



**NEUROANATOMÍA DEL CONTROL MUSCULAR DE
LA SIRINGE Y SU RELACIÓN CON EL
REPERTORIO VOCAL DE 4 ESPECIES
SUBOSCINAS CHILENAS**

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

TOMÁS SALAS ORCHARD

Marzo, 2023

Directores de Tesis:

**JORGE MPODOZIS MARÍN
MÁXIMO FERNÁNDEZ VILLAFANA
MACARENA FAUNES CARVALLO**

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 Magíster presentada por el candidato.

Tomás Salas Orchard

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Jorge
Mpodozis

Co-Directores de Tesis

Dr. Máximo
Fernández

Dr. Macarena Faunes

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Mario Penna

Dr. Rodrigo Vásquez

A los ojos rojos del diucón,
su transparencia.

Resumen Biográfico



Nací en 1996, en la capital. En el colegio nunca me gustó la Biología, pero sí ir al cerro, cosa que hice desde pequeño motivado por mis padres. Un profesor de Filosofía en la media me hizo leer a Morin, Prigogine, Schrödinger y Maturana & Varela, entre otros. Quedé condenado a ver en la vanguardia de las ciencias una redención -una vuelta de tuerca, quise- a cierta infertilidad que la cultura dominante atribuye a las humanidades. Ingresé a Biología en la Chile con el deseo de poder reflexionar sobre las bases biológicas del lenguaje y sobre el origen y evolución de los seres vivos. Harto de no hallar por ninguna parte canalización para ese deseo, congelé en tercer año pensando cambiarme de carrera. Hecho el trámite, salí de secretaría de estudios y en el pasillo vi un cartel del curso de Neuroetología del Rayo.

Al principio las clases eran como oír uzbeko, pero supe enseguida que ese era el lugar que estaba buscando. Me asombró la neuroanatomía comparada en contexto evolutivo, y aprendí algo de técnicas histológicas y electrofisiológicas complejas, pero sólo hasta que me invitaron a grabar pájaros al cerro, y a estudiar la evolución de su canto, pude ver en el quehacer de biólogo algo a lo que realmente quisiera dedicarme. Esta tesis es el resultado formal, de dos años de madrugar para ir a entrometerse en bosques aledaños a la ciudad, a espiar y aprender cómo viven y cantan las turcas, los tapaculos, los fio fíos, los tijerales, los rayaditos, los chucaos, los hues hues, los diucones, entre otros.

Agradecimientos

al

monte del barrio las Perdices, en el Bosque Panul, en la Quebrada de la Plata, en la Senda Darwin y en Pupelde. Por regalarnos la conciencia y urgencia de este vínculo perdido.

a

Viole por ser el equipo que somos;

Mapas y *Juli* por toda la vida y su apoyo en este proceso particular;

Máximo, primero por haberme acogido como aprendiz de anatomista y más tarde invitarme a esta aventura en que hemos ido aprendiendo a descubrir la maravilla de nuestra biodiversidad;

Maca por financiarme y convertirme en un pilar de todo el trabajo que he hecho en relación a la anatomía de la siringe;

Jompoma por permitir una tesis así en tu laboratorio y por tu entusiasmo en velar que la Biología y sus estudiantes reflexionemos;

Marce por tu enorme apoyo técnico en los análisis de esta tesis y tu motivación contagiosa;

Elisa por tu ternura y crianza histológica desinteresada;

Toto por tu compañerismo y complicidad tesística;

Maricel por tus sugerencias e inquisiciones al callo sobre los resultados de esta tesis y por alimentarme;

Amanda por haber nutrido nuestros terrenos de motivación;

Fonchi por tu amistad y tu rigor neurobiológico enseñado;

Sara por tu ayuda preciada en los análisis anatómicos;

Pablo Henny y *Rafael Gatica* por permitirme usar su microscopio y el gentil apoyo técnico para usarlo;

Manfred, *Carolina* y *Albertine* por haber gustado de este trabajo;

Juan Salazar, *Fernando Navea*, *Janis Donaire* y *Benjamín Maldonado* por la expertiz de terreno compartida;

Chico por los reactivos más de una vez, sin problemas compartidos;

Javi y *Joaco*, por llevarme o acompañarme a terreno más de una vez y darme ánimo, tantas veces.

Y por último, a *Relmu*, por tu amanecer.

Índice de Materias

Lista de Tablas y Lista de Figuras

Lista de Abreviaciones

Resumen

Abstract

1. INTRODUCCIÓN.

1.1.- **Anatomía.** Anatomía anatomía de la siringe y del sistema del canto

1.2.- **Vocalizaciones y Modo de Vida.** Diversidad vocal en aves Passeriformes e Historia Natural de las especies estudiadas

1.3.- **Hipótesis,** Objetivos y Planteamiento del problema

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.- **Permisos**

2.2.- **Terrenos:** grabaciones y capturas

2.3.- **Histología:** siringes y cerebros

2.4.- **Análisis anatómico**

2.5.- **Análisis bioacústico y estadístico**

3. RESULTADOS.

3.1.- **Anatomía de la Siringe**

3.2.- **Anatomía de nXII**

3.3.- **Conteo motoneuronas de nXII y axones de Ts**

3.4.- **Repertorios Vocales**

3.5.- **Análisis PCA repertorios Turca y Fíofío**

3.6.- **Comparación repertorios y datos anatómicos**

4. DISCUSIÓN.

4.1.- **Anatomía y Repertorios Vocales**

4.2.- **Relevancia inervación de la SIM y estructura muscular siringe**

5. BIBLIOGRAFÍA.

Lista de Tablas

Resultados -

Tabla 1. Resumen de los números de anatomía obtenidos para los 9 ejemplares examinados de las 5 especies de aves. (p. 35)

Tabla 3. Resumen de características espectrales de frecuencia (gris), contexto conductual (verde) y subtipos (beige) de las vocalizaciones tipo del repertorio de los dos rinocriptidos. (p. 43)

Tabla 3. Resumen de características espectrales de frecuencia (gris), contexto conductual (verde) y subtipos (beige) de las vocalizaciones tipo del repertorio de los dos tiránidos. (p. 47)

Tabla 4. Promedios de Delta Frecuencia (DeltaF) de distintos aspectos del repertorio para los 4 suboscinos del estudio. (p. 53)

Lista de Figuras

Introducción -

Figura 1.i. Esquemas de siringe de Passeriformes. (p. 2)

Figura 1.ii. Sistema del canto oscino en el contexto filogenético de la clase Aves, y su comparación a Suboscinos al nivel del cerebro posterior en el bulbo raquídeo. (p.4)

Figura 1.iii. Historia natural y ubicación de las 5 aves del estudio dentro del orden Passeriformes. (p. 7)

Métodos -

Figura 2.i. Tres tipos de cortes de siringe realizados. (p. 12)

Figura 2.ii. Modo de conteo de motoneuronas del programa StereoInvestigator. (p.15)

Figura 2.iii. Modo de conteo de axones del nervio Ts en el programa ImageJ. (p.16)

Figura 2.iv. Modo en que se seleccionaron las vocalizaciones nota por nota en el programa Raven Pro. (p.17)

Resultados -

Figura 3.i. Siringes de las cinco especies en estudio. (p. 20)

Figura 3.ii. Detalle de la siringe completa de los 4 suboscinos. (p. 22)

Figura 3.iii. Extensión de SIM de los 4 suboscinos en el eje dorsoventral, en cortes de siringe completa teñidos con He y Myo. (p. 24)

Figura 3.iv. Inervación de TL y pared traqueal interna por Ts, con inmunohistoquímica en cortes Tqtv y Tqlg de Chucao, Diucón, Fíofío y ZF. (p. 26)

Figura 3.v. Inervación de SIM, SEM, PV y pared traqueal interna, con inmunohistoquímica en cortes Sirlg de los dos rinocriptidos. (p. 28)

Figura 3.vi. Inervación de SIM y SEM, con inmunohistoquímica en cortes Sirlg los dos tiránidos y ZF. (p. 30)

Figura 3.vii. Cortes coronales de cerebro tratados con NISSL y CHAT de los dos rinocriptidos. (p. 32)

Figura 3.viii. Cortes coronales de cerebro tratados con NISSL y CHAT de los dos tiránidos y ZF. (p. 34)

Figura 3.ix. Comparación de los resultados obtenidos para conteos de axones de Ts, motoneuronas de nXII y normalización por peso de cerebro del n.º de motoneuronas de nXII, por especie. (p. 36)

Figura 3.x. Vocalizaciones tipo que componen el repertorio vocal de ambos rinocriptidos, la Turca y el Chucao. (p. 42)

Figura 3.xi. Vocalizaciones tipo que componen el repertorio vocal de ambos tiránidos, el Diucón y el Fíofío. (p. 46)

Figura 3.xii. Resultados de PCA para el repertorio de Turca seleccionado por notas, a partir de 44 instancias grabadas para 7 de sus 9 vocalizaciones tipo. (p. 51)

Figura 3.xiii. Resultados de PCA para el repertorio de Fíofío seleccionado por notas, a partir de 45 instancias para 8 de sus 10 vocalizaciones tipo. (p. 52)

Figura 3.xiv. Correlaciones entre datos anatómicos, tamaño del repertorio y delta de frecuencia promedio del repertorio de las especies estudiadas. (p. 54)

Discusión -

Figura 4.i. Comparación la estructura acústica de la canción territorial de los 4 suboscinos en el contexto de la estructura de sus siringes. (p. 65)

Lista de Abreviaciones

BL: Labios bronquiales (*del inglés “bronchial labia”*), par de membranas interna de la siringe que controlan la presión de aire, y por ende la modulación de la frecuencia de las vocalizaciones en Passeriformes (*indicados con flechas o caracteres calipso en las Figuras*).

BLl: Labios bronquiales laterales, situados en la pared interna de la siringe, en relación a los elementos cartilagosos A1 y A2.

BLm: Labios bronquiales mediales, situados en la pared interna de los bronquios, justo debajo de la juntura medial de los bronquios (*pessulus* en oscinos).

Cc: canal central o acueducto central del cerebro, visible en cortes coronales posteriores del bulbo raquídeo.

CHAT: Tinción inmunohistoquímica contra la enzima colina acetil transferasa.

CTb: Trazador neuronal hecho desde la Toxina beta del Cólera (*del inglés Cholera toxin Beta*).

DAB: Diaminobenzidina. Reactivo que da la coloración oscura en las inmunohistoquímicas cromogénicas utilizadas.

DeltaF: Delta de Frecuencia.

Dm: porción dorsomedial de nXII.

FLM: Fascículo longitudinal medial, situado entremedio de ambos pares de nXII a lo largo de todos los cortes coronales de bulbo raquídeos realizados.

