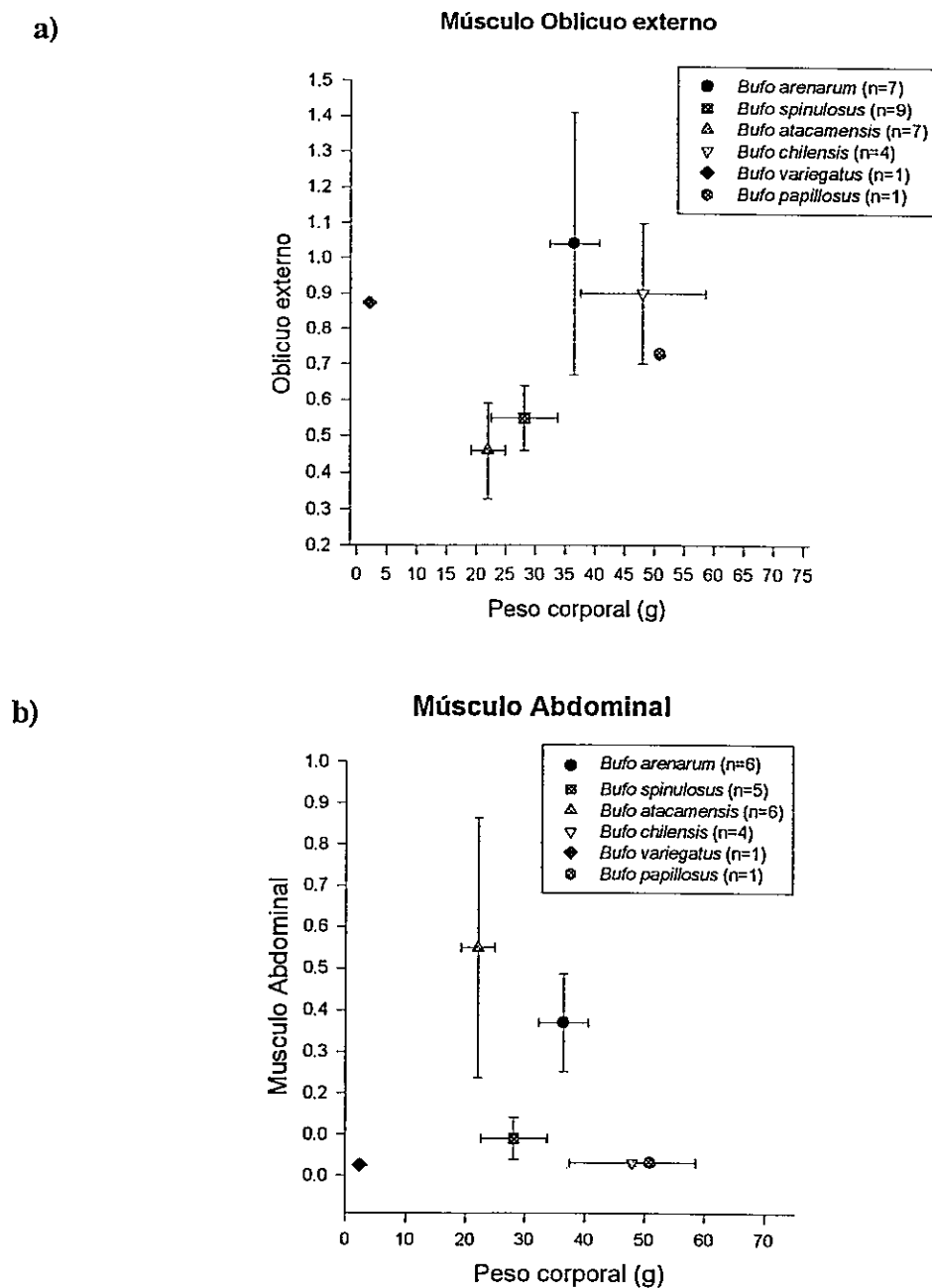


Figura 10.- Comparación de la musculatura torácica asociada a la producción de canto.

a) Musculatura Oblicua Externa y b) Musculatura Abdominal en las especies del grupo *spinulosus*, *B. variegatus* y *B. arenarum*. Se grafica la masa estandarizada de cada especie (peso músculo/peso total del animal; media \pm e.s).

c) Análisis de Correlaciones Univariadas.- Como se observa en la matriz de correlaciones generada a partir de los datos crudos (Tabla 10), muchos de los atributos acústicos y morfológicos asociados al canto covariaron. Un análisis detallado de esta información muestra por ejemplo, que el tamaño corporal (TM) afectó significativamente a cuatro de los catorce caracteres estudiados. Entre los parámetros asociados a la morfología se encontró que los Músculos Constrictor y Dilatador son significativamente afectados por el TM, mientras que entre los parámetros acústicos sólo la Tasa de Pulsos y la Frecuencia Dominante variaron significativamente y en sentido negativo, sugiriendo que una disminución en TM implicaría una Frecuencia Dominante más alta y una tasa de pulsos mayor. El Cartílago Aritenoide mostró una variación positiva con todos los caracteres evaluados, a excepción del Tiempo promedio (Tprom) y Rendimiento. Las correlaciones encontradas para el C. Aritenoide resultaron ser significativas para el C. Cricoide, Músculo Dilatador y M. Constrictor, mientras que para los parámetros acústicos la producción de notas dobles, la duración del canto y el número de pulsos mostraron estar relacionadas significativamente con el C. Aritenoide. De este modo, un aumento este cartílago influiría en la posibilidad de producir cantos con mayor número de notas dobles, cantos más largos y un mayor número de pulsos. Por otra parte, el Cartílago Cricoide mostró un patrón similar al C. Aritenoide, pero sólo se encontró una influencia significativa para la producción de notas dobles y la duración del canto. El Músculo Constrictor mostró variar negativamente con el volumen y largo de la cuerda vocal, la musculatura abdominal, la tasa de pulsos, el número de pulsos y la frecuencia dominante. A pesar de la variación en los cambios de señales observada, ninguna de estas

correlaciones resultó ser significativa. Resulta interesante que el Músculo Dilatador se correlaciona de modo contrario al M. Constrictor con la Musculatura Abdominal, el número de pulsos, el tiempo promedio de pulsos y Rendimiento. Al igual que el M. Constrictor, ninguna de las correlaciones observadas resultó ser significativa. Dentro de los caracteres medidos de la cuerda vocal, el volumen de cuerda vocal no mostró significancia estadística con las otras variables estudiadas, mientras que el largo de la Cuerda Vocal mostró asociarse significativamente y en forma negativa sólo con Tprom. Lo anterior sugiere, que un aumento en el largo de las cuerdas vocales posibilitaría la producción de pulsos más cortos. El carácter número de pulsos no mostró significancia estadística con los otros caracteres, a excepción del cartílago Aritenoide, en se observó una relación significativa y negativa . Entre las correlaciones encontradas sólo mostraron ser significativas con la masa laringe cartílago: la duración del canto y el número de notas dobles, variando todas positivamente. La frecuencia dominante, además del tamaño corporal, evidenció una correlación significativa con la tasa de pulsos. Finalmente, la medida Rendimiento mostró variar de distinto modo en función de los parámetros evaluados, siendo significativa con la duración del canto y con el número de pulsos.

Si bien, se ha visto que el tamaño corporal influye de distinto modo en los parámetros estudiados y que sólo su efecto es significativo para la tasa de pulsos, la frecuencia dominante y el músculo dilatador, es posible que alguna de las variables estudiadas pueda relacionarse de modo indirecto con el tamaño corporal a través del efecto de otras variables que sí son afectadas por el tamaño corporal, como por ejemplo, el efecto del tamaño corporal sobre el músculo dilatador es significativo, mientras que este último sólo es significativo con relación al Cartílago Aritenoide. Es posible,

entonces, que la significancia de esta última correlación puede ser efecto sólo de tamaño corporal y no de la influencia por sí misma del dilatador. Para detectar este tipo de influencias, se realizó un segundo análisis de Correlación de Pearson, pero esta vez sobre los residuos resultantes de la regresión entre tamaño corporal y todas las variables. La Tabla 11 resume el análisis efectuado esta vez sobre los residuos. Se puede observar que efectivamente la relación significativa encontrada entre el Músculo Dilatador y el Cartílago Aritenoide, ahora no es significativa, por lo que se puede deducir que la significancia anterior era un efecto indirecto del tamaño corporal. Por otro lado, interesante resulta observar que algunas correlaciones mantienen su significancia estadística y otras se vuelven significativas. Por ejemplo, T_{prom} mantiene su relación negativa y significativa con el largo de la cuerda vocal, pero ahora T_{prom} muestra una relación significativa con el número de pulsos. Por otra parte el Cartilago Aritenoide, que sólo mantiene como significativa la correlación con la tasa de pulsos, mientras que aparece ahora como significativa T_{prom} . Lo anterior muestra que existe un efecto pasivo del tamaño corporal sobre las comparaciones efectuadas en la Tabla 10.

Tabla 10

	Aritenoide	Cricoide	Músculo Constrictor	Músculo Dilatador	Volumen Cuerda Vocal	Largo Cuerda Vocal	Masa Larínge Cartilago	Masa Músculo Abdom.	Notas Dobles	Duración	Pulsos	Tprom	Tasa	Frec. Dom.	Rendimiento
TM	0.631	0.363	0.480**	0.866***	-0.027	-0.639	0.252	-0.367	0.387	0.780	0.181	0.570	-0.974***	-0.941***	-0.211
Aritenoide		0.900**	0.295	0.767	0.098	0.080	0.810	0.581	0.889 **	0.951***	0.88**	-0.200	0.208	0.188	-0.778
Cricoide			0.189	0.756	0.854	0.195	0.793	0.477	0.937***	0.819**	-0.383	-0.343	0.506	0.518	-0.780
Constrictor				0.718	-0.276	-0.671	0.129	-0.083	0.592	0.297	-0.083	0.781	-0.800	-0.794	0.187
Dilatador					0.166	-0.388	0.601	0.195	0.592	0.790	0.532	-0.223	-0.796	-0.718	-0.469
V. C. Vocal						0.295	0.442	0.584	0.312	0.167	0.488	-0.629	0.269	0.477	-0.546
L. C. V.							0.462	0.721	0.317	0.047	0.489	-0.867**	0.657	0.602	-0.491
Masa L-C								0.750	0.743	0.857***	0.902***	-0.472	-0.304	-0.133	-0.900
Musc. Ab.									0.375	0.319	0.579	-0.600	0.256	0.301	-0.593
N. Dobles										0.733	0.896**	-0.378	-0.257	-0.339	0.126
Duración											0.850**	-0.199	0.705	-0.613	-0.853**
Pulsos												-0.617	-0.199	-0.203	-0.940**
Tprom													-0.597	-0.624	0.673
Tasa														0.965**	0.185
Frec. Dom															0.114

Tabla 10.- Matriz de correlación de atributos acústicos y morfológicos entre las especies del grupo *spinulosus*, *B. arenarum* y *B. variegatus*. Se utiliza la correlación de Pearson. (* *p < 0.05; *** p < 0.001). Los nombres abreviados de las estructuras anatómicas abreviadas en la primera columna corresponden a los mismos dados en extenso en la primera fila, a excepción de Tprom = Tiempo promedio, Frec. Dom. = Frecuencia dominante, TM = tamaño corporal.

Tabla 11

	Cricoide	Músculo Constrictor	Músculo Dilatador	Volumen Cuerda Vocal	Largo Cuerda Vocal	Masa Músculo Abdom.	Duración	Pulsos	Tprom	Tasa	Frecuencia Dominante	Rendimiento
Aritenoide	0.785	-0.276	0.462	0.555	0.601	0.632	0.620	0.97***	-0.823**	0.138	0.066	-0.821**
Cricoide		-0.258	0.743	0.827**	0.541	0.707	0.272	0.790	-0.785	0.393	0.376	-0.518
Constrictor			0.390	-0.374	-0.520	0.005	0.165	-0.471	0.684	-0.612	-0.518	0.091
Dilatador				0.642	0.098	0.664	0.378	0.390	-0.283	-0.067	0.022	-0.445
V. C. Vocal					0.633	0.765	0.096	0.663	-0.800	0.543	0.599	-0.394
L. C. V.						0.785	-0.153	0.654	-0.814**	0.791	0.764	-0.176
Musc. Ab.								-0.333	-0.648	0.489	0.548	-0.333
Duración									-0.243	-0.660	-0.678	-0.934***
Pulsos									-0.923**	0.241	0.177	-0.812
Tprom										-0.563	-0.515	0.569
Tasa										0.979***	0.979***	0.352
Frec.Dom.												0.376

Tabla 11.- Matriz de correlación de atributos acústicos y morfológicos entre las especies del grupo *spinulosus*, *B. arenarum* y *B. variegatus*. Los valores corresponden a los residuos de la regresión entre cada variable y el tamaño corporal, sólo están presentes aquellas que resultaron ser significativas en el análisis de regresión. Se utiliza la correlación de Pearson. (* *p < 0.05; *** p < 0.001). Los nombres abreviados de las estructuras anatómicas abreviadas en la primera columna corresponden a los mismos dados en extenso en la primera fila, a excepción de Tprom = Tiempo promedio, Frec. Dom. = Frecuencia dominante.

ANÁLISIS MULTIVARIADO

a) Parámetros Acústicos.- La Tabla 12 muestra los pesos relativos (loading components) de los caracteres estudiados para un Análisis de Componentes Principales (ACP). Se puede observar que entre el primer y segundo eje se explica un 93.56 % de la varianza observada (79.49 % y 14.08% respectivamente). En el primer eje, los caracteres Tasa de pulsos, la Frecuencia Dominante y Rendimiento, muestran valores negativos, mientras que los restantes caracteres son positivos. Se ha mencionado, que en un análisis de Componentes Principales, el primer eje muestra los efectos asociados a tamaño corporal (Thorpe, 1976). En este contexto, se puede sugerir que aquellos caracteres que muestran un mayor peso, se ven más afectados por el tamaño corporal (duración y notas dobles) y que el sentido de variación (positivo o negativo) mostraría como el tamaño corporal afecta estas variables. Lo anterior, estaría de acuerdo con los resultados del Análisis de Correlación de Pearson, donde los parámetros acústicos varían en el mismo sentido y con similar magnitud, al correlacionarlos con el tamaño corporal (ver Tabla 10).

Al realizar un análisis discriminante sobre los coeficientes estandarizados de los valores obtenidos a partir del análisis de ACP, utilizando como variable de clasificación a las especies, se obtuvieron diferencias significativas (Wilks' Lambda=0.0233; $F=191.79$; $p < 0.001$; g.l.=25, 2739). Lo anterior, sugiere que, para este análisis, las especies muestran diferencias importantes en sus atributos acústicos que permiten distinguirlas. Esto se ve más claramente en la Tabla 13, que corresponde a la clasificación generada por grupos después de corregir usando "acuchillamiento de datos" ("Jackknife"), se puede observar que los valores de clasificación correcta oscilan entre 61 y 92 %, hecho

que indica la existencia de diferenciación en los atributos acústicos. La figura 11 nos muestra gráficamente este patrón, evidenciando la separación evidente de *B. variegatus* en el componente 2 y de *B. arenarum* el componente 1, se puede observar además que todas las especies restantes segregan entorno al eje 1. Un análisis más detallado muestra que las especies *B. spinulosus* y *B. papillosus* segregan juntas, mientras que lo mismo sucede para *B. atacamensis* y *B. chilensis*, mostrando este par de especies una mayor diferenciación en comparación a *B. spinulosus* y *B. papillosus*, donde los valores se sobreponen en mayor medida (Fig. 11).

Tabla 12

	EJE 1	EJE 2	EJE 3	EJE 4	EJE 5
Notas dobles	0.196	0.315	-0.102	-0.001	0.001
Duración	0.665	-0.0001	0.082	-0.006	0.005
Pulsos	0.086	0.138	0.144	0.006	0.005
Tprom	0.013	-0.013	-0.006	0.004	0.009
Tasa	-0.529	0.137	0.087	0.013	-0.001
Frec. Domin.	-0.095	0.014	0.011	-0.115	0.010
Rendimiento	-0.031	-0.020	-0.014	0.023	0.045
% varianza	79.489	14.080	4.667	1.425	0.232

Tabla 12.- Resultados de los cinco primeros ejes de Componentes Principales de los atributos acústicos medidos en las especies del grupo *spinulosus*, *B. arenarum* y *B. variegatus*.

