

UCH - FC  
MAG - B  
R457  
C.1



**“PERCEPCIÓN ACÚSTICA DEL  
LAGARTO LLORÓN  
A SUS LLAMADOS DE ANGUSTIA”**

**Tesis**

Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

**Magíster en Ciencias Biológicas**

Facultad De Ciencias

Por

**Claudio Vittorio Reyes Olivares**

Julio, 2015

Director de Tesis: Dr. Hugo Torres-Contreras

Co-directora de Tesis: Dra. Antonieta Labra Lillo

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

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

**CLAUDIO VITTORIO REYES OLIVARES**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día tres de julio del año 2015.

**Director de Tesis:**

Dr. Hugo Torres-Contreras

**Co-Directora de Tesis**

Dra. Antonieta Labra Lillo

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Rodrigo Vásquez

Dr. Rigoberto Solís



*R. Vásquez*  
.....  
*[Signature]*  
.....

*A mis padres y hermanos,  
por creer siempre en mí,  
a mi compañera Inger,  
por darme su apoyo incondicional,  
y a la naturaleza, por permitir asombrarme cada día*



Claudio Vittorio Reyes Olivares nació el 28 de octubre de 1988 en Santiago de Chile. Estudió Biología, con mención en Medio Ambiente, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en donde demostró su interés por la fauna de nuestro país al ser ayudante del curso “Zoología de Campo”. Conjuntamente durante sus estudios, su afición por los insectos lo llevó a realizar unidades de investigación y su Seminario de Título en los laboratorios de Limnología y Ecofisiología Animal, respectivamente. El año 2013, Claudio ingresó al programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la misma casa de estudios, en donde renovó su línea investigativa al analizar aspectos bioacústicos y conductuales en reptiles chilenos, trabajo que realiza actualmente en el Laboratorio de Neuroetología de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. En la presente tesis, Claudio nos presenta su investigación relacionada con la comunicación acústica en el lagarto llorón, *Liolaemus chiliensis*.

## Agradecimientos

Quiero agradecer de forma muy personal a mis tutores el Dr. Hugo Torres-Contreras y la Dra. Antonieta Labra, quienes con paciencia y mucha calidad humana me han guiado y apoyado a lo largo de esta etapa. En especial, agradezco a la Dra. Labra por haberme formado rigurosamente en el estudio de la biología conductual y la herpetología, y por apoyarme siempre en las distintas etapas de este proceso.

Gratifico al Dr. Torres-Contreras, Dra. Labra, Dr. Rodrigo Vásquez, Dr. Rigoberto Solís, Dr. Nelson Velásquez y a Inger Rain, por su ayuda en la revisión y mejora de este trabajo. Asimismo, agradezco especialmente al Dr. Velásquez y al Dr. Mario Penna por guiarme en los experimentos de vibrometría láser, y por el apoyo y consejos entregados a lo largo del desarrollo de esta tesis. Igualmente, retribuyo al Dr. Felipe Moreno por su invaluable colaboración en el análisis de datos.

Agradezco de forma muy personal a Valentina Bozzo, Hugo Díaz, Misque Hoare, Dra. Labra, Catalina Montesino, Marta Mora, Fernando Navea, Bárbara Ojeda, Conny Reyes, Dra. Soledad Valdecantos y a Michael Weymann, por haberme ayudado en el trabajo de terreno y de laboratorio. Agradezco nuevamente al Sr. Weymann por facilitarme su fotografía de *Liolaemus chiliensis*.

Doy las gracias a todos mis amigos, compañeros de laboratorio y familiares, por entregarme el ánimo necesario para seguir adelante, y por mostrar siempre interés en mí trabajo. Agradezco cariñosamente a mis padres, Graciela y Claudio, a mis hermanos, Conny y Gino, y a mi compañera Inger, ya que sin ellos esta labor no hubiera sido concretada.

Finalmente, reconozco a las fuentes de financiamiento que permitieron la realización de mis estudios de Magister: Beca de Magister Nacional año 2013 de CONICYT (CONICYT-PCHA/ Magíster Nacional/ 2013-22130605), Beca Guillermo Puelma (Fundación Guillermo Puelma, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) y Proyecto FONDECYT 1120181 de la Dra. Antonieta Labra (CONICYT).

## Índice

Lista de tablas .....	vii
Lista de figuras .....	viii
Lista de símbolos, abreviaturas o nomenclatura .....	x
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Hipótesis</i> .....	8
<i>Objetivo general</i> .....	9
<i>Objetivos específicos</i> .....	9
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
<i>Captura y mantención de los animales</i> .....	11
<i>Experimento de playback</i> .....	14
<i>Medición de la sensibilidad auditiva</i> .....	20
<i>Análisis estadístico</i> .....	27
RESULTADOS .....	29
<i>Experimentos de playback</i> .....	29
<i>Medición de sensibilidad auditiva</i> .....	33
DISCUSIÓN .....	41
<i>Experimento de playback</i> .....	41
<i>Sensibilidad auditiva de adultos y juveniles del lagarto llorón</i> .....	45
<i>Relación entre llamados de angustia, sensibilidad auditiva y respuesta conductual</i> .....	52
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	57

## Lista de tablas

**Tabla 1:** Conductas registradas en las videograbaciones de *Liolaemus chilensis*. Se registró la frecuencia de ocurrencia de la primera conducta, mientras que en las demás, se registró el tiempo total que fueron desplegadas.....19

**Tabla 2:** Resultados del Modelo Lineal General (MLG) realizado para determinar el efecto del tipo de estímulo (llamado vs. ruido), origen del estímulo (homo- vs heterotípico), y sus interacciones, sobre las diferencias (valores post-estímulo menos valores pre-estímulo) de cuatro conductas (exploración química, movimientos, escapes y tiempo en la mitad frontal del terrario) y la latencia post-estímulo. F indica el valor del estadístico, y p la probabilidad. Los grados de libertad del análisis fueron de 1,20. Los valores del análisis que resultaron estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) se remarcan en negrita.....30

**Tabla 3:** Valores promedio ( $\pm$  EE) del largo hocico-cloaca (LHC), y de tres variables fisiológicas obtenidas desde la función de transferencia de la membrana timpánica ( $V_{max}$  = velocidad máxima,  $F_{pico}$  = frecuencia pico y  $F_{central}$  = frecuencia central), medidas en individuos adultos ( $n = 15$ ) y juveniles ( $n = 10$ ) de *Liolaemus chiliensis*. Se indican los resultados de la Prueba t-Student, utilizada para evaluar las diferencias entre las clases de edades de cada una de las variables. La t indica el valor del estadístico, y p la probabilidad. Los valores del análisis que resultaron estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) se remarcan en negrita.....36

**Tabla 4:** Correlaciones (r) entre las tres variables fisiológicas obtenidas desde la función de transferencia de la membrana timpánica ( $V_{max}$  = velocidad máxima,  $F_{pico}$  = frecuencia pico y  $F_{central}$  = frecuencia central) y el largo hocico-cloaca (LHC) de adultos y juveniles de *Liolaemus chiliensis* ( $n = 25$ ). Los valores estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) se remarcan en negrita.....37



## Lista de figuras

- Figura 1:** Oscilograma (A) y espectrograma (B) de dos llamados de angustia de *Liolaemus chiliensis*, representativos de dos poblaciones; a la izquierda, uno procedente de Melipilla (hembra adulta, largo hocico-cloaca = 99,8 mm; modificado de Labra y col., 2013), y a la derecha uno de Pucón (macho adulto, largo hocico-cloaca = 62 mm). En el llamado de Melipilla se observa la presencia de armónicos extendiéndose en el rango ultrasónico (sobre la línea punteada). El llamado de Melipilla fue registrado con un micrófono G.R.A.S. 40 BE, mientras que el de Pucón con un micrófono Sennheiser ME 66.....5
- Figura 2:** (A) Distribución de *Liolaemus chiliensis* en Chile (Mella, 2009). Los círculos indican las localidades de las poblaciones estudiadas: círculo rojo = Melipilla, círculo negro = Isla de Maipo, y círculo amarillo = Pucón. El rectángulo señala el recuadro mostrado en B. (B) Poblaciones estudiadas de *L. chiliensis* de la zona central de Chile. (C) Ejemplar adulto de *L. chiliensis*; se indica su meato auditivo derecho (Fotografía: Michael Weymann).....12
- Figura 3:** Oscilograma (A) y espectrograma (B) de dos llamados de angustia sintéticos de *Liolaemus chiliensis*, creados en base a las características espectro-temporales de los llamados de dos poblaciones aisladas (> 800 km), provenientes de: Melipilla (llamado homotípico) y Pucón (llamado heterotípico). Estos llamados fueron utilizados en los experimentos de *playback* y en la evaluación de sensibilidad auditiva de *L. chiliensis* (ver más adelante).....16
- Figura 4:** Oscilograma (A) y espectrograma (B) de tres estímulos sintéticos utilizados en la evaluación de la velocidad de respuesta de la membrana timpánica de *Liolaemus chiliensis*, denominados: “completo” (llamado de angustia sintético con ultrasonido), “audible” (solo el rango audible del llamado completo), y “ultrasónico” (solo el rango ultrasónico del llamado completo). El llamado completo fue creado a partir de un llamado con ultrasonido representativo de la población de Isla de Maipo (individuo hembra, largo hocico-cloaca = 78,2 mm).....22
- Figura 5:** Oscilograma (A) y espectrograma (B) de un llamado de angustia sintético de *Liolaemus chiliensis*, creado en base a las características espectro-temporales de la población de Isla de Maipo. Este llamado fue utilizado en la evaluación de sensibilidad auditiva de *L. chiliensis*.....23

**Figura 6:** Diferencia de los valores post- y pre-estímulo (promedio  $\pm$  EE) de las conductas observadas en *Liolaemus chiliensis* (n = 21). Se utilizaron dos estímulos (llamado o ruido) de distinto origen (homo- vs heterotípico). La línea horizontal (cero) indica el punto donde no hay cambio entre el periodo pre- y post-estímulo. Los valores negativos indican que después del estímulo la conducta disminuyó en relación a la condición pre-estímulo.....31

**Figura 7:** Latencia post-estímulo (s; promedio  $\pm$  EE), o tiempo comprendido entre el término del estímulo acústico (llamado o ruido) y el despliegue de alguna otra conducta, de individuos adultos de *Liolaemus chiliensis* (n = 21). Se muestra además el efecto del origen del estímulo acústico (homo- vs heterotípico). Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del análisis *a posteriori* LSD de Fisher.....32

**Figura 8:** (A) Función de velocidad medida al centro de la membrana timpánica para un grupo de adultos (n = 15) y juveniles (n = 10) de *Liolaemus chiliensis*. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  EE, y ambos ejes de gradúan en escala logarítmica. La barra negra indica el rango de valores de la frecuencia dominante de sus llamados de angustia (obtenido de Labra y col., 2013). (B) Proporción (en dB) entre el valor promedio de velocidad mostrado en A para adultos y juveniles. El eje de la abscisa se gradúa en escala logarítmica.....35

**Figura 9:** Correlación entre el largo hocico-cloaca de adultos (círculos) y juveniles (triángulos) de *Liolaemus chiliensis*, y su: (A) velocidad máxima, y (B) frecuencia central; ambas variables fisiológicas fueron obtenidas desde la función de transferencia de la membrana timpánica.....37

**Figura 10:** Promedio  $\pm$  EE de la velocidad de respuesta de la membrana timpánica (MT) de individuos adultos (círculos, n = 15) y juveniles (triángulos, n = 10) de *Liolaemus chiliensis*, frente a la emisión de tres llamados de angustia sintéticos, denominados: "completo" (llamado con rango audible y ultrasónico), "audible" (rango audible del llamado completo) y "ultrasónico" (rango ultrasónico del llamado completo). Se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del análisis *a posteriori* LSD de Fisher.....39

**Figura 11:** Promedio  $\pm$  EE de la velocidad de respuesta de la membrana timpánica (MT) de individuos adultos de *Liolaemus chiliensis* (n = 15) frente a la emisión de tres llamados de angustia sintéticos, creados a partir de las vocalizaciones de individuos provenientes de tres localidades: Melipilla, Pucón e Isla de Maipo. Se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del análisis *a posteriori* LSD de Fisher.....40

**Figura 12:** Características esenciales del oído medio de un lagarto iguánido (Modificado de Wever y Werner, 1970). Esquema superior: vista ventral del animal; esquema inferior: vista lateral.....47

## Lista de símbolos, abreviaturas o nomenclatura

°C: grado Celsius

μL: microlitro

μm: micrómetro

cm: centímetro

dB: decibel

EE: Error Estándar

F<sub>0</sub>: Frecuencia fundamental

F<sub>central</sub>: Frecuencia central

F<sub>pico</sub>: Frecuencia pico

g: gramo

Hz: Hertz

Kg: kilogramo

kHz: kilohertz

LHC: Largo Hocico-Cloaca

mg: milígramo

MLG: Modelo Lineal General

mm: milímetro

ms: milisegundo

msnm: metros sobre el nivel del mar

MT: Membrana Timpánica

ng: nanogramo

RMS: Root Mean Square (en español, Valor Cuadrático Medio)

s: segundo

SPL: Sound Pressure Level (en español, Nivel de Presión Sonora)

TA: Serie de tonos audibles

TU: Serie de tonos ultrasónicos

S: Serie de llamados sintéticos

V: voltio

$V_{\max}$ : Velocidad máxima

W: Vatio o Watt

## RESUMEN

*Liolaemus chiliensis* es conocido como el lagarto llorón por emitir llamados de angustia cuando es capturado por un depredador. Estos llamados alertarían a conespecíficos del riesgo depredatorio, pues los individuos responden con inmovilidad al percibir dichas vocalizaciones. Análisis de los llamados muestran que estos presentan variación geográfica, lo cual podría determinar una interrupción de la habilidad para decodificar el mensaje de alerta entre distintas poblaciones. Esto podría deberse a que las sensibilidades auditivas están estrechamente asociadas a las características de las vocalizaciones, de lo cual a la fecha no existen antecedentes. Dentro de este contexto, en esta tesis se evaluó: i) la respuesta conductual de individuos de una población de *L. chiliensis* a llamados de angustia locales (homotípicos) y no locales (heterotípicos), y ii) la vibración timpánica de adultos y juveniles en respuesta a tonos (0,1-40 kHz), llamados sintéticos con y sin ultrasonido, y a los llamados utilizados en los experimentos conductuales. La variación geográfica de los llamados afectó la respuesta de los lagartos, ya que éstos presentaron una mayor inmovilidad al percibir el llamado homotípico, lo cual implica que los individuos evaluados están más "sintonizados" a los llamados de su propia población. Se discuten dos hipótesis para explicar este reconocimiento diferencial. Por primera vez, y utilizando vibrometría láser, se estableció que la membrana timpánica (MT) de este lagarto responde entre los 0,5-10 kHz y tiene una velocidad máxima de respuesta ( $V_{max}$ ) a los 2 kHz aproximadamente, en ambas edades. No obstante, los adultos presentaron una mayor  $V_{max}$  que juveniles, y

esta variable se correlacionó positivamente con su tamaño corporal. La mayor sensibilidad auditiva de adultos podría deberse al progresivo aumento del área de la MT durante la ontogenia. No hubo respuesta timpánica al ultrasonido en ambas edades, por lo que estas altas frecuencias podrían ser un subproducto de los llamados o estarían dirigidas a depredadores con una sensibilidad auditiva elevada. Hubo una correspondencia parcial entre las mayores velocidades de respuesta de la MT de ambas edades y el rango de valores de la frecuencia dominante de sus llamados, lo cual sugiere que la entrada del sonido a través de la MT es importante en la detección de vocalizaciones con significancia biológica para esta especie. Curiosamente, la MT fue más sensible al llamado heterotípico que al llamado homotípico. Esta respuesta no se condice con la conducta mostrada por los lagartos ante estos estímulos. Probablemente, la duración de los llamados podría estar influyendo en el grado de inmovilidad que muestran los lagartos llorones al percibir sus llamados de angustia.

## ABSTRACT

*Liolaemus chiliensis* is known as the weeping lizard because it emits distress calls when is captured by a predator. These calls would alert conspecifics on the predatory risk, as individuals respond with immobility when they perceive these vocalizations. Analysis shows that these calls have geographic variation, which could result in a disruption of the ability to decode the alert message between populations. This could be because the auditory sensitivities are closely linked to the characteristics of the calls, but presently, there is no data. In this context, this thesis evaluated: i) the behavioral response of individuals from a population of *L. chiliensis* to local (homotypic) and nonlocal (heterotypic) distress call, and ii) the tympanic vibration of adults and juveniles in response to tones (0.1-40 kHz), synthetic calls with and without ultrasound, and the calls used in behavioral experiments. The geographic variation of the calls affected the response of the lizards, as they showed more immobility to the homotypic call, implying that individuals are more "tuned" to their local calls. Two hypotheses are discussed to explain this recognition. For first time, and using laser vibrometry, it was established that the tympanic membrane (TM) responds to sounds between 0.5-10 kHz, having its maximum velocity response ( $V_{max}$ ) at approximately 2 kHz, in both age groups. However, adults had a higher  $V_{max}$  than juveniles, and this variable was positively correlated with body size. The greatest auditory sensitivity of adults may be consequence of the progressive increase in TM area during ontogeny. The TM did not response to ultrasound in both ages, so these high frequencies could be a call by-product or they would have as a target predators with high auditory sensitivity. There

was a partial match between the higher velocity response of the TM of both ages and the range of values of the dominant frequency of their calls, which suggests that TM is an important input sound via for call detection of biological significance in this species. Interestingly, the TM was more sensitive to the heterotypic call than to homotypic call. This response is not consistent with the behavior shown by the lizards to these stimuli. Probably, call duration may modulate the degree of immobility showed by lizard when they are exposed to their distress calls.