He: Tinción de Hematoxilina Eosina.

M. Fernández: Máximo Fernández

Myo: Tinción inmunohistoquímica contra la proteína de citoesqueleto “Miosina” (*del inglés “myosine”*).

NF: Tinción inmunohistoquímica contra la proteína de filamento intermedio de axones de neuronas “Neurofilamento”.

nX: Núcleo diez del nervio vagal, situado sobre nXII en cortes coronales anteriores y mediales del bulbo raquídeo.

nXII: Núcleo doce del nervio hipogloso-traqueosiringeo, ubicado en el bulbo raquídeo o cerebro posterior que recibe proyecciones del núcleo rotundo del arcopalio y proyecta sobre la musculatura intrínseca de la siringe y el la lengua.

OL: Obliquus Lateralis, segundo SIM del Fíofío (*indicado con flechas o caracteres rojos en las figuras*).

OV: Obliquus Ventralis, SIM compartido por el Diucón y el Fíofío (*indicado con flechas o caracteres rojos en las figuras*).

PCA: Análisis de componentes principales (*del inglés “Principal Components analysis”*).

PFA: Paraformaldehído 4% en buffer salino.

PV: *Processus vocalis* o Proceso vocal, elemento cartilaginoso de la siringe de la suprafamilia Furnarii, dentro de ella, los rinocriptidos (*indicado con flechas o caracteres azules en las figuras*).

QP: Quebrada de la Plata, Estación Experimental Germán Greve, Rinconada, Maipú.

RAM: Núcleo retroambiguo, centro de control respiratorio

Rinocriptido/a/-s: Especie perteneciente a la familia *Rhinocryptidae* de aves suboscinas.

SD: Senda Darwin, Estación Biológica, Ancud, Chiloé.

SEM: Musculatura extrínseca de la siringe (del inglés "*syrinx extrinsic musculature*").

SIM: Músculo intrínseco o musculatura intrínseca de la siringe (del inglés "*syrinx intrinsic musculature*").

Sirlg: cortes longitudinales de siringe.

Ssp: Núcleo Supraespinal, situado bajo el nXII en cortes coronales posteriores y mediales del bulbo raquídeo.

ST: Sternotrachealis, músculo que surge la tráquea al nivel de la siringe (rinocriptidos) o sobre ella (tiránidos) para ir hacia el esternón (*indicado con flechas o caracteres verde oscuro en las figuras*).

SV2: Tinción inmunohistoquímica contra la glicoproteína de membrana vesicular de sinapsis SV2.

Tiránido/a/-s: Especie perteneciente a la familia *Tyrannidae* de aves suboscinas.

TL: Tracheolateralis, músculo que recorre la traquea y la siringe (*indicado con flechas o caracteres naranjos o amarillos en las figuras*).

TM: Membrana traqueal (del inglés *Tracheal membrane*), exclusiva de suboscinos traqueófonos, es decir, del parvorden Furnariida, consistente de una porción ventral (TMv) y una porción dorsal (TMd) situada entre ambos PV.

Tqlg: cortes longitudinales de tráquea.

Tqtv: cortes transversales de tráquea.

Ts: Rama traqueosiríngea del nervio hipogloso-traqueosiríngeo.

VD: Vocalis Dorsalis, SIM de rinocriptidos (*indicado con flechas o caracteres rojos*).

VI: porción ventrolateral de nXII.

ZF: Pinzón cebrado o diamante (del inglés "*Zebra Finch*"), ave oscina modelo

Resumen

El estudio de las aves suboscinas (sub-orden del orden Passeriformes) ha sido opacado por el estudio del sub-orden hermano, las aves cantoras oscinas, debido a la extensa evidencia de repertorios vocales amplios y aprendizaje del canto en el segundo. Los Oscinos, poseen un elaborado circuito sensomotor como sustrato de sus vocalizaciones plásticas, el sistema del canto. Los Suboscinos, generalmente considerados vocalizadores innatos carentes de un sistema del canto, emergen como un caso de interés luego de evidencia de conductas vocales complejas y estructuras similares a aquellas del sistema del canto en ciertas especies.

En este trabajo estudiamos a 4 Suboscinos chilenos: la Turca, *Pteroptochos megapodios*, y el Chucao, *Scelorchilus rubecula* (familia *Rhinocryptidae*); y el Fíofío, *Elaenia chilensis*, y el Diucón, *Pyrope pyrope*, (familia *Tyrannidae*). En primer lugar, realizamos una descripción de las características estructurales y neuromusculares de su órgano vocal, la siringe. En segundo lugar, contamos el número de motoneuronas del principal núcleo del cerebro posterior inervando la musculatura intrínseca de la siringe (**SIM**), el núcleo XII (**nXII**) y en 4 especies, el número de axones en su nervio traqueosiríngeo (**Ts**). Dichos datos anatómicos también fueron obtenidos para el modelo oscino, *Taeniopygia guttata*, el diamante o pinzón cebrado (**ZF**) extensamente estudiado, que permitió que nuestros resultados en Suboscinos fueran contextualizados comparativamente. En tercer lugar, presentamos el repertorio vocal de los 4 Suboscinos estudiados, construido en base a criterios conductuales formados a partir de 2 años de trabajo de campo. Buscando correlacionar el tamaño y variabilidad de sus repertorios al grado de innervación motora de su siringe, encontramos repertorios equivalentemente amplios (9-10 vocalizaciones tipo) en la Turca, el Fíofío y -preliminarmente- el Chucao, a pesar de la siringe menos muscular en el grupo rinocriptido en comparación a los tiránidos; y 5 tipos vocales -preliminares- en el Diucón. Las categorías vocales se profundizaron en el programa bioacústico Raven Pro y fueron examinadas por análisis estadísticos de componentes principales (**PCA**) para la Turca y el Fíofío.

Nuestros resultados muestran cómo altos números de motoneuronas del nXII y de axones del Ts, en conjunto a abundante SIM, no dan cuenta del tamaño de los repertorios vocales, sino que explican la capacidad de estas aves de producir una conducta vocal más variable en el dominio de la frecuencia, y por ello, presentar elementos vocales mixtos en una misma instancia vocal. Los resultados de esta tesis destacan la significativa diversidad neuroanatómica y vocal de Suboscinos chilenos, esto es, repertorios vocales con múltiples vocalizaciones tipo y subtipos, con siringes menos o mucho menos musculares que un Oscino pero abundantemente inervadas, y sugieren mecanismos explicativos diferentes para la modulación *activa* de frecuencia de las vocalizaciones, asociada a la innervación de la siringe, versus la modulación *estructural* de su frecuencia, asociada a la estructura de la siringe.

Abstract

The study of suboscine birds (sub-order of the order Passeriformes) has been overshadowed by the study of its sister sub-order, the oscine songbirds, due to the extended evidence for wide vocal repertoires and song learning in the second. Oscines possess an elaborate neural sensorimotor circuitry sustaining their plastic vocalizations, the song-system. Suboscines, generally considered innate vocalizers lacking a song-system, emerge as a case in point after evidence of complex vocal behaviours and songsystem-like structures in certain species.

In this work we studied 4 Chilean Suboscines: the Turca, *Pteroptochos megapodios*, and the Chucao, *Scelorchilus rubecula* (family *Rhinocryptidae*); and the Fíofo, *Elaenia chilensis*, and the Diucón, *Pyrope pyrope*, (family *Tyrannidae*). On the first place, we described structural and neuromuscular characteristics of their vocal organ, the syrinx. On the second place, we counted the number of motoneurons of the main hindbrain nucleus innervating the syrinx's intrinsic musculature (**SIM**), the XII nucleus (**nXII**), and in 4 species, the number of axons in the tracheosyringeal nerve (**Ts**). This anatomical data was also obtained for the extensively studied oscine model, *Taeniopygia guttata*, the Zebra Finch (**ZF**), which allowed our results for Suboscines to be contextualized comparatively. On the third place, we built the vocal repertoire of the 4 Suboscines, based on behavioral criteria formed along 2 years of field work. Aiming to correlate the size and variability of their repertoires to the degree of motor innervation of their syrinx, we found equally ample repertoires (9-10 vocalization types) in the Turca, the Fíofo, and -preliminarily- the Chucao, despite the lesser muscular syrinx in the rhinocryptids in comparison to the tyrannids; and 5 -preliminary- vocal types in the Diucón. Vocal categories were further explored with the bioacoustics software Raven Pro and examined through principal components analysis (**PCA**) for the Turca and the Fíofo.

Our results show how high numbers for both nXII motoneurons and Ts axons, don't account for vocal repertoire sizes, but rather explain these birds' capacity of producing a more variable vocal behavior on the frequency domain, and thus, present mixed vocal elements on the same vocal event. This thesis' results highlight Suboscines' significant neuroanatomical and vocal diversity, that is, vocal repertoires with multiple vocalization types and subtypes, with lesser or much lesser muscular syringes than an Oscine, though highly innervated, and suggests different explicative mechanisms for the *active* modulation of frequency of vocalizations, associated to the innervation of the syrinx, versus their *structural* modulation of frequency, associated to the structure of the syrinx.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Anatomía. Anatomía de la siringe y del sistema del canto.

La siringe, el órgano vocal de las aves, consiste en una especialización de la juntura tráqueo bronquial. Esta estructura, única de la clase Aves, presenta morfologías altamente diversas entre especies del grupo (Ames 1971; Düring & Elemans 2016; Goller 2022) (Figura 1.i A-C). En el orden Passeriformes, y particularmente en el suborden Oscinos, la siringe presenta una musculatura muy desarrollada, cuya actividad modula la frecuencia principal de las vocalizaciones, mediante oclusión o liberación del paso del aire, y el control de la tensión de membranas vibratorias (Fig. 1.i A-B).

El plan estructural de la siringe de un ave paseriforme oscina consiste en un engrosamiento de la tráquea en el punto de bifurcación en dos bronquios. Esta zona queda cubierta parcialmente por musculatura intrínseca (SIM) cuyas fibras nacen y terminan en la misma siringe, insertándose en anillos traqueales modificados (A1, A2, etc.). Las fuentes fonatorias en la siringe de Oscinos son dos pares de membranas gruesas llamadas labios bronquiales (BL), los cuales se ubican al inicio de cada bronquio, en la pared interna lateral y medial asociados a los anillos traqueales (Mindlin & Laje, 2005; Düring y col., 2013). La extensión de la siringe en Passeriformes se considera desde la inserción más anterior de la SIM, hasta los primeros anillos bronquiales modificados (B1, según la nomenclatura usada en este escrito), mientras que en otras familias, se mide con respecto a otras estructuras como “hitos” demarcadores (Ames, 1971).