Figura 11

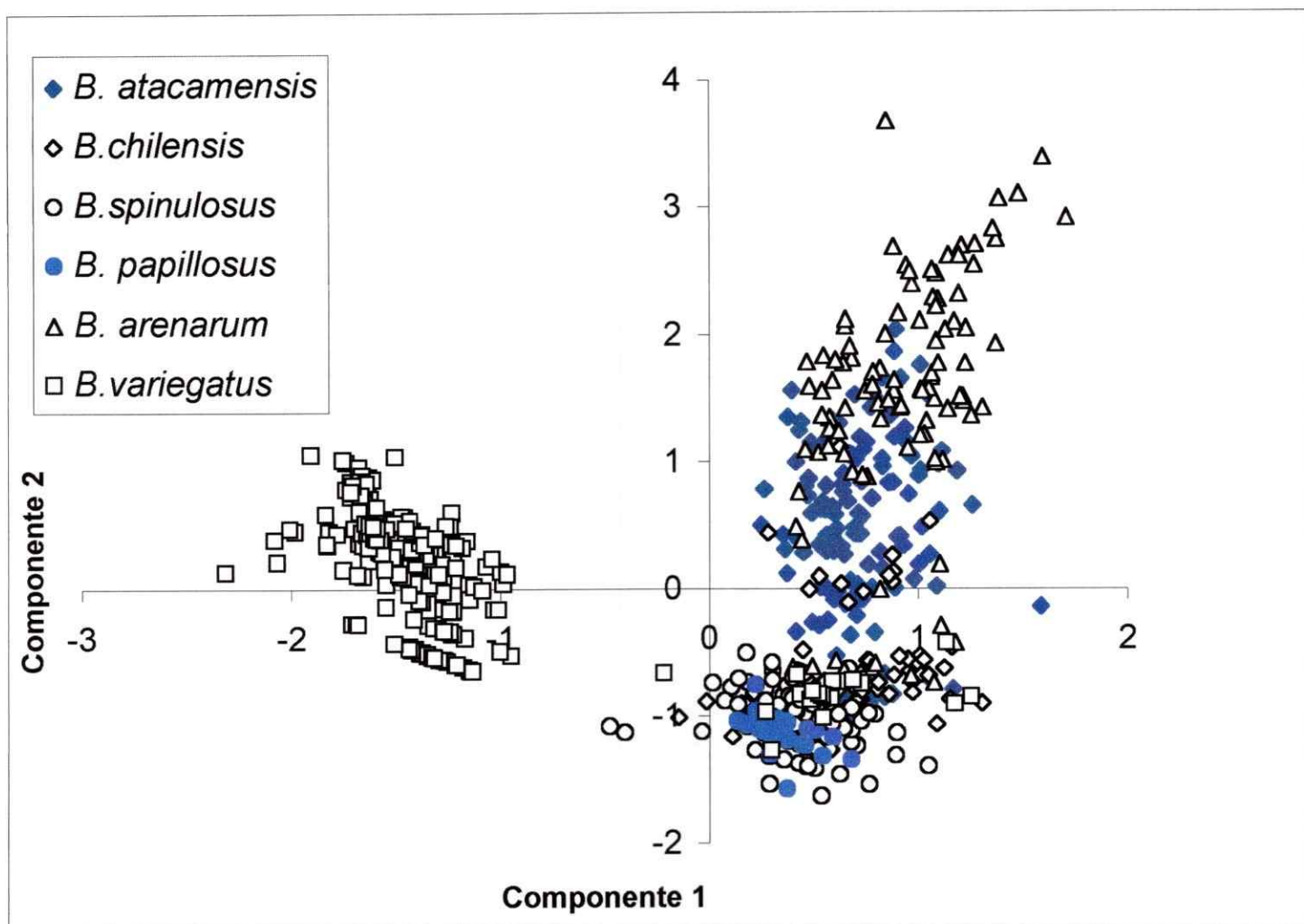


Figura 11.- Representación gráfica de los atributos acústicos generado a partir de los un Análisis de Componentes Principales para las especies grupo *spinulosus*, *B.arenarum* y *B. variegatus*..

Tabla 13

Especies	B. atac.	B.chil.	B. spin.	B.pap.	B.aren.	B.var.	% Clasif.
<i>B. atacamensis</i>	92	18	17	3	21	0	61
<i>B. chilensis</i>	3	68	2	2	0	0	91
<i>B. spinulosus</i>	0	9	82	43	0	0	61
<i>B. papillosus</i>	0	0	4	36	0	0	90
<i>B. arenarum</i>	3	12	0	0	87	0	85
<i>B. variegatus</i>	0	20	0	0	0	225	92
Total	98	17	105	84	108	225	

Tabla 13.- Matriz de Clasificación generada a partir de un Análisis Discriminante utilizando como criterio de agrupación a las especies y como caracteres los coeficientes estandarizados generados por ACP. Se representa en negritas el porcentaje de clasificación correcta, utilizando Jackknife como factor de corrección y el número de cantos para cada especie analizadas, representado por el Total.

Un análisis de agrupamiento generado a partir de los coeficientes canónicos de los atributos acústicos, utilizando como criterio la distancia Euclidiana y como método de agrupamiento centroide a partir de la mediana (Fig. 11), mostró que las especies *B. arenarum* y *B. variegatus* se separan de las especies del grupo *spinulosus* y que, dentro de este grupo existen dos agrupaciones *B. papillosus*-*B. spinulosus* y *B. chilensis*-*B. atacamensis*.

Figura 12

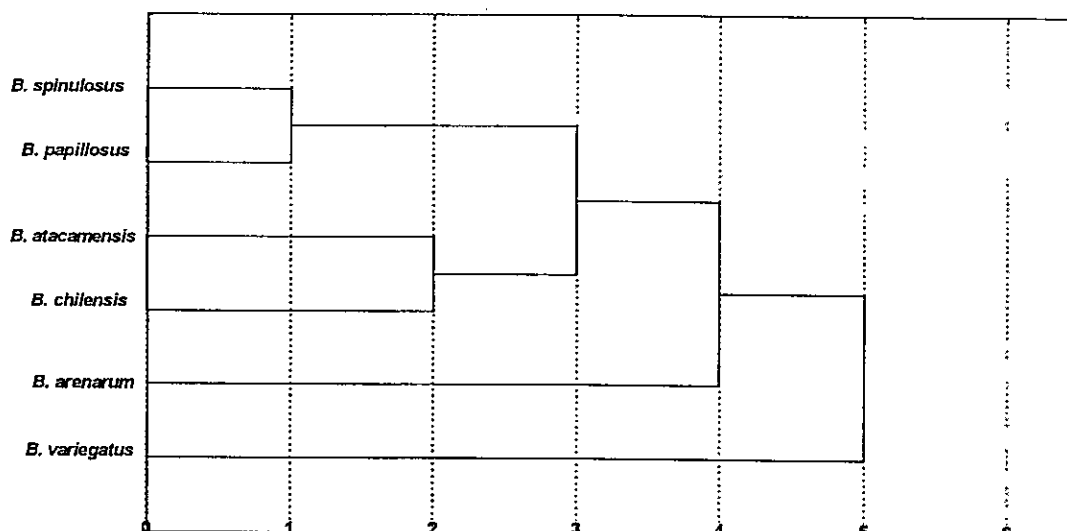


Figura 12.- Agrupamiento generado a partir de los coeficientes canónicos obtenidos de un análisis discriminante sobre los atributos acústicos en las especies del grupo *spinulosus*, *B. arenarum* y *B. variegatus*. Se utilizó la distancia euclidiana y centroide como criterio de agrupamiento.

a) **Parámetros Morfológicos de la Laringe.**- La Tabla 14 muestra los pesos relativos ("loading components") de los caracteres estudiados para un Análisis de Componentes principales (ACP). Se puede observar que entre el primer y segundo eje se explica un 82.28 % de la varianza observada (54.09 % y 28.19 % respectivamente). En el primer eje todos los caracteres resultaron ser positivos, sugiriendo que estos caracteres covarían

en el mismo sentido del tamaño corporal. Al realizar un análisis discriminante sobre los coeficientes estandarizados de los valores obtenidos a partir del análisis de ACP, utilizando como variable de clasificación a las especies, no se obtuvieron diferencias significativas (Wilks' Lambda=0.044; F=3.026; $p < 0.065$; g.l.=10, 3.026). En concordancia, la matriz de clasificación corregida por Jackknife, solo mostró dos especies correctamente clasificadas, *B. atacamensis* y *B. spinulosus* (50% y 33%; respectivamente). Lo anterior, podría sugerir que las especies no muestran diferencias importantes en los caracteres morfológicos de la laringe asociados al canto que permita diferenciarlas. Sin embargo, un análisis de agrupamiento de los coeficientes canónicos de estos caracteres evidencia un patrón similar al obtenido para los caracteres acústicos, sugiriendo un buen correlato entre la morfología de la laringe y los caracteres acústicos.

Tabla 14

	EJE 1	EJE 2	EJE 3	EJE 4	EJE 5
Cartílago Aritenoide	0.920	0.031	-0.291	0.226	0.081
Musc. Constrictor	0.656	0.698	-0.130	0.056	-0.243
Musc. Dilatador	0.916	0.205	0.052	-0.335	0.033
Vol. Area Vocal	0.511	-0.657	0.520	0.063	-0.176
Largo Cuerda Vocal	0.084	-0.803	-0.571	-0.094	-0.116
Cartílago Cricoide	0.928	-0.293	0.093	0.040	0.166
% varianza	54.094	28.191	11.825	3.021	2.308

Tabla 14.- Resultados de los cinco primeros ejes de Componentes Principales de los atributos morfológicos de la laringe medidos en las especies del grupo *spinulosus*, *B. arenarum* y *B. variegatus*.

Figura 13

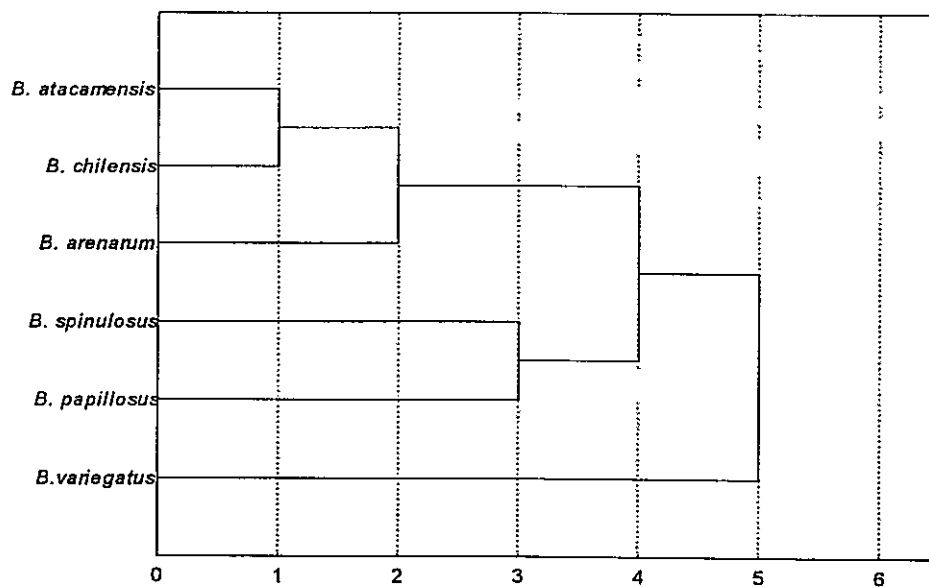


Figura 13.- Agrupamiento generado a partir de los coeficientes canónicos obtenidos de un análisis discriminante sobre los atributos morfológicos asociados a la laringe en las especies del grupo *spinulosus*, *B. arenarum* y *B. variegatus*. Se utilizó la distancia euclidiana y centroide como criterio de agrupamiento.

3) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS CARACTERES ASOCIADOS AL CANTO.

a) Mapeo de Caracteres.- Con la finalidad de obtener una perspectiva histórica sobre la evolución de los atributos acústicos y morfológicos asociados al canto, se procedió a mapear estos caracteres sobre la filogenia obtenida con el análisis de evidencia total (Fig. 6). Para esto se utilizó el programa MacClade 3.1 (Maddison & Maddison, 1992). Esta opción del programa aplica un algoritmo de optimización de dos pasos bajo el criterio de máxima parsimonia. Para efectuar este tratamiento los caracteres son tratados con igual peso y como no ordenados. El resultado de este análisis corresponde a la reconstrucción de los estados del carácter mapeados sobre la filogenia. Este análisis puede mostrar que estos caracteres son reconstruidos como **equivocos o resueltos**. **Equivoco** implica que no es posible asignar un estado particular del carácter a una especie dada, mientras que **resuelto**, significa que asigna a una especie un estado particular sin ambigüedad (ver Box 1, Cunningham y col, 1998). A continuación describo los resultados de este análisis aplicado a las especies del grupo *spinulosus*, *B. variegatus* y *B. arenarum*.

La figura 14 muestra la reconstrucción realizada para el Cartílago Aritenoide. Se puede observar que la tendencia a la reducción de este cartílago es un paralelismo, pues aparece dos veces de forma independiente en el clado *spinulosus-papillosus* y en *B. rubropunctatus*. Por otro lado, el clado *chilensis-atacamensis* presenta un volumen de cartílago similar al outgroup *B. arenarum*. El análisis de mapeo para este carácter sugiere que la condición volumen del Cartílago Aritenoide, se expresa diferencialmente dentro del grupo, manteniendo un volumen mayor el clado *chilensis-atacamensis*, correspondiendo a una simplesiomorfía si se contrasta con la condición encontrada para *B. arenarum*.

Figura 14

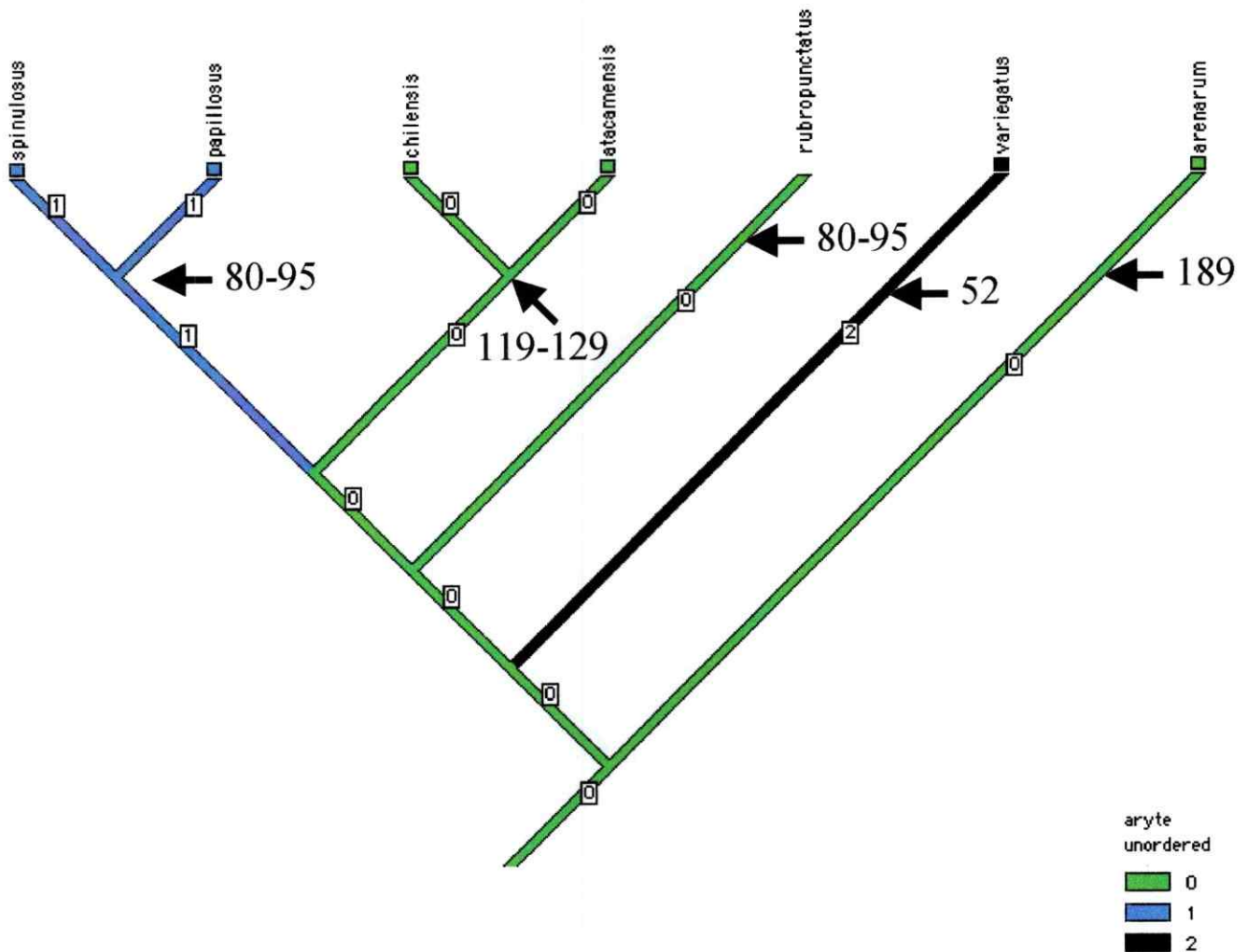


Figura 14 .- Volumen de Cartilago Aritenoide mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S). Los valores indicados junto a la flecha muestran el volumen de Cartilago Aritenoide por especie. Los valores mostrados en el extremo inferior izquierdo (0, 1, 2) corresponden a las polarizaciones efectuadas para este carácter, siendo "0" la condición plesiomórfica y los restantes valores distintos estados del carácter analizado. Esta notación se aplica a todas las figuras mostradas en este tipo de análisis (Figuras 14 a 22).