## INTRODUCCIÓN

La depredación es una de las presiones selectivas más importantes a la que se enfrentan los organismos (Endler, 1986; Freidenfelds y col., 2012), a lo cual los animales presa responden evolutivamente con sofisticadas adaptaciones morfológicas, fisiológicas y conductuales, que les permiten sobrevivir, y eventualmente, reproducirse (Barnard, 2004; Lind y Cresswell, 2005). Dentro de estas adaptaciones antidepredatorias, los llamados de angustia (traducción de *distress calls*, *sensu* Martin y col., 2011) son vocalizaciones que generalmente son emitidas por individuos presa cuando son capturados por un depredador (Hogstedt, 1983; Klump y Shalter, 1984; Møller y Nielsen, 2010; Branch y Freeberg, 2012; Dorado-Rodriguez y col., 2012). Sin embargo, estos llamados también son emitidos por crías de algunas especies de mamíferos y cocodrilos bajo distintas situaciones de urgencia, que no involucran necesariamente la presencia de un depredador (Vergne y col., 2011; Lingle y col., 2012; Illmann y col., 2013). Se ha establecido que los llamados de angustia que ocurren directamente en una situación de depredación aumentarían las probabilidades de sobrevivencia de la presa o de sus conespecíficos, pues afectarían la conducta del depredador o de sus congénicos (Perrone, 1980; Högstedt, 1983; Conover, 1994; Neudorf y Sealy, 2002; Caro, 2005). Por una parte, los llamados de angustia emitidos por una presa podrían sorprender o confundir a un depredador, permitiendo así la interrupción del evento depredatorio (Driver y Humphries, 1969; Neudorf y Sealy, 2002; Branch y Freeberg, 2012). Adicionalmente, las presas podrían aumentar sus probabilidades de escapar del evento depredatorio, al atraer con sus llamados de

angustia a depredadores secundarios que potencialmente atacarían al depredador primario (Perrone, 1980; Högstedt, 1983). Por otro lado, los conespecíficos de una presa que emite llamados de angustia podrían aumentar sus probabilidades de sobrevivir al percibir estas vocalizaciones; en primer lugar, los conespecíficos pueden desplegar conductas antidepredatorias que impedirían su detección por parte de un depredador (e.g. inmovilidad; Hoare y Labra, 2013), y en segundo lugar, los conespecíficos podrían permitir el escape del emisor al desplegar ataques hacia el depredador (Smith, 1977; Klump y Shalter, 1984; Russ y col., 1998; Lingle y col., 2012). En definitiva, es evidente el beneficio que entregan los llamados de angustia a la adecuación biológica de las especies. Existen evidencias de que presas sobrevivientes a numerosos ataques depredatorios poseen una mayor tasa de emisión de llamados de angustia al ser capturadas, en comparación con aquellas que han sufrido una menor cantidad de estos ataques (Møller y Nielsen, 2010). Más aun, diversas especies han evolucionado la capacidad de fisgonear los llamados de angustia de heteroespecíficos para alertarse del peligro depredatorio (e.g. Russ y col., 2004; Teichroeb y col., 2013). Este fisgoneo de señales acústicas heteroespecíficas, es posible ya que diferentes taxa presentan una gran similitud en la estructura básica de sus llamados de angustia (Anfibios: De Toledo y col., 2009; Aves: Stefanski y Falls, 1972; Mathevon y col., 1997; Aubin, 1991; Mamíferos: Russ y col., 2004; Lingle y col., 2012), y a que el proceso de decodificación de estas señales es similar entre ellas (Aubin, 1991).

A pesar de que el llamado de angustia de muchas especies ha sido descrito (e.g. Höld y Gollmann, 1986; Neudorf y Sealy, 2002; Russ y col., 2004; Toledo y Haddad, 2009; Teichroeb y col., 2013), muy poco se conoce sobre la variación intraespecífica de

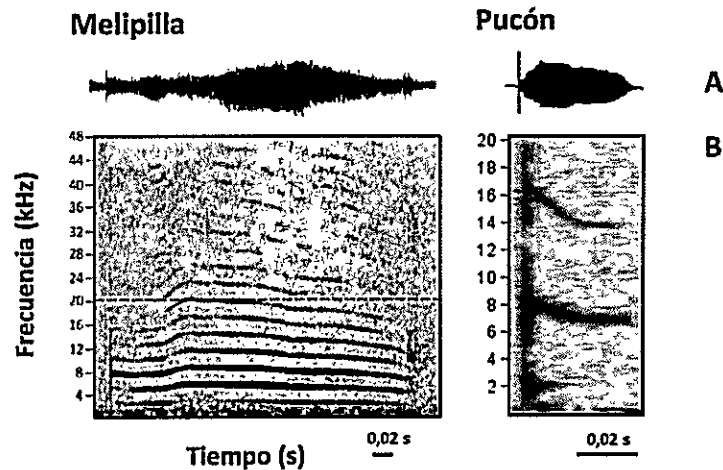
tales señales y de las consecuencias conductuales que éstas tendrían sobre los individuos (e.g. Blumstein y col., 2008). Esto contrasta con la gran cantidad de estudios relacionados con la variación de señales acústicas involucradas en reproducción y reconocimiento intraespecífico (véanse revisiones actuales Gerhardt, 2013; Wilkins y col., 2013). Sin embargo, se han documentado ciertos tipos de variación intraespecífica en los llamados de angustia a nivel cuantitativo, por ejemplo, en el repertorio de estos llamados a nivel individual (Frankenberg y Werner, 1984), a lo largo de la ontogenia (Wilkinson y Huxley, 1978; Martins y Haddad, 1988), entre sexos (e.g. Freeberg y Branch, 2013) o entre poblaciones aisladas geográficamente (Reyes-Olivares, obs. pers.). Es probable que la variación cuantitativa de estos llamados afecte su decodificación a nivel intraespecífico (e.g. Blumstein y col., 2008). Por ejemplo, se ha observado que al manipular ciertas características de los llamados de angustia (e.g. modulación de frecuencia (Aubin 1987; 1989), estructura armónica (Aubin y Brémond, 1992) o frecuencia fundamental (Teichroeb y col., 2013)), el proceso de decodificación de la señal puede romperse, afectando así la respuesta conductual que despliegan los receptores. Por lo tanto, un alto grado de variación en las características de estas señales a nivel intraespecífico, como el observado entre poblaciones aisladas geográficamente (Reyes-Olivares, obs. pers.), podría determinar procesos de decodificación diferenciales, y por ende, respuestas conductuales distintas a nivel poblacional. En este sentido, es fundamental poder evaluar si el proceso de decodificación en una población se mantendría ante la emisión de llamados de angustia de otra población distante geográficamente.

*Liolaemus chiliensis* es conocido como el lagarto llorón porque emite llamados de angustia cuando es capturado (Donoso-Barros, 1966; Labra y col., 2013). Este lagarto es la única especie del clado Unidentata (Lacertilios que no son dibámidos ni gecónidos, *sensu* Vidal y Hedges, 2005), de la cual se conoce detalladamente la estructura de sus llamados de angustia. Estos se caracterizan por presentar distintos tipos de modulación de frecuencia, fenómenos no lineales<sup>1</sup> y numerosos armónicos que se extienden hacia altas frecuencias, los que incluso alcanzan el ultrasonido (Labra y col., 2013). Sus llamados presentan gran variabilidad a nivel individual e intrapoblacional (Labra y col., 2013), como también a nivel interpoblacional (Reyes-Olivares, obs. pers.), y además se ha observado que la frecuencia de emisión de sus vocalizaciones disminuye hacia las poblaciones más australes de su amplio rango de distribución (Pincheira-Donoso y Núñez, 2005). Se ha propuesto que estas vocalizaciones les permitirían repeler a depredadores, como también alertar a conespecíficos del riesgo depredatorio (Carothers y col., 2001; Labra y col., 2013). Datos recientes confirman estas propuestas, observándose que los lagartos responden con inmovilidad prolongada al percibir un llamado de angustia (Hoare y Labra, 2013). Sin embargo, no existe claridad si la variabilidad de estos chillidos podría afectar la respuesta de conespecíficos. Particularmente, es probable que las notorias diferencias interpoblacionales encontradas en los llamados de angustia de esta especie (Reyes-Olivares, obs. pers.; Fig. 1) podrían determinar un reconocimiento diferencial de los

---

<sup>1</sup> Características acústicas que emergen cuando los factores involucrados en la vocalización (e.g. amplitudes de las cuerdas vocales) varían de formas que no son linealmente proporcionales entre ellos (véase Riede y col., 2000).

llamados característicos de cada población, el cual puede verse reflejado en una respuesta conductual distinta para cada caso.



**Figura 1:** Oscilograma (A) y espectrograma (B) de dos llamados de angustia de *Liolaemus chiliensis*, representativos de dos poblaciones; a la izquierda, uno procedente de Melipilla (hembra adulta, largo hocico-cloaca = 99,8 mm; modificado de Labra y col., 2013), y a la derecha uno de Pucón (macho adulto, largo hocico-cloaca = 62 mm). En el llamado de Melipilla se observa la presencia de armónicos extendiéndose en el rango ultrasónico (sobre la línea punteada). El llamado de Melipilla fue registrado con un micrófono G.R.A.S. 40 BE, mientras que el de Pucón con un micrófono Sennheiser ME 66.

El análisis de la variación espectro-temporal de los llamados de angustia de *L. chiliensis* a nivel interpoblacional, muestra que los chillidos de una población de Chile central poseen una mayor duración, un mayor número de armónicos y frecuencias fundamentales más bajas que una población del extremo sur de su rango de distribución (Reyes-Olivares, obs. pers.; Fig. 1). No es claro si esta variación en las características de sus llamados de angustia podría sesgar la decodificación de estas señales hacia llamados homotípicos o locales (*sensu* Pitocchelli, 2014). Para responder

esta pregunta, se estudió la respuesta de lagartos llorones de una población de Chile central a llamados de angustia homo- y heterotípicos (llamados de una población distante, *sensu* Pitocchelli, 2014). Si la variación en las características de los llamados de angustia no interrumpe la decodificación de la señal en la población estudiada, ésta responderá de igual manera independientemente del origen del chillido. Lo anterior podría dar indicios de un probable mantenimiento de la cohesión comunicativa entre poblaciones a pesar de las variaciones en la estructura de las vocalizaciones. No obstante, si la población se encuentra “sintonizada” a los chillidos homotípicos, ésta no podrá decodificar correctamente los llamados heterotípicos, lo cual determinará la discriminación de estas señales.

La respuesta conductual que podría desplegar el lagarto llorón frente a sus llamados de angustia homo- y heterotípicos, está fuertemente relacionada con el nivel de correspondencia existente entre las características espectrales de estos chillidos y la sensibilidad auditiva de los receptores (e.g. Teichroeb y col., 2013). En este sentido, es fundamental poder determinar y relacionar la sensibilidad auditiva de este lagarto con el principal componente de frecuencias de sus llamados de angustia (frecuencia dominante), con la finalidad de aproximarnos a comprender el proceso de decodificación de estas señales. Considerando que la comunicación vocal entre conespecíficos es biológicamente relevante para *L. chiliensis* (Hoare y Labra, 2013), es probable que exista una correspondencia entre la frecuencia de mayor sensibilidad de su sistema auditivo y la frecuencia dominante de sus vocalizaciones, como se ha observado en otras especies (Konishi, 1970; Dooling y Saunders, 1975; Wilczynski y col., 1993). No obstante, y aunque existe una minuciosa descripción de las características

espectro-temporales del llamado de angustia de *L. chiliensis* (Labra y col., 2013), actualmente se desconoce la sensibilidad auditiva de este lagarto. Más aún, no es claro si el lagarto llorón es sensible auditivamente al ultrasonido de su llamado de angustia (Labra y col., 2013), puesto que solo se ha evaluado la respuesta de estos lagartos frente a llamados sin ultrasonido (Hoare y Labra, 2013). Examinar este aspecto permitirá aproximarnos a determinar si el ultrasonido presente en sus llamados (Labra y col., 2013), podría tener algún rol funcional dentro de la comunicación vocal intraespecífica.

Los estudios conductuales realizados en *L. chiliensis* se han centrado en determinar la respuesta en individuos adultos. Sin embargo, se ha observado que la sensibilidad auditiva de lagartos presenta diferencias a lo largo de la ontogenia, cuando se ha evaluado tanto electrofisiológicamente (Werner y col., 1998; Johnstone y Werner, 2001; Werner y col., 2008), como a través de la función de transferencia de la membrana timpánica (Werner y col., 1998; Werner y col., 2002), determinándose que individuos adultos poseen sensibilidades auditivas mayores que juveniles. Estas diferencias de sensibilidad auditiva a nivel ontogenético se relacionarían con el tamaño corporal desigual de adultos y juveniles, el cual se corresponde directamente con el tamaño de las estructuras del oído (Werner e Igić, 2002; Werner y col., 2002). Sin embargo, la existencia de variación ontogenética en la sensibilidad auditiva ha sido reportada esencialmente en lagartos pertenecientes al clado Gekkonomorpha (Werner y col., 1998; Johnstone y Werner, 2001; Werner y col., 2002; pero véase Rosowski, 1988), básicamente porque este grupo ha causado gran interés como modelo de estudio del aparato auditivo de lagartos, al presentar un vasto desarrollo de la

comunicación vocal dentro de reptiles (Frankenberg y Werner, 1992). Evaluar la sensibilidad auditiva de adultos y juveniles en un lagarto no gecko que vocaliza, como *L. chiliensis*, permitirá tener una visión más amplia de cómo cambian las capacidades auditivas durante la ontogenia de lagartos. Además, esta medición permitirá aproximarnos a comprender cómo responderían los individuos de diferentes edades a los llamados de angustia registrados en esta especie (Hoare y Labra, 2013; Labra y col., 2013).

### ***Hipótesis***

**Hipótesis 1:** La variación en las características acústicas de los llamados de angustia homo- y heterotípicos determina un reconocimiento diferencial de estas vocalizaciones por parte de los lagartos llorones.

**Predicción:** Los lagartos llorones evaluados estarán mejor “sintonizados”, o tendrán una respuesta conductual más intensa, a los llamados de angustia de su propia población u homotípicos.

**Hipótesis 2:** La sensibilidad auditiva de lagartos llorones adultos es mayor que la de individuos juveniles.

**Predicción:** Se espera que los individuos adultos del lagarto llorón presenten una respuesta auditiva más intensa frente a los estímulos acústicos que los individuos juveniles.



**Hipótesis 3:** Existe una correspondencia entre la capacidad auditiva del lagarto llorón y las principales características espectrales de su llamado de angustia.

**Predicción:** Dada la significancia biológica que posee el llamado de angustia del lagarto llorón (el cual disminuye el riesgo de depredación de conespecíficos), se espera que coincidan los valores de frecuencia en los cuales se registre su mayor sensibilidad auditiva con los valores de la frecuencia dominante de sus llamados.

### ***Objetivo general***

Examinar aspectos de la percepción acústica de *L. chiliensis*, específicamente: i) la respuesta conductual frente a la emisión de llamados de angustia homotípicos y heterotípicos, y ii) atributos de su sensibilidad acústica, factor relevante para comprender el proceso de decodificación de estos llamados.

### ***Objetivos específicos***

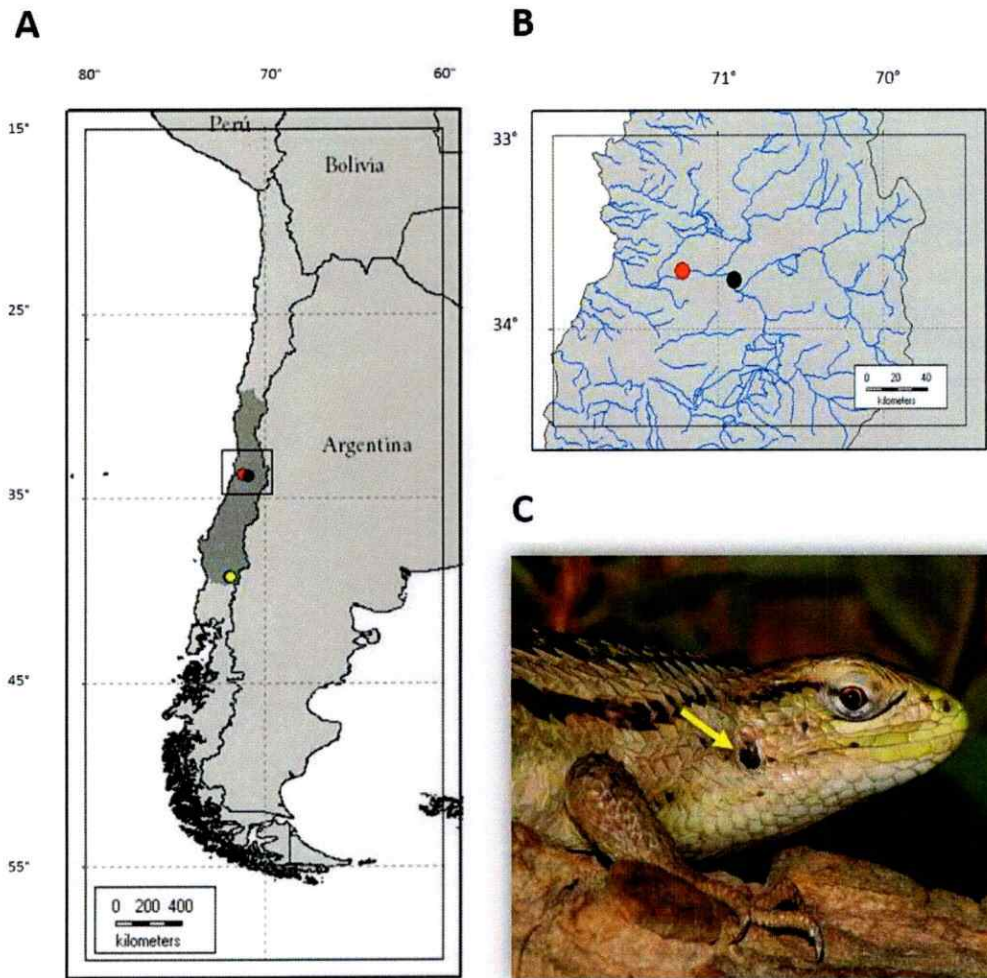
- Determinar a través de su respuesta conductual si *L. chiliensis* discrimina entre llamados de angustia homo- y heterotípicos (sin ultrasonido). Con esto se determinará el efecto de la variabilidad interpoblacional del chillido en la respuesta de alarma.
- Examinar y comparar la sensibilidad auditiva de adultos y juveniles de *L. chiliensis* frente a estímulos audibles y ultrasónicos.
- Relacionar la sensibilidad auditiva de adultos y juveniles de *L. chiliensis* con el principal componente de frecuencias de los llamados de angustia registrados en esta especie.