En la Figura 1.i B, se ve en mayor detalle la siringe típica de un Oscino, en este caso el cuervo americano. Ésta, además de los músculos intrínsecos -varios pares-, presenta dos pares de músculos extrínsecos (SEM) anclados a otras partes del cuerpo en un extremo y a la siringe en el otro. Tracheolateralis (TL) se encuentra unido a la tráquea en toda su extensión rostral y a la siringe en el extremo caudal; el segundo, Sternotrachealis (ST) se une a la siringe en un extremo y al esternón en el otro (Ames 1971; Mindlin & Laje 2005; Düring y col 2013).

En el suborden hermano de Oscinos, los Suboscinos (Fig. 1.ii A), se pueden reconocer de forma general dos planes estructurales de siringes: a) una siringe presente en el parvorden Tyrannida, similar al morfotipo oscino pero con menor desarrollo y número de pares de SIM; y b) una siringe presente en el parvorden Traqueófono (Fig. 1.i C) que difiere del morfotipo oscino en dos aspectos: por un lado en la posición y desarrollo de su SIM, normalmente más reducida y situada sobre el músculo extrínseco ST; y por otra parte por la presencia de dos estructuras novedosas, un elemento cartilaginoso llamado Processus Vocalis (PV), sobre el cual se inserta la SIM, y una tercera fuente de sonido en el centro de la siringe llamada membrana traqueal (TM) (Ames, 1971, Amador y col., 2008, Goller 2022). La

presencia de estas dos estructuras (PV y TM) son un rasgo sinapomórfico del grupo traqueófono (García y col., 2017).

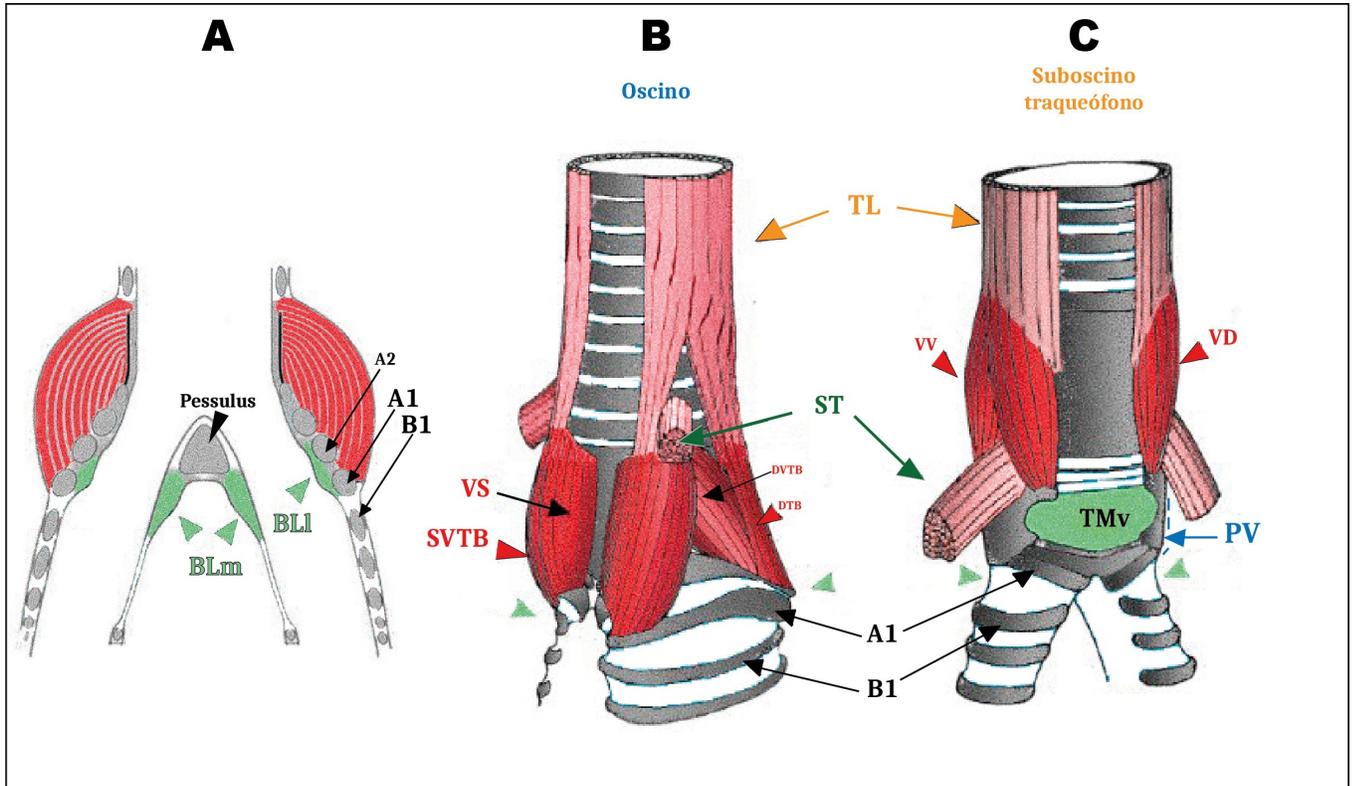


Figura 1. i. Esquemas de siringe de Passeriformes. La musculatura extrínseca (SEM) está coloreada con rosado claro, y la musculatura intrínseca (SIM) está coloreada en rojo oscuro. Los elementos cartilaginosos están en gris. Colores de flechas y letras que indican y nombran a PV (azul), TL (naranja), ST (verde oscuro), SIM (rojo) y labios y membranas fonatorias (calipso), constituyen el código de color usado para todas las figuras de siringe del escrito. **A.** Corte coronal de la siringe de un Oscino, donde la posición de cada par de labios bronquiales es similar para un suboscino no traqueófono (como *tiránidos*). **B.** Esquema en vista ventrolateral de la siringe de un oscino, el cuervo americano, *Corvus brachyrhynchus*, con la posición de cada par de BL indicada. **C.** Esquema en vista ventral de la siringe de un suboscino traqueófono, el picoguadaña, *Campylorhamphus trochilirostris*. Comparte los mismos elementos de su siringe con los rinocriptidos estudiados, excepto su segundo SIM, VV. La membrana traqueal sobresale en calipso con fines ilustrativos, pero en la realidad se encuentra en la pared interna de esta. A1: primer elemento cartilaginoso plano desde posterior a anterior, al que se inserta SIM en oscinos y tiránidos, y PV en suboscinos traqueófonos. A2: segundo elemento cartilaginoso plano desde posterior a anterior. B1: primer elemento cartilaginoso redondo desde A1 hacia posterior. BLl: Labios bronquiales laterales. BLm: Labios bronquiales mediales. DTB: músculo traqueobranquial dorsal. DVTB: músculo traqueobranquial profundo. PV: Elemento cartilaginoso-esquelético Processus Vocalis. ST: músculo sternotrachealis. SVTB: músculo intrínseco superficial ventral. TL: músculo tracheolateralis. TMv: membrana traqueal ventral. VD: músculo intrínseco vocalis dorsalis. VS: músculo síringeo ventral. VV: músculo intrínseco vocalis ventralis.

La musculatura de la siringe es innervada por la rama traqueosiringea (Ts) del nervio hipogloso, cuyas ramas bajan por la tráquea a través del músculo extrínseco TL. El núcleo motor que origina los axones de Ts es el duodécimo par craneal, o núcleo hipogloso (nXII) (Fig 2.ii B), ubicado en el bulbo raquídeo. Este núcleo se pueden reconocer dos subdivisiones, una traqueosiringea de mayor tamaño ubicada más caudal, y otra lingual de menor tamaño situada en la parte más rostral (Roberts y col., 2007).

En Oscinos, el nXII es el nervio motor de una red de núcleos cerebrales especializados en el control de la estructura de la siringe y por lo tanto en la modulación activa de las emisiones vocales, denominado sistema del canto (Fig. 2.ii B) (Akutagawa y col., 2010; Sakata y col., 2020). Además, esta red está presente en formas análogas en todos los grupos de aves donde se ha demostrado aprendizaje vocal como Oscinos, loros y colibríes (Gahr, 2000). Este aprendizaje se refiere a la capacidad de aves de aprender nuevas vocalizaciones mediante la interacción con uno o más tutores durante la ontogenia temprana (Janik & Slater, 2000), o más tarde a lo largo de la ontogenia, incorporando nuevos elementos acústicos al repertorio de vocalizaciones (Nottebohm & Nottebohm, 1978; Ten Cate, 2021).

Por otra parte, estudios filogenéticos recientes han situado a los loros, orden Psittaciformes, en proximidad filética a Oscinos (Fig 2.ii A) (Suh y col., 2011, Kuhl y col., 2020). Esto ha configurado un escenario evolutivo en que el suborden hermano de Oscinos, los Suboscinos, surge como candidato a ser estudiado en detalle por la presencia de estructuras del sistema del canto y el desarrollo de su conducta vocal.

En Oscinos la proyección directa desde el telencéfalo hacia el nXII (Fig 2.ii C.) así como al centro premotor respiratorio (RAm) se ha descrito como un rasgo central en la plasticidad vocal y el control motor (Albert & Daniel, 1996). Si bien esta conectividad al nXII no se ha demostrado en Suboscinos, existe evidencia en un Suboscino norteamericano (de la familia *Tyrannidae*) que muestra una proyección extratelencefálica directa hacia RAm (Fig. 2.ii D), lo que sugiere la posibilidad de control activo del flujo de aire que atraviesa la siringe, y así, sobre los aspectos temporales de sus vocalizaciones (Liu y col., 2013; Janik & Slater 2000).

Además, como antecedente a esta tesis se estudió parte de la conectividad de este sistema en el Suboscino chileno Fíofo (también de la familia *Tyrannidae* Fig 2.ii E). Mediante un experimento de trazado neural, se marcó la proyección de las motoneuronas de nXII hacia el Ts, junto a las dendritas de las neuronas del nXII, las que se extienden hacia el núcleo RAm. Este resultado, muestra que al menos una parte posterior de la vía del sistema del canto estaría presente en un Suboscino chileno. Además, se observó una musculatura intrínseca (SIM) considerable en la siringe del Fíofo.