Un panorama similar al C. Aritenoide lo presenta el mapeo del Cartílago Cricoide sobre la filogenia, con el clado *chilensis-atacamensis* que mantiene un mayor volumen en comparación a las otras especies del grupo y este volumen es similar al registrado para *B. arenarum* (Fig. 15).

La figura 16 muestra el mapeo para el volumen de Músculo Dilatador. En general, se observa variación entre las especies, pues mientras *B. atacamensis* y *B. chilensis*, muestran valores similares, *B. spinulosus* y *B. papillosus* difieren en el volumen de este músculo. Es interesante, observar que en *B. spinulosus* se presentan los menores valores de volumen muscular, correspondiendo esta tendencia a una autapomorfía del grupo *spinulosus*. Al mapear el volumen de Músculo Constrictor (Fig. 17), se observa que la condición de un músculo constrictor grande está representada en la mayoría de las especies, con la excepción del clado *chilensis-atacamensis*, en el que se observa una reducción del tamaño de este músculo, pudiendo postularse esta reducción como una sinapomorfía de este clado.

El Volumen de la Cuerda Vocal (Fig. 18) mostró valores similares en todas las especies, pudiendo postularse una tendencia a una reducción la cuerda vocal, para el clado *spinulosus-papillosus*, siendo en la primera notablemente menor (0.9 mm^3). La única excepción a esta tendencia, corresponde a *B. chilensis*, donde se observan valores similares a *B. arenarum* y *B. variegatus*.

Figura 15

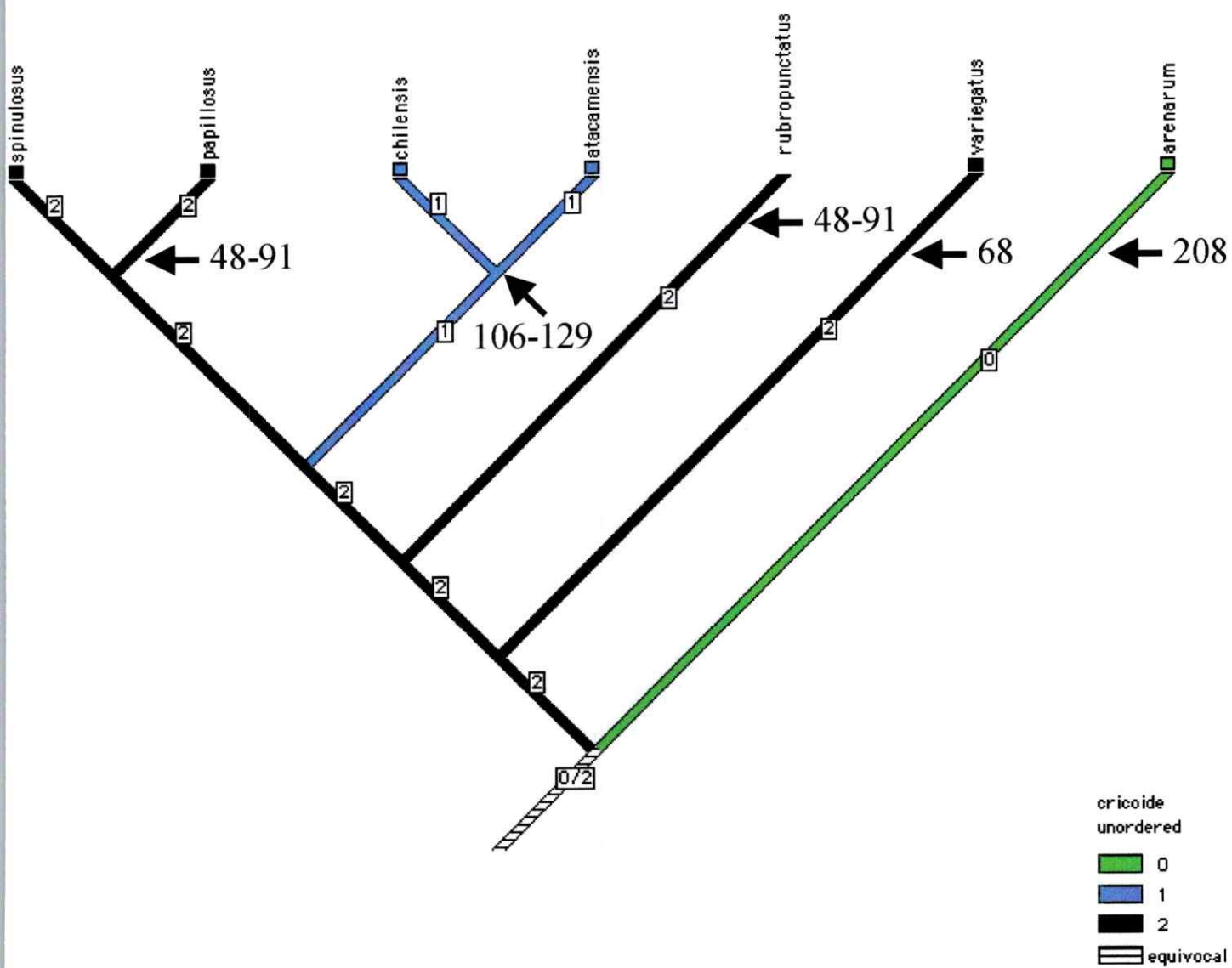


Figura 15.- Volumen de Cartilago Cricoide mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S). Los valores indicados junto a la flecha muestran el volumen de Cartilago Cricoide por especie.

Figura 16

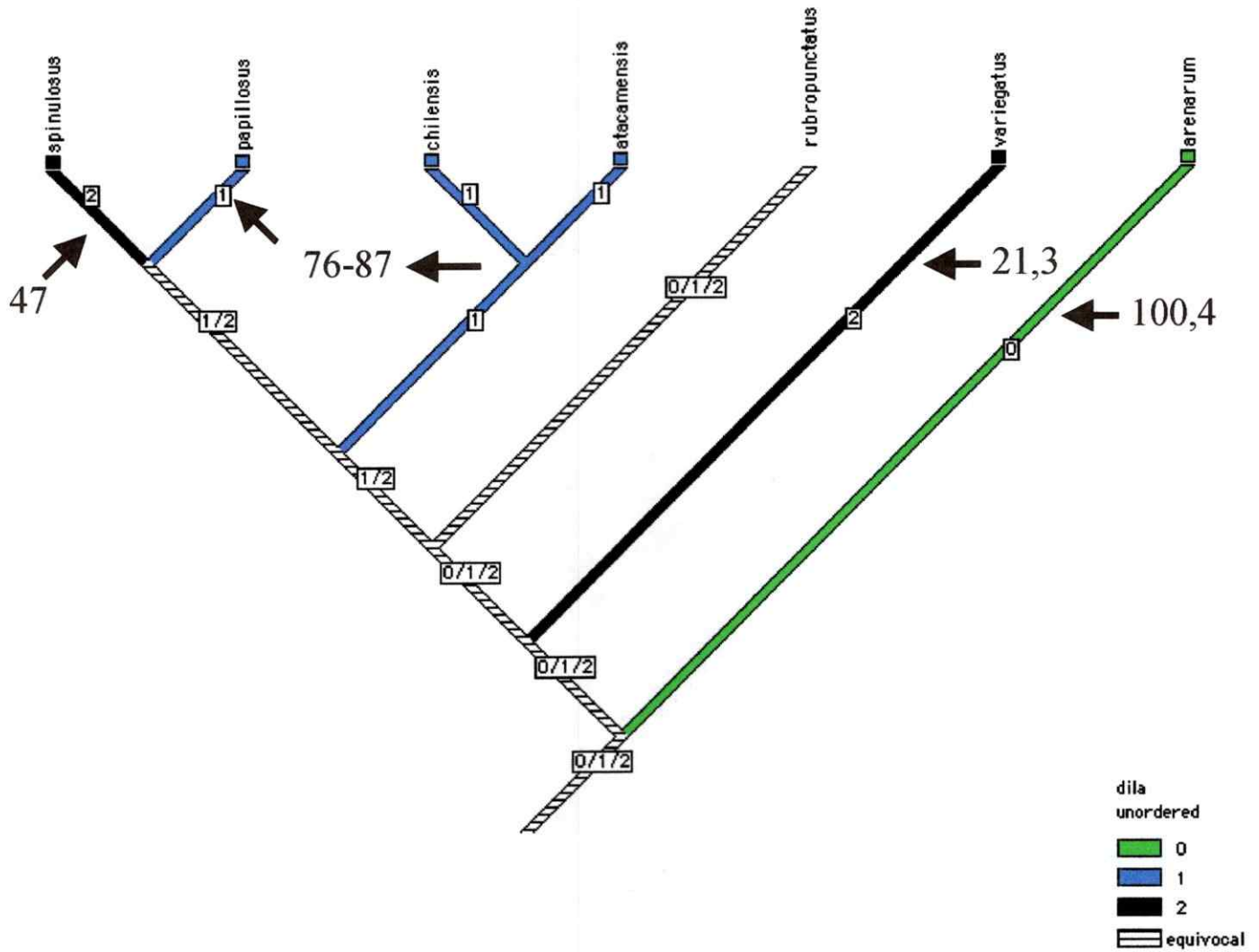


Figura 16.- Volumen de Músculo Dilatador mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S). Los valores indicados junto a la flecha muestran el volumen de M. Dilatador por especie.

Figura 17

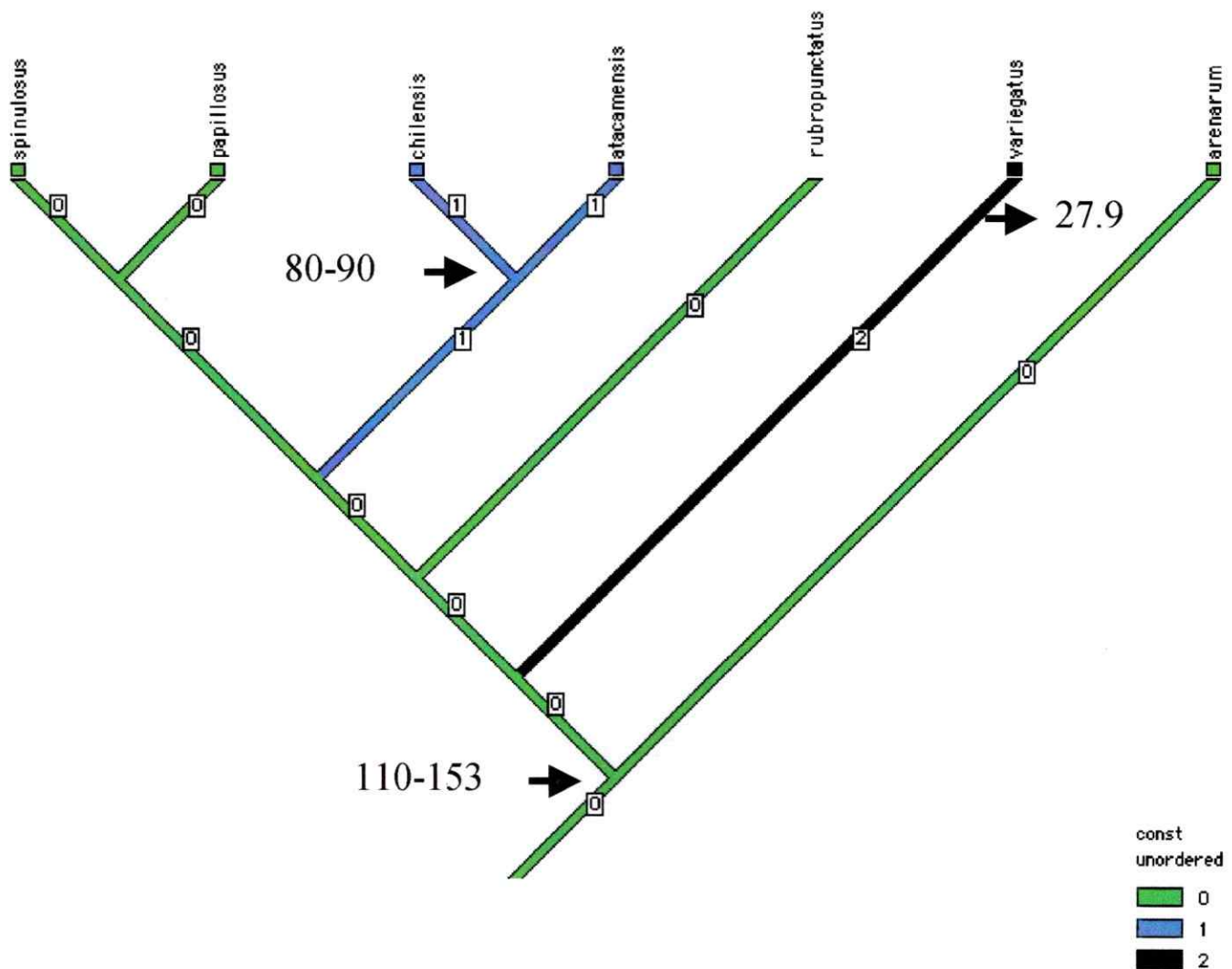


Figura 17.- Volumen de Músculo Constrictor mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S). Los valores indicados junto a la flecha muestran el volumen de M. Constrictor por especie.

Figura 18

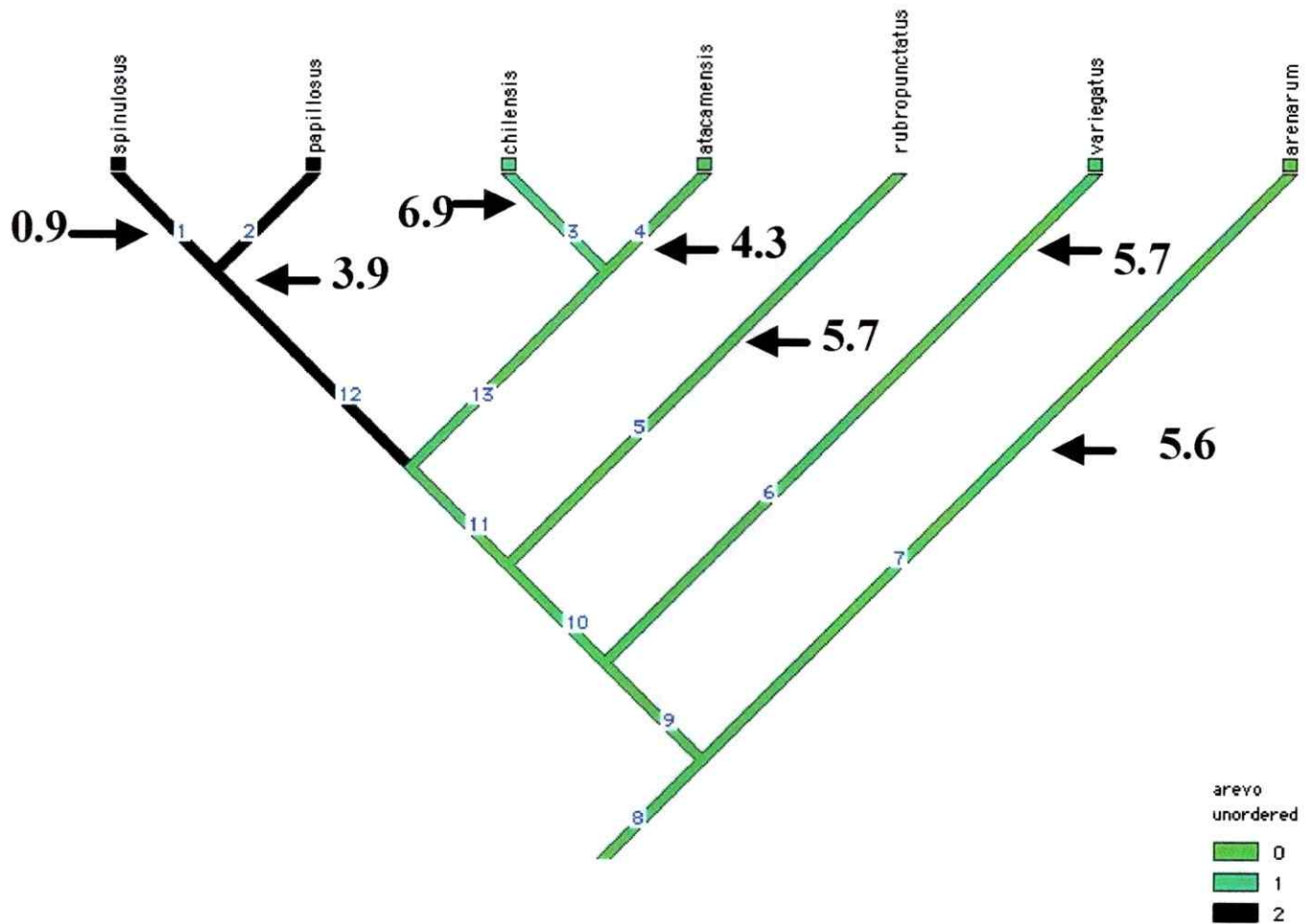


Figura 18.- Volumen de Cuerda Vocal mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S). Los valores indicados junto a la flecha muestran el volumen de Cuerda Vocal por especie.