- Evaluar la sensibilidad auditiva de una población de *L. chiliensis* de la zona central de Chile frente a llamados de angustia homo- y heterotípicos, y relacionar estas respuestas con la conducta desplegada por los lagartos ante cada uno de estos estímulos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Captura y mantención de los animales*

En la primera etapa de este estudio (periodo primavera-verano de los años 2012-2013), se colectaron 21 lagartos adultos de *L. chiliensis* (10 ♀ y 11 ♂; promedio del largo hocico-cloaca:  $85,39 \pm 1,83$  EE mm) provenientes de la localidad de Melipilla, R.M. ( $33^{\circ}41'S$ ,  $71^{\circ}13'W$ ; Fig. 2). Dado que este sitio de captura fue perturbado con fines agrícolas durante el verano de 2013, se definió un nuevo sitio de colecta en la localidad de Isla de Maipo, R.M. ( $33^{\circ}45'S$ ,  $70^{\circ}54'W$ ; Fig. 2) con el objeto de evaluar la sensibilidad auditiva de *L. chiliensis*, para lo cual, durante el periodo primavera-verano de los años 2013-2014, se capturaron 15 lagartos adultos (7 ♀ y 8 ♂; promedio del largo hocico-cloaca:  $85,10 \pm 2,26$  EE mm), y 10 individuos juveniles (promedio del largo hocico-cloaca:  $52,72 \pm 2,88$  EE mm). La distinción entre adultos y juveniles se determinó a partir del tamaño corporal y coloración diferencial de estos rangos etarios (Pincheira-Donoso y Núñez, 2005). Todos los lagartos capturados fueron transportados al laboratorio de Neuroetología de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, en donde fueron medidos (largo hocico-cloaca, en mm) y sexados (a través de observación directa de la base de su cola; no se pudo identificar el sexo de individuos juveniles con este método). Los lagartos fueron inspeccionados bajo lupa para determinar la presencia de ectoparásitos (*Pterygosoma sp.*, Fajfer y González, 2013). Los animales infectados fueron desparasitados con FIPRONIL® 0,25% en aerosol. Posteriormente, los



**Figura 2:** (A) Distribución de *Liolaemus chiliensis* en Chile (Mella, 2009). Los círculos indican las localidades de las poblaciones estudiadas: círculo rojo = Melipilla, círculo negro = Isla de Maipo, y círculo amarillo = Pucón. El rectángulo señala el recuadro mostrado en B. (B) Poblaciones estudiadas de *L. chiliensis* de la zona central de Chile. (C) Ejemplar adulto de *L. chiliensis*; se indica su meato auditivo derecho (Fotografía: Michael Weymann).

individuos fueron colocados en terrarios individuales de plástico (44,5 x 32 x 25 cm), los cuales tenían una ventana frontal (14,5 x 10 cm) y una tapa hermética, ambas cubiertas por una malla plástica para proveer una mejor iluminación y ventilación, además de una mayor superficie para trepar. Cada terrario contenía un sustrato de arena de tres cm de espesor, dos pocillos de greda, uno para refugio y sitio de termorregulación (colocado en posición invertida), y otro con agua *ad libitum*, además de una percha de madera para trepar. Estos terrarios fueron situados en un vivario con ventilación continua que simulaba las condiciones experimentadas por los animales en el campo durante el verano: fotoperiodo de 13:11 L:O y un rango con temperaturas extremas de 13 y 30°C; estas condiciones fueron provistas por luces halógenas (100 W). Los animales fueron alimentados tres veces por semana con larvas y adultos de *Tenebrio molitor*, polvoreados con suplemento vitamínico y mineral (SERA reptimineral C). Para permitir la habituación de los lagartos, éstos no fueron perturbados a lo menos por una semana antes de comenzar los experimentos (a excepción de cuando fueron alimentados). Al finalizar los ensayos, todos los individuos fueron devueltos a su punto original de colección o a un lugar cercano con condiciones semejantes a las iniciales (en el caso de algunos lagartos provenientes de Melipilla).



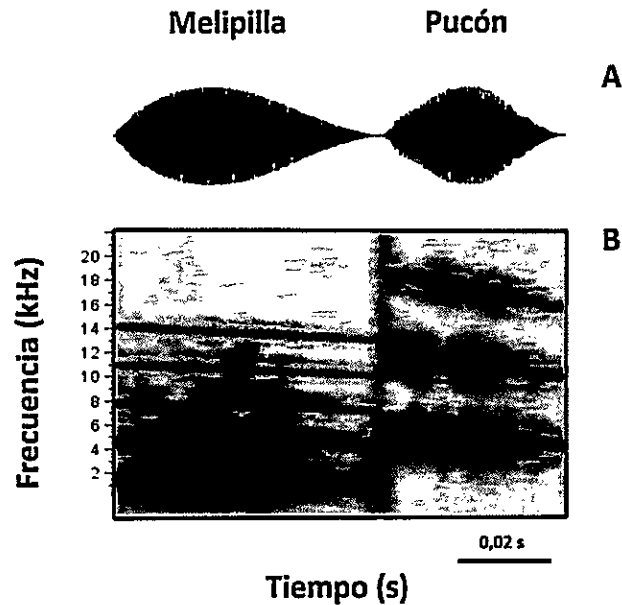
### ***Experimento de playback***

Se evaluó la respuesta conductual de lagartos llorones provenientes de Melipilla frente a llamados de angustia homo- y heterotípicos. Para ello se los expuso a chillidos sintéticos de individuos provenientes de su propia localidad y de una población distante (> 800 km), ubicada en Pucón, IX Región (39°16'S, 71°58'W; Fig. 2), respectivamente. Con el fin de controlar el efecto de la variación intrapoblacional en las características de los llamados de cada población, se creó un llamado sintético poblacional (véase Hoare y Labra, 2013), utilizándose las características espectro-temporales promedio de los llamados de angustia de cada población. Para ello se grabaron llamados de angustia en una temporada anterior, utilizando individuos diferentes a los incluidos en este estudio. En estas grabaciones, los llamados fueron evocados por dos minutos a través de suaves tocaciones en el *rostrum* de cada lagarto (véase Labra y col., 2013). El registro de estas vocalizaciones se realizó con un micrófono direccional (Sennheiser ME 66, Sennheiser Electronic Corporation, USA; frecuencia de respuesta: 40 Hz-22 kHz), y una grabadora (Tascam DR100, TEAC Corp., Tokio, Japón), utilizando una tasa de muestreo de 44,1 kHz y 16 bit de resolución. Antes de cada grabación, el micrófono fue calibrado con el tono puro (1000 Hz/93,8 dB SPL) emitido por un calibrador (Brüel & Kjær 4230, Brüel & Kjær, Nærum, Dinamarca). Se seleccionaron solo los llamados que presentaron una modulación de frecuencia descendente, pues este patrón fue el más común entre los chillidos registrados (Labra y col., 2013). Se utilizó un total de 246 llamados emitidos por 30 individuos adultos provenientes de Melipilla (promedio de llamados emitidos por individuo = 8,2), y 20 llamados a partir de ocho individuos adultos procedentes de Pucón (promedio de

llamados emitidos por individuo = 2,5). Los archivos WAV generados (44,1 kHz/16 bits), fueron filtrados (filtro de paso alto, corte de frecuencia: 200 Hz) y analizados con el programa Raven Pro 1.3 (Cornell Laboratory of Ornithology). En cada una de las vocalizaciones grabadas se evaluaron los siguientes parámetros espectro-temporales: duración del llamado (s), tiempo de máxima amplitud (ms), número de armónicos, y la frecuencia (Hz) e intensidad (dB) de cada armónico. A partir del valor promedio poblacional de los parámetros medidos, se sintetizaron los siguientes estímulos: 1) llamado de angustia homotípico, 2) llamado de angustia heterotípico, 3) ruido blanco<sup>2</sup> homotípico, y 4) ruido blanco heterotípico. Cada uno de estos estímulos fue creado utilizando el programa Adobe Audition 3.0. Los armónicos fueron construidos a partir de la frecuencia fundamental (F0), cuyos valores de frecuencia e intensidades fueron medidos al comienzo y al final de la señal. El llamado homotípico tuvo una duración de 60 ms y una amplitud máxima a los 25 ms, mientras que el llamado heterotípico tuvo una duración de 43 ms y una amplitud máxima a los 21 ms (Fig. 3). Asimismo, el llamado de angustia homotípico tuvo cinco armónicos y una F0 que presentó una modulación descendente desde los 2,9 a los 2,6 kHz, mientras que el llamado heterotípico tuvo tres armónicos y una F0 con una modulación descendente desde los 6,3 a los 5,3 kHz (Fig. 3). Cabe destacar que la F0 de estos llamados coincidió con su frecuencia dominante. Por último, cada ruido blanco fue sintetizado usando los parámetros temporales de los llamados sintéticos de cada población (i.e. duración).

---

<sup>2</sup> Señal aleatoria que contiene todas las frecuencias; fue utilizado como estímulo control.



**Figura 3:** Oscilograma (A) y espectrograma (B) de dos llamados de angustia sintéticos de *Liolaemus chiliensis*, creados en base a las características espectro-temporales de los llamados de dos poblaciones aisladas (> 800 km), provenientes de: Melipilla (llamado homotípico) y Pucón (llamado heterotípico). Estos llamados fueron utilizados en los experimentos de *playback* y en la evaluación de sensibilidad auditiva de *L. chiliensis* (ver más adelante).

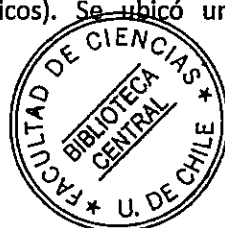
Durante el registro de las vocalizaciones se midió la intensidad de los llamados con un sonómetro (Brüel & Kjær 2230, Brüel & Kjær, Nærum, Dinamarca), ubicado a unos 15 cm en frente del animal, el cual fue calibrado previamente con un calibrador de sonido (Brüel & Kjær 4230). Basados en los datos de intensidad obtenidos, cada estímulo sintético fue emitido a 51 dB RMS SPL, valor medido al centro del terrario experimental. La reproducción de cada estímulo se realizó utilizando un reproductor (iPod Nano A1320, Apple Inc., USA) y un parlante Behringer® (Behringer, Zhongshan, China) ubicado en el suelo a unos 15 cm de la ventana de cada terrario experimental; ambos artefactos estaban conectados a un amplificador (NAD Electronics 3020i, NAD



Electronics International, Ontario, Canadá).

Antes de cada ensayo experimental, se removió el pocillo con agua y la percha de madera desde el terrario, aunque se mantuvo el refugio. Cada lagarto fue expuesto en su terrario a una lámpara infrarroja o a luz solar por aproximadamente 15 minutos, para permitir a los animales termorregular activamente. Posteriormente, el terrario con el lagarto fue ubicado dentro de una cámara atenuadora de sonidos (i.e. cámara anecoica), en donde se reemplazó su tapa plástica por una cubierta de vidrio (37 x 30 cm) para poder videografiar la conducta del lagarto. La cubierta de vidrio fue limpiada con etanol (95 %) después de cada sesión, con el objeto de remover cualquier rastro químico dejado por los individuos evaluados que pudiera afectar la conducta de un nuevo sujeto experimental. Para evitar posibles sesgos conductuales provocados por variaciones en la temperatura corporal del animal, se mantuvo la arena experimental a una temperatura aproximada de 35°C utilizando lámparas infrarrojas, y se registró la temperatura cloacal del sujeto evaluado al final de cada sesión. Si la temperatura del lagarto se desvió  $\pm 2$  °C respecto al valor de la temperatura corporal selectiva de esta especie ( $\sim 35^\circ\text{C}$ ; Labra y col., 2009), el ensayo se descartó y se repitió a lo menos dos días después. Al finalizar cada sesión de grabación, se devolvió al terrario el pocillo con agua y la percha para trepar. Cada lagarto examinado no fue perturbado, excepto cuando fueron alimentados, por al menos tres días antes de una nueva sesión experimental.

Usando un diseño contrabalanceado, los 21 lagartos adultos de Melipilla fueron expuestos solo una vez a cada uno de los cuatro estímulos sintéticos creados (i.e. llamados o ruidos blancos, homo- y heterotípicos). Se ubicó una videocámara



(Panasonic HDC-TM20, Panasonic Corp., Japón) a unos 60 cm sobre el terrario experimental para poder grabar la conducta de cada lagarto por 12 minutos, más el tiempo de la estimulación acústica. La grabación comenzó después de que el lagarto realizara su primer lamido, conducta que determina el inicio de la exploración química (Labra y Niemeyer, 1999). Los experimentos tuvieron tres etapas: 1) Periodo pre-estímulo, o los seis minutos previos a la emisión del estímulo, 2) periodo de estimulación, o el periodo durante el cual se presentó el estímulo acústico, cuya duración fue de 1,892 y 1,829 s para los llamados/ruidos sintéticos de Melipilla y Pucón, respectivamente, y 3) Periodo post-estímulo, o los seis minutos siguientes al término de la estimulación. El estímulo acústico presentado estaba compuesto por tres sonidos idénticos (llamados o ruidos blancos), separados por dos periodos de silencio de 0,7 y 1 s.

Se utilizó el programa JWatcher (Blumstein y col., 2000) para evaluar desde las grabaciones la frecuencia o duración de cuatro variables conductuales durante los periodos pre- y post-estímulo (exploración química, movimientos, tiempo de escape, y el tiempo durante el cual el animal estuvo cerca de la ventana del terrario; para definiciones véase Tabla 1). Asimismo, se registró una variable exclusivamente en el periodo post-estímulo, la latencia post-estímulo (véase definición en Tabla 1). No se realizó análisis conductual durante el corto periodo de estimulación. Finalmente, se midió el cambio conductual inducido por cada estímulo acústico calculando la diferencia entre el valor post- y pre-estímulo de cada una de las conductas registradas en ambos periodos.

**Tabla 1:** Conductas registradas en las videograbaciones de *Liolaemus chilensis*. Se registró la frecuencia de ocurrencia de la primera conducta, mientras que en las demás, se registró el tiempo total que fueron desplegadas.

Conducta	Descripción	Referencia
Exploración química	Conductas involucradas en el muestreo de sustancias químicas en el ambiente, las que incluyen el número de lamidos y las aperturas bucales. Sin embargo, esta última conducta fue raramente observada (<1%).	(Hoare y Labra, 2013)
Movimientos (s)	Índice de exploración conductual que incluye el tiempo total en que el animal realiza movimientos (e.g. desplazarse, cambiar de posición, <i>scanning</i> <sup>3</sup> ), y que excluye otros tipos de movimiento listados en esta tabla (e.g. tiempo de escape).	(Hoare y Labra, 2013)
Tiempo de escape (s)	Correr; frotar la punta del hocico en las paredes del terrario; trepar los muros o excavar en el sustrato.	(Font y Desfilis, 2002)
Latencia post-estímulo (s)	Periodo comprendido entre el final de una estimulación acústica y el comienzo de cualquier conducta.	(Hoare y Labra, 2013)
Tiempo cerca de la ventana (s)	El terrario fue virtualmente dividido en dos secciones de igual área. Se registró el tiempo de permanencia en el área más cercana a la fuente emisora de los estímulos. Esta área comprendió la mitad de la arena experimental adyacente a la ventana.	Este trabajo

<sup>3</sup> Movimiento de cabeza asociado a la vigilancia visual del entorno (Greenberg, 1985).