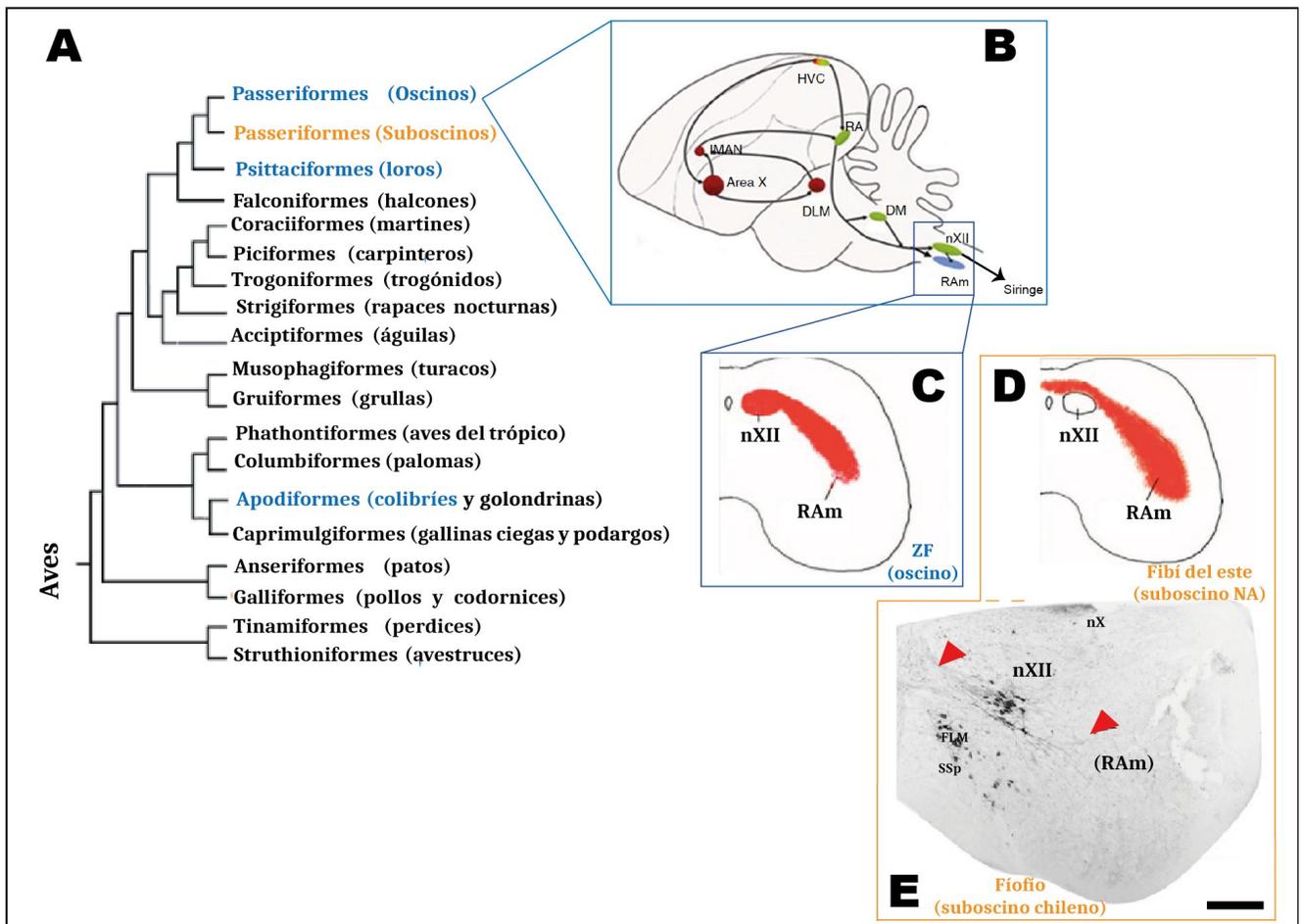


Figura 1.ii. Sistema del canto oscino en el contexto filogenético de la clase Aves, y su comparación a Suboscinos al nivel del cerebro posterior en el bulbo raquídeo. **A.** Filogenia de los órdenes de la clase Aves (modificado de Liu y col, 2013), Passeriformes dividido en dos subórdenes mayores, Oscinos y Suboscinos. En azul: Oscinos, Psittaciformes (loros) y Apodiformes (dentro de estos, en particular, colibríes), quienes presentan aprendizaje vocal; y en amarillo: Suboscinos. Hacia abajo: aves consideradas más basales, y hacia arriba las más derivadas. **B.** Esquema del sistema del canto oscino en el plano sagital (modificado de Liu y col, 2013), con los núcleos pertenecientes a la porción anterior o sensorial en rojo, y los núcleos de la porción posterior o motora del sistema, en verde claro -excepto RAM, en azul-. **C.** Esquema sagital del hemisferio derecho del bulbo raquídeo de un ZF inyectado con un trazador neuronal anterógrado (Dil, C12) en el núcleo robusto del arcopalio (RA), con trayectoria de fibras arcopaliales que ingresan tanto a nXII como a RAM. Plano sagital. **D.** Esquema sagital del bulbo raquídeo de un suboscino -*Sayornis phoebe*, fibí del este-, al que se hizo la misma inyección. En rojo, trayectoria de fibras arcopaliales que rodean nXII y terminan en RAM. **E.** Vista en coronal a 4X, del hemisferio derecho del bulbo raquídeo de un suboscino chileno, el Fiofio, inyectado con un trazador retrógrado (CTb, *del inglés cholera toxin beta*) en Ts. Somas de células de nXII se llenan, cuyas fibras se extienden hacia RAM (antecedente de esta tesis, trabajo de M. Fernández). Área X: núcleo de ganglios basales del palio. DLM: nucleus dorsolateralis anterior thalamis. DM: núcleo dorsomedial del tálamo. FLM: fasciculus longitudinalis medialis. HVC: núcleo

mesopallial integrador de la parte auditiva y motora del sistema del canto. LMAN: núcleo magnocelular lateral, del neostriado anterior. nX: núcleo diez del nervio vago. nXII: núcleo doce del nervio hipogloso-traqueosiríngeo. RA: núcleo robusto del arcopalio. RAm: nucleus retroambigualis, centro de control respiratorio. SSp: nucleus supraspinalis. Barra de escala en E: 250 μm , en F: 500 μm .

1.2.- Vocalizaciones y Modo de Vida. *Diversidad vocal en aves Passeriformes e Historia Natural de las especies estudiadas*

Las vocalizaciones de las aves pueden catalogarse en repertorios, donde se agrupan los principales sonidos que emiten, según su similitud espectral y sus conductas asociadas (Catchpole & Slater, 2008). En Passeriformes, particularmente Oscinos, los repertorios vocales se dividen en canciones y llamadas (Marler, 2004). La canción es una vocalización compleja, compuesta de distintas notas o elementos emitidas de una manera estereotipada, la que está estrechamente asociada a la reproducción y a la territorialidad. Esta vocalización es el objeto principal del proceso de aprendizaje vocal en Oscinos y es característica del grupo (Kroodsma, 2004). Además, las llamadas son vocalizaciones simples que típicamente constan de una o dos notas (pueden ser más, en cuyo caso se denominarán “cantos”), están asociadas a una gama mucho más amplia de conductas, y están extendidas a todas las aves (Marler, 2004).

A lo largo de la clase Aves, los tamaños de repertorios vocales son altamente diversos. Sin embargo, es notable que en Passeriformes, particularmente Oscinos, están presentes los repertorios vocales por lejos más numerosos. Aun así existen algunos Oscinos, como el Zebra Finch (ZF), que puede asemejarse en el tamaño de repertorio a aves de otros órdenes, como loros o cucos (Catchpole & Slater, 2008). Más notable aún es que en aves basales, como gallos, puede observarse repertorios que superan en tamaño a algunos Oscinos (Marler, 2004).

Al buscar relacionar esta capacidad vocal con la estructura de la siringe, no existe una correspondencia evidente. Por ejemplo, aves basales de Anseriformes (patos), poseen siringes simples, sin musculatura intrínseca ni extrínseca (Düring & Elemans, 2016), pero se ha reportado en ellas plasticidad vocal por imitación (Ten Cate, 2021). Sin embargo, todos los grupos de aves que presentan aprendizaje vocal canónico (Oscinos, loros y colibríes), también presentan una cantidad importante de musculatura intrínseca en sus siringes (Goller, 2022). Respecto a esto cabe destacar que las siringes de Suboscinos también presentan musculatura intrínseca y extrínseca de desarrollo intermedio, lo cual podría ir acompañado de control motor.

En cuanto a la inspección de la conducta vocal de Suboscinos, se han realizado algunos estudios de crecimiento aislado o ensordecimiento en 3 especies de N. América (Kroodsma, 1984; Kroodsma & Konishi, 1991) y 1 de Sudamérica (Touchton y col., 2014), con el fin de impedir la interacción socioacústica de las aves

durante su ontogenia y reconocer la posibilidad de aprendizaje vocal. Estos reportes muestran que en estas condiciones las aves desarrollan de manera normal la vocalización más característica de su especie. Además, experimentos de denervación del nervio Ts en suboscinos han sugerido que la musculatura de la siringe no participaría en el control motor de las vocalizaciones, ya que éstas no se ven mayormente afectadas por su denervación (Amador y col., 2008; García y col., 2017). Estas evidencias han llevado a generalizar que el canto de las aves suboscinas es innato, en contraposición a los Oscinos, ya que en estos últimos tanto el crecimiento aislado (Price, 1979; Slater, 1989) como la denervación de su siringe cambia notoriamente la estructura acústica de las vocalizaciones (*Fringilla coelebs*, Nottebohm, 1971; *Serinus canaria*: Nottebohm & Nottebohm, 1976; *Parus atricapillus*: Nowicki & Capranica, 1986; *Taenopygia guttata*: Williams y col., 1992).

Sin embargo, cabe mencionar que los estudios de impedimento socioacústico y denervación en suboscinos silvestres han sido llevados a cabo en situaciones de laboratorio dificultando un estudio completo del despliegue vocal de estas aves, reduciéndose solo a las vocalizaciones emitidas en estas condiciones.

Por otra parte, diversos estudios recientes indican una mayor riqueza vocal en el grupo de lo que sugerían los trabajos más tempranos. Así, en estudios de otras especies de Suboscinos han descrito variación individual y geográfica en las vocalizaciones (Lovell & Lein, 2004b; Wiley y col., 2005; Fitzsimmons y col., 2008; Foote y col., 2013; Ippi y col., 2011; Norambuena & Victoriano 2020), capacidad de reconocimiento de vecinos y extraños a través de aspectos particulares en sus vocalizaciones (Lovell & Lein, 2004b), reconocimiento interespecífico (Lovell & Lein, 2005) y desarrollo ontogenético de las vocalizaciones (Trainer y col., 2002).