La figura 19 muestra el mapeo del carácter presencia de "trill" en el canto de las especies estudiadas. Se puede observar que esta condición se presenta en *B. spinulosus* y *B. papillosus* dentro del "ingroup", y en *B. arenarum* en el outgroup. En las otras especies este carácter está ausente, o resulta equívoco para *B. rubropunctatus*. Al observar este carácter, se puede postular que la presencia de "trill" corresponde a una plesiomorfía. Por otro lado, el carácter Pulsos Dobles (Fig. 20), aparece en el clado *chilensis-atacamensis* y en el outgroup *B. arenarum*, sugiriendo que su presencia correspondería a una condición plesiomórfica del grupo. Es interesante, el hecho que nuevamente para *B. rubropunctatus*, la asignación de un estado particular resulta equívoca.

El carácter Número de Pulsos (Fig. 21), presenta dos condiciones, cantos con muchos pulsos (9-16), presente en *B. chilensis*, *B. atacamensis* y en el outgroup *B. arenarum*. La otra condición observada corresponde a cantos con pocos pulsos (4-7) presente en las especies restantes. Interesante, resulta el observar el mapeo de este carácter, es que la tendencia es producir pocos pulsos, siendo la condición cantos con varios pulsos, una condición plesiomórfica.

La Duración de los cantos (Fig. 22), mostró nuevamente un patrón similar al Número de Pulsos, con *B. chilensis*, *B. atacamensis* y el outgroup *B. arenarum*, presentando cantos más largos, mientras que las restantes especies presentan cantos en promedio menores (0.29-1.2 s). Lo anterior, sugiere que esta última condición correspondería a una novedad evolutiva en el grupo.

Figura 19

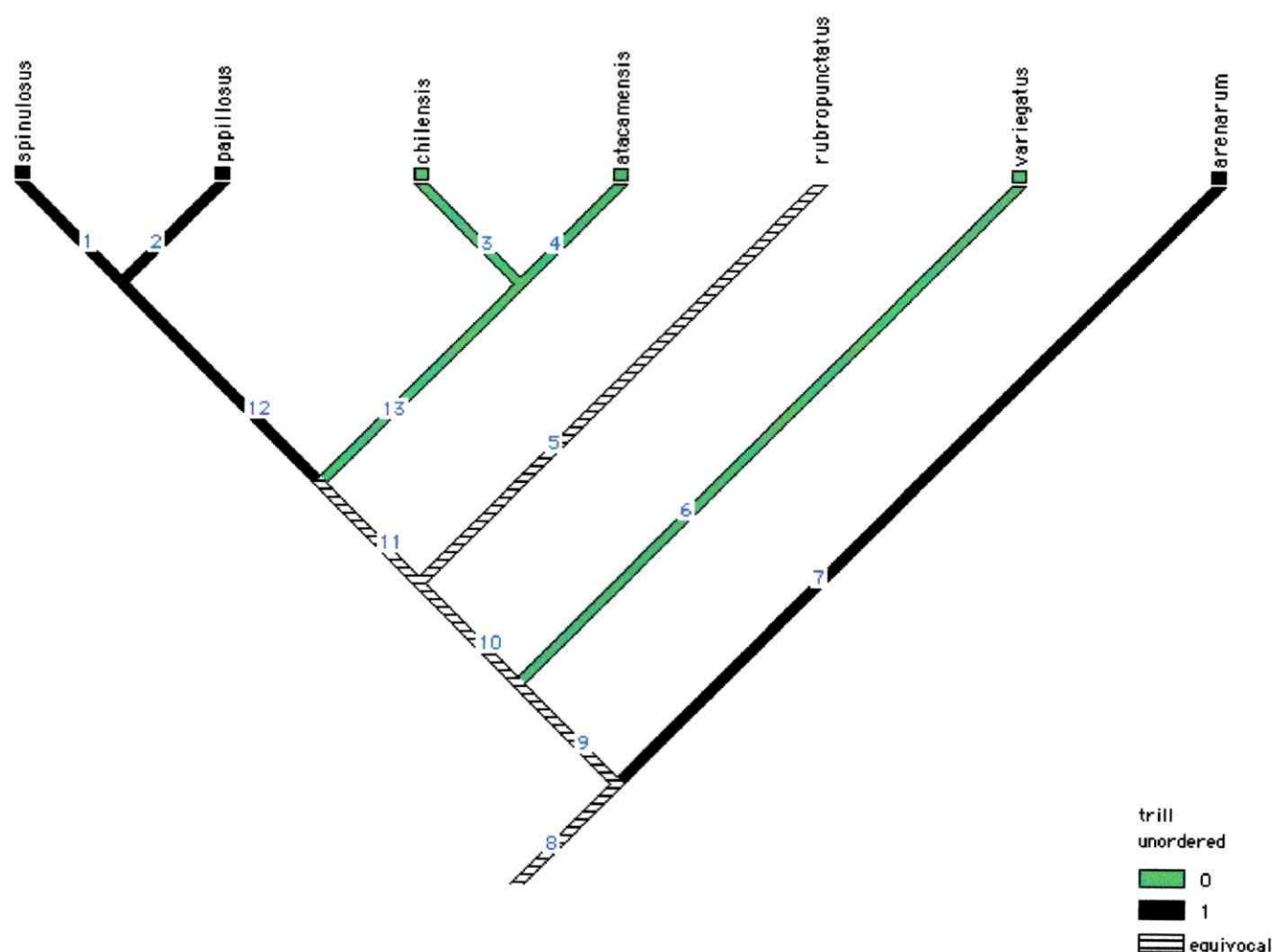


Figura 19.- El carácter Trill mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S). Se representa presencia (negro) y ausencia (verde).

Figura 20

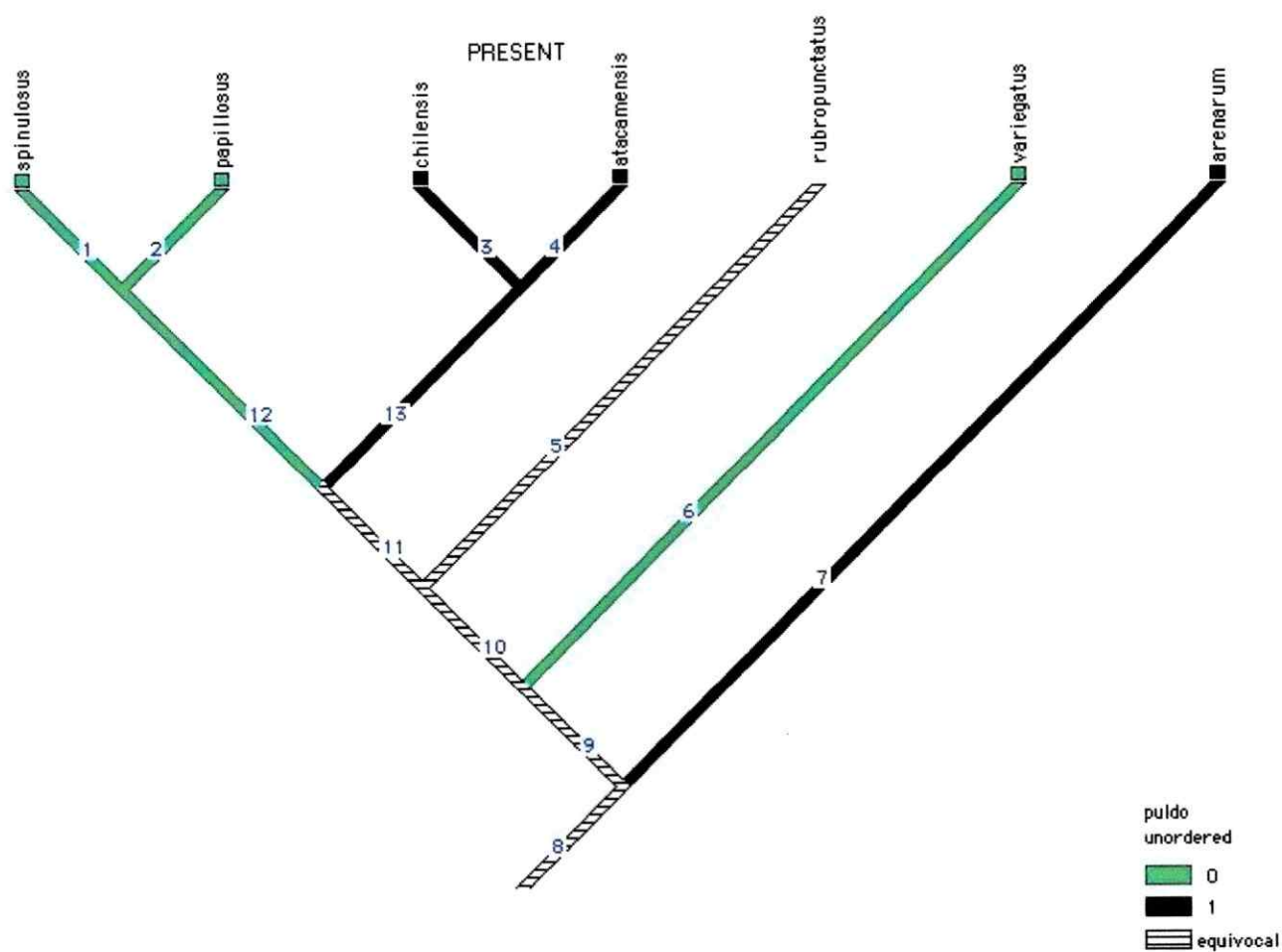


Figura 20.- El carácter Pulsos Dobles mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S). Se representa presencia (negro) y ausencia (verde).

Figura 21

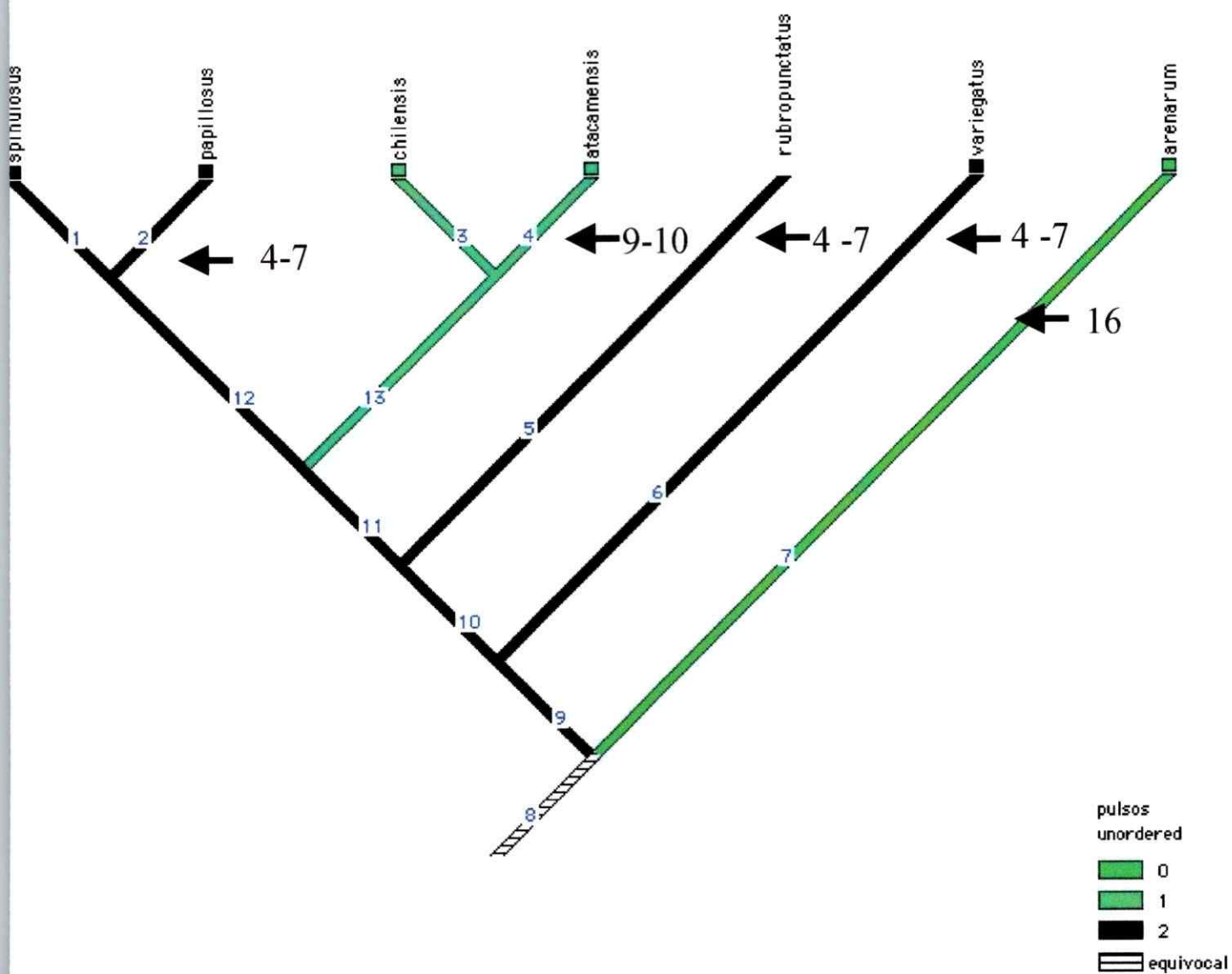


Figura 21.- El carácter Número de Pulsos mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S). Se representa presencia (negro) y ausencia (verde).