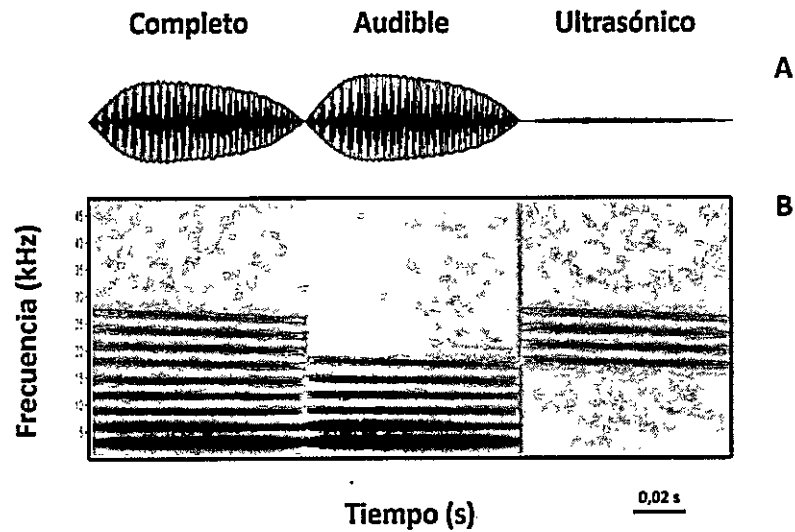
### ***Medición de la sensibilidad auditiva***

La sensibilidad auditiva de lagartos llorones de Isla de Maipo, se evaluó a través de la respuesta vibratoria de su membrana timpánica (MT) frente a la emisión de distintos tonos puros y llamados de angustia sintéticos, utilizando vibrometría láser, técnica reconocida por su rápida medición y baja nocividad (Werner y col., 2001; Gridi-Papp y Narins, 2009). Debido a que el lagarto llorón tiene expuesta su MT (Fig. 2C), esta técnica resulta particularmente adecuada para medir las vibraciones timpánicas y así aproximarnos a su sensibilidad auditiva, tanto en el rango audible como ultrasónico.

Se utilizó el programa Adobe Audition 3.0 para crear todos los estímulos sintéticos. En primer lugar, se sintetizaron dos series de tonos según su rango de frecuencias: tonos en el rango audible (TA: 0,1-20 kHz) y tonos en el rango ultrasónico (TU: 21-40 kHz). En ambas series los tonos tuvieron una duración de 500 ms y silencios intertonos de 1 s. La frecuencia de los tonos aumentó en la serie TA en pasos de 0,1 kHz entre 0,1 y 6 kHz, 0,5 kHz, entre 6,5 y 10 kHz, y 1 kHz entre 11 y 20 kHz. Por otro lado, en la serie de TU la frecuencia aumentó en pasos de 1 kHz entre 21 y 40 kHz.

Se prepararon llamados sintéticos para determinar la respuesta de la MT al componente audible y ultrasónico del llamado de angustia. Para ello, se registraron las vocalizaciones de individuos procedentes de Isla de Maipo. Se usó el mismo protocolo de grabación de los chillidos creados en la sección anterior, pero utilizando un micrófono G.R.A.S. 40 BE (G.R.A.S. Sound & Vibration A/S, Holte, Dinamarca; frecuencias de respuesta: 0,2-97 kHz). De las 93 vocalizaciones obtenidas a partir de 12 individuos adultos (5 ♀ y 7 ♂), solo 18 presentaron ultrasonido. Se utilizaron exclusivamente las grabaciones de adultos ya que éstos emitieron llamados con

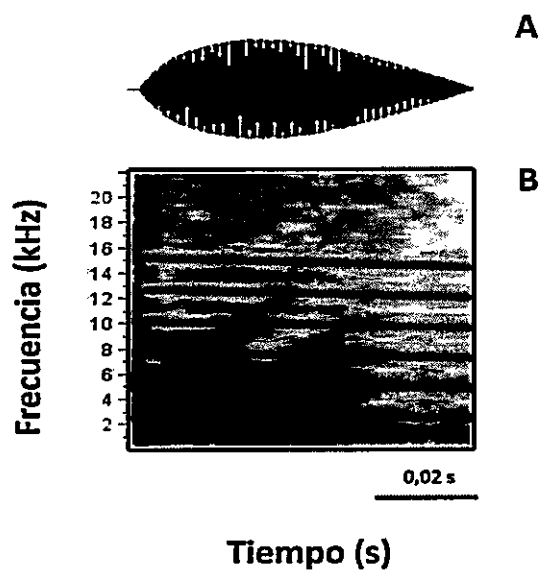
frecuencias ultrasónicas más intensas que juveniles. Se seleccionó un único chillido representativo con las frecuencias ultrasónicas más intensas (emitido por un hembra, largo hocico-cloaca = 78,2 mm). Se realizó esta selección ya que no fue posible crear un llamado poblacional con ultrasonido, debido al bajo valor de intensidad promedio registrado en los armónicos ultrasónicos de la población. El archivo WAV del llamado representativo (96 kHz/16 bits) fue filtrado (filtro de paso alto, corte de frecuencia: 200 Hz) y analizado con el software Raven Pro 1.3. Se evaluaron las mismas variables espectro-temporales definidas anteriormente en la sección "Experimento de *playback*" de Materiales y Métodos. Utilizando el programa Adobe Audition 3.0, se creó una imitación sintética del llamado representativo, denominada "llamado completo" (i.e. que comprende rango audible + rango ultrasónico). Este llamado tenía una duración de 80 ms y una envolvente que alcanzaba su máxima amplitud a los 26 ms (Fig. 4). Asimismo, este estímulo tuvo nueve armónicos y una FO que presentaba una modulación descendente desde los 3 a los 2,6 kHz (Fig. 4). Por último, y utilizando nuevamente el programa Adobe Audition 3.0, se separaron los componentes audible y ultrasónico del llamado completo. De esta manera se crearon dos nuevos estímulos sintéticos, denominados: "llamado audible" (i.e. solo rango audible del llamado completo) y "llamado ultrasónico" (i.e. solo rango ultrasónico del llamado completo) (Fig. 4).



**Figura 4:** Oscilograma (A) y espectrograma (B) de tres estímulos sintéticos utilizados en la evaluación de la velocidad de respuesta de la membrana timpánica de *Liolaemus chiliensis*, denominados: “completo” (llamado de angustia sintético con ultrasonido), “audible” (solo el rango audible del llamado completo), y “ultrasónico” (solo el rango ultrasónico del llamado completo). El llamado completo fue creado a partir de un llamado con ultrasonido representativo de la población de Isla de Maipo (individuo hembra, largo hocico-cloaca = 78,2 mm).

Finalmente, se evaluó la respuesta de la MT frente a los llamados de angustia sintéticos utilizados en los experimentos de *playback* (llamados de Melipilla y Pucón; Fig. 3), con el propósito de relacionar la respuesta auditiva con el despliegue conductual mostrado ante estos estímulos. De igual forma, se evaluó la respuesta de su MT ante la emisión de un llamado que imitaba las características vocales de su población (i.e. llamado sintético de Isla de Maipo; Fig. 5). Dada la cercanía geográfica que presentan las poblaciones de Isla de Maipo y Melipilla (~ 30 km), se espera que las respuestas auditivas a los llamados de estas poblaciones sean similares. De ser esto efectivo, se podrá relacionar la respuesta conductual desplegada ante el llamado de Melipilla con la respuesta auditiva dada ante este llamado. Para elaborar el llamado de

Isla de Maipo, se siguió el mismo procedimiento de grabación y síntesis utilizado en la creación de los llamados poblacionales de Melipilla y Pucón. En total, se obtuvieron 93 llamados de angustia simples (i.e. sin fenómenos no lineales) a partir de las vocalizaciones de 12 individuos adultos (5 ♀ y 7 ♂). En base a los parámetros acústicos de estas vocalizaciones, se definió un llamado sintético poblacional con una duración de 71 ms y una envolvente que alcanzó una amplitud máxima a los 22 ms (Fig. 5). Además, este llamado tuvo seis armónicos y una F0 con una modulación de frecuencia descendente desde los 2,5 a los 2,4 kHz (Fig. 5). Al igual que los llamados usados en los experimentos de *playback*, la F0 de este llamado coincidió con su frecuencia dominante.



**Figura 5:** Oscilograma (A) y espectrograma (B) de un llamado de angustia sintético de *Liolaemus chiliensis*, creado en base a las características espectro-temporales de la población de Isla de Maipo. Este llamado fue utilizado en la evaluación de sensibilidad auditiva de *L. chiliensis*.

Se creó una serie, denominada "S", con todos los llamados de angustia sintetizados (llamado completo, audible, ultrasónico, y los tres llamados poblacionales de Melipilla, Pucón e Isla de Maipo). Esta serie fue emitida completamente a los individuos adultos, mientras que solo se emitieron los llamados completo, audible y ultrasónico a juveniles. La serie de llamados sintéticos se presentó consecutivamente después que los tonos (i.e. TA + TU + S).

Los lagartos fueron anestesiados con una inyección intramuscular de Virbac Zoletil® 50 en uno de sus antebrazos, aplicando una dosis total de 0,4 µl/g. En una cámara anecoica, cada individuo anestesiado fue puesto en posición natural (con el dorso hacia arriba) sobre una placa de calor (ReptiTherm®), ubicada sobre una mesa antivibraciones (TMC 63-500). La temperatura de la placa de calor (~ 35°C) fue controlada y monitoreada utilizando un regulador de voltaje y una termocupla, respectivamente.

Los tonos y los llamados de angustia sintéticos fueron emitidos desde un computador PC (Procesador Intel® Core™ 2 Duo), utilizando el software SigGen (Tucker-Davis Technologies, TDT, Alachua, FL, USA). Estos estímulos pasaron a través de un convertidor Digital-Análogo (DA, System 3, Tucker-Davis Technologies, TDT, Alachua, FL, USA), siendo la amplitud de estos estímulos controlada por un atenuador programable (PA5, System 3, Tucker-Davis Technologies, TDT, Alachua, FL, USA). Los estímulos salidos del DA fueron amplificados (SKP, modelo MAX-710X, SKP Pro Audio, China) y emitidos por dos parlantes según su rango de frecuencias (Dynaudio BM 6, Dynaudio, Skanderborg, Dinamarca, rango de frecuencia: 0,04 - 20 kHz; Fostex FT17H Horn Super Tweeter, Fostex Company, Foster Electric Company, Tokio, Japón, rango de



frecuencia: 5 - 50 kHz). Ambos parlantes fueron ubicados a 80 cm frente al sujeto experimental. Para estandarizar el protocolo experimental, todas las mediciones fueron hechas en la MT izquierda. Se realizó una calibración antes de iniciar el registro de la respuesta timpánica, en la cual se midió el nivel de presión sonora (SPL) de cada uno de los estímulos emitidos. Para esto se utilizaron dos micrófonos, uno para la serie de TA (Brüel & Kjær 2250), y otro para las series de TU+S (G.R.A.S. 40 BE). Ambos fueron conectados a un sonómetro (Brüel & Kjær 2250) y a una grabadora (TASCAM DR-680), respectivamente. Fue necesaria una grabadora para evaluar el valor de SPL de los estímulos de la serie TU+S, ya que los valores de SPL de los estímulos ultrasónicos no pudieron ser evaluados directamente desde un sonómetro; la medición de SPL de la serie TU+S fue realizada con el programa Raven Pro 1.3. Ambos micrófonos fueron dispuestos a unos 5 cm sobre la superficie dorsal de la MT izquierda. Esta calibración proporcionó los valores de referencia necesarios para asegurar una emisión de tonos a una intensidad constante de  $80 \pm 5$  dB SPL. Se utilizó una intensidad constante para que las diferencias de vibración de la MT fuesen determinadas solo por las variaciones en la frecuencia de la señal y no por cambios de intensidad. De esta manera, la velocidad de respuesta indicará directamente la transferencia de vibraciones sonoras desde el aire a la MT (Werner y col., 2002).

El cabezal del vibrómetro láser (VL) (Polytec CLV-2534-3, Polytec, Waldbronn, Alemania) fue posicionado a unos 40 cm de la cabeza del animal. Este cabezal emite un rayo láser que fue enfocado perpendicularmente a la MT. Una superficie reflectante pequeña (0,3 x 0,3 cm y < 0,02 mg) fue adherida al centro de la MT para obtener una mejor señal de salida del vibrómetro láser. Esta superficie reflectante fue posicionada



usando un microscopio de luz binocular (PZO OP-1, PZO, Varsovia, Polonia). La alineación del rayo láser con la superficie reflectante fue ajustada hasta que el componente reflejado registrara una señal máxima. Este procedimiento mejoró la relación señal/ruido de las señales de velocidad registradas por el interferómetro del VL (Werner y col., 1998). La salida del VL fue conectada al canal izquierdo de una grabadora digital (TASCAM DR-680) para registrar la señal de respuesta de éste. Por su parte, el computador PC fue conectado en línea al canal derecho de la misma grabadora para registrar y evaluar la correcta salida de los estímulos emitidos.

Antes de presentar cada serie de estímulos (TA o TU + S), se emitió un tono de calibración de 1 kHz y 1 s de duración. El registro del tono de calibración se utilizó como referente en la medición de velocidad de los estímulos durante el análisis de datos (ver más adelante). Asimismo, se midió la amplitud (V) de la señal respuesta del VL frente al tono de calibración, directamente desde un osciloscopio (GoldStar Model OS-3020, Ez Digital Co., Ltd, Gyeonggi-do, Corea del Sur).

Los archivos WAV generados durante los registros (44,1 kHz/16 bits, para la serie de tono de calibración + TA, y de 96 kHz/16 bits para la serie de tono de calibración + TU + S), fueron analizados con el programa Raven Pro 1.3. Se midió el RMS del tono de calibración y de cada uno de los estímulos, en ambos canales. Se usó un script del programa R (R Development Core Team, 2014, <http://www.r-project.org/>) para automatizar la medición de RMS de las señales de respuesta en cada canal. En esta medición se utilizó la selección de las señales registradas en el canal derecho como un “templado” para seleccionar las del canal izquierdo. Consecutivamente, se calculó la velocidad de respuesta ( $\text{mm s}^{-1}$ ) de cada tono de calibración, multiplicando su valor de

amplitud (V) \* 5 mm s<sup>-1</sup>/ 1V (valor designado en el decodificador de velocidad del VL). Finalmente, se determinó la velocidad de respuesta de cada estímulo registrado en el canal izquierdo, utilizando el siguiente algoritmo:  $(RMS_E * V_{TC}) / RMS_{TC}$ , en donde  $RMS_E$  = RMS de cada estímulo,  $V_{TC}$  = Velocidad del tono de calibración, y  $RMS_{TC}$  = RMS del tono de calibración.

A partir de los valores de velocidad de la MT obtenidos para cada tono, se determinaron las siguientes variables fisiológicas por individuo: velocidad máxima ( $V_{max}$ ; mm s<sup>-1</sup>) o el mayor valor de velocidad registrado, frecuencia pico ( $F_{pico}$ ; Hz) o frecuencia a la cual se registró la  $V_{max}$ , y la frecuencia central ( $F_{central}$ ; Hz) o valor de frecuencia representativa de los mayores valores de velocidad alcanzados. La  $F_{central}$  fue obtenida a partir del siguiente algoritmo:  $[\sum \{(V_{max} - V_x) * F_{Vx}\}] / \sum V_x$ , en donde  $V_x$  = valor de velocidad  $\geq$  al valor de  $(V_{max}/2)$ , y  $F_{Vx}$  = frecuencia de respuesta de  $V_x$  (modificado de Penna y col., 2009).

### **Análisis estadístico**

De los resultados del experimento de *playback*, se aplicó una transformación logarítmica ( $\log_{10}$ ) a los valores de movimiento y latencia post-estímulo para normalizarlos. Se analizó el efecto del origen del estímulo acústico (homotípico vs heterotípico), del tipo de estímulo (llamado vs ruido), y de su interacción, sobre las variables estudiadas, utilizando un Modelo Lineal General (MLG) anidado de medidas repetidas, seguido de un análisis a posteriori LSD de Fisher.

Para evaluar si existían diferencias en las variables fisiológicas estudiadas ( $V_{max}$ ,  $F_{pico}$  y  $F_{central}$ ) entre adultos y juveniles, se utilizó una Prueba t-Student. Asimismo, se

realizó una correlación de Pearson entre las variables fisiológicas medidas y el valor de largo hocico-cloaca de los individuos. Las mediciones de machos y hembras adultos fueron agrupadas en todos los análisis, ya que no difirieron en el valor de  $V_{\max}$  ( $t_{13} = 0,01$ ;  $p = 0,99$ ),  $F_{\text{pico}}$  ( $t_{13} = -0,7$ ;  $p = 0,49$ ),  $F_{\text{central}}$  ( $t_{13} = 0,1$ ;  $p = 0,92$ ) y largo hocico-cloaca ( $t_{13} = -0,08$ ;  $p = 0,93$ ). Por otro lado, se aplicó una transformación logarítmica a las respuestas de la MT frente a los llamados audible y ultrasónico de Isla de Maipo, y al llamado poblacional de Melipilla. Para evaluar el efecto de la edad y del tipo de estímulo sobre la velocidad de respuesta obtenida ante los estímulos completo, audible y ultrasónico, se utilizó un ANDEVA de medidas repetidas de dos vías. Además, se comparó la respuesta de la MT frente a los estímulos poblacionales de Melipilla, Pucón e Isla de Maipo, utilizando un ANDEVA de medidas repetidas de una vía. Ambos ANDEVA fueron seguidos por un análisis a posteriori LSD de Fisher.

Todos los datos cumplieron con los supuestos de homocedasticidad y normalidad. Los análisis se realizaron utilizando el software STATISTICA 12.0 (StatSoft, Inc. 1984-2014), considerando un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ .

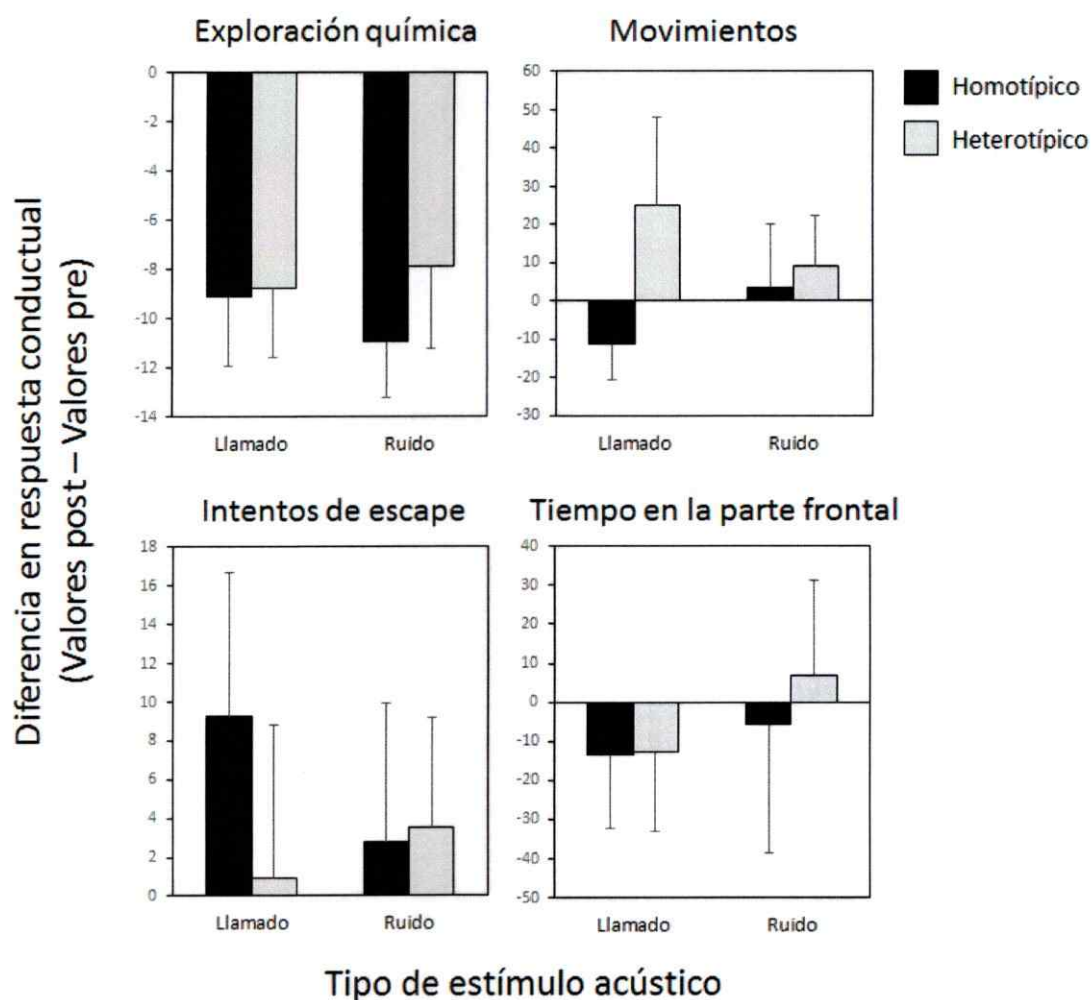
## RESULTADOS

### *Experimentos de playback*

La Tabla 2 resume los resultados del análisis estadístico de las cinco variables conductuales estudiadas. Ninguno de los factores considerados en el análisis (tipo de estímulo, origen del estímulo, o la interacción entre estos) tuvo un efecto sobre las conductas de exploración química, movimiento, escape o tiempo en la parte frontal del terrario (Fig. 6). Sin embargo, la latencia post-estímulo fue modulada por diferentes factores, como el tipo de estímulo; los lagartos tuvieron una mayor latencia frente a los llamados que ante los ruidos blancos. Además, la interacción entre el tipo y el origen del estímulo también moduló esta variable; los lagartos reaccionaron con una mayor latencia a cualquier movimiento cuando fueron expuestos al llamado homotípico, en comparación con las latencias exhibidas ante el llamado heterotípico y los ruidos de ambas poblaciones (Fig. 7). Por último, los individuos se comportaron de manera distinta al percibir el llamado heterotípico y el ruido homotípico, y la respuesta registrada ante el ruido heterotípico fue similar a las dos anteriores (Fig. 7).

**Tabla 2:** Resultados del Modelo Lineal General (MLG) realizado para determinar el efecto del tipo de estímulo (llamado vs. ruido), origen del estímulo (homo- vs heterotípico), y sus interacciones, sobre las diferencias (valores post-estímulo menos valores pre-estímulo) de cuatro conductas (exploración química, movimientos, escapes y tiempo en la mitad frontal del terrario) y la latencia post-estímulo. F indica el valor del estadístico, y p la probabilidad. Los grados de libertad del análisis fueron de 1,20. Los valores del análisis que resultaron estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) se remarcan en negrita.

	Exploración química	Movimientos	Escape	En mitad frontal	Lat. post- estímulo
Variable Respuesta	F (p)	F (p)	F (p)	F (p)	F (p)
Tipo de estímulo	0,032 (0,86)	0,001 (0,98)	0,120 (0,73)	0,434 (0,52)	<b>8,60 (0,0082)</b>
Origen de estímulo	0,508 (0,48)	2,202 (0,15)	0,272 (0,61)	0,054 (0,82)	0,283 (0,60)
Tipo x Origen estímulo	0,204 (0,66)	0,546 (0,47)	0,347 (0,56)	0,048 (0,83)	<b>5,35 (0,032)</b>



**Figura 6:** Diferencia de los valores post- y pre-estímulo (promedio  $\pm$  EE) de las conductas observadas en *Liolaemus chiliensis* ( $n = 21$ ). Se utilizaron dos estímulos (llamado o ruido) de distinto origen (homo- vs heterotípico). La línea horizontal (cero) indica el punto donde no hay cambio entre el periodo pre- y post-estímulo. Los valores negativos indican que después del estímulo la conducta disminuyó en relación a la condición pre-estímulo.

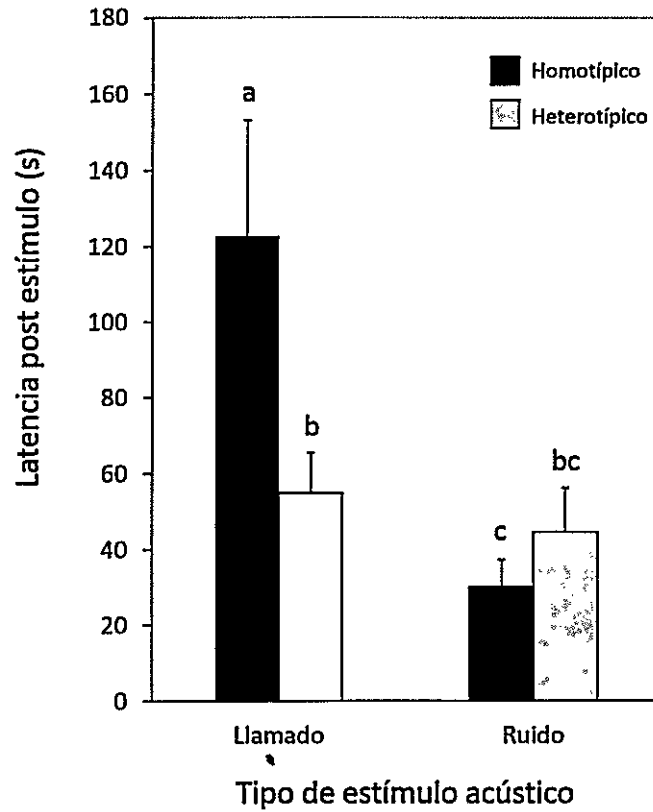


Figura 7: Latencia post-estímulo (s; promedio  $\pm$  EE), o tiempo comprendido entre el término del estímulo acústico (llamado o ruido) y el despliegue de alguna otra conducta, de individuos adultos de *Liolaemus chiliensis* ( $n = 21$ ). Se muestra además el efecto del origen del estímulo acústico (homo- vs heterotípico). Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del análisis *a posteriori* LSD de Fisher.

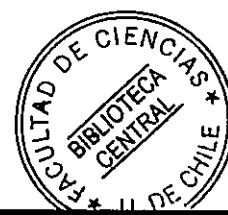


### **Medición de sensibilidad auditiva**

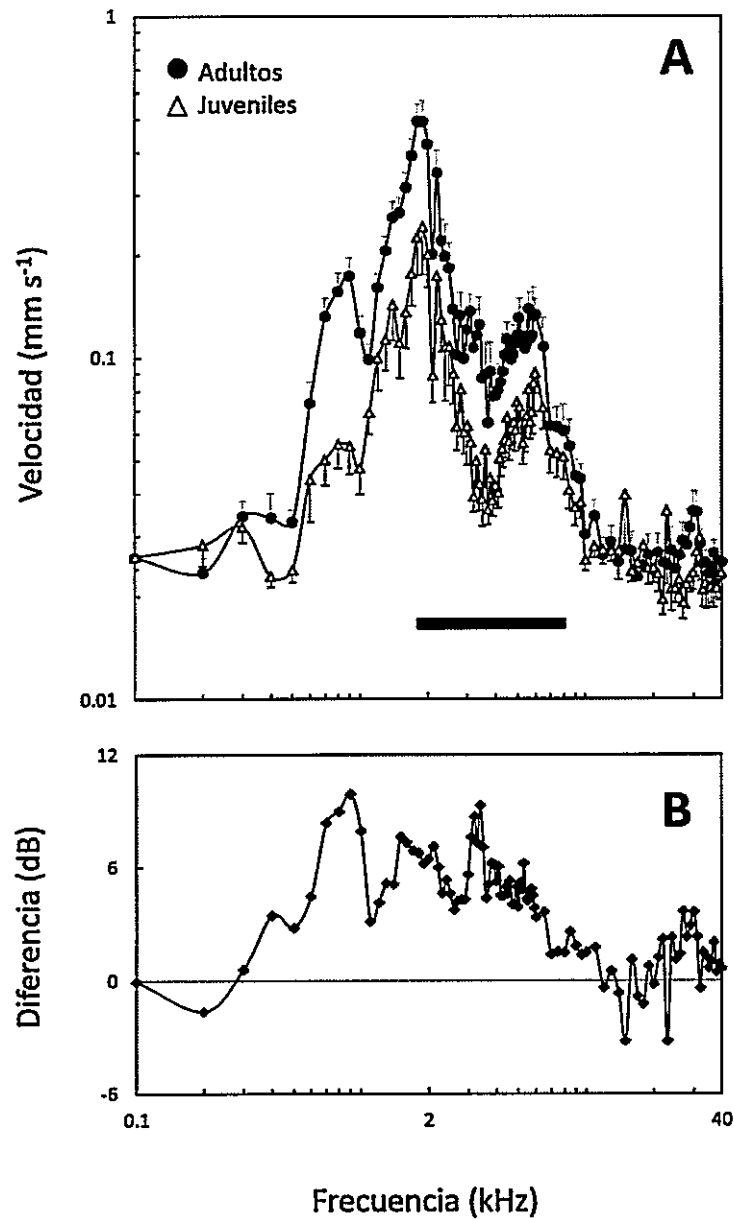
La Fig. 8A muestra la función de transferencia de la MT de individuos adultos y juveniles de *L. chiliensis* frente a las series de tonos (TA y TU). Entre los 0,5-10 kHz se observa que existen tres puntas aguzadas para ambas edades, correspondiendo la segunda al máximo valor de velocidad promedio alcanzado (0,49 y 0,24 mm s<sup>-1</sup> para adultos y juveniles, respectivamente), la cual se registra a una frecuencia de 1,9 kHz. Además, la curva de los adultos se distribuye paralelamente por sobre la de los juveniles, alcanzando mayores valores de velocidad dentro del rango de frecuencias descrito. Sin embargo, a bajas frecuencias (0,1-0,5 kHz), las curvas no son paralelas; la respuesta de la MT de los juveniles supera a la de los adultos a los 0,2 kHz, y posteriormente, ésta disminuye entre los 0,3-0,5 kHz. Por último, desde los 10-40 kHz se observa una respuesta mínima de la MT (< 0,03 mm s<sup>-1</sup>), la que es similar en ambas edades.

Al comparar la función de transferencia de velocidad de la MT de individuos adultos y juveniles de *L. chiliensis* con el rango de valores de la frecuencia dominante de sus llamados de angustia (obtenidos de Labra y col., 2013), se observa que existe cierta correspondencia entre las mayores velocidades registradas y el principal componente de frecuencias de sus llamados (Fig. 8A).

La Fig. 8B muestra la proporción entre los valores de la función de transferencia de la MT de adultos y juveniles. Ésta información fue obtenida calculando la proporción de los resultados de velocidad (valor de adulto/valor de juvenil) para cada frecuencia de las series de tonos, y luego expresada en dB (Werner y col., 1998). Los resultados indican que entre los 0,1-0,3 kHz aproximadamente, existe una pérdida de 0,5-1 dB en



la respuesta timpánica de los adultos. No obstante, entre los 0,3-12 kHz, se observa una ganancia de respuesta promedio de 5 dB en adultos. Por último, sobre los 12 kHz la respuesta de la MT es comparativamente similar entre adultos y juveniles.



**Figura 8:** (A) Función de velocidad medida al centro de la membrana timpánica para un grupo de adultos ( $n = 15$ ) y juveniles ( $n = 10$ ) de *Liolaemus chillensis*. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  EE, y ambos ejes de gradúan en escala logarítmica. La barra negra indica el rango de valores de la frecuencia dominante de sus llamados de angustia (obtenido de Labra y col., 2013). (B) Proporción (en dB) entre el valor promedio de velocidad mostrado en A para adultos y juveniles. El eje de la abscisa se gradúa en escala logarítmica.

La Tabla 3 resume los valores del largo hocico-cloaca y de las variables fisiológicas evaluadas en adultos y juveniles de *L. chiliensis*, además del resultado del análisis estadístico correspondiente. El largo hocico-cloaca de individuos adultos es significativamente mayor que el de juveniles. Además, solo la  $V_{\max}$  fue diferente entre edades; los individuos adultos tienen en una  $V_{\max}$  significativamente mayor que juveniles.

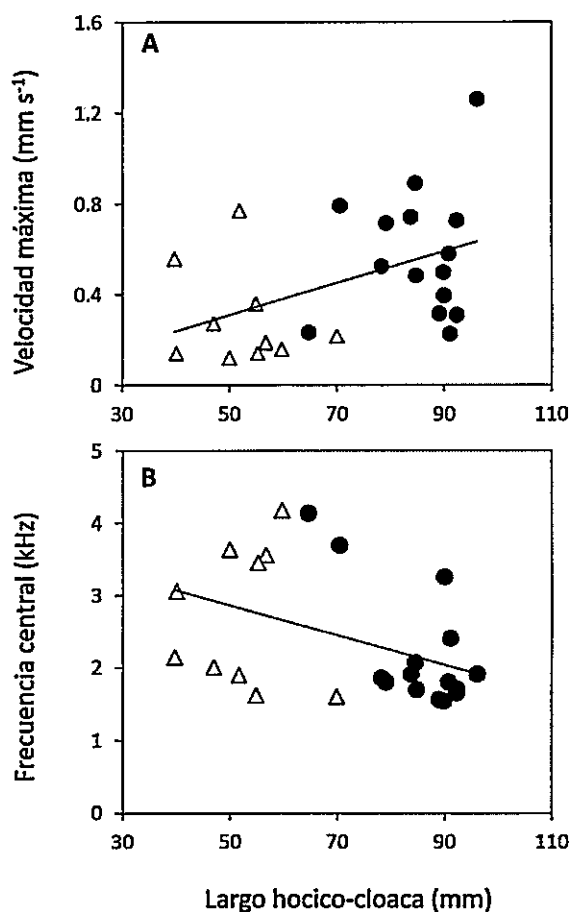
**Tabla 3:** Valores promedio ( $\pm$  EE) del largo hocico-cloaca (LHC), y de tres variables fisiológicas obtenidas desde la función de transferencia de la membrana timpánica ( $V_{\max}$  = velocidad máxima,  $F_{\text{pico}}$  = frecuencia pico y  $F_{\text{central}}$  = frecuencia central), medidas en individuos adultos ( $n = 15$ ) y juveniles ( $n = 10$ ) de *Liolaemus chiliensis*. Se indican los resultados de la Prueba t-Student, utilizada para evaluar las diferencias entre las clases de edades de cada una de las variables. La  $t$  indica el valor del estadístico, y  $p$  la probabilidad. Los valores del análisis que resultaron estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) se remarcan en negrita.

Variable morfológica o fisiológica	Adultos	Juveniles	$t_{23}$ (p)
LHC (mm)	85,1 $\pm$ 2,3	52,7 $\pm$ 2,9	<b>8,97 (&lt;&lt; 0,001)</b>
$V_{\max}$ (mm/s)	0,58 $\pm$ 0,073	0,29 $\pm$ 0,068	<b>2,75 (0,0113)</b>
$F_{\text{pico}}$ (kHz)	2,1 $\pm$ 0,29	2,0 $\pm$ 0,18	0,112 (0,912)
$F_{\text{central}}$ (kHz)	2,2 $\pm$ 0,21	2,7 $\pm$ 0,30	-1,42 (0,170)

La Tabla 4 muestra los resultados de las correlaciones entre el largo hocico-cloaca y las tres variables fisiológicas medidas en adultos y juveniles de *L. chiliensis*. La  $V_{\max}$  se correlacionó positiva y significativamente con el largo hocico-cloaca (Fig. 9A), y correlacionó negativamente con la  $F_{\text{central}}$ . Asimismo, la  $F_{\text{central}}$  correlacionó negativamente con el largo hocico-cloaca (Fig. 9B).