Más aún, se ha hallado evidencia de aprendizaje vocal en suboscinos tropicales del género *Procnias*, familia Cotingidae (Kroodsma y col., 2013). Tras un *crossfoster* (crecimiento cruzado) a un individuo de la especie *Procnias albus*, criado con ejemplares de una especie de Oscino tropical (un Chopí, similar a un Tordo chileno). En esta condición la *Procnia* aprendió a imitar el canto del chopí, logrando un canto no idéntico pero muy similar. Además, la *Procnia* no fue capaz de emitir el canto típico de su especie de forma normal, sino que de forma truncada. Por otro lado, en una especie del mismo género, *Procnias tricarunculatus*, se han descrito vocalizaciones cambiantes a lo largo de la ontogenia (Kroodsma y col., 2013), fenómeno característico en varios loros y Oscinos. Cabe mencionar, que la siringe del género suboscino *Procnias* es muy muscular, similar a un Oscino.

Ante esta evidencia se hace interesante estudiar en detalle la diversidad vocal y estructural de la siringe en Suboscinos, pero sobre todo, investigar la diversidad de modos en que el aspecto vocal y estructural están relacionados. Además, Sudamérica y Chile resultan un lugar propicio para ello, debido a que este es uno de los lugares donde principalmente se distribuye el suborden. Debido a esto, escogimos dos grupos de Suboscinos distintos en su modo de vida y en su siringe

(familia *Rhinocryptidae*: terrestres y traqueófonos; familia *Tyrannidae*: arbóreos y no traqueófonos).

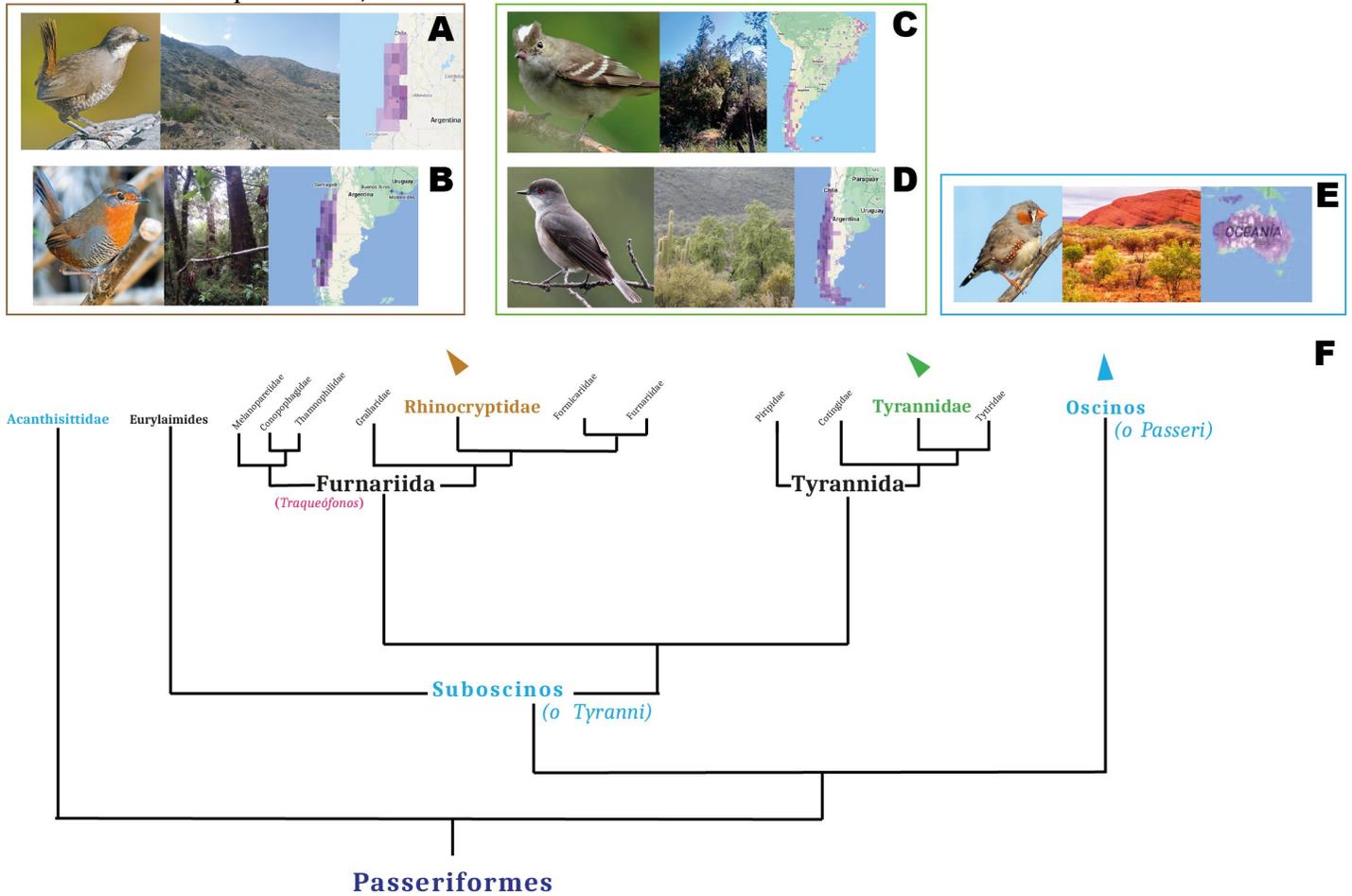


Figura 1.iii. Historia natural y ubicación de las 5 aves del estudio dentro del orden Passeriformes. **A.** La Turca, rinocriptido de la zona centro, centro norte y centro sur de Chile, habita en el matorral esclerófilo, y fue estudiada en Quebrada de la Plata (QP). **B.** El Chucao, rinocriptido de la zona centro sur de Chile, y sur de Chile y suroeste de Argentina, habitante del bosque caducifolio y bosque templado lluvioso, estudiado en Chiloé -principalmente en Senda Darwin (SD). **C.** El Fiofio, tiránido que habita durante la primavera y el verano en la zona centro y sur de Chile, y comenzado el otoño migra a la costa de Brasil para pasar otoño e invierno allí, fue estudiado en Santiago, QP principalmente, y en Chiloé, SD principalmente. **D.** El Diucón, tiránido que habita a lo largo de todo Chile, excepto el extremo norte, y también el suroeste de Argentina, fue estudiado en lugares similares al Fiofio. **E.** El ZF, oscino modelo criado habitualmente en laboratorios de Biología de aves, y también una mascota común a lo largo del mundo, habita naturalmente en Oceanía, en Australia e Indonesia. Predomina en el centro de Australia, en formaciones de matorral semidesértico, viviendo en grandes grupos de individuos. **F.** Filogenia de passeriformes con foco en las familias de suboscinos, basado en Oliveros y col (2019). En azul, Passeriformes, orden de aves cantoras. En celeste, sus tres órdenes, Acanthisittidae (2 especies vivas de Nueva Zelanda), Suboscinos y Oscinos. Los parvordenes Furnariida (suboscinos traqueófonos) y Tyrannida (suboscinos no traqueófonos)

contienen aves del continente americano, mientras que la familia Eurylaimides contiene a los únicos suboscinos no americanos, habitantes del trópico africano, asiático y de Oceanía. Fotos de Turca y Chucao por Pio Marshall, Diucón por Laure Matlle y Fíofío por Yousif Attia.

Las aves escogidas para este estudio consisten en: a) dos Suboscinos rinocriptidos, la Turca, *Pteroptochos megapodios*, y el Chucao, *Scelorchilus rubecula*, que pertenecen al parvorden Furnariida (Fig 1.iii A, B y F) los cuales presentan una siringe traqueófona (Fig 1.ii C); b) dos suboscinos tiránidos (Fig 1.iii C, D y F), el Fíofío (eellelelelelele) y el Diucón, los cuales presentan una siringe más similar a un oscino (Fig 1.ii C). La Turca (Fig 1.ii A) presenta hábitos terrestres, y es frecuentemente vista rascando el suelo en busca de comida o debajo de arbustos (su nombre específico *megapodios* viene dado por sus grandes patas, capaces de mover piedras completas del suelo), y raramente vista volar excepto cuando desciende de una ladera o cuando sube a árboles para desplegar alarmas o llamadas de contacto. Presenta dinámicas sociales desarrolladas, a menudo escuchada llevando a cabo duetos o tríos vocales entre individuos localizados a través de distintos sitios en medio del matorral (Montecinos y col., 2017). El Chucao (Fig 1.ii B) también de hábitos terrestres y frecuentemente visto rascando el suelo en busca de gusanos, a diferencia de la Turca, vive en bosques cerrados y no sale de estos. Es muy curioso y se aproxima fácilmente a un observador, siendo muy fácil grabarlo en la temporada reproductiva, a diferencia de la Turca, que si bien no tímida prefiere evitar a los humanos (Correa & Mpodozis, 2015). Por otro lado, el Fíofío es un ave migratoria de hábitos arbóreos, que constituye uno de los dispersores de semillas más importantes de la región, es insectívoro, y es posible hallarlo durante la temporada reproductiva en árboles altos o herbáceas de sotobosque en flor, tanto en sectores urbanos como naturales, en busca insectos o frutos. Es un ave marcadamente social, que si bien no posee bandadas estables, se encuentra frecuentemente en grupos de 3 o 4 individuos, peleando o interactuando bruscamente. Notablemente, se ha descrito que luego de la migración, vuelven al mismo árbol que constituye su territorio en la temporada reproductiva siguiente por hasta cuatro años (Espinoza y Egli 1997). El Diucón es un insectívoro más bien solitario, aunque es posible verlo en grupos de varios individuos en la temporada no reproductiva. Tiene hábitos arbóreos, pero también es frecuente verlo a altura de los matorrales. Curiosamente es común verlo observando su propio reflejo en vidrios de automóviles o edificaciones. Forma parte de uno de los muchos suboscinos chilenos para los que se cree existe migración local, lo cual no se ha estudiado a la fecha.

1.4.- Hipótesis, objetivos y planteamiento del problema.

HIPÓTESIS:

Las aves suboscinas presentan repertorios vocales cuyo tamaño se relaciona directamente con el grado de desarrollo de la musculatura intrínseca de la siringe y con el grado de inervación de esta.