Figura 22

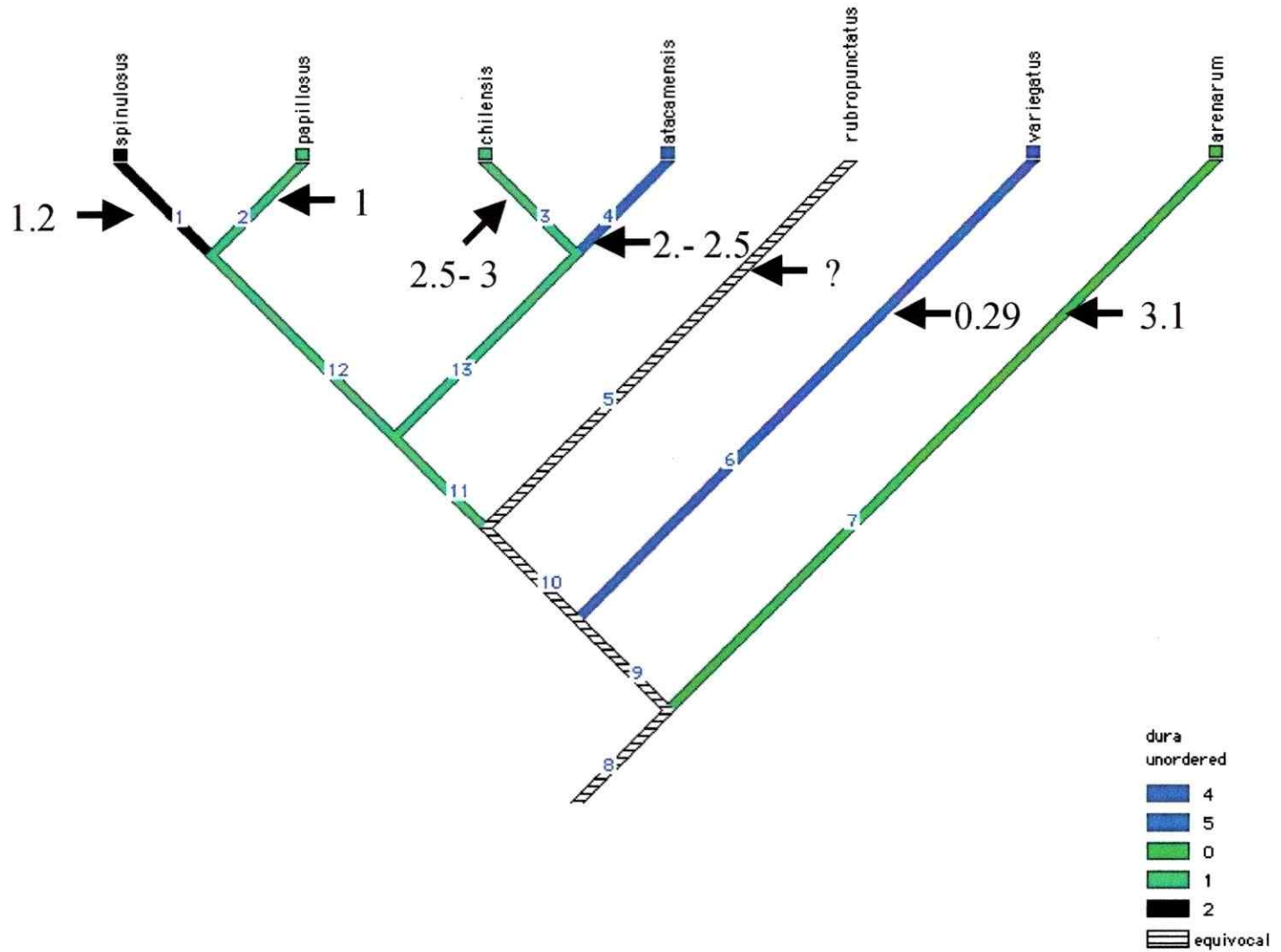


Figura 22.- El carácter Duración del canto mapeado en la filogenia construida sobre evidencia total de caracteres morfológicos y moleculares (12S-16S). Los valores indicados junto a la flecha muestran el volumen de Cuerda Vocal por especie.

Modelos de Evolución de Caracteres asociados al canto y Filogenia.-

El método de Mooers y col (1999) evalúa en que medida distintos caracteres están asociados a la filogenia y que escenario (genético, histórico, especiación) podría describir mejor los cambios en las estructuras estudiadas. En este sentido, es posible comparar el distinto grado de ajuste a la filogenia, bajo distintos modelos de cambio evolutivo. Para efectos de las comparaciones relevantes para esta tesis, he evaluado dos grupos de caracteres: los cantos y las estructuras morfológicas de la laringe. Los modelos que he contrastado corresponden al modelo genético, especiación y no histórico.

La Tabla 15 resume los valores de ajuste a la filogenia para los dos grupos de caracteres estudiados. Se puede observar que para ambos grupos de caracteres el modelo de especiación es el que presenta el menor valor de ajuste a la filogenia, reflejando probablemente, que en sus tasas de cambio, ambos grupos de caracteres no están determinadas por los mismos factores que producen los eventos de especiación.

En el caso de los caracteres morfológicos de la laringe, el modelo genético es el que presenta los mayores valores de ajuste a la filogenia seguido por el modelo no-histórico (Tabla 15). De acuerdo a Edwards (1992) que considera, que cualquier par de hipótesis de verosimilitud, son distintas cuando las diferencias entre sus probabilidades son aproximadamente de siete, es posible sugerir, que tanto el modelo genético como el no histórico no difieren significativamente en su ajuste a la filogenia, mientras que los dos últimos, si difieren del modelo ligado a especiación. De acuerdo a esto, los cambios morfológicos de la laringe estarían asociados a los cambios genéticos (por ej. Número de sustituciones) en el grupo *spinulosus*, de modo que, los posibles cambios en este grupo

de caracteres, serían mejor modelados como deriva en el tiempo, siendo relevante para explicar su cambio factores como el tamaño poblacional o efectos fundadores.

Para el grupo de caracteres asociados al canto, el panorama resulta más complejo, pues, ninguno de los modelos evaluados se ajusta de modo significativamente distinto en sus valores de Máxima Verosimilitud. Sin embargo, entre éstos el modelo no-histórico corresponde al que presenta el mejor ajuste, el cual es considerablemente mayor al modelo genético. Esto sugiere que ni factores asociados a deriva genética, ni factores asociados a eventos de especiación, estarían modelando su evolución. Si lo anterior es válido, entonces la evolución de los cantos, estaría explicada por factores distintos a los que modificarían a la laringe. Esto sugiere, fuertemente un desacople entre estos dos grupos de caracteres en cuanto a su evolución.

Tabla 15

Caracteres	Genético	Especiación	No-Histórico
Laringe	10,334	0	7,546
Canto	0,627	0	4,01

Tabla 15.- Ajustes de Máxima Verosimilitud a la filogenia para los grupos de caracteres continuos asociados a la laringe y a los cantos. Se representa los valores de diferencia entre los valores de Máxima Verosimilitud. Se representa con "0" a aquella que muestra el menor ajuste.

DISCUSION

1) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS ESPECIES CHILENAS DEL GRUPO *spinulosus*.

A partir de los años 70, ha existido un creciente interés en la utilización de caracteres moleculares para estudios sistemáticos evolutivos en distintos grupos de organismos (Bremer, 1996). Junto al uso de este tipo de caracteres, han emergido algunas controversias metodológicas acerca de la importancia y confiabilidad de los caracteres moleculares en comparación a los morfológicos y de como ambos tipos de datos deben ser tratados: si en forma separada utilizando **congruencia de caracteres** (Patterson y col, 1993; de Queiroz y col, 1995), **evidencia total** (Kluge, 1989), o una **aproximación condicional** (Bull y col, 1993; Huelsenbeck y col; 1996). Si bien, el problema está lejos de ser resuelto, en un creciente número de trabajos se ha comenzado a utilizar toda la evidencia disponible en la búsqueda de hipótesis filogenéticas (Cannatella y col., 1993; Bremer, 1996; De Salle y col., 1997; Cunningham, 1997; Cannatella y col., 1998; Baker y col., 1998; Miyamoto, 1996; Remsen y de Salle, 1998; Laiponte y col, 1999; Farias y col, 2000). En estos estudios, se ha tratado a las distintas bases de datos como **particiones** y se ha evaluado su grado de congruencia a través de distintos indicadores tales como el ILD (*Incongruence length differences*; Farris y col, 1995) o el índice de Bremer (*Bremer support*; 1996)

A la fecha, el trabajo más completo sobre estimaciones filogenéticas usando bases de datos moleculares versus morfológicas, corresponde a Baker y col. (1998). Estos

autores, basándose en una revisión de quince estudios sistemáticos concluyen que aunque, las particiones moleculares y las morfológicas muestran un grado importante de incongruencia medido por la prueba ILD, la utilización de toda la evidencia disponible, incrementa el soporte de cada nodo (*Bremer support*). Estos autores, muestran además, que los datos morfológicos tienen valores de consistencia similares o mayores que los datos moleculares y sugieren a la luz de esta evidencia, que ambos tipos de datos deben ser tratados de modo conjunto.

El análisis filogenético del grupo *spinulosus*, basado en los caracteres morfológicos no mostró ser resolutivo al interior del grupo interno, y solo mostró soporte estadístico para la separación entre *B. rubropunctatus* y las otras especies. Este hecho, concuerda con el patrón descrito para este género de "morfología conservada" (Graybeal, 1997). A diferencia de los caracteres morfológicos, las particiones moleculares mostraron un alto nivel de resolución al interior del grupo interno, con buenos valores de bootstrap para los clados *spinulosus-papillosus* y *atacamensis-chilensis* (Figuras 4 y 5). Es interesante observar que la evidente diferencia entre el número de caracteres filogenéticamente informativos entre caracteres morfológicos (85.7%; Tabla 8) y los moleculares (12S:4.36%; 16S: 5.06%; Tabla 7), no se refleja en el nivel de resolución de la filogenia dada por estos caracteres, en cuanto a topología y al sustento de cada nodo (ver Tabla 8 y Figuras 4 y 5). Esto se debe a que las particiones moleculares muestran valores menores de homoplasias. Lo anterior, sugiere que, alternativamente a que los bufónidos sean morfológicamente conservados, la falta de resolución dada por la partición morfológica, se debe a que, en parte, en varios de los caracteres analizados un mismo

estado aparece más una vez, lo que indica que varios de estos caracteres se han perdido y vuelto a ganar (reversiones), en el transcurso de la evolución de este grupo.

Por otro lado, tanto el gen 12S como el gen 16S, muestran topologías similares, siendo la única excepción la ubicación de *B. rubropunctatus*, que es más basal para el gen 12S, mientras que para el gen 16S, la ubicación de esta especie es problemática, debido a que se resuelven dos hipótesis igualmente parsimoniosas con distinta ubicación de *B. rubropunctatus*, en la primera esta especie corresponde al grupo hermano de las restantes especies del grupo *spinulosus*, y en la otra hipótesis se ubica ligada al clado *spinulosus-papillosus*. La ubicación problemática de esta especie, se resuelve al tratar a los genes 12S y 16S en forma conjunta en una sola matriz, ya que la hipótesis filogenética recuperada muestra a *B. rubropunctatus* como la especie más basal en el grupo *spinulosus* (Fig. 6). La misma topología es nuevamente obtenida al tratar todos los caracteres en una misma matriz usando evidencia total (Fig.6), siendo la única diferencia con la filogenia anterior, menores valores de bootstrap para cada nodo. Si bien, tanto la evidencia total, como el tratamiento separado de los caracteres recuperan esencialmente, la misma topología, existen importantes diferencias al comparar los valores de *ILD* y *Bremer support* aportados por las particiones moleculares y las de evidencia total (Tabla 8). La prueba de *ILD*, muestra que no existen conflictos al mezclar en una misma matriz los genes 12S y 16S ($p < 0.53$). A diferencia del caso anterior, se observó un importante grado de conflicto al tratar todos los datos de modo conjunto ($p < 0.01$). De acuerdo, a este criterio estas matrices (morfológicas y moleculares) no debieran mezclarse en un análisis. Sin embargo, al observar los valores de *Bremer support*, el panorama es distinto pues se constata que los valores de sustento son idénticos a los clados *spinulosus-*

papillosus y *atacamensis-chilensis*, y que para la evidencia total la separación entre *B. rubropunctatus* y las restantes especies del grupo *spinulosus* aparece más robusta en un paso (Fig 6). El encontrar que el ILD y *Bremer support* están en conflicto, no es una novedad, pues resultados similares han sido descritos por Baker y col. (1988) y Remsen y de Salle (1998). Estos autores detectaron además, que el soporte de ciertos nodos se incrementaba al agregar a los datos moleculares los morfológicos. Lo anterior, plantea una dicotomía no resuelta, en orden al modo de evaluar las particiones. En mi opinión el criterio que debiera primar es aquella combinación que garantice el máximo poder explicativo, aún cuando existan otros criterios como ILD que indiquen la existencia de diferencias entre particiones. Por esta razón la hipótesis filogenética que surge de la evidencia total, surge como la más adecuada para reflejar las relaciones filogenéticas del grupo (Fig. 6).

Si bien, con relación a la búsqueda de hipótesis filogenéticas, se ha abordado el problema de la combinación simultánea de distintas particiones, todas las búsquedas han sido realizadas bajo el criterio de Máxima Parsimonia. Es sabido que existen por lo menos otros tres métodos de inferencia filogenética Máxima Probabilidad (ML), Mínima Evolución (ME) y Neighbor Joining (NJ), que utilizan distintos algoritmos para la estimación filogenética (Para una revisión ver Swofford y col. 1996). En el contexto de la búsqueda de aquella hipótesis que se aproxime en mejor forma a describir la historia evolutiva de un grupo, es pertinente examinar si otros criterios distintos a MP, recuperan la misma filogenia. La Tabla 9 resume la información resultante al aplicar ML, ME y NJ. Interesante resulta el hecho que independiente del método usado los clados *spinulosus-papillosus* y *atacamensis-chilensis* muestran un alto respaldo estadístico y que

para *B. rubropunctatus* sólo existe respaldo para el análisis combinado de los genes 12S y 16S, resultando concordante con la topología obtenida por MP. La anterior información muestra cómo la combinación de distintos tipos de algoritmos y metodologías de búsqueda, pueden aportar para la corroboración de la filogenia de un grupo de organismos, vía metodologías y supuestos distintos.

2) LOS ATRIBUTOS ACÚSTICOS DEL CANTO DE LIBERACIÓN EN LAS ESPECIES CHILENAS DEL GRUPO *spinulosus*: CONSIDERACIONES MORFOLÓGICAS E HISTÓRICAS

Los estudios realizados sobre señales acústicas tanto en insectos, anfibios y aves se han realizado principalmente en aspectos relacionados con la evolución del canto bajo tres factores selectivos: selección sexual, atenuación ambiental y energética (Bucher y col., 1982; Ryan y Brenowitz, 1985; Taigen y col., 1985; Ryan y col., 1990). Dado que la expresión del canto es el resultado de la interacción de diferentes presiones selectivas y de restricciones (ej. morfológicas) que operan en forma independiente, la aproximación al estudio de la evolución de señales acústicas no puede ser entendida adecuadamente, sin evaluar la influencia de los factores no sujetos a selección natural (factores últimos) como las restricciones de tipo filogenéticas y morfológicas.

La aproximación filogenética, ha sido incorporada, solo recientemente a la interpretación de la evolución del canto (Cocroft y Ryan, 1995; Emerson, 1996; Emerson y Boyd, 1999). Estos trabajos han analizado la evolución del canto nupcial, y han evidenciado, cómo a través de la evidencia filogenética, es posible interpretar desde una nueva óptica este fenómeno. Emerson (1996) muestra, cómo en *Rana blythi*, la pérdida de canto nupcial y su aparición en la hembra, corresponde una novedad evolutiva.

Esta autora basa esta conclusión en la ubicación de esta especie en un nodo terminal. De modo similar, Cocroft y Ryan (1995) mapeando atributos espectrales y temporales sobre la filogenia en el género *Bufo* y *Pseudoacris*, encuentran que, en general, los caracteres estudiados muestran un grado importante de divergencia en su evolución, siendo algunos muy variables entre especies hermanas, mientras que otros resultan ser muy conservados. Adicionalmente, estos autores, encuentran en hylidos que, caracteres del canto asociados con la morfología resultan ser más conservados que aquellos ligados a conducta y fisiología, mientras que para bufónidos no se encontró diferencias entre caracteres asociados a morfología, conducta y fisiología. Lo anterior, sugiere que no es posible, realizar generalizaciones, acerca de la evolución de las señales acústicas, sin un acabado conocimiento de la filogenia del grupo en cuestión y que, adicionalmente muchas de las explicaciones son linaje dependiente, es decir, que los factores que moldearon la evolución de un carácter en un grupo no necesariamente son los mismos para otro grupo, pues factores asociados a la historia de evolutiva podrían establecer distinto tipo de respuestas en cada grupo.

1) Caracteres Acústicos y correlatos morfológicos

En relación a las restricciones morfológicas a la producción de canto, los trabajos se han centrado principalmente en anfibios (en *Bufo*: McAlister, 1971; Martin, 1971; Martin, 1972; Martin y Gans, 1972; Schimdt y col., 1990; en *Physalaemus*: Drewry y col., 1982; Ryan y Drewes, 1990; Jaramillo y col. 1997; en *Xenopus*: Schimdt, 1972; 1973; en *Rana*: McClelland y Wilckzynsky, 1989; en *Hyla*: McClelland y col, 1997) y, en menor medida, en aves (Lambrechts; 1996; Buskirk, 1997; Podos; 1997; Larzen y Goller, 1999). En estos trabajos, en general, se ha visto que la expresión de un atributo

acústico, está explicado por múltiples factores asociados con las estructuras que producen la señal, entre éstos, los más importantes corresponden al tamaño corporal y las estructuras asociadas a la laringe. Los estudios realizados por Martin (1972b) muestran que la mayoría de los cambios encontrados en la expresión de un carácter acústico, no requieren cambios drásticos en la configuración morfológica del sistema que los produce (laringe y musculatura torácica). Por ejemplo, para especies del grupo *Bufo americanus*, Cocroft y Ryan (1995) encontraron que las especies de este grupo producen el mismo tipo de pulsos, pero cada especie lo produce a distinta tasa. Martin (1972b) muestra que estas diferencias pueden ser explicadas, simplemente por diferencias en la activación de la musculatura torácica, más que requerir un cambio importante de la laringe. La diferenciación entre las especies en la producción de señales acústicas, se origina entonces, desde el punto de vista morfológico, dentro de un marco limitado de combinaciones de las estructuras responsables del canto. Estudios realizados en esta temática, han mostrado, que el tamaño de la musculatura de la laringe, tiende a relacionarse con características temporales de los cantos, mientras que un tamaño grande de laringe, de las cuerdas vocales y cartílago aritenoide predice cambios en los parámetros temporales (McClelland y Wilczynsky, 1989; Ryan y Drewas, 1990; Wilczynsky y col, 1993). El sistema emisor, responde, entonces, en su expresión final de un modo dinámico con un grado de interdependencia importante entre las estructuras morfológicas de la laringe y los elementos pasivos de la producción de canto (tracto vocal).