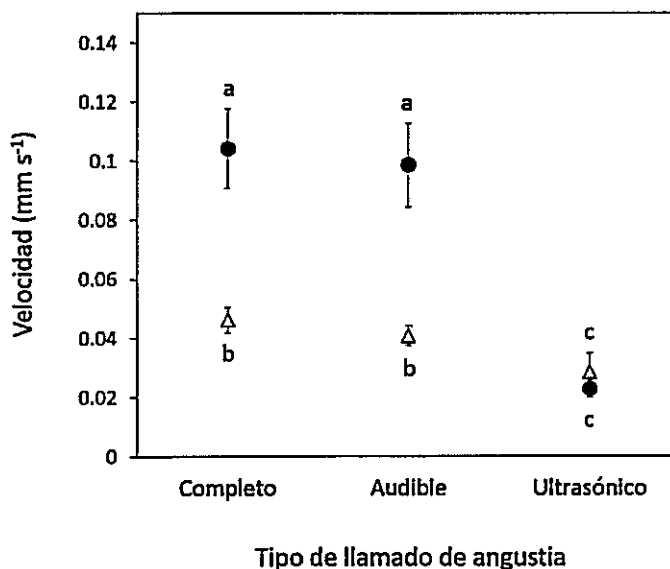
**Tabla 4:** Correlaciones ( $r$ ) entre las tres variables fisiológicas obtenidas desde la función de transferencia de la membrana timpánica ( $V_{\max}$  = velocidad máxima,  $F_{\text{pico}}$  = frecuencia pico y  $F_{\text{central}}$  = frecuencia central) y el largo hocico-cloaca (LHC) de adultos y juveniles de *Liolaemus chiliensis* ( $n = 25$ ). Los valores estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) se remarcan en negrita.

	LHC	$F_{\text{central}}$	$F_{\text{pico}}$
$V_{\max}$	<b>0,489 (0,013)</b>	<b>-0,525 (&lt; 0,01)</b>	-0,0849 (0,69)
$F_{\text{pico}}$	-0,202 (0,33)	0,381 (0,060)	
$F_{\text{central}}$	<b>-0,409 (0,042)</b>		



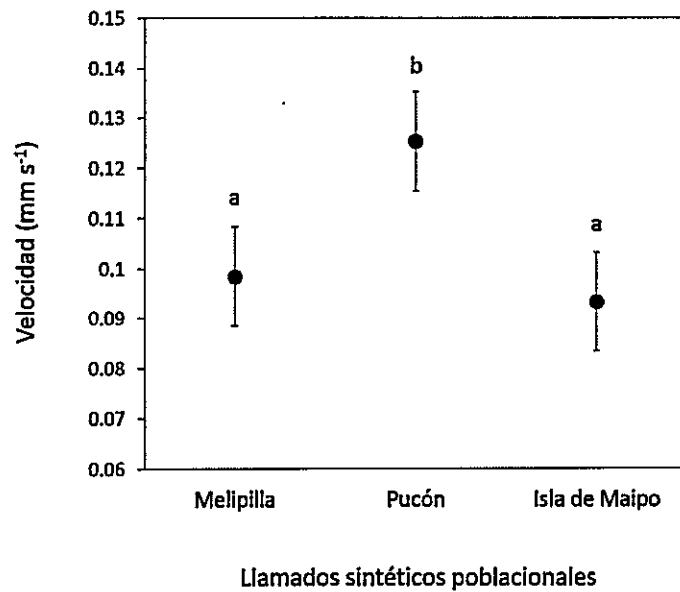
**Figura 9:** Correlación entre el largo hocico-cloaca de adultos (círculos) y juveniles (triángulos) de *Liolaemus chiliensis*, y su: (A) velocidad máxima, y (B) frecuencia central; ambas variables fisiológicas fueron obtenidas desde la función de transferencia de la membrana timpánica.

La Fig. 10 muestra la velocidad de respuesta promedio de la MT de individuos adultos y juveniles de *L. chilensis* ante la emisión de los llamados sintéticos completo, audible y ultrasónico. La velocidad de respuesta de la MT es significativamente mayor en individuos adultos que en juveniles frente a los estímulos completo y audible ( $p < 0,05$ ; análisis *a posteriori* LSD de Fisher). Sin embargo, no existe diferencia cuando se presenta el estímulo ultrasónico. Además, existe un efecto del tipo del estímulo; la velocidad de respuesta ante la emisión de los llamados completo y audible es similar y significativamente mayor que la registrada con el llamado ultrasónico ( $p << 0,01$ ; análisis *a posteriori* LSD de Fisher). Asimismo, se encontró un efecto conjunto de la edad y el tipo de estímulo, en donde la respuesta de adultos y juveniles ante la emisión de los estímulos completo y audible es significativamente mayor que la respuesta registrada con el estímulo ultrasónico en ambas edades ( $p << 0,01$ ; análisis *a posteriori* LSD de Fisher). Por último, la respuesta de velocidad promedio frente al llamado ultrasónico fue similar y cercana a los  $0,02 \text{ mm s}^{-1}$  en ambas edades, la cual se aproxima al valor obtenido en la función de transferencia entre los 10-40 kHz (Fig. 8A).



**Figura 10:** Promedio  $\pm$  EE de la velocidad de respuesta de la membrana timpánica (MT) de individuos adultos (círculos,  $n = 15$ ) y juveniles (triángulos,  $n = 10$ ) de *Liolaemus chiliensis*, frente a la emisión de tres llamados de angustia sintéticos, denominados: "completo" (llamado con rango audible y ultrasónico), "audible" (rango audible del llamado completo) y "ultrasónico" (rango ultrasónico del llamado completo). Se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del análisis *a posteriori* LSD de Fisher.

Finalmente, la Fig. 11 muestra la respuesta de velocidad promedio de la MT de individuos adultos de *L. chiliensis* frente a los llamados sintéticos poblacionales. Se observa que las velocidades de respuesta ante los llamados sintéticos de Melipilla e Isla de Maipo son similares, y significativamente menores que la respuesta exhibida ante el llamado sintético de Pucón ( $p < 0,01$ ; análisis *a posteriori* LSD de Fisher).



**Figura 11:** Promedio  $\pm$  EE de la velocidad de respuesta de la membrana timpánica (MT) de individuos adultos de *Liolaemus chiliensis* ( $n = 15$ ) frente a la emisión de tres llamados de angustia sintéticos, creados a partir de las vocalizaciones de individuos provenientes de tres localidades: Melipilla, Pucón e Isla de Maipo. Se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del análisis *a posteriori* LSD de Fisher.



## DISCUSIÓN

### *Experimento de playback*

Los individuos de *L. chiliensis* respondieron a los llamados de angustia con una prolongada inmovilidad, conducta que aumentaría la probabilidad de no ser detectados por el depredador. Es decir, estas llamadas alertarían a conespecíficos del riesgo depredatorio, como había sido propuesto previamente (Hoare y Labra, 2013). Sin embargo, la variación geográfica de sus llamados determina un quiebre en la cohesión comunicativa en esta especie, ya que los individuos de *L. chiliensis* de la zona central de Chile estarían más “sintonizados” a los llamados característicos de su población, considerando que presentan una mayor inmovilidad frente a los llamados homotípicos que ante llamados heterotípicos y ruidos. De esta manera, los resultados apoyan la primera hipótesis de reconocimiento diferencial de llamados de angustia homo- y heterotípicos.

Los factores que determinarían este reconocimiento diferencial de los llamados de distintas poblaciones son desconocidos, pero se proponen aquí dos hipótesis no excluyentes. La primera se relaciona con la información decodificada en su llamado de angustia. El tamaño corporal del emisor (i.e. presa) está codificado en su llamado de angustia, y dado que los tamaños de presas y depredadores se correlacionan positivamente (Costa, 2009; Jonsson, 2014), el llamado sería una aproximación del tamaño del depredador, y por lo tanto, del riesgo que el depredador atacante representaría para el conespecífico receptor de estas vocalizaciones. Esta información

modularía la respuesta conductual de los lagartos ante el llamado de angustia. En muchas especies se ha observado que diferentes características de sus llamados codifican información que se relaciona con su tamaño corporal (e.g. Martin y col., 2011; Vergne y col., 2012), como se ha observado en *L. chiliensis*, en el que la duración y la F0 (o frecuencia del primer armónico) de su llamado de angustia se correlacionan con su largo hocico-cloaca de manera positiva y negativa, respectivamente (Labra y col., 2013). La relación entre las características espectro-temporales del llamado de angustia de *L. chiliensis* y su tamaño corporal se ve reflejada en los llamados homo- y heterotípico utilizados. El llamado heterotípico presentó una menor duración y una F0 más alta que el llamado homotípico, debido a que fue sintetizado a partir de los llamados emitidos por lagartos provenientes de Pucón, los cuales presentan tamaños corporales menores que los lagartos procedentes de Melipilla ( $t_{39} = 4,8$ ;  $p < 0,01$ ). De esta manera, y dado que el tamaño corporal de presas y depredadores se correlaciona positivamente (Costa, 2009; Jonsson, 2014), el llamado heterotípico se relacionaría con el ataque de un depredador relativamente pequeño, por lo que esta vocalización no representaría un riesgo real para lagartos llorones de mayor tamaño, como los evaluados en este trabajo, y por ende, éstos no responderían con inmovilidad al percibirlo.

La relación entre la respuesta conductual exhibida ante los llamados y la proporción del tamaño corporal de emisores y receptores, ha sido observada en el estudio de llamados de alarma, o vocalizaciones emitidas por presas en presencia de un depredador antes de cualquier contacto físico (Caro, 2005). Se ha visto que individuos de mayor tamaño corporal reaccionan solamente a llamados de alarma emitidos por

individuos del mismo tamaño, mientras que individuos pequeños (juveniles) responden al llamado emitido por individuos grandes y pequeños (Hanson y Coss, 2001; Nakano y col., 2013; pero véase Blumstein y Daniel, 2004). Nuevos estudios son necesarios para clarificar si la proporción de tamaño entre emisores y receptores modula la respuesta a los llamados de angustia en el lagarto llorón.

La segunda hipótesis se relaciona con la influencia que tiene el tamaño corporal sobre el aparato productor de vocalizaciones y los llamados que este produce, y la correspondencia de estos llamados con el sistema de recepción auditivo (e.g. Wilczynski y col., 1993; McClelland y col., 1997). En distintas especies se ha observado que el aumento del tamaño corporal de los individuos incrementa alométricamente el tamaño de las estructuras del aparato productor de vocalizaciones, tales como tracto vocal o cuerdas vocales, lo cual disminuye los valores de la  $F_0$  y de la frecuencia dominante de sus llamados (Wilczynski y col., 1993; Fitch, 1997; McClelland y col., 1997; Martin y col., 2011). Al mismo tiempo, este aumento del tamaño corporal incrementa la dimensión de los componentes del oído, como el área de la MT o el volumen del oído medio, oído interno y de la extracolumela (McClelland y col., 1997; Werner e Igić, 2002), lo que permitiría a los individuos estar sintonizados de mejor manera a las bajas frecuencias de sus llamados (Wilczynski y col., 1993; McClelland y col., 1997). Así, el tamaño corporal determinaría la existencia de una correspondencia entre las características del llamado emitido y percibido por un individuo. En este sentido, los lagartos responderían con una mayor inmovilidad al llamado homotípico ya que estarían mejor sintonizados a la frecuencia dominante baja de este estímulo (que a su vez es la  $F_0$ ; valor promedio: 2,8 kHz), dado que su tamaño corporal es similar al de

los individuos utilizados en la creación del llamado homotípico ( $t_{52} = 0,83$ ;  $p = 0,41$ ). Por otro lado, el menor tiempo de inmovilidad ante el llamado heterotípico coincidiría con la menor capacidad de los individuos evaluados para percibir las frecuencias dominantes altas de este estímulo (valor promedio: 5,8 kHz), ya que éstos presentaron tamaños corporales mayores que los individuos utilizados en la síntesis del llamado heterotípico ( $t_{27} = 5,0$ ;  $p < 0,01$ ). La manipulación experimental del valor de la FO o de la frecuencia dominante del llamado de angustia de *L. chiliensis*, podrá clarificar a qué frecuencia se encuentra más sintonizado un lagarto de determinado tamaño. Asimismo, es necesario investigar la relevancia de otros parámetros del llamado en la respuesta conductual, como la duración del estímulo acústico (e.g. Blumstein y col., 2008), ya que los lagartos desplegaron tiempos de inmovilidad similares ante el llamado y ruido heterotípico. Finalmente, es esencial relacionar su capacidad auditiva con las características espectrales de sus llamados, para comprender cómo ocurre la decodificación de estas señales, y por ende, la respuesta conductual desplegada frente a ellos, lo cual se discute en la siguiente sección.

Hasta donde se conoce, esta es la primera vez que se muestra que la variación geográfica de llamados de angustia puede interrumpir los beneficios que estos representan. Considerando que el lagarto llorón no vocaliza en interacciones sociales (Bozzo, 2015), la variación geográfica de estas vocalizaciones ciertamente no tendría un papel importante en el proceso de especiación (Wilkins y col., 2013). Sin embargo, no podemos descartar que las diferencias geográficas de los llamados de angustia del lagarto llorón surjan como un epifenómeno de la segregación de estas poblaciones causado por aislamiento genético o por diferentes presiones selectivas.

### ***Sensibilidad auditiva de adultos y juveniles del lagarto llorón***

A pesar de que se conocen las características y la función del llamado de angustia de *L. chiliensis*, la cual sería alertar a conespecíficos del riesgo depredatorio (Hoare y Labra, 2013; Labra y col., 2013), hasta la fecha era desconocida la sensibilidad auditiva de la especie. En este trabajo, y por primera vez, se evaluó la sensibilidad auditiva de lagartos llorones adultos y juveniles a través de la medición de la respuesta vibratoria de su MT frente a tonos de distinta frecuencia (incluyendo ultrasonido). El rango de respuesta de la MT fue similar al encontrado en otros lagartos (Werner y col., 1998), y la MT de adultos respondió con una mayor velocidad que la de juveniles. Además, no hubo respuesta de la MT al ultrasonido en ambas edades.

La mayor respuesta de la función de transferencia de velocidad de la MT de adultos y juveniles de *L. chiliensis*, se obtuvo entre los 0,5 y 10 kHz, al evaluar con frecuencias desde los 0,1 a los 40 kHz. Este rango de respuesta es semejante al obtenido en adultos y juveniles del gecko *Eublepharis macularius*, el cual presenta velocidades de respuesta de la MT que van desde los 0,6 a los 10 kHz, evaluado entre los 0,15 y 20 kHz (Werner y col., 1998). Sin embargo, el rango de respuesta observado en otros lagartos puede ser variable, e incluso puede extenderse hasta mayores frecuencias (aproximadamente 15 kHz; Werner y col., 1998; Werner y col., 2002). Lo anterior, estaría relacionado con las diferencias especie-específicas de la morfología del oído medio de lagartos (Saunders, 2000).

Adultos y juveniles de *L. chiliensis* presentaron curvas de respuesta con formas similares, dentro del rango de frecuencias señalado anteriormente, las cuales fueron paralelas y aguzadas en su máximo valor de velocidad. Esta respuesta no concuerda

con la observada en otras especies de lagartos, en las cuales la forma de la curva de individuos juveniles difiere de la de adultos, siendo no aguzada, sino aplanada en su valor máximo, y supera a la de adultos a altas frecuencias (Werner y col., 1998; Werner y col., 2002). Probablemente, los individuos juveniles utilizados en este estudio se encuentren en un estado ontogenético avanzado, pues se ha planteado que a medida que crecen los individuos más aguzada se vuelve la curva de respuesta de su MT (Relkin, 1998; Werner y col., 2002). Por una parte, una disminución de la amortiguación y de las fuerzas friccionales del oído medio durante el crecimiento, determinaría curvas de respuesta más aguzadas (Relkin, 1998; Werner y col., 1998; Werner y col., 2002). Alternativamente, es probable que un aumento de la masa de las distintas estructuras (e.g. extracolúmela, colúmela; Fig. 12), así como un mayor nivel de osificación de la colúmela, hayan degradado la respuesta de su oído medio ante frecuencias altas (Relkin, 1998; Werner y col., 1998). Futuros estudios comparados de la morfología de las estructuras del oído medio de adultos y juveniles de *L. chiliensis* permitirán avalar o rechazar estas propuestas.