OBJETIVO GENERAL:

Describir la conducta vocal de 4 aves suboscinas de Chile y evaluar el nivel de musculatura e inervación de sus respectivas siringes, relacionándolas con los rasgos vocales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir la anatomía de la musculatura, cartílagos y membranas de la siringe, así como su inervación motora en las 4 especies suboscinas mencionadas, además del oscino modelo (ZF). A través de la examinación histológica de su inervación, y posterior estimación estereológica del número de motoneuronas del núcleo nXII y el número de axones de Ts, definir el grado de inervación de su musculatura intrínseca y evaluar la relación de ésta con los tamaños de los repertorios caracterizados.
2. Describir en el campo los diversos tipos y contextos de uso en las vocalizaciones de 4 aves suboscinas, con el fin de estimar el repertorio completo de las vocalizaciones tipo o principales en cada especie, con sus respectivas conductas asociadas. Además, describir subtipos o variaciones a estas vocalizaciones principales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se desarrolló en dos espacios: terreno y laboratorio. En terreno la experimentación fue principalmente no invasiva, grabando aves con micrófonos direccionales y observando con binoculares desde escondites camuflados o de pie y en sigilo. En ciertas ocasiones se realizaron capturas para anillamiento o para obtención de material histológico. Los experimentos de laboratorio fueron realizados únicamente en tejido de animales ya sacrificados, ya sea durante esta tesis o en trabajo previo. Tanto para las capturas como para los procedimientos histológicos se contó con permisos pertinentes, detallados a continuación.

2.1.- Permisos

Para poder capturar y anillar o sacrificar aves nativas silvestres para su estudio anatómico, este trabajo se remite a la resolución exenta N° 3289/2021 del Servicio Agrícola Ganadero (SAG) que autorizó a M. Fernández -co-tutor de esta tesis- la captura de aves con fines de investigación mediante trampas de piso y redes niebla (donde está explicitada la autorización a mi involucramiento en las capturas), en la Quebrada de la Plata (QP) de la Estación Experimental Germán Greve Silva, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile (UCh), en el sector de Rinconada de Maipú, Región Metropolitana; y en la Estación Biológica Senda Darwin (SD), en la comuna de Ancud, Región de Los Lagos. Esto se llevó a cabo entre el 28 de Mayo del 2021 y el 31 de mayo de 2022.

Además, todos los procedimientos están autorizados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Uch, N.º 21493-FCS-UCH. En esta autorización se establece que el proyecto de tesis que dio pie a este trabajo no contravino las normas bioéticas del Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales. En este se autorizó el uso de muestras completas de siringe, cerebro y médula de 3 ejemplares por especie de interés del estudio entre octubre 2021 y septiembre 2022, en los sitios QP y SD.

2.2.- Terrenos: grabaciones y capturas

Se realizaron campañas de muestreo de vocalizaciones y observaciones conductuales en QP (Jun. 2021, y Sept-Dic. 2021, 3 veces por semana; Feb. 2022-Junio 2022, 1 vez por semana; Ago. 2022-Nov. 2022, 2 veces por semana) y en SD (Ago. 2021, 2 semanas; Ene. 2022, 3 semanas; Julio 2022, 2 semanas), además de varias instancias puntuales de muestreo en las cercanías del Bosque Panul, La Florida, Santiago, a lo largo de los dos años del estudio. El horario de muestreo fue desde el amanecer (5.50 am~7.30 am) a 12.30 del día, aunque en algunas ocasiones se

grabó durante la tarde. Se utilizó una grabadora digital Tascam DR-100, un micrófono direccional Rode Ntg4, audífonos y un micrófono de solapa. Se grabó con muestreo de 88,2 Khz, archivos WAV en profundidad de 24 bits, se configuró la ganancia a 7 como estándar, y se guardaron ficheros de 30 minutos como máximo. Además, se utilizaron binoculares para observar a distancia y celular, donde se tomaron abundantes notas con el número de la grabación, la hora, el lugar, y los eventos de interés registrados. Dichas notas fueron fundamentales para la posterior navegación en el abundante material acústico obtenido. Las grabaciones fueron realizadas desde escondites camuflados -Turcas y Chucaos-, de pie y en sigilo -todas las aves-, o bien recostados en el suelo de los bosques de peumo donde se estudiaron los Fíofios.

En QP, se escogieron 3 sitios experimentales para las Turcas (*Matorral entre polvorín 2 y 3*, *Zona de reforestación polvorín 6* o *Turcódomo* y *Zona portaguayacanes*), siendo *Turcódomo* el más muestreado. Para los Fíofio fueron 3 sitios experimentales (*Bosque chico de peumos*, *Bosque grande de peumos 1* [el más muestreado], *Bosque grande de peumos 2*). En SD, se escogieron 4 sitios experimentales para los Fíofio (*Camino bosque abierto*, *Camino bosque viejo*, *Pupelde alto*, *Pupelde bajo*) y 4 para los Chucaos (*Bosque abierto*, *Bosque viejo*, *Pupelde alto*, *Pupelde bajo*), siendo todos equivalentemente muestreados.

En el caso del Diucón, hubo varios días de grabación dedicados a mostrarlo, pero fue muy difícil dar con un lugar en un bosque o matorral natural ya sea de QP o de SD, donde se le pudiera encontrar de manera habitual, por lo que el estatus del repertorio vocal propuesto para esta especie es preliminar.

Para profundizar en las observaciones sobre correlatos conductuales de algunas vocalizaciones de Turcas y Chucaos, se realizaron un par de experimentos básicos de *playback*, con parlantes *bluetooth* manipulados desde escondites. Consistieron en reproducir vocalizaciones con específicas con la intención de observar la respuesta en el ave. Así se pudo grabar vocalizaciones hasta entonces desconocidas en el Chucao (*Rapaz*), y entender mejor el grado de territorialidad de una de las vocalizaciones de la Turca (*Sirenita*) y el Chucao (*Territorial I*).

Las capturas fueron realizadas con trampas de piso o resorte (rinocriptidos) y redes niebla (tiránidos). Para individualización, algunas aves fueron marcadas con un anillo metálico en una de sus patas (inscrito en el SAG según protocolo del permiso entregado) y un anillo de color para reconocimiento visual. Si bien la examinación de variaciones vocales intra e interindividuales mediante análisis estadísticos fue descartada para este trabajo (el equipo de trabajo formado sigue esta línea investigativa), el anillamiento de aves fue utilizado para establecer si un mismo individuo es capaz de producir todas las vocalizaciones del repertorio de la especie; y para documentar la capacidad de una misma ave de hacer más de un subtipo dentro de las vocalizaciones tipo, como enriquecimiento del repertorio.

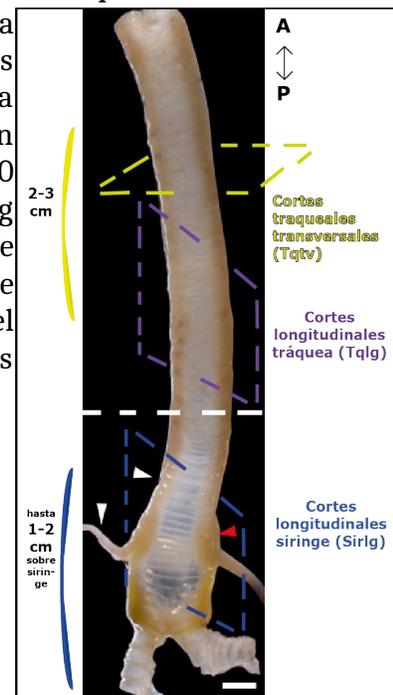
2.3.- Histología: siringes y cerebros

En este estudio se utilizó tejido proveniente de 5 animales. Dos Fíofío fueron encontrados sin vida en el campus Juan Gómez Millas (Fíofío n.º 16, macho; y Fíofío n.º 17, hembra, respectivamente), y posteriormente fijados por inmersión de cuerpo completo en paraformaldehído 4% (PFA) en buffer salino PBS 0,01 M, para su posterior procesamiento. Un Chucao (nº3, hembra) y un Diucón (nº1, hembra) fueron capturados en trampas de piso y redes niebla respectivamente, dentro del terreno de SD en Julio 2022, temporada de invierno. En ambos casos la eutanasia se realizó a través de una perfusión intracardiaca bajo sobredosis de anestesia, con una mezcla de ketamina y xilacina (100 y 40 mg/g, respectivamente) y perfundidos a través del corazón con buffer salino y PFA 4%, con una jeringa. Los cuerpos de ambas aves fueron fijados por inmersión y mantenidos en refrigeración por una semana hasta volver al laboratorio en Santiago. Además, se procesó la siringe de un Zebra Finch (ZF) sacrificado dentro del uso del proyecto de M. Faunes.

Las siringes y los cerebros fueron retirados, pesados y fotografiados en una lupa Olympus SZ61, y los cerebros se bloquearon en el plano coronal en el marco estereotáxico. Cerebros y siringes se postfijaron por 4 horas, y luego de lavarse en buffer salino, se pusieron en sacarosa 30% de un día a otro, como crioprotector.

Luego, se gelatinizaron con gelatina tipo A de cerdo, para evitar la disgregación de tejido al realizar los cortes. Las muestras gelatinizadas se volvieron a poner en sacarosa 30% de un día a otro, y entonces se seccionaron en forma seriada en un criomicrotomo. Los cortes de cerebro fueron todos coronales de 40 micrones de grosor. Los cortes de siringe, fueron de dos tipos (Fig 2.i), traqueal transversal (**Tqtv**) (porción de tráquea a 1-2 cm sobre la siringe), para examinar los axones del nervio Ts; y siringe longitudinal (**Sirlg**) para examinar la siringe propiamente tal. En el Diucón y el Chucao, se incorporó un tercer tipo de corte con fines exploratorios, este es, traqueal longitudinal (**Tqlg**) (Fig2.i).

Fig. 2.i. Tres tipos de cortes de siringe realizados. Ilustración con la Siringe de una Turca macho, según código de color usado en *Resultados*. La línea punteada blanca indica el punto de bloqueo que separa los cortes traqueales de los de siringe. La flecha roja apunta a uno de los pares de la musculatura intrínseca (SIM), y cada flecha blanca, a un par de cada tipo de músculo extrínseco (SEM). Barra de escala: 4 mm.



Posteriormente se realizó un conjunto de tinciones específicas a cada serie, según el tejido a tratar. Para siringe, los tres tipos de corte se dividieron en 4 series. En cada caso, se desarrolló una tinción de hematoxilina eosina (**HE**) en la serie 1, que permite visualizar núcleos celulares (hematoxilina) y tejido conjuntivo

(eosina), y distinguir entre musculatura y cartílago en la siringe. De la serie 2 a la 4 se realizaron tinciones inmunohistoquímicas. En la serie 2 se hizo una tinción doble de Neurofilamento (**NF**), que marca axones y fibras de neuronas motoras y sensoriales (la proteína de filamento intermedio abundante en axones, *neurofilamento*), con **SV2**, que marca terminales nerviosos (la glicoproteína vesicular *SV2*). En la serie 3 se hizo una tinción sobre la enzima colina acetil transferasa (**CHAT**), que marca somas y prolongaciones de neuronas colinérgicas (motoras), y en la serie 4 se hizo una tinción para Miosina (**Myo**), que marca músculo esquelético (la proteína *miosina* de citoesqueleto). Los cerebros se cortaron en 4 series para Fiofio y 5 para el Diucón y Chucao, debido a su mayor tamaño. En la serie 1, se realizó una tinción de Nissl, que marca ácidos nucleicos, en particular cuerpos de Nissl (ricos en ARN) y nucleolos, para llevar a cabo conteos de motoneuronas del nXII. En la serie 4 se realizó nuevamente una tinción de CHAT, para poder ubicar y delimitar más fácilmente el nXII en el cerebro posterior.