Los resultados del análisis univariado de los atributos espectrales y temporales, mostraron que en las especies estudiadas, existieron diferencias significativas en todos los

parámetros medidos excepto en la tasa de pulsos y la frecuencia dominante. Con relación a la tasa de pulsos, este carácter muestra una alta homogeneidad entre las especies del ingroup. Es interesante contrastar esta situación a la descrita para el grupo del *Bufo americanus* por Brown y Littlejohn (1972), quienes no encuentran diferencias importantes entre las especies de este grupo ni en el canto de liberación ni para el canto nupcial (a excepción de *B. woodhousei*), sugiriendo que este carácter resulta ser bastante conservado entre las especies, ya que presenta homogeneidad independiente de las distintas presiones que pueden moldear el carácter (ej. selección sexual). Con respecto a la frecuencia dominante, nuevamente las diferencias observadas, no resultaron ser significativas entre las especies estudiadas, al controlar por tamaño corporal. Martin (1971) describe que las diferencias en la frecuencia dominante entre *B. cognatus*, *B. valliceps* y *B. marinus*, no dependen de la masa corporal de la cuerda vocal, sino de la capacidad de resonancia de ésta. Para el caso de las especies estudiadas en esta tesis, no se midió la masa de la cuerda vocal, pero si se comparó el volumen y el largo de la cuerda vocal, no encontrándose diferencias significativas en el largo de la cuerda vocal, pero sí en el volumen de cuerda vocal, mostrando el menor volumen en *Bufo spinulosus* (Fig. 9e). Esta reducción, sin embargo, no se expresa en notables diferencias en la frecuencia dominante entre las especies. Esto sugiere que otros factores, distintos al ancho y largo de la cuerda vocal, determinan la expresión de la frecuencia dominante. Esto es respaldado por el análisis de correlaciones donde se muestra que la cuerda vocal no influye en la frecuencia dominante y que sólo es afectada por el tamaño corporal, pues al correlacionar los residuos de la regresión entre estas variables no aparece un efecto significativo (ver Tablas 13 y 14). Si, sólo el tamaño corporal es el factor que determina

la frecuencia dominante, la modificación de este carácter sería indirecta, pues sólo respondería de modo alométrico, esta sugerencia ya había sido mencionada tempranamente por Martin (1972b). El carácter pulsos dobles, claramente es el más divergente en el grupo *spinulosus*, estando presente en *B. chilensis* y *B. atacamensis*.

El canto descrito para las especies del grupo *spinulosus*, se clasifica según Martin (1972b), como de tipo I, donde la producción del canto de liberación esta determinado por el paso unidireccional de aire desde los pulmones a la laringe, hecho que implica una contracción muscular pulsátil continua de la musculatura torácica. Una mayor masa de musculatura torácica podría entonces facilitar la contracción rápida y posibilitar la producción de pulsos dobles. Los datos recolectados sugieren que esta se estaría dando por distinto tipo de musculatura torácica para cada especie. Para el caso *B. chilensis*, es el músculo oblicuo externo en el que presenta una mayor masa en proporción a las otras especies (Fig. 10a), mientras que para *B. atacamensis* la mayor masa se verifica en el músculo abdominal (Fig. 10b). Adicionalmente, es interesante, el constatar como para estas dos especies, se asocia un mayor volumen de cartílago aritenoide y cricoide (Fig. 8a y 8b). Si bien esta tendencia no muestra diferencias significativas al efectuar un ANOVA, el análisis de correlación de Pearson detecta una relación positiva y significativa, entre la producción de pulsos dobles y el volumen de cartílago aritenoide y cricoide (Tabla 10). Lo anterior nos indica, como la combinación de una mayor masa de musculatura torácica y de cartílagos posibilitaría la producción de pulsos dobles. Schmidt (1973) describe, para *Rana pipiens pipiens*, que la cuerda vocal también podría influir de modo activo en la producción de pulsos, los datos de esta tesis no muestran que ésta tenga algún efecto en la producción de pulsos totales o de pulsos dobles, pero sí en

los tiempos promedios de duración de un pulso, como se discute más adelante (Tabla 10). Este hecho sugiere, una vez más, que los mecanismos de producción de una señal pueden evolucionar de modo independiente.

La duración del canto, mostró ser significativamente distinta entre las especies estudiadas. Es interesante notar que dentro de las especies del grupo *spinulosus*, nuevamente *B. atacamensis* y *B. chilensis*, presentan los cantos más largos, siendo muy similares a los de *B. arenarum*. La explicación podría estar dada por la masa muscular torácica y de cartílagos de la laringe presentes en estas especies. Sin embargo, si la musculatura tiene un efecto positivo sobre la duración del canto, este no es significativo (Tabla 10), siendo relevante sólo el efecto de los cartílagos que muestran una variación positiva y significativa (Tabla 10). Este efecto solo se produce por estar asociado al tamaño corporal, pues los residuos de los cartílagos y la duración, no muestran significancia estadística (Tabla 11).

Un carácter interesante, es el tiempo promedio de cada pulso, donde se observa que los mayores tiempos promedios de duración se dan para *B. spinulosus* y *B. papillosus*. Las correlaciones hechas sin considerar el efecto de tamaño corporal mostraron que este carácter, solo es dependiente del largo de la cuerda vocal y no curiosamente, de su volumen total (Tabla 10). Sin embargo, la comparación de los residuos, además de confirmar el efecto negativo y significativo de la longitud de la cuerda vocal, añadió al Cartílago Aritenoide y al Número de Pulsos como factores que determinan y modifican la duración de un pulso en el mismo sentido del largo de la cuerda vocal. De este modo y resumiendo, cantos más cortos, cartílagos aritenoides pequeños y cuerdas vocales largas, producen como efecto la producción de tiempos

promedios de pulsos más cortos. Esto sugiere que la expresión de este carácter depende de modo activo de la actividad del aritenoide y de modo pasivo, del largo de la cuerda vocal. En esta lógica, cantos más cortos, posibilitarían una mayor excitación de la cuerda vocal. Un mecanismo similar ha sido descrito por Schmidt (1973) para *Rana pipiens pipiens* y por Martin (1972b) en las especies de *Bufo*. Adicionalmente, es posible asociar, por ejemplo la presencia de "trill", en *B. spinulosus* y *B. papillosus* a estas estructuras actuando en forma conjunta, produciendo la vibración continua de la cuerda vocal y dando como resultado la alta tasa de pulsos descrita (Penna y Veloso, 1981).

La cuantificación del carácter Rendimiento, es una manera de evaluar en el canto de liberación cuánto es asignado a la señal y cuánto a silencio. Al comparar las especies, se encontró un patrón de variación significativa, con *B. spinulosus* y *B. papillosus* las especies que presentaron mayores valores, es decir un uso mayor del canto en la señal, dejando muy poco para silencio entre pulsos. Junto a esta observación, se encontró que la Duración del canto y el Cartílago Aritenoide afectan significativamente y con una componente negativa esta variable. Esto es esperable si se piensa que cantos más largos y con vibraciones del aritenoide mayores, producirán más pulsos y por ende menores eventos de silencio entre pulsos.

Un resultado interesante del análisis de correlaciones es que el volumen de la cuerda vocal no tiene efecto significativo prácticamente en ninguna variable acústica ni morfológica, a pesar de la existencia de diferencias significativas mostradas por el ANOVA. Este hecho se debe fundamentalmente, al menor volumen de cuerda vocal de *B. spinulosus*. Al respecto, Martin (1972b) menciona que la masa de la cuerda vocal explica diferencias entre la mayoría de las especies estudiadas, pero no resulta ser un buen

descriptor para explicar las diferencias entre *B. cognatus* y *B. valliceps*, siendo propiedades mecánicas de las cuerdas vocales distintas a la masa las que puedan explicar estas diferencias. En este caso, hemos visto como el largo de la cuerda vocal determina importantes diferencias en los tiempos promedios de los pulsos. Otra consideración anexa a este punto es que los estudios donde se ha visto un efecto importante de las cuerdas vocales y diferencias entre las especies, corresponden a trabajos hechos sobre canto nupcial y no sobre el canto de liberación. Al respecto, Martin y Gans (1971) mencionan que para *Bufo valliceps*, muchas modificaciones relativas al flujo de aire (mecanismos activos) y producción de sonido respondería a selección sobre la eficiencia sobre canto nupcial y no sobre el canto de liberación. Esto nos lleva a pensar que un mismo sustrato morfológico puede expresar distintos niveles de variación en función de los factores que lo modelan (por ejemplo: efectos indirectos, a través de cambios en tamaño corporal o efectos directos, a través de selección sexual).

La perspectiva multivariada de los atributos acústicos, nos muestra que *B. variegatus* presenta notables diferencias con las otras especies (Fig. 11). Las razones que explican esta diferenciación, se relacionan, por un lado, con las evidentes diferencias en tamaño corporal entre *B. variegatus* y las otras especies. Por otro lado, con el mecanismo descrito para la producción del canto de liberación (Tipo II), lo que implica que cada pulso es producido por la contracción continua de la musculatura torácica y no pulsátil (Tipo I), como lo es en las especies del grupo *spinulosus* y *B. arenarum* (Martin, 1972). En las otras especies, es evidente, que al utilizar de modo conjunto los cantos de las especies, es posible, establecer diferencias entre ellas (Fig. 11 y Tabla 13), hecho que sugiere que en su expresión global los caracteres acústicos serían buenos descriptores a

nivel específico. Es interesante, que en general, los porcentajes de clasificación correcta muestran valores altos (60%-91%), y que las malas clasificaciones ocurren, como era de esperar, entre las especies hermanas (*B. atacamensis*-*B. chilensis* y *B. spinulosus*- *B. papillosus*, ver Tabla 13). Esto sugiere que los cantos, parecen estar determinados fuertemente por la filogenia. Al respecto, es interesante el contrastar este patrón de diferenciación especie específico de los cantos con el análisis multivariado resultante de los caracteres morfológicos de la laringe. Este muestra que las diferencias entre las especies resultan ser marginalmente significativos ($p=0,065$) y que en el análisis de clasificación discriminante los valores de clasificación correcta son extremadamente bajos, por ejemplo sólo dos especies resultan bien clasificadas (50% y 33%), sugiriendo que la morfología de la laringe, es conservada entre las especies. Sin embargo, al graficar los valores de los coeficientes canónicos para el canto y para los caracteres morfológicos de la laringe (Figs.12 y 13, respectivamente), es claro que ambos agrupamientos muestran un patrón similar, y éste resulta ser, a su vez, similar a la filogenia de las especies. Este hecho, sugiere que los sistemas acústicos y morfológicos, como un todo podrían evolucionar de modo acoplado.

2) Sistemas Acústicos y Morfológicos : Evolución Acoplada?

Aún cuando sea posible describir y explicar cómo se relacionan las estructuras morfológicas en la producción del canto, las preguntas acerca de cómo han evolucionado estas estructuras y la existencia de un correlato evolutivo estricto entre los patrones observados del canto y la estructura que las produce, requieren otro tipo de aproximación. Para dar cuenta de estas interrogantes, es necesario recurrir al método comparado.

Los métodos disponibles a la fecha son dos: el método de Parsimonia, que reconstruye estados ancestrales utilizando caracteres discretos (Cunningham y col, 1998; Maddison, 1990), y la familia de métodos estadísticos desarrollados tanto para caracteres discretos y continuos. Estos métodos se pueden dividir, a su vez, en el Método de Contrastes Independientes (Harvey y Pagel, 1991; Garland y col., 1992) y los Métodos de Máxima Verosimilitud (Pagel, 1994, 1997; Schluter y col., 1997; Mooers y col, 1999). Una comparación de estos distintos protocolos para inferir cambio evolutivo, muestra que los métodos de Máxima Probabilidad, poseen dos ventajas, en comparación al método de Parsimonia, a) La posibilidad de usar caracteres continuos y b) evita estimar puntualmente los estados ancestrales, y por tanto la posibilidad de dos o más hipótesis igualmente parsimoniosas. Recientemente, Mooers y col (1999) han descrito un método de Máxima Verosimilitud que ofrece la posibilidad de estimar tasas de cambio en grupos de caracteres como un todo. Esta aproximación ha sido aplicada para estudiar la evolución de los cantos, plumaje y la tráquea en un grupo de aves (Gruinae). Utilizando este método, encuentran distintos ajustes a la filogenia, entre los cantos y la tráquea, sugiriendo que estos grupos de caracteres evolucionan de modo independiente.

2.1) Mapeo de Caracteres usando Máxima Parsimonia.-

El mapeo de los caracteres nos muestra una vez más, que los caracteres parecen evolucionar en mosaico, mostrando apomorfías y reversiones dependiendo del carácter en cuestión. Para los caracteres asociados al canto, la presencia de "trill" representa una condición primitiva, pues está presente en *B. arenarum*. Este carácter constituiría entonces, una simplesiomorfía y correspondería a una reversión ya que esta presente, en el clado terminal *spinulosus-papillosus* (Fig. 19). Similar interpretación se puede aplicar a los estados de carácter: presencia pulsos dobles, número de pulsos altos y duración del canto (Figs. 20, 21 y 22, respectivamente). Correspondiendo a simplesiomorfías, asociadas al clado *atacamensis-chilensis*. Desde esta perspectiva claramente las especies *B. atacamensis* y *B. chilensis*, corresponden a las especies más conservadas en cuanto a sus cantos.

Para las estructuras de la laringe, es claro que las especies *B. atacamensis* y *B. chilensis*, resultan más similares a *B. arenarum* (outgroup). De acuerdo a esto, caracteres como Volumen de Cartílagos Aritenoide y Cricoide, corresponden a simplesiomorfías. Por otro lado, caracteres como Músculo Dilatador, muestra una disminución del volumen entre las otras especies, constituyendo una apomorfía de *Bufo spinulosus*. El panorama es distinto al mapear la evolución de la Musculatura Constrictora, pues se observa que la condición reducción del volumen de este carácter constituye una apomorfía para el clado *atacamensis-chilensis*. Finalmente, respecto a la cuerda vocal, se observa que la condición reducción del volumen en comparación a los "outgroups", corresponde a una

tendencia clara entre las especies del grupo *spinulosus*, con el extremo de reducción en *B. spinulosus*.

Resumiendo, los caracteres acústicos muestran distintos grados de variación en función de la filogenia, mostrando por ejemplo que las especies más conservadas resultan ser *B. atacamensis* y *B. chilensis*, y que las restantes, muestran variar en distinto sentido. En relación a los caracteres morfológicos asociados a la laringe, es posible, generalizar, que cada estructura muestra distintas tendencias en su evolución, siendo los cartílagos los únicos caracteres que parecen evolucionar de modo similar. Los restantes caracteres parecen modificarse de modo independiente, si bien, muestran estar asociados en su cambio, a clados específicos (ej., cartílagos, músculo constrictor para el clado *atacamensis-chilensis*). En perspectiva comparada se puede entonces, deducir que los sistemas de caracteres acústicos y morfológicos muestran distintas vías de evolución, siendo difícil con este tipo análisis el establecer relaciones respecto a la evolución de estos caracteres como un todo y su relación con la filogenia del grupo.

2.2) Mapeo de caracteres usando Máxima Verosimilitud

Los resultados de análisis de evolución de caracteres, hechos a partir del modelo de Mooers y col. (1999), nos permiten visualizar cómo cambian las tasas de evolución de los caracteres asociados al canto y a la morfología de la laringe en la filogenia, en función de distintos modelos. Es claro que ambos grupos de caracteres no se ajustan bien al modelo de cambios asociados a tasa de especiación, hecho que es esperable para el canto de liberación, pues se trata de un grupo de caracteres no involucrado en procesos de selección sexual. La interpretación del resultado de máxima verosimilitud para la

morfología de la laringe, es un poco más complicada, pues si se considera la sugerencia, que este grupo habría perdido el canto nupcial (Martin, 1972), y que los caracteres morfológicos asociados al canto son conservados (Cocroft y Ryan, 1995), la ausencia de correlación con factores asociados a eventos de especiación, podría sugerir que este grupo de especies nunca ha presentado canto nupcial o que en su expresión la morfología de la laringe no es influenciada por estos factores. Respecto a este último punto, se ha documentado que la morfología de la laringe presenta diferencias asociadas a selección sexual, tanto a nivel intraespecífico (machos y hembras: en el género *Rana*, McClelland y Wilczynsky, 1983; en el género *Hyla*, McClelland y col., 1997) y a nivel interespecífico (género *Hyla*, Wilczynsky y col. 1993). Esto sugiere que especies que presentan canto nupcial conservan la morfología que permite la expresión de esta conducta. Como las especies del grupo *spinulosus* no muestran este es posible que el canto nupcial nunca haya estado presente en estas especies. Para evaluar esta proposición, son necesarios otros protocolos de investigación, entre los que se incluye: un muestreo más extenso de los bufónidos con y sin canto nupcial, y el desarrollo de una búsqueda de los factores que modulan su expresión, como por ej. diferencias en niveles hormonales. Esta opción ha sido aplicada con éxito para especies del género *Rana* de Borneo (Emerson y Berrigan, 1993; Emerson, 1996; Emerson y Ward, 1998; para una revisión ver Emerson y Boyd, 1999), en que se ha demostrado la influencia de factores hormonales en la aparición o pérdida de canto nupcial y en los caracteres secundarios relacionados.

Para los caracteres morfológicos asociados a la laringe, el mejor modelo de cambio, corresponde al modelo genético, lo que sugiere, que los cambios en la laringe estarían ligados a fenómenos asociados a factores como por ejemplo deriva genética. Si se considera que existen antecedentes que ligan cambios morfológicos a cambios genéticos (Omland, 1997), es posible entonces postular que factores que determinen cambio genético entre poblaciones, podrían determinar cambios en la morfología de la laringe. Al respecto, se ha demostrado para poblaciones de *Acris crepitans* (McClelland y col, 1996; 1998), la existencia de un grado importante de diferenciación en los caracteres asociados a la laringe, en función de la procedencia geográfica. Si bien este corresponde a un estudio intraespecífico, esta evidencia sugiere que factores ligados a fijación de variantes genéticas como barreras o tamaño poblacional, influirían en la expresión de atributos morfológicos. Esta influencia se podría dar ya sea directamente sobre la laringe o de modo indirecto a través de variación en el tamaño corporal.

Resumiendo, respecto a los caracteres acústicos, ninguno de los modelos planteados se ajusta bien a la filogenia, lo que sugiere, que en su expresión estos caracteres serían lo suficientemente plásticos, para no ser influidos por los factores genéticos o factores asociados a eventos de especiación. Por otra parte, los caracteres asociados a la laringe, estarían ligados a procesos de cambio genético, no siendo importantes en este caso, factores ligados a especiación. Esto nos muestra finalmente, que ambos grupos de caracteres, parecen evolucionar de modo independiente y que en su evolución, los procesos ligados a especiación no explicarían las tasas de cambio en ambos grupos de caracteres.

CONCLUSIONES

- Entre las especies chilenas del grupo *spinulosus*: *B. rubropunctatus* corresponde a la especie basal del grupo, siendo el grupo hermano de dos clados: *chilensis-atacamensis* y *spinulosus-papillosus*.
- Entre las distintas particiones evaluadas para inferir las relaciones filogenética entre las especies chilenas del grupo *spinulosus*, la de evidencia total, es la que mostró mejor soporte estadístico y valores de índice de decaimiento.
- Las especies del grupo *spinulosus*, muestran en sus atributos acústicos diferencias que permiten asignar los niveles de variación como especie- específico.
- Los caracteres morfológicos asociados a la laringe, no mostraron diferencias entre las especies, lo que implica que son altamente conservados.
- El mapeo de los caracteres acústicos y morfológicos sobre la filogenia usando Máxima Parsimonia, mostró que, en general, estos caracteres parecen evolucionar de modo independiente.
- Entre las especies del grupo interno, *B. atacamensis* y *B. chilensis* resultaron ser las que presentaron el mayor número de caracteres plesiomórficos.
- El análisis de Máxima Verosimilitud, mostró que los caracteres acústicos y caracteres morfológicos, evolucionan de modo independiente, y que ambos grupos de caracteres no se relacionan con un modelo de especiación, en cuanto a su evolución.

BIBLIOGRAFIA

Baker, R.H. Yu, X. y DeSalle, R. 1998. Assessing the relative contribution of molecular and morphological characters in simultaneous analysis trees. *Mol. Phyl. Evol.* 9(3): 427-436.

Baum, D y Larson, A. 1991. Adaptation reviewed: A phylogenetic methodology for studying character macroevolution. *System. Zool.* 40:1-18.

Blair, W.F. 1972. Evolution of Genus *Bufo*. University of Texas.

Blair W. F. y Pettus D. 1954. The mating call and its significance in the Colorado River Toad (*Bufo alvarius* Girard). *Texas J, Sci.* 6: 72-77.

Bremer, B. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.

Bremer, B. 1996. Combined and separate analyses of morphological and molecular data in the plant family Rubiaceae. *Cladistics*, 12: 21-40.

Brown, L. y Littlejohn, M.J.. 1972. Male release call in the *Bufo americanus* group. En: Evolution of Genus *Bufo*. W. F. Blair editor. University of Texas.

Bucher, T.L., Ryan, M.J. y Bartholomew, G. A.. 1982. Oxygen consumption during resting, calling and nest building in the frog *Physalaemus pustulosus*. *Physiol. Zool.* 55: 10-22.

Blair, W.F. 1972. Evolution of Genus *Bufo*. University of Texas.

Blair W. F. y Pettus D. 1954. The mating call and its significance in the Colorado River Toad (*Bufo alvarius* Girard). Texas J, Sci. 6: 72-77.

Brooks, D. y McLennan, D.. 1991. Phylogeny, Ecology and Behaviour: A research program in Comparative Biology. Chicago. University of Chicago Press.

Bucher, T.L., Ryan, M.J. y Bartholomew, G. A.. 1982. Oxygen consumption during resting, calling and nest building in the frog *Physalaemus pustulosus*. Physiol. Zool. 55: 10-22.

Bull, J, Huelsenbeck, J, Cunnigham, C, Swofford, D. y Waddell, P. 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. Syst. Biol. 42: 384-397.

Buskirk, J.V. 1997. Independent evolution of song structure and note structure in American woods warblers. Proc. R. Soc. Lond. B. 264: 755-761.

Cannatella D. y Hillis D.. 1993. Amphibians relationships: phylogenetics analysis of morphology and molecules. Herpetological Monographs, 7: 1-7.

Cannatella D., Hillis D., Chippindale P., Weigt L., Rand A. y Ryan M.. 1998. Phylogeny of frogs of the *Physalaemus pustulosus* species group, with and examination of data incongruence. Syst. Biol. 47(2): 311-335.

Cei, J. 1961. *Bufo arunco* (Molina) y las formas chilenas de *Bufo spinulosus* Wiegman. Invest. Zool. Chilenas 7 : 59-79.

Cei, J. 1962. Batracios de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile.

Cei, J. 1972. Bufo of South America. pp:82-91. En: Evolution in the Genus Bufo. W. Frank Blair (Ed.). University of Texas Press.

- Cei, J. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico italiano. Monografia 2*. Pubblicato dalla Università degli studi di firenze.
- Crocroft, T. 1994. A cladistic analysis of chorus frog phylogeny (Hylidae: *Pseudoacris*). *Herpetologica* 50(4):420-437.
- Crocroft, R. B. y Ryan, M. R.. 1995. Pattern of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Anim. Behav.* 49: 283-303.
- Cunningham, C , 1997. Is congruence between data partitions a reliable predictor of phylogenetic accuracy? Empirically testing and iterative procedure for choosing among phylogenetics methods. *Syst. Biol.* 46(3): 464-478.
- Cunningham, C.W., Omland, K. E. y Oakley, T. 1998. Reconstructing ancestral character states: a critical reappraisal. *TREE* 13(9):361-366.
- De Queiroz, Donoghue M. y Kim J.. 1995. Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27: 423-450.
- DeSalle, R. y Brower, A.. 1997. Process partitions, congruence, and independence of characters: inferring relationships among closely related Hawaiian *Drosophila* from multiple gene region. *Syst. Biol.* 46(4):751-764.
- Doherty, J. A. y Hoy, R.. 1985. Communication in insects, III. The auditory behavior of crickets: some views of genetical coupling, song recognition, and predator detection. *Quart. Rev. Biol.* 60: 457-472.

- Drewry, G.E., Heyer, W.R. y Rand, A.S. 1982. A Functional analysis of the complex call of the frog *Physalaemus pustulosus*. *Copeia*, 3: 636-645.
- Duellman, W. 1979. The Herpetofauna of the Andes: Pattern of distribution, origin, differentiation and present communities. *En* W. Duellman (editor) . The South American Herpetofauna: its origin, evolution and dispersal.
- Duellman W & Shulte. R. 1992. Description of a new species of *Bufo* from Northern Perú with comments on phenetic groups of South American Toads. *Copeia* 1: 162-172.
- Edwards, A. 1992. Likelihood. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Emerson, S., 1996. Phylogenies and physiological processes-the evolution of sexual dimorphism in Southeast Asian Frogs. *Syst. Biol.* 45(3): 278-289.
- Emerson, S. y Hasting P.. 1998. Morphological correlations in evolution: consequences for phylogenetic analysis. *Quart. Rev. Biol.* 73(2): 141-162.
- Emerson, S.B. y Ward, E. 1998. Male secondary sexual characteristics, sexual selection, and molecular divergence in fanged ranid frogs Southeast Asia. *Zool. J. Linnean Soc.* 122: 537-553.
- Emerson, S.B. y Boyd, S.K. 1999. Mating vocalizations of female frogs: control and evolutionary mechanisms. *Brain, Behav. Evol.* 53: 187-197.
- Eriksson, T. 1998. Autodecay version 4.0 (program distributed by author). Department of Botany, Stockholm University. Stockholm.
- Escariz, V. 1965. Información Anatómica sobre *Bufo arenarum* (1867). *Revista del Museo de la Plata. Universidad Nacional de la Plata. Tomo VIII:* 1-322.

- Farias ,I., Ortí, G, y Meyer, A.2000. Total evidence: Molecules, Morphology, and the phylogenetics of Cichild fishes. . J. Exp. Zool. 288 :76-92.
- Farris, S., Källersjö, Kluge, G., y Bult, C. 1995. Testing significance of incongruence. Cladistics 10: 315-319.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the Comparative Method. Amer. Nat. 125: 1-15.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: Phylogeny Inferences Package, Version 3.4. Department of Genetics, SK-50; University of Washington, Seattle.
- Formas, J. 1978. The chromosome of *Bufo rubropunctatus* and *Bufo chilensis* (Anura:Bufonidae) .and other species of spinulosus group. Experientia 34: 452-454.
- Gallardo, J. 1962. A propósito de *Bufo variegatus* (Günther), sapo del bosque húmedo antartándico, y las otras especies de Bufo neotropicales. Physis XXIII, 23:93-102.
- Gerhardt, H.C.,1981. Mating call recognition in the barking treefrog (*Hyla cinerea*) importance of two frecuency bands as a function of sound pressure level. J. Comp. Physiol. 144: 9-16.
- Gerhardt, H.C., 1982. Sound pattern recognition in some North American treefrog (Anura: Hylidae): implications for mate choice. Am. Zool. 22:581-595.
- Gerhardt, H.C., 1987. Evolutionary and neurobiological implications of selective phonotaxis in the green treefrog (*Hyla cinerea*). Anim. Behav. 35:1479-1489.
- Gerhardt, H.C., 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. Annu. Rev. Ecol. Syst. 25: 293-324.

- Graybeal, A. 1997. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and test of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zool. J. Linn. Soc.* 119: 297-338.
- Goebel, A.M., Donnelly, J.M. y Atz M.E. 1999. PCR primers and amplifications methods for 12S ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome b in Bufonids and other frogs, and an Overview of PCR primers which have amplified DNA in Amphibians successfully. *Mol. Phyl. Evol.* 11(1): 163-199.
- Harvey P. y M. Pagel. 1991. *The Comparative Methods in the Evolutionary Biology.* Oxford Univ. Press.
- Hennig, W. 1966. *Phylogenetic systematic.* Urbana. Illinois: University of Illinois Press.
- Howard, R.D. y Young, J.R: 1998. Individual variation in male vocal traits and female mating preferences in *Bufo americanus*. *Anim. Behav.* 55: 1165-1179.
- Garland, T., Harvey, P. y Ives, A. 1992. Procedures for the analysis for the analysis of comparative data using independent contrast. *System. Biol.* 41(1): 18-32.
- Huey, R. y Bennett, A.. 1987. Phylogenetic studies of coadaptation: preferred temperatures versus optimal performance temperatures in lizards. *Evolution* 41: 1098-1115.
- Huelsenbeck, J., Bull J y Cunningham C. 1998. Combining data in phylogenetic analyses. *TREE* 11: 52-157.
- Jaramillo, C., Rand, A.S., Ibáñez, R. Y Dudley, R. 1997. Elastics structures in the vocalization apparatus of the Túngara frog *Physalaemus pustulosos* (Leptodactylidae). *J. Morphol.* 233: 287-295.

Kluge, A. 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships of *Epicrates* (Boide, Serpentes). *Syst. Zool.* 38: 7-25.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Pääbo s., Villablanca, F.X.y Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplifications and sequencing with conserved primers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 6196-6200.

Kumar ,S.,Tamura K. y Nei M. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Pennsylvania State, Urbana). Version 1.0.

Lambrechts, M. 1996. Organizations of birdsong and constraints on performances. *En: Ecology and evolution of acoustic communication in bird.* pp: 305-320. Kroodsma D. y Miller, H (eds). Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY.

Lapointe, F-J, Kirsch, J.A.W. y Hutcheon, J.M. 1999. Total evidence, consensus and bat phylogeny: a distance-based approach. *Mol. Phyl. Evol.* 11(1): 55-66.

Larsen, O.N. y Goller, F. 1999. Role of syringeal vibrations in bird vocalizations. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 266: 1609-1615.

Lauder, G. 1990. Functional morphology and systematics: Studying fuctional patterns in a historical context. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21: 317-340.

Losos, J. 1990. A phylogenetic analysis of character displacement in Caribbean *Anolis* lizards. *Evolution* 44: 558-569.

Losos, J. 1994. Integrative Approaches to Evolutionary Ecology: *Anolis* lizards as Model System. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25:467-493.

Maddison, W.P y Maddison D.R., 1992. MacClade: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 3.0, Sinauer.

Marco, A., Kiesecker, J.M., Chivers, D.P. y Blaustein, A.R. 1998. Sex recognition and mate choice by male western toads, *Bufo boreas*. *Anim. Behav.* 55: 1631-1635.

Martin, W.F. 1971. Mechanics of sound production in toads of the genus *Bufo*: passive elements. *J. Exp. Zool.* 176: 273-294.

Martin, R. 1972a. Evidence from Osteology. pp: 37-70. *En: Evolution in the Genus Bufo*. Blair W. Frank. (ed.) University of Texas Press.

Martin, R. 1972b. Evolution of vocalization. pp: 207-309. *En: Evolution in the Genus Bufo*. Blair W. Frank. (ed.) University of Texas Press

Martin, W.E. y Gans, C. 1987. Muscular control of the vocal tract during release signaling in the toad *Bufo valliceps*. *J. Morphol.* 137: 1-28.

Martins, E. 2000. Adaptation and the comparative method. *TREE* 15(7): 296-299.

McAlister, W.H. 1961. The Mechanics of Sound Production in North American *Bufo*. *Copeia*, 1: 86-95.

McClelland, B.E., Wilczynski, W. y Ryan, M.J. 1996. Correlations between call characteristics and morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). *The Journal of Experimental Biology* 199: 1907-1919.

McClelland, B.E., Wilczynski, W. y Rand, S. 1997. Sexual dimorphism and species differences in the neurophysiology and morphology of the acoustic communication system of two neotropical hylids. *J. Com. Physiol A.* 180: 451-462.

McClelland, B.E., Wilczynski, W. y Ryan, M.J. 1998. Intraspecific variation in laryngeal and ear morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). *Biol. J. Linn. Soc.* 63: 51-67.

McLennan, D. 1991. Integrating phylogeny and experimental ethology: from the pattern to process. *Evolution* 45: 1773-1789.

Maxson, L. 1984. Molecular probes of phylogeny and biogeography in toads of the widespread genus *Bufo*. *Mol. Biol. Evol.* 1:345-356.

Mezey, A. 1979. Variabilidad de caracteres y compatibilidad genética en especies del grupo *spinulosus*. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias con Mención en Biología. Universidad de Chile.

Miles, D. y Dunham, A.. 1993. Historical perspectives in Ecology and Evolutionary Biology: The use of Phylogenetic Comparative Analysis. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24:587-619.

Miyamoto, M. 1996. A congruence study of molecular and morphological data for eutherian mammals. *Mol. Phyl. Evol.* 6(3): 373-390.

Mooers, A., Vamosi, S.M. y Schuller, D. 1999. Using phylogenies to test macroevolutionary hypothesis of trait evolution in cranes (Gruinae). *Am. Nat.* 154(2): 249-259.

Moreno P, Villagran C, Marquet P y Marshall L. Quaternary paleobiogeography of northern and central Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 67 : 487-502.

- Moritz C, Dowling T, Brown W. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292.
- Nelson, C. 1972. Mating calls of Microhylidae: Descriptions and phylogenetic and ecological considerations. *Herpetologica* 29:163-176.
- Omland, K. 1997. Correlated rates of molecular and morphological evolution. *Evolution* 51(5): 1381-1393.
- Pagel, M. 1994. Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proc. Roy. Soc. Lond, B.* 255: 37-45.
- Pagel, M. 1997. Inferring evolutionary processes from phylogenies. *Zool. Scr.* 26:331-348.
- Pagel, M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 401: 877-884.
- Palumbi, S.R., Martin A., Romano S., McMillan W., Stice L. y Grabowski G. 1991. "The simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0" Publicación provada recopilada por S. Palumbi, Dept. Zoology, Univ. Hawaii, Hololulu, HI, 96882.
- Patterson, C, Williams D. & Humpries C.. 1993. Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24: 153-188.
- Penna, M. y Veloso, A. 1981. Acoustical signals related to reproduction in the *spinulosus* group of *Bufo* (Amphibia; Bufonidae). *Canadian Journal of Zoology*, 59(1):54-60.

Penna, M., Robles, L. y Vargas, C.. 1986. Auditory responses in the eighth nerve of a mating call-less toad, *Bufo chilensis* (Amphibia, *Bufo* *chilensis* (Amphibia, *Bufo* *chilensis*)). *Comp. Biochem. Physiol.* 84(4):625-631.

Penna, M., Palazzi, C., Paolinelli, P. y Solis, R. 1990. Midbrain auditory sensitivity in toads of the genus *Bufo* (Amphibia-Bufo) with different vocal repertoires. *J. Comp. Physiol. A* 167: 673-681.

Penna M. y Solis R. 1998. Frog call intensities and sound propagation in the South American temperate region. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42: 371-381.

Podos, J. 1997. A performance constraints on the evolution of trilled vocalizations in a songbird family (Passeriformes:Emberizidae). *Evolution* 51(2): 537-551.

Remsen, J y DeSalle, R. 1998. Character congruence of multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae. *Mol. Phyl. Evol.* 9(2):225-235.

Ryan, M. 1985. Energetic efficiency of vocalization by the frog *Physalaemus pustulosus*. *J. Exp. Biol.* 116: 47-52.

Ryan, M. J. 1986. Neuroanatomy influences speciation rates in anurans. *Proc. Nat. Acad. Scien.* 83: 1379-1382.

Ryan, M. 1988a. Energy, calling ans selection. *Amer. Zool.* 28: 885-898

Ryan, M.J., 1988b. Constraints and patterns in the evolution of anuran acoustic communication. *En: The evolution of the amphibian auditory system.* Fritzch B., Ryan M.J., Wilczynski, Hetherington, W. T. y Walkowiak W (eds). Wiley Intersciencie

Ryan, M. J. 1995. Female response to ancestral advertisement calls in Túngara frogs. *Science* 269: 390-392.

Ryan, M. y Brenowitz, E.. 1985. The role of body size, phylogeny and ambient noise in the evolution of bird song. *Am. Nat.* 126: 87-100.

Ryan, M.J. y Drewes, R.C. 1990. Vocal morphology of the *Physalaemus pustulosus* species group (Leptodactylidae): morphological response to sexual selection for complex calls. *Biol. J. Linn. Soc.* 40: 37-52.

Ryan, M.J. y Wilczynski, W. 1991. Evolution of intraspecific variation in the advertisement call of a cricket frog (*Acris crepitans*, Hylidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 44: 249-271.

Ryan, M. J. y Rand, A. S.. 1995. Female responses to Ancestral Advertisement calls in Túngara Frogs. *Science* 269:390-392.

Ryan, M., Tuttle, M. y Rand, A.. 1982. Bat predation and sexual advertisement in a neotropical frog *Physalaemus pustulosus*. *Amer. Nat.* 119: 136-139.

Ryan, M. J., Bartholomew, G. y Rand, A.. 1983. Reproductive energetics of neotropical frog. *Physalaemus pustulosus*. *Ecology* 64: 1456-1462.

Ryan, M.J., Cocroft, R.B y Wilczynski, W. 1990. The role of environmental selection in intraspecific divergence of mate recognition signals in the cricket frog *Acris crepitans*. *Evolution* 44(7): 1869-1872.

Schmidt, R.S. 1972. Action of intrinsic laryngeal muscles during release calling in leopard frog. *J. Exp. Zool.* 181: 233-244.

Schmidt, R.S. 1973. Vocal cord mechanisms of release calling in northern leopard frog. *Copeia*, 3: 624-627.

Schmidt, R.S. Kemnitz, Ch.P. y Hudson, W.R. 1990. Origin of anuran calling: description of toad releasing. *J. Exp. Zool.* 254: 338-342.

Schluter, D. 1995. Uncertainty in ancient phylogenies. *Nature* 377: 108-109.

Schluter, D, Price T., Mooers A. y Ludwig, D. 1997. Likelihood of ancestor states in adaptative radiation. *Evolution* 51: 1699-1711.

Sessions, S. 1996. Chromosomes: Molecular Cytogenetics. Pags.:121-167. *En: Molecular Systematics*, 2nd edition. Hillis, D. M., Moritz C., and Mable, B.K., (eds). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Shaw, K.L. 1999. A nested analysis of song groups and species boundaries in the Hawaiian cricket genus *Laupala*. *Mol. Phyl. Evol.* 11(2): 332-341.

SatSoft, Inc. 1997. STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK.

Sullivan, B.K. y Wagner, W. E.. 1988. Variation in advertisement calls, and social influences on calling behavior in the Gulf Coast Toad (*Bufo valliceps*). *Copeia* (4):1014-1020.

Sullivan, B. K. y Malmos, K. B.. 1994. Call variation in the colorado toad (*Bufo alvarius*): behavioral and phylogenetic. 50(2):146-156.

Swofford, D., Olsen, G., Waddell, J. y Hillis, D. 1996. Páginas: 407-510. Phylogenetic Inferences. Pags.:121-167. *En: Molecular Systematics*, 2nd edition. Hillis, D. M., Moritz C., and Mable, B.K., (eds). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

- Swofford, D. 1999. PAUP*4: Phylogenetics analysis using parsimony (and other methods) version 4d. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taigen, T.L. y Wells, K.D. 1985. Energetics of vocalization by an anuran amphibian (*Hyla versicolor*). J. Comp. Physiol. 155:163-170.
- Taigen, T.L.; Wells, K.D. y Marsh, R.L.. 1985. The enzymatic basis of high metabolics rates in calling frogs. Physiol. Zool. 58: 719-726.
- Thompson, J; Higgins,D. y Gibson, J.1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progresive multiple sequence alignment throgouh sequence weighting, position-specific gap penalties and weigth matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
- Thorpe, 1976. Biometric analysis of geographic variation and racial affinities. Biol. Rev. 51: 407-452.
- Vellard, J. 1959. El Genero *Bufo*, estudios sobre batracios andinos. Mem. Mus. Hist. Nat. 8:1-48.
- Veloso, A. y Navarro, J. 1988. Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. Boll. Reg. Sci. Nat. Torino 6(2): 481-593.
- Wagner, W. 1989. Social correlates of variation in male calling behavior in Blanchard's cricket frog, *Acris crepitans blanchardi*. Ethology 82: 27-45.
- Walsh, P., Metzger A. y R. Higuchi. 1991. Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 10: 506-513.
- Waterman, T. Expectation and achivement in comparative phisiology. J. Exp. Zool. 194: 309-344.

Wells, K. 1978. Territoriality in the green frogs (*Rana clamitans*): vocalizations and agonistic behaviour. *Anim. Behav.* 26: 1051-1063.

Wells, K. y Schwartz, J.. 1984. Vocal communication in a neotropical treefrog, *Hyla ebraccata*: adversiment call. *Anim. Behav.* 32: 405-420.

Wiley, E. 1981. *Phylogenetics: The Theory and Practice of Phylogenetic Systemic*. New York. John Wiley.

Wilczynski, W., McClelland, B.E. y Rand, S. 1993. Acoustic, auditory and morphological divergence in three species of neotropical frog. *J. Comp. Physiol.* 172: 425-438.

Wilkinson, L.1996. *SYSTAT: The system for statistics*. Systat. Inc., Evanston, IL.

ANEXO 1

a) Lista de caracteres morfométricos analizados.

- 1) Largo antero-posterior : desde el hocico hasta la cloaca.
- 2) Ancho de la cabeza : medido a la altura de los tímpanos .
- 3) Altura de la cabeza : medida a la altura del eje interorbital .
- 4) Ancho de la mandíbula inferior : tomada en el extremo más ancho de la mandíbula.
- 5) Largo de la pata anterior : desde el segundo dedo hasta la axila .
- 6) Largo de la pata posterior 1: separada en la distancia desde el segundo dedo a la articulación metatarsal .
- 7) Largo de la pata posterior 2: desde la articulación metatarsal hasta la rodilla y desde la rodilla a la cloaca.
- 8) Largo de la pata posterior 3: desde la rodilla a la cloaca.
- 9) Distancia narina-boca : desde la punta del hocico al eje de la narina.
- 10) Distancia narina-ojo : distancia desde uno de los orificios de narina hasta el borde más inferior del ojo.
- 11) Ancho interorbital : ancho del eje entre los bordes interiores de los ojos .
- 12) Largo hocico-eje interorbital :Largo desde la punta del hocico hasta el eje interorbital .
- 13) Diámetro de la parótida : diámetro en sentido antero- posterior.
- 14) Distancia entre narinas : Ancho entre los orificios de las narinas .
- 15) Diámetro del ojo : diámetro del párpado del ojo .
- 16) Diámetro del tímpano : medido en sentido antero-posterior .
- 17) Largo de la cabeza : medido desde la punta del hocico al eje entre los tímpanos.

b) Detalle de las polarizaciones efectuadas para la partición morfológica.

1.- Tamaño de la cabeza:

- 0. pequeña
- 1. grande

2.- Forma del hocico:

- 0. redondeado
- 1. obtuso

3.- Presencia de crestas cefálicas:

- 0. ausente
- 1. presente

4.- Tamaño de los dedos de la mano:

- 0. 3-4-1-2
- 1. 3-1-4-2
- 2. 3-4=1-2

ordenados por tamaño de cada dedo de mayor a menor.

5. Ancho internasal:

- 0. angosto
- 1. ancho

6.- Formaciones queratinosas dorsales:

- 0. ausentes
- 1. presentes

7.- Forma de la lengua:

- 0. subcircular
- 1. elipsoidal

8.- Reflejo hipnótico:

- 0. ausente
- 1. presente

9.- Forma del canal occipital:

- 0. no techado
- 1. techado

10.- Supraorbitales:

- 0. **tenues**
- 1. **prominentes**

11.- Ancho interorbital:

- 0. **angosto**
- 1. **intermedio**
- 2. **ancho**

12.- Longitud de la extremidad posterior:

- 0. **corto**
- 1. **mediano**
- 2. **largo**

se considera desde el radio hasta la falange.

13.- Distancia narina-ojo:

- 0. **corta**
- 1. **mediana**
- 2. **larga**

14.- Ubicación de la constricción secundaria:

- 0. **en el par 7**
- 1. **en el par 11**

15.- Ubicación del centromero:

- 0. **submetacéntrico**
- 1. **metacéntrico**

16.- Cintura escapular:

- 0. **corta**
- 1. **larga**

17.- Forma del Esternon:

- 0. **sin forma de ancla**
- 1. **con forma de ancla**

18.- Valores índice Ancho mandíbula/ancho interorbital:

- 0. **3.7 a 4.5**
- 1. **4.9 a 6**
- 2. **> 3.4**

19. Cresta Supraorbital:

- 0. **ausente**
- 1. **presente**

20. Cresta Parótica:
0. ausente
1. presente
21. Cresta Postorbital:
0. ausente
1 presente


```

atacamensis      . . . . . A . . . . . C . . G . . . . . T T . A A . . . T . . . . . A . .
variegatus       . . . . . A . . . . . T . . . . . C C . G . . . . . T T C . T C . T . T . A . . . . . A . . . . .
rubropunctatus   . . . . . ? ? A . . . . . C . . G . . . . . G . . T C . . . . . ? . ? . . . . . ? . .
arenarum         . . . . . A . . . . . A . . . . . T . A . C T G . . C T A C . . A G . . . . . C A T .

spinulosus       A T A A C T T C T A T A G A T A A T A T G A C T G T A A G T T T T T G G T T G G G G T G A C C G C -
papillosus      . . . . .
chilensis       T . . . . . G . . C G C . . C . . . . .
atacamensis     T . . . . . G . . C G C . . C . . . . .
variegatus      T C C . . . . . C T A G C . C . T . . . . . A . . . . . A . . . . .
rubropunctatus  . . . . . ? . ? . . C ? C . . C . ? . . . . . ? . ? . . ? . ? . . ? . . ? . A
arenarum        T C . . T A . T . . . . A G . . . . C . . . . . C . . . . . A . .

spinulosus       G G A G C A T A A C A T A A C C T C C A T G T T G A A A G A A T T A T T T - C T A A G C T A A G A A
papillosus      . . . . .
chilensis       . . . . . C . . . . . T . C . T . . . . .
atacamensis     . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . .
variegatus      . . . . . A . G T . . . . . C . . . . . T . A . T . . . . . C . . . . G
rubropunctatus  . . . . . C . C . ? . . C . . . . . ? . . . . .
arenarum        . . . . . C . . . . . T . . . . .

spinulosus       T T A C C T A T C T A A G C A T C A A T A A A T T G A C A T C T A T T G A C C C A A T A T A T T T G
papillosus      . . . . .
chilensis       . . . . . A . . . . . C . . . . .
atacamensis     C . . . . . A . . . . . T . . . . . C . . . . .
variegatus      C C . . G C C . . . . . C . . . . . A . . . . .
rubropunctatus  - - - - -
arenarum        . A . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . . C . . . .

spinulosus       A C C A A C G A A C C A A G T T A C C C T A G G G A T A A C A G C G C A A T C C A C T T C A A G A G
papillosus      . . . . .
chilensis       . . . . .
atacamensis     . . . . .
variegatus      . G . . . . .
rubropunctatus  - . . T . ? - - - - -
arenarum        . . . . .

spinulosus       C T C C T A T C G A C A A G T G G G T T T A C G A C C T C G A T G T T G G A T C A G G G T A T C C C
papillosus      . . . . .
chilensis       . C . . . . .
atacamensis     . C . . . . .
variegatus      . . . . .
rubropunctatus  - - - - -
arenarum        . . . . .

spinulosus       A G T G G T G C A G C C G C T A C T A A A G G T T C G T T T G G T C A A C G A T T A A A A C C C T A
papillosus      . . . . .
chilensis       . . . . .
atacamensis     . . . . . T . . . . .
variegatus      - - - - -
rubropunctatus  - - - - -
arenarum        . . . . .

spinulosus       C G T G A T C T G A G T T C A A A C C C G G A G G
papillosus      - - - - -
chilensis       - - - - -
atacamensis     - - - - -
variegatus      - - - - -
rubropunctatus  - - - - -
arenarum        - - - - -

```

ANEXO 3

Sección transversal de la laringe de *Bufo atacamensis*. Se detallan las estructuras medidas en la laringe para las comparaciones a nivel morfológico entre las especies estudiadas