La  $V_{\max}$  tuvo valores promedio de 0,58 y 0,29  $\text{mm s}^{-1}$  en adultos y juveniles, respectivamente, los cuales son menores a los registrados en otras especies de lagartos ( $\sim 2 \text{ mm s}^{-1}$  en ambas edades; Saunders y col., 2000; Werner y col., 2002). Una posible explicación a esta diferencia podría radicar en que en el presente estudio se utilizó una menor intensidad de los tonos (80 dB SPL), en comparación a la usada en otros trabajos (100 dB SPL; Werner y col., 1998; Saunders y col., 2000; Werner y col., 2001; Werner y col., 2002). En segundo lugar, el mayor tamaño de la superficie reflectante utilizada (0,3 x 0,3 cm; < 0,02 mg), comparado con la dimensión de los elementos reflectantes

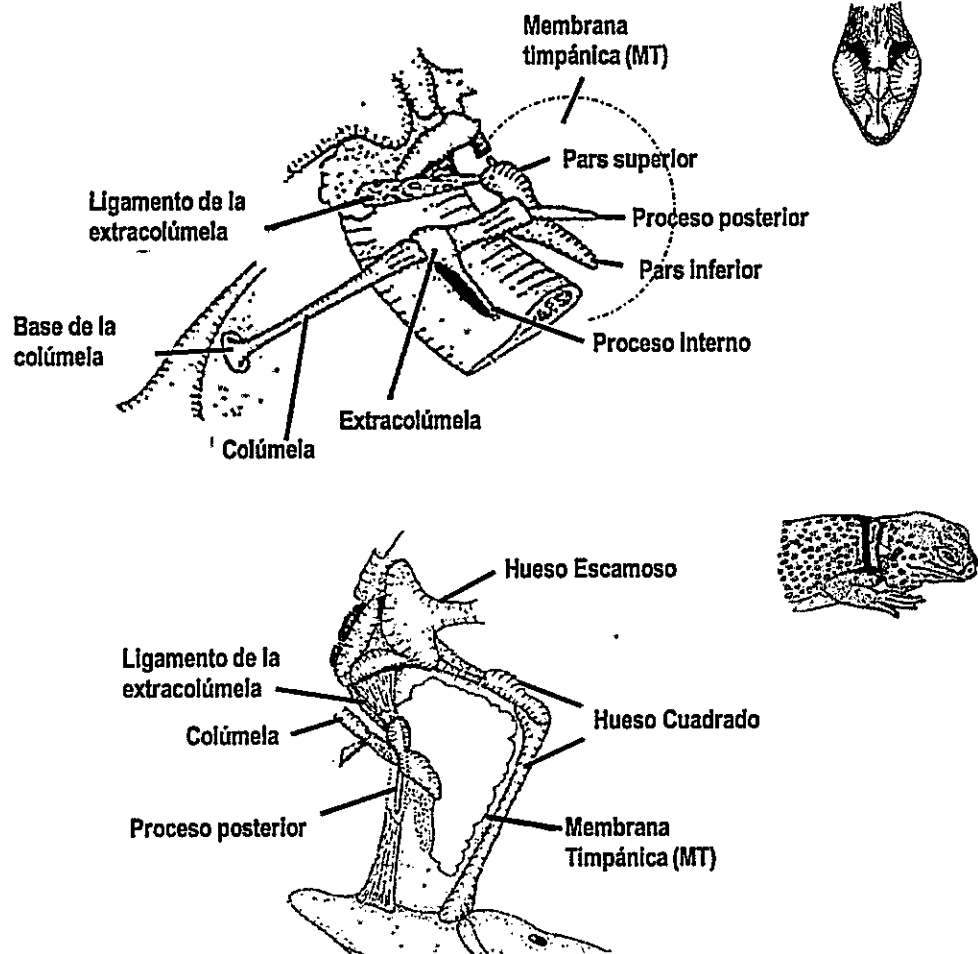


Figura 12: Características esenciales del oído medio de un lagarto iguánido (Modificado de Wever y Werner, 1970). Esquema superior: vista ventral del animal; esquema inferior: vista lateral.

ocupados en otros trabajos (e.g. microperlas de vidrio: 15-30  $\mu\text{m}$  y 5-10 ng; Werner y col., 1998; Werner y col., 2002), pudo haber afectado la movilidad de la MT, y por lo tanto, haber disminuido la velocidad de respuesta registrada. Sin embargo, y a pesar de haber obtenido valores menores que los alcanzados en otros estudios, es probable que la curva de velocidad de la MT obtenida en *L. chiliensis* mantenga la misma forma y

rango de respuesta al aumentar la intensidad de los estímulos emitidos, ya que se ha observado en otros lagartos que esta respuesta aumenta linealmente dentro de un rango de intensidades de 72-96 dB SPL, y bajo un rango de frecuencias de 0,1-10 kHz (Manley, 1972a).

La  $F_{\text{pico}}$  tuvo valores promedio de 2,0 y 2,1 kHz en adultos y juveniles de *L. chiliensis*, respectivamente, los cuales son semejantes a los registrados en otros lagartos como *Elgaria multicarinata* y *Ctenophorus reticulatus* (Saunders y col., 2000). Sin embargo, estos valores discrepan con las  $F_{\text{pico}}$  obtenidas en otras especies de lacertilios, fundamentalmente porque esta medida presenta gran variabilidad dentro de este grupo (rango de  $F_{\text{pico}}$  registrados en lagartos: 0,5-5,5 kHz; Rosowski, 1988; Werner y col., 1998; Saunders y col., 2000; Hetherington, 2001; Werner y col., 2002).

Por otra parte, se encontraron diferencias entre la función de transferencia de velocidad de la MT de adultos y la de juveniles. Los individuos juveniles presentaron mayores velocidades que adultos a bajas frecuencias (0,1 - 0,3 kHz), lo cual contrasta con lo observado en otros lagartos, en los cuales la respuesta es similar entre edades dentro de este rango (Werner y col., 1998; Werner y col., 2002). Es probable que la respuesta a bajas frecuencias solo sea aparente, y derive del surgimiento de ruido no-lineal durante la medición (obs. pers.). Luego, entre los 0,3-12 kHz, la velocidad de respuesta de adultos superó la de juveniles en todo este rango. De hecho, la  $V_{\text{max}}$  se correlacionó positivamente con el tamaño corporal de los individuos, al igual que lo observado en distintas especies de lagartos (Werner y col., 1998; Werner y col., 2002; Werner y col., 2008). De este modo, se respalda la segunda hipótesis de diferencias en la sensibilidad auditiva de adultos y juveniles. Específicamente, esta relación directa



entre la respuesta de la MT y el tamaño corporal se debe a que este último factor covaría positivamente con el área de la MT a lo largo de la ontogenia (Werner y col., 1998; Werner e Igić, 2002). Una MT con un área mayor responderá con gran velocidad, al tener una menor amortiguación y un área efectiva de vibración<sup>4</sup> superior (Wever y Werner, 1970; Werner y col., 1998; Werner e Igić, 2002). Conjuntamente, el mayor nivel de osificación de la colúmela de adultos permitirá aumentar la capacidad de vibración de la MT al disminuir la amortiguación de esta estructura (Werner y col., 1998). Asimismo, es probable que la mayor respuesta de la MT de adultos esté relacionada con el progresivo aumento de la admitancia<sup>5</sup> del oído medio durante la ontogenia de lagartos no geckos (Rosowski, 1988). A partir de observaciones realizadas en aves, se ha propuesto que este aumento gradual de la admitancia estaría relacionado directamente con el incremento de la cantidad de colágeno presente en la MT (Saunders y col., 2000). Es necesario evaluar las características estructurales de la MT, y de los demás componentes del oído medio de *L. chiliensis* durante su ontogenia, para poder comprender como ocurre la transmisión de las señales acústicas en el oído de esta especie.

La  $F_{\text{central}}$  se correlacionó negativamente con el tamaño corporal y la  $V_{\text{max}}$ . Estos resultados son similares a los encontrados en el lagarto caimán (*E. multicaarinata*), en el que la frecuencia dada en su máximo de admitancia se relaciona negativamente con el tamaño corporal y con el área de la MT (estructura que influiría en el valor de  $V_{\text{max}}$ ; Rosowski, 1988; Werner y col., 1998; Werner e Igić, 2002). Probablemente, la menor

---

<sup>4</sup> Porción central de la MT que no está fijada en los bordes (Wever y Werner, 1970).

<sup>5</sup> Aceptación del paso de la energía; lo contrario a impedancia.

masa de las estructuras conductoras del oído medio de juveniles haya determinado que éstos tuvieran valores de  $F_{\text{central}}$  más altos, pues tal característica permite que estos componentes tengan una mayor frecuencia de resonancia (Werner e Igić, 2002; Werner y col., 2002). Nuevamente, es necesario examinar la estructura y capacidad de transmisión de los componentes del oído medio de *L. chiliensis* para poner a prueba estos supuestos.

No hubo respuesta de la MT de individuos adultos y juveniles ante los estímulos ultrasónicos (tonos y llamado ultrasónico), lo cual podría deberse a distintas causas. Por un lado, Manley (1972b) observó en *Gekko gekko* que sobre los 3-4 kHz la MT pasa de tener un simple movimiento "tipo pistón" a un movimiento nodal y antinodal de vibración, lo que alteraría el movimiento del extremo cónico de la MT, disminuyendo su respuesta a altas frecuencias. Asimismo, en *Gekko gekko* se observa que sobre los 4 kHz ocurre una flexión del *pars* inferior de la extracolúmelas (el cual se une a la MT en el centro de ésta, i.e. proceso timpánico; Fig. 12), la cual reduciría la respuesta de esta estructura hacia altas frecuencias (Manley, 1972b). Esta flexión, determinada por la naturaleza cartilaginosa del proceso timpánico, absorbería considerablemente la fuerza conducida desde la MT hacia el eje de la colúmelas ósea, reduciendo la respuesta de vibración a altas frecuencias (Manley, 1972b; Saunders y col., 2000). Probablemente, estos factores contribuyan a que no se reconozcan especies de lagartos que puedan percibir ultrasonido (Frankenberg y Werner, 1992). Estos datos han llevado a proponer que el ultrasonido presente en el llamado de angustia de lagartos (Brown, 1984; Labra y col., 2013) podría ser tan solo un subproducto (epifenómeno) de su mecanismo de producción sonora (e.g. Blumberg y Alberts, 1990; Frankenberg y Werner, 1992). Sin

embargo, también se ha planteado que el ultrasonido de sus llamados podría estar dirigido a depredadores con una mayor sensibilidad auditiva (e.g. mamíferos), por ejemplo, para ahuyentarlos (Frankenberg y Werner, 1992). Con respecto a esta última alternativa, dentro de los potenciales mamíferos depredadores de *L. chiliensis* que podrían percibir el ultrasonido de sus llamados de angustia, se encuentran dos especies de zorros del género *Lycalopex* (*L. culpaeus* y *L. griseus*), y el mustélido *Galictis cuja*. Aunque se desconoce la sensibilidad auditiva específica de estos carnívoros, es muy probable que perciban el ultrasonido de las llamadas de angustia del lagarto llorón, ya que se encuentran emparentados filogenéticamente con especies que son sensibles a este componente acústico (Isley y Gysel, 1975; Bardeleben y col., 2005; Koepfli y col., 2008; Brandt y col., 2013). Sin embargo, hasta el momento solo se ha examinado la respuesta conductual que despliegan depredadores con una menor capacidad auditiva (e.g. culebras) ante el componente audible de los llamados de angustia de *L. chiliensis* (Hoare y Labra, 2013). Por lo tanto, es necesario realizar esta evaluación conductual en depredadores con una mayor sensibilidad auditiva, utilizando las características ultrasónicas de los chillidos de este lagarto, con el propósito de examinar la funcionalidad de estas altas frecuencias.

Finalmente, y dado que la mayor parte del cuerpo teórico expuesto proviene de estudios realizados en especies de lagartos geckos, los cuales poseen una estructura del oído medio diferente a la de lagartos del clado Unidentata (Wever y Werner, 1970; Saunders y col., 2000; Werner y col., 2008), es necesario reconocer específicamente la relación existente entre las distintas características estructurales del oído medio del lagarto llorón y su sensibilidad auditiva a lo largo de la ontogenia.

### ***Relación entre llamados de angustia, sensibilidad auditiva y respuesta conductual***

Las mayores velocidades de la MT de adultos y juveniles se corresponden con el rango de valores de la frecuencia dominante de los llamados de angustia de adultos (2-8 kHz aproximadamente; Labra y col., 2013). De esta manera, los resultados apoyan la tercera hipótesis de concordancia entre la sensibilidad auditiva y las características espectrales del llamado. Además, la MT de adultos respondió a los llamados sintéticos de las tres poblaciones evaluadas (Melipilla, Pucón e Isla de Maipo), dentro del rango de correspondencia ya señalado. Es destacable que la MT presentara una menor respuesta vibratoria ante los llamados de animales provenientes de Melipilla e Isla de Maipo que frente al llamado de animales de Pucón.

La correspondencia existente entre los mayores valores de velocidad de la MT de adultos y juveniles de *L. chiliensis*, y el principal componente de frecuencias de sus llamados de angustia (frecuencia dominante), sugiere que la entrada del sonido a través del tímpano es importante en la detección de vocalizaciones con significancia biológica para esta especie (e.g. Penna y col., 2009). Más aun, es probable que también exista una correspondencia entre la respuesta vibratoria de la MT y los audiogramas de sensibilidad acústica obtenidos desde otras estructuras de la vía auditiva (e.g. papila basilar, nervio coclear) de *L. chiliensis*. En lagartos geckos, por ejemplo, existe una congruencia entre las respuestas de sensibilidad de la MT y del nervio coclear ante la emisión progresiva de estímulos acústicos, las que a su vez predecirían de buena manera las respuestas obtenidas en audiogramas conductuales (Manley, 1990; Werner y col., 1998). Sin embargo, es necesario ser cautos al interpretar el proceso de

percepción de señales acústicas en este lagarto solo a partir de la vibración de la MT, ya que la respuesta espectral exhibida por el tímpano no contempla la pérdida de señal a lo largo de la vía auditiva, la cual ocurre principalmente en la porción cartilaginosa de la cadena osicular o en la transducción de la señal en las células ciliadas de la papila basilar (Gridi-Papp y Narins, 2009). Es fundamental poder evaluar si la respuesta exhibida por otros componentes de la vía auditiva de *L. chiliensis* se relacionaría con la velocidad de respuesta de la MT y las frecuencias enfatizadas en sus llamados de angustia.

Las respuestas de la MT de adultos ante los tres llamados sintéticos poblacionales se encontraron dentro del rango de correspondencia dado entre la curva de respuesta timpánica y los valores de frecuencia dominante del llamado de angustia (2-8 kHz aproximadamente; Fig. 8A). Las respuestas obtenidas ante los llamados sintéticos de Melipilla e Isla de Maipo fueron similares y concordaron con los valores registrados en la función de transferencia de la MT de adultos entre los 2,5 y 3 kHz. Por otro lado, la respuesta exhibida ante el llamado de Pucón fue mayor que la de los otros llamados, y coincidió con la velocidad alcanzada a los 6 kHz, aproximadamente, en la función de transferencia. Convergentemente, estos valores de frecuencia se aproximan a los de la frecuencia del armónico dominante, que a su vez es el armónico fundamental de estos estímulos sintéticos. Por lo tanto, la MT de *L. chiliensis* estaría respondiendo al valor del principal componente de frecuencia de su llamado de angustia. En este sentido, la velocidad registrada ante el llamado de lagartos de Pucón fue superior a la obtenida con los llamados de las otras poblaciones (Fig. 11), debido a que el valor de frecuencia del armónico dominante de este estímulo (6 kHz

aproximadamente) determina una mayor vibración de la MT, como se observa en su función de transferencia (Fig. 8A).

Sin embargo, la mayor velocidad de respuesta de la MT ante el llamado de lagartos de Pucón (heterotípico) no se condice con la menor inmovilidad mostrada por los individuos al percibir este estímulo en los experimentos de *playback*. Lo mismo ocurre, pero de manera inversa, con el llamado de los lagartos de Melipilla (homotípico). Por el momento no es posible dar una explicación clara a esta observación. Es posible que el proceso de decodificación de esta vocalización, y por ende, el grado de inmovilidad mostrado por los individuos al percibir un llamado de angustia, no dependa únicamente de las características espectrales de estos estímulos, sino que también de su componente temporal. Es probable que la mayor duración del llamado homotípico (60 ms), comparada con el llamado heterotípico (43 ms), haya generado una respuesta conductual más intensa en los lagartos. Por ejemplo, en el roedor *Marmota flaviventris* se ha observado que mientras más duraderos son los llamados de angustia que emiten las crías de esta especie, mayor es la respuesta desencadenada en individuos adultos (Blumstein y col., 2008). Es necesario manipular el factor temporal de los llamados de angustia de *L. chilensis* para evaluar su rol en el proceso de decodificación de estas señales a nivel intraespecífico.

## CONCLUSIONES

- Los lagartos llorones de la zona central de Chile responden con un mayor tiempo de inmovilidad frente a un llamado homotípico (de la población local) que ante un llamado heterotípico (de una población distante). Por lo tanto, existiría un reconocimiento de los llamados de angustia a nivel intraespecífico.
- La membrana timpánica del lagarto llorón responde entre los 0,5 y 10 kHz, y tiene una vibración máxima a los 2 kHz aproximadamente.
- La función de transferencia de velocidad de la membrana timpánica varía entre lagartos adultos y juveniles, de la siguiente manera: i) La velocidad máxima registrada ( $V_{max}$ ) es significativamente mayor en adultos que en juveniles, y se correlaciona con el largo hocico-cloaca de éstos, ii) la frecuencia central ( $F_{central}$ ) se correlaciona con el largo hocico-cloaca de los individuos y con la  $V_{max}$ .
- No hubo respuesta timpánica ante los estímulos ultrasónicos en ambas edades, lo que sugiere que el ultrasonido no sería relevante en la comunicación intraespecífica.
- Existe una correspondencia parcial entre las mayores velocidades de respuesta de la membrana timpánica de ambas edades y el rango de valores de frecuencia dominante encontrados en los llamados de angustia, lo cual sugiere que la entrada del sonido a través del tímpano es importante en la detección vocalizaciones con significancia biológica para esta especie.