Para la tinción HE de siringes fue preciso montar los cortes en portaobjetos inmediatamente cortados del criomicrotomo y luego, dejarlos secar. De esta manera, esta primera serie sirve de referencia para el ordenamiento de los cortes de las demás series. Luego de esto, los cortes montados se rehidratan en una serie de alcoholes descendiente en concentración, de 100% a 30%, por un tiempo de sumersión de 1 minuto por solución, para luego pasar a hematoxilina, que tiñe los núcleos celulares, y luego pasar por agua e intensificar el color violeta de los núcleos con una gota de amoniaco, si es que una revisión rápida en microscopio indica que es necesario. Entonces se sumerge en Eosina brevemente, que tiñe tejido conectivo, colágeno y otros. De ser necesario, se añade una o dos gotas de ácido clorhídrico a la muestra para disminuir la intensidad de la Eosina. Luego las muestras se deshidratan en una serie de alcoholes de concentración crecientes de 30% a 100%, con 1 minuto de inmersión por solución, para entonces ser sumergidas en Xilol por más de un día, y finalmente cubrirse con pegamento de montaje para microscopía Entellan y cubreobjetos.

Para las tinciones inmunohistoquímicas en siringes se determinó que para la obtención de una marca visible era necesario realizar una doble liberación del epítipo blanco del anticuerpo. Ésta se realizó en primera instancia con un baño de Borohidruro de Sodio (NaBH_4) 1% en buffer salino PBS 0,01 M, agente reductor que permite desfijar parcialmente la muestra, liberando sitios bloqueados por demasiado entrecruzamiento y en segunda instancia con Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), situando la placa donde están los cortes en un baño maría a 75 °C. Este choque de calor en Citrato supone un leve daño a la composición del tejido que resulta en una eficiente liberación de epítipo para la tinción posterior.

Para las tinciones inmunohistoquímicas en general se siguió el protocolo de Marx y col. (2012) de tinciones cromogénicas con complejo AB y diaminobenzidina (**DAB**). Los cortes obtenidos del criomicrotomo -en uso con hielo seco-, fueron depositados en placas con PBS 0,01 M, y refrigerados con una gota de Azida de

Sodio 1% para evitar la proliferación de hongos en las muestras. Se realizó una saturación de la enzima peroxidasa con una solución 3% de peróxido de hidrógeno en PBS. El anticuerpo primario se incubó por 3 días para siringe en una proporción 1:5000 para NF, 1:500 para CHAT y Miosina, en PBS-tritón-x 0,3%. Luego de lavar 3 veces por 10 minutos con PBS, el anticuerpo secundario se incubó por 2 horas para cerebro, a temperatura ambiente y agitación, y de un día a otro, a 4°C y en agitación en siringe, con 20 microlitros/mL de suero de caballo para bloquear la marca inespecífica, en PBSt 0,3% y a una concentración de 1:1000 tanto contra cabra (animal donde se fabricó el anti-CHAT) como contra ratón (animal donde se fabricaron los anti- NF, SV2 y Myo). Luego de lavar 3 veces por 10 minutos con PBS, se incubó el complejo AB (A, 1:500; B, 1:500) por 2 horas. Se repitió el mismo lavado y se incubó el tejido en una solución de DAB (50 microlitros/mL) intensificada con Cobalto de Níquel (NiCo) (4 microlitros/mL) por 30 minutos. La reacción cromogénica se desencadenó con 10 microlitros de una solución 0,03% de peróxido de hidrógeno en agua destilada. Agregando 10 microlitros por minuto en la medida en que la revisión rápida bajo lupa indicara necesario, se dio por terminada la reacción entre 5 a 20 minutos, para volver a realizar lavados en buffer salino, y refrigerar o montar los cortes en un portaobjetos, dejarlos secar y finalmente llevar a cabo la deshidratación y montaje con Xilol y Entellan.

Para la tinción de Nissl, los portaobjetos con los cortes se introdujeron en cloroformo por 45 minutos. Luego, estos se hidrataron con una serie de alcoholes en concentración decreciente de 100% a 70%, con 1 minuto de sumersión por solución. Luego los cortes fueron sumergidos en una solución de Cresyl Violeta por 20 minutos, regulando el nivel de tinción de los citoplasmas y nucleolos al sumergir en agua destilada para lavar el Cresyl Violeta, o devolviendo y dejando más tiempo en esta última solución para intensificar la marca. Luego se hizo una deshidratación por alcoholes de 70% a 100% con 1 minuto de sumersión por solución, para luego depositar los cortes en Xilol, y al día siguiente cubrirlos con Entellan.

Adicionalmente, se estudió material anatómico de 3 Turcas y 3 ZF (siringes y cerebros) disponible en el Laboratorio de Neurobiología y Biología del Conocer, obtenidos en estudios previos, procesados con tinciones ya mencionadas (He, NF, CHAT y Nissl, específicamente). El material fue fotografiado en un microscopio Olympus BX61 asociado a una cámara Hamamatsu (ORCA-R2) en modo campo claro utilizando el programa Cell Sens Dimension (Olympus), y en el microscopio Lionheart FX (Biotek) que permite el montaje instantáneo de fotos tomadas en distintas áreas aledañas de una muestra.

2.4.- Análisis anatómico

El número de motoneuronas del nXII fue estimado a través del método del fraccionador óptico (Glaser & Wilson, 1998) en un microscopio Nikon (Eclipse

4000) de campo claro con platina motorizada (Ludl Electronics) y asociado al programa Stereoinvestigator (MBF Bioscience). En este se dibujó el área de interés de la muestra a un aumento en que fuera fácilmente ubicable (4X -Fig. 2.ii A- y/o 10X). Se dibujó el contorno del bulbo raquídeo de cortes posteriores de cerebro teñidos con Nissl de cada una de las 5 aves del estudio. Luego, con otro contorno se dibujó el nXII (Fig. 2.ii B-C), tanto su porción dorsomedial (Dm) como su porción ventrolateral (VI). En un inicio, para ubicar correctamente el nXII en los Nissl se usaron de referencia las tinciones de CHAT, correspondientes a la misma área del cerebro del mismo ejemplar, donde los somas de las motoneuronas del nXII destacan como los únicos sitios teñidos en el bulbo raquídeo. En el modo de conteo de células del fraccionador óptico de StereoInvestigator, midió el grosor del tejido montado en cada sitio de conteo, debido al encogimiento post-tinción, que fue de aproximadamente un 65%. Se utilizó un marco de conteo de 60x60 micrones, distribuido en una grilla del mismo tamaño. (Fig. 2.ii B-C). De esta forma los marcos de conteo, si bien aleatorios, siempre seleccionarían toda la superficie del nXII de cada corte, debido a la considerable pequeñez de este núcleo, para así no subestimar el número de motoneuronas presentes en él. El disector óptico del marco de conteo, es decir su altura en el eje Z, fue definido en 7 micrones, que fue la zona considerada como claramente en foco en las muestras a 100X, poco menos de la mitad de su grosor total. De esta forma, y definiendo como blanco de conteo los nucleolos de las motoneuronas del nXII, este método admite conteos sólo a células de interés cuyo nucleolo no se sobreponga a alguno de los bordes de exclusión en el eje xy del marco de conteo (lados rojos del cuadrado, Fig. 2.ii B-C) y sólo células cuyos nucleolos se encuentren en foco dentro de la profundidad de 7 micrones con respecto al grosor de 15 micrones aprox. , incluyendo nucleolos en foco que rocen el borde superior (cara de inclusión) de estos 7 micrones, y excluyendo nucleolos en foco que rocen el borde inferior de esos 7 micrones (cara de exclusión).

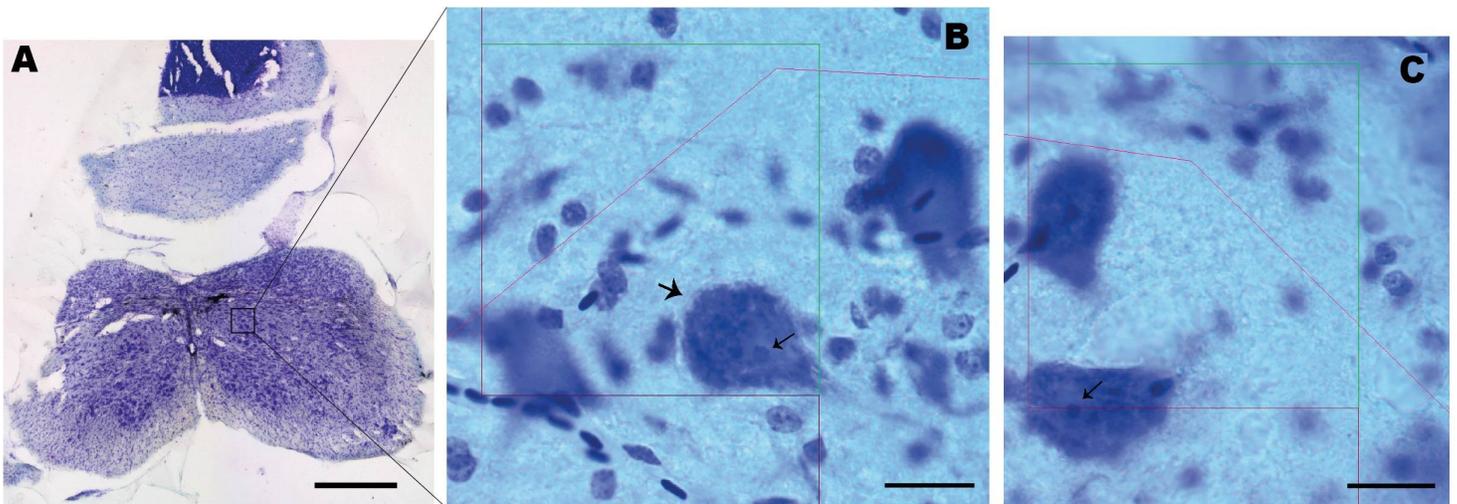


Figura 2.ii. Modo de conteo de motoneuronas en el programa StereoInvestigator. **A.** Corte coronal de cerebro posterior (cerebelo arriba, bulbo raquídeo abajo) de ZF a 4X, con nXII enmarcado en negro. **B.** Aumento de A, a 100X. Marco de conteo con zona de inclusión (lados verdes cuadrado) y zona de exclusión (lados rojos cuadrado), en un borde del nXII delimitado por una línea fucsia. La flecha gruesa indica una motoneurona del nXII, y la flecha delgada apunta su nucleolo, blanco del conteo, dentro del área de inclusión en este caso. **C** Nucleolo en foco apuntado por la flecha, pero que es atravesado por la línea de exclusión, y por ende no contable (100X). Barra de escala en A: 500 μm , B y C: 13 μm .

La población total de motoneuronas del núcleo se estimó considerando la distancia entre las secciones y el promedio de los grosores medidos manualmente en cada sitio de conteo. La ecuación de esta estimación fue la siguiente:

$$N = \sum Q \cdot \frac{t}{h} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf} \quad (1)$$

Donde el número de células estimadas en la subdivisión (N) es la sumatoria de los marcadores contados (Q) por la altura del disector (h, 7 micrones en este caso), relativo al promedio de alturas manualmente medidas en los sitios de conteo (t), multiplicado a su vez por el inverso del área de muestreo (1/asf) y por el inverso del número de cortes muestreados (1/ssf) (West y col., 1991). Los números estimados de motoneuronas del nXII fueron normalizados por el peso del cerebro para cada ave correspondiente. Además, se obtuvo una estimación del volumen del nXII y el bulbo raquídeo (las dos estructuras que fueron contorneadas en cada corte en StereoInvestigator) en el programa Neurolucida Explorer (MBF Bioscience) a partir de la multiplicación de la superficie calculada dentro del contorno por el grosor promedio de los cortes, a su vez multiplicado por el número de series de la muestra.

En los cortes correspondientes a la siringe se realizaron conteos de axones del nervio Ts provenientes de las motoneuronas del nXII, para evaluar la proporción de estos que proyectaban directamente a SIM. Esto fue llevado sobre fotos del nervio Ts a 40X o 100X. El conteo de los axones se realizó seleccionando manualmente uno por uno en el programa ImageJ, y los conteos se verificaron automáticamente con el paquete “Cell Counter” de dicho programa (Figura 2.iii). Los números resultantes fueron divididos por los números de motoneuronas del nXII, obteniendo el dato de proporción axones (Ts): motoneuronas (nXII) (ax/mn) (Tabla 1). Como se mencionó, la preservación de los tejidos de los animales procesados depende de si éstos fueron perfundidos intracardiácamente o fijados por inmersión. Esto fue un obstáculo en la visualización de los nervios cortados transversalmente, ya que en ambos Fíofío fue difícil hallar un nervio marcado que fuera inequívocamente contable y permitiera evitar repetir un conteo por error, debido al aspecto ladeado de los axones en casi todos los cortes obtenidos, salvo un par en los que sí se logró distinguir por axón y realizar el conteo eficientemente (Fíofío 17, hembra).

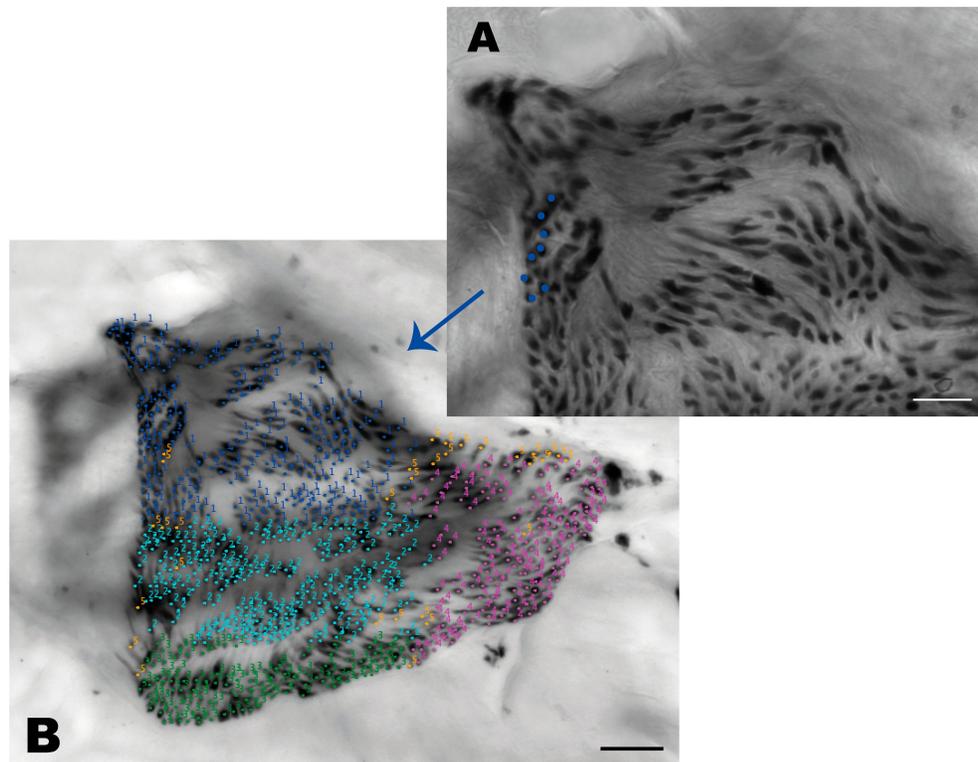


Figura 2.iii. Modo de conteo de axones del nervio Ts en el programa ImageJ. Nervio Ts del ZF O en un corte Tqtv, marcado con NF. **A.** Vista en 100X de la parte superior del corte, aumento al que se realizaron los conteos. **B.** Vista del mismo nervio en 40X desde el programa ImageJ, donde se recopilieron las 5 tandas de conteos a 100X (representados en los colores de los puntitos numerados) que en conjunto cubrían toda la envergadura del nervio. Barra de escala: 10 μ m en A, 20 μ m en B.

2.5.- Análisis bioacústico y estadístico

Las vocalizaciones se visualizaron en el programa RavenPro (Laboratorio de Ornitología, Universidad de Cornell) como espectrogramas. Se aplicó un filtro de banda entre 0-300 Hz a todas las grabaciones. Para los audios de Turca y Chucao, se utilizó un tamaño de ventana de 2000 muestras, y se utilizó una vista de 0 a 5000 Hz. Para Fíofío y Diucón el tamaño de la ventana del espectrograma fue 1300 muestras, y la vista utilizada fue entre 0 y 8000 Hz. Para la confección de los repertorios vocales Turca y Fíofío se seleccionaron nota por nota (excluyendo selecciones de vocalización completa para estos análisis), 44 vocalizaciones representativas de 7 de las 9 vocalizaciones tipo identificadas para la Turca (exceptuando *Íntimo* y *Distress*) y 45 vocalizaciones representativas de 8 de las 10 vocalizaciones tipo identificadas para el Fíofío (exceptuando *Inmadura*, y *Wayu*). Se escogieron 13 variables cuantitativas (*Begin Time (s)*, *End Time (s)*, *Low Frequency (Hz)*, *High Frequency (Hz)*, *Peak Frequency (Hz)*, *Center Frequency (Hz)*, *Delta Frequency (Hz)*, *Delta Time (s)*, *Avg Entropy (bits)*, *Frequency 95% (Hz)*, *Frequency*

75% (Hz), *Frequency 25% (Hz)*, *Frequency 5% (Hz)*) y 10 variables categóricas (*Song Name, Song Class, Song Count, Note N.º, Note Position, Note Name, song class, Place, Hour, Recording N.º, Date*). Las grabaciones de Turca fueron tomadas de 9 lugares distintos, con al menos 200 metros de distancia entre sí. Las grabaciones de Fíofío fueron tomadas de 17 lugares distintos, distantes por al menos 200 metros de distancia entre sí. La gran mayoría de las vocalizaciones son de horas de la mañana.

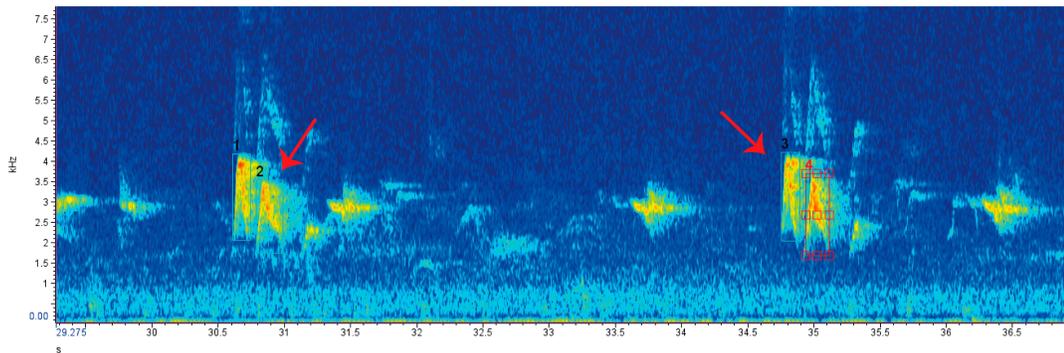


Figura 2.iv. Modo en que se seleccionaron las vocalizaciones nota por nota en el programa Raven Pro, para los análisis estadísticos. Ejemplo de *Main Song* de Fíofío, en ambas instancias seleccionadas cada nota por separado.

Utilizando el programa R Studio 1.4, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) a ambos repertorios, con el fin de evaluar qué variables mejor describieran la variabilidad del repertorio construido, y preliminarmente ver si estas variables agrupaban las vocalizaciones según las categorías construidas. En primer lugar, se hizo un análisis de normalidad a las 13 variables numéricas. A partir de los resultados se pudo interpretar que ninguna de las variables tenía distribución normal para ninguno de los dos repertorios analizados, por lo que se debió escalar todas las variables. Se corroboró que las variables no estuvieran demasiado correlacionadas entre sí, mediante una matriz de correlaciones, debiéndose de hecho descartar una de las variables que se habían considerado en el proceso. Luego, mediante un análisis de componentes principales se evaluó qué componentes principales explicarían el mayor porcentaje de la varianza de los datos, y en conjunto, cuántos componentes principales explicarían más del 80% de la varianza. A través de los gráficos obtenidos a partir de los dos componentes principales como eje X e Y, se evaluó cuál de las variables categóricas asociadas a los datos del repertorio permitirían agrupar mejor las vocalizaciones. Más aún, mediante un análisis discriminante lineal, se buscó cuáles