- La membrana timpánica de individuos adultos respondería al valor de frecuencia del armónico dominante (al mismo tiempo  $F_0$ ) de los llamados de angustia sintéticos característicos de tres poblaciones distintas de este lagarto (Melipilla, Pucón e Isla de Maipo).
- La membrana timpánica fue más sensible al llamado heterotípico (Pucón) que al llamado homotípico (Melipilla). Esta respuesta no se condice con la menor y mayor inmovilidad mostrada por los lagartos ante estos estímulos, respectivamente. Probablemente, la duración de los llamados podría estar influyendo en el grado de inmovilidad que muestran los lagartos llorones al percibir sus llamados de angustia.



## BIBLIOGRAFÍA

- Aubin, T. 1987. Respective parts of the carrier and of the frequency-modulation in the semantics of distress calls. An experimental study on *Sturnus vulgaris* by mean of digital synthesis methods. *Behaviour*. 100: 123-133.
- Aubin, T. 1989. The role of frequency modulation in the process of distress calls recognition by the starling (*Sturnus vulgaris*). *Behaviour*. 108: 57-72.
- Aubin, T. 1991. Why do distress calls evoke interspecific responses? An experimental study applied to some species of birds. *Behavioural Processes*. 23: 103-111.
- Aubin, T. y Brémond, J.C. 1992. Perception of distress call harmonic structure by the starling (*Sturnus vulgaris*). *Behaviour*. 120: 151-163.
- Bardeleben, C., Moore, R.L. y Wayne, R.K. 2005. A molecular phylogeny of the Canidae based on six nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37: 815-831.
- Barnard, C.J. 2004. *Animal behaviour: mechanism, development, function and evolution*. Prentice Hall.
- Blumberg, M.S. y Alberts, J.R. 1990. Ultrasonic vocalizations by rat pups in the cold: an acoustic by-product of laryngeal braking? *Behavioral Neuroscience*. 104: 808-817.
- Blumstein, D.T., Evans, C.S. y Daniel, J.C. 2000. JWatcher 0.9. An Introductory User's Guide. <http://www.jwatcher.ucla.edu/>.
- Blumstein, D.T., Richardson, D.T., Cooley, L., Winternitz, J. y Daniel, J.C. 2008. The structure, meaning and function of yellow-bellied marmot pup screams. *Animal Behaviour*. 76: 1055-1064.
- Blumstein, D.T. y Daniel, J.C. 2004. Yellow-bellied marmots discriminate between the alarm calls of individuals and are more responsive to calls from juveniles. *Animal Behaviour*. 68: 1257-1265.

- Bozzo, V. 2015. Interacciones sociales en *Liolaemus chiliensis* (el lagarto llorón). Tesis para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria y al Título de Médico Veterinario, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Silvoagropecuarias, Universidad Mayor. 35 pp.
- Branch, C.L. y Freeberg, T.M. 2012. Distress calls in tufted titmice (*Baeolophus bicolor*): are conspecifics or predators the target? *Behavioural Ecology*. 23: 854-862.
- Brandt, C., Malmkvist, J., Nielsen, R.L., Brande-Lavridsen, N. y Surlykke, A. 2013. Development of vocalization and hearing in American mink (*Neovison vison*). *The Journal of Experimental Biology*. 216: 3542-3550.
- Brown, A.M. 1984. Ultrasound in gecko distress call (Reptilia: Gekkonidae). *Israel Journal of Zoology*. 33: 95-101.
- Caro, T. 2005. Antipredatory defenses in birds and mammals. The University Chicago Press: Chicago.
- Carothers, J.H., Groth, J.G. y Jaksic, F.M. 2001. Vocalization as a response to capture in the central Chilean lizard *Liolaemus chiliensis* (Tropiduridae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 36: 93-94.
- Conover, M.R. 1994. Stimuli eliciting distress calls in adult Passerines and response of predators and birds to their broadcast. *Behaviour*. 131: 19-37.
- Costa, G.C. 2009. Predator size, prey size, and dietary niche breadth relationships in marine predators. *Ecology*. 90: 2014-2019.
- De Toledo, L.F., Fernando, C. y Haddad, B. 2009. Defensive vocalizations of Neotropical anurans. *South American Journal of Herpetology*. 4: 25-42.
- Donoso-Barros, R. 1966. Reptiles de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Dooling, R.J. y Saunders, J.C. 1975. Hearing in the parakeet (*Melopsittacus undulatus*): absolute thresholds, critical ratios, frequency difference limens, and vocalizations. *Journal of Comparative Physiological and Psychology*. 88: 1-20.

- Dorado-Rodrigues, T.F., Campos, V.A., dos Santos, M.M., Pansonato, A. y Struessmann, C. 2012. Circumstances and bioacoustics of the distress call of *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) during predation by *Thamnodynastes chaquensis* (Serpentes: Dipsadidae) in the Brazilian Pantanal. *Salamandra*. 48: 237-240.
- Driver, P.M. y Humphries, D.A. 1969. The significance of the high-intensity alarm call in captured passerines. *Ibis*. 111: 243-244.
- Endler, J.A. 1986. Defense against predation. En: M.E. Feder y G.V. Lauder (eds), *Predator-prey Relationships, Perspectives and Approaches from the Study of Lower Vertebrates*. pp. 109-134. University of Chicago Press, Chicago.
- Fajfer, M. y González, D. 2013. Pterygosomatid mites of a new group *ligare* (Acariformes: Pterygomatidae: *Pterygosoma*) parasitizing tree iguanas (Squamata: Liolaemidae: *Liolaemus*). *Zootaxa*. 3: 301-319
- Fitch, W.T. 1997. Vocal tract length and formant frequency dispersion correlate with body size in rhesus macaques. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 102: 1213-1222.
- Font, E. y Desfilis, E. 2002. Chemosensory recognition of familiar and unfamiliar conspecifics by juveniles of the Iberian wall lizard, *Podarcis hispanica*. *Ethology*. 108: 1-12.
- Frankenberg, E. y Werner, Y.L. 1984. The defensive vocal «distress» repertoire of gekkonid lizards: intra- and inter-specific variation. *Amphibia-Reptilia*. 5: 109-124.
- Frankenberg, E. y Werner, Y.L. 1992. Vocal communication in the reptilia-facts and questions. *Acta Zoológica Lilloana*. 41: 45-62.
- Freeberg, T.M. y Branch, C.L. 2013. Call variation in Tufted Titmice (*Baeolophus bicolor*) in a distress context: potential sex differences. *Ethology*. 119: 680-691.
- Freidenfelds, N.A., Robbins, T.R. y Langkilde, T. 2012. Evading invaders: the effectiveness of a behavioral response acquired through lifetime exposure. *Behavioral Ecology*. 23: 259-664.
- Gerhardt, H.C. 2013. Geographic variation in acoustic communication: reproductive character displacement and speciation. *Evolutionary Ecology Research*. 15: 605-632.

- Greenberg, N. 1985. Exploratory behavior and stress in the lizard, *Anolis carolinensis*. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 70: 89-102.
- Gridi-Papp, M. y Narins, P.M. 2009. Environmental influences in the evolution of tetrapod hearing sensitivity and middle ear tuning. *Integrative and Comparative Biology*. 49: 702-716.
- Hanson, M.T. y Coss, R.G. 2001. Age differences in the response of California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*) to conspecific alarm calls. *Ethology*. 107: 259-275.
- Hetherington, T. 2001. Laser vibrometric studies of sound-induced motion of the body walls and lungs of salamanders and lizards: implications for lung-based hearing. *Journal of Comparative Physiology A*. 187: 499-507.
- Hoare, M. y Labra, A. 2013. Searching for the audience of the weeping lizard's distress call. *Ethology*. 119: 860-868.
- Hödl, W. y Gollmann, G. 1986. Distress calls in Neotropical frogs. *Amphibia-Reptilia*. 7: 11-21.
- Hogstedt, G. 1983. Adaptation unto death: function of fear screams. *American Naturalist*. 121: 562-570.
- Illmann, G., Hammerschmidt, K., Špinka, M. y Tallet, C. 2013. Calling by domestic piglets during simulated crushing and isolation: a signal of need? *PloS one*. 8: e83529.
- Isley, T.E. y Gysel, L.W. 1975. Sound-source localization by the red fox. *Journal of Mammalogy*. 56: 397-404.
- Johnstone, B.M. y Werner, Y.L. 2001. Hearing in some Australian geckos (Reptilia: Sauria: Gekkonomorpha). *Herpetological Natural History*. 8: 49-56.
- Jonsson, T. 2014. Trophic links and the relationship between predator and prey body sizes in food webs. *Community Ecology*. 15: 54-64.
- Klump, G.M. y Shalter, M.D. 1984. Acoustic behaviour of birds and mammals in the predator context; I. Factors affecting the structure of alarm signals. II. The functional significance and evolution of alarm signals. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 66: 189-226.

- Koepfli, K.P., Deere, K.A., Slater, G.J., Begg, C., Begg, K., Grassman, L., Lucherini, M., Veron, G. y Wayne, R.K. 2008. Multigene phylogeny of the Mustelidae: resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation. *BMC Biology*. 6: 10.
- Konishi, M. 1970. Comparative neurophysiological studies of hearing and vocalizations in songbirds. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*. 66: 257-272.
- Labra, A., Pienaar, J. y Hansen, T.F. 2009. Evolution of thermal physiology in *Liolaemus* lizards: adaptation, phylogenetic inertia, and niche tracking. *American Naturalist*. 174: 204-220.
- Labra, A., Silva, G., Norambuena, F., Velásquez, N. y Penna, M. 2013. Acoustic features of the weeping lizard's distress call. *Copeia* 2013: 206-212.
- Labra, A. y Niemeyer, H.M. 1999. Intraspecific chemical recognition in the lizard *Liolaemus tenuis*. *Journal of Chemical Ecology*. 25: 1799-1811.
- Lind, J. y Cresswell, W. 2005. Determining the fitness consequences of antipredation behavior. *Behavioral Ecology*. 16: 945-956.
- Lingle, S., Wyman, M.T., Kotrba, R., Teichroeb, L.J. y Romanow, C.A. 2012. What makes a cry a cry? A review of infant distress vocalizations. *Current Zoology*. 58: 698-726.
- Manley, G.A. 1972a. Frequency response of the ear of the Tokay gecko. *Journal of Experimental Zoology*. 181: 159-168.
- Manley, G.A. 1972b. The middle ear of the Tokay gecko. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. 81: 239-250.
- Manley, G.A. 1990. *Peripheral hearing mechanisms in reptiles and birds*. New York: Springer-Verlag.
- Martin, J.P., Doucet, S.M., Knox, R.C. y Mennill, D.J. 2011. Body size correlates negatively with the frequency of distress calls and songs of Neotropical birds. *Journal of Field Ornithology*. 82: 259-268.
- Martins, M. y Haddad, C.F. 1988. Vocalizations and reproductive behaviour in the smith frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae). *Amphibia-Reptilia*. 9: 49-60.

- Mathevon, N., Aubin, T. y Brémond, J.C. 1997. Propagation of bird acoustic signals: comparative study of starling and blackbird distress calls. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*. 320: 869-876.
- 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.
- Mella, J.E. 2005. Guía de campo, reptiles de Chile: Zona central. En A.P. Peñaloza, F.F. Novoa y M. Contreras (eds), Centro de Ecología Aplicada Ltda. Page xii + 147. Santiago, Chile.
- Møller, A.P. y Nielsen, J.T. 2010. Fear screams and adaptation to avoid imminent death: effects of genetic variation and predation. *Ethology, Ecology and Evolution*. 22: 183-202.
- Nakano, R., Nakagawa, R., Tokimoto, N. y Okanoya, K. 2013. Alarm call discrimination in a social rodent: adult but not juvenile degu calls induce high vigilance. *Journal of Ethology*. 31: 115-121.
- Neudorf, D.L. y Sealy, S.G. 2002. Distress calls in birds of a Neotropical cloud forest. *Biotropica* 34: 129-137.
- Penna, M., Gormaz, J.P. y Narins, P.M. 2009. When signal meets noise: immunity of the frog ear to interference. *Naturwissenschaften*. 96: 835-843.
- Perrone, M. 1980. Factors affecting the incidence of distress calls in passerines. *The Wilson Bulletin*. 92: 404-408.
- Pincheira-Donoso, D. y Núñez, H. 2005. Las especies chilenas del genero *Liolaemus* Wiegmann, 1834 (Iguania: Tropicuridae: Liolaeminae): Taxonomía, sistemática y evolución. *Publicación Ocasional del Museo Nacional de Historia Natural*. 59: 4-486.
- Pitocchelli, J. 2014. Song discrimination by male Mourning Warblers (*Geothlypis philadelphia*) and implications for population divergence across the breeding range. *The Canadian Field-Naturalist*. 128: 408-415.
- Relkin, E.M. 1988. Introduction to the analysis of the middle ear. En: A.F. Jahn y J. Santos-Sacchi (eds), *Physiology of the Ear*. pp. 103-124. New York: Raven Press.

- Riede, T., Herzog, H., Mehwald, D., Seidner, W., Trumler, E., Böhme, G. y Tembrock, G. 2000. Nonlinear phenomena in the natural howling of a dog-wolf mix. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 108: 1435-1442.
- Rosowski, J.J., Ketten, D.K. y Peake, W.T. 1988. Allometric correlations of middle-ear structure and function in one species: the alligator lizard. *Abstracts of the Eleventh Midwinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology*.
- Russ, J.M., Jones, G., Mackie, I.J. y Racey, P.A. 2004. Interspecific responses to distress calls in bats (Chiroptera: Vespertilionidae): a function for convergence in call design? *Animal Behaviour*. 67: 1005-1014.
- Russ, J.M., Racey, P.A. y Jones, G. 1998. Intraspecific responses to distress calls of the pipistrelle bat, *Pipistrellus*. *Animal Behaviour*. 55: 705-713.
- Saunders, J.C., Duncan, R.K., Doan, D.E. y Werner, Y.L. 2000. The middle ear of reptiles and birds. En: R.J. Dooling, R.R. Fay y A.N. Popper (eds). *Comparative Hearing: Birds and Reptiles*. pp. 13-69. Springer, New York, USA.
- Smith, A.K. 1977. Attraction of bullfrogs (Amphibia, Anura, Ranidae) to distress calls of immature frogs. *Journal of Herpetology* 11: 234-235.
- Stefanski, A. y Falls, J.B. 1972. A study of distress calls of song, swamp, and white-throated sparrows (Aves: Fringillidae). II. Interspecific responses and properties used in recognition. *Canadian Journal of Zoology*. 50: 1513-1525.
- Teichroeb, L.J., Riede, T., Kotrba, R. y Lingle, S. 2013. Fundamental frequency is key to response of female deer to juvenile distress calls. *Behavioural processes*. 92: 15-23.
- Toledo, L.F. y Haddad, C.F.B. 2009. Defensive vocalizations of Neotropical anurans. *South American Journal of Herpetology*. 4: 25-42.
- Vergne, A.L., Aubin, T., Taylor, P. y Mathevon, N. 2011. Acoustic signals of baby black caimans. *Zoology*. 114: 313-320.
- Vergne, A.L., Thierry, A., Martin, S. y Mathevon, N. 2012. Acoustic communication in crocodylians: information encoding and species specificity of juvenile calls. *Animal Cognition*. 15: 1095-1109.
- Vidal, N. y Hedges, S.B. 2009. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenias. *Comptes Rendus Biologies*. 332: 129-139.

- Werner, Y.L. e Igić, P.G. 2002. The middle ear of gekkonoid lizards: interspecific variation of structure in relation to body size and to auditory sensitivity. *Hearing Research*. 167: 33-45.
- Werner, Y.L., Igić, P.G., Seifan, M. y Saunders, J.C. 2002. Effects of age and size in the ears of gekkonomorph lizards: middle-ear sensitivity. *Journal of Experimental Biology*. 205: 3215-3223.
- Werner, Y.L., Igić, P.G. y Saunders, J.C. 2001. Effects of surgery and other experimental factors on the evaluation of middle ear function in gekkonoid lizards. *Hearing Research*. 160: 22-30.
- Werner, Y.L., Montgomery, L.G., Safford, S.D., Igić, P.G. y Saunders, J.C. 1998. How body size affects middle-ear structure and function and auditory sensitivity in gekkonoid lizards. *Journal of Experimental Biology*. 201: 487-502.
- Werner, Y.L., Montgomery, L.G., Seifan, M. y Saunders, J.C. 2008. Effects of age and size in the ears of gekkotan lizards: auditory sensitivity, its determinants, and new insights into tetrapod middle-ear function. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 456: 951-967.
- Wever, E.G. y Werner, Y.L. 1970. The function of the middle ear in lizards: *Crotaphytus collaris* (Iguanidae). *Journal of Experimental Zoology*. 175: 327-341.
- Wilczynski, W., McClelland, B.E. y Rand, A.S. 1993. Acoustic, auditory, and morphological divergence in three species of Neotropical frog. *Journal of Comparative Physiology A*. 172: 425-438.
- Wilkins, M.R., Seddon, N. y Safran, R.J. 2013. Evolutionary divergence in acoustic signals: causes and consequences. *Trends in Ecology and Evolution*. 28: 156-166.
- Wilkinson, R. y Huxley, C.R. 1978. Vocalizations of chicks and juveniles and the development of adult calls in the Aldabra White-throated rail *Dryolimnas cuvieri aldabranus* (Aves: Rallidae). *Journal of Zoology*. 186: 487-505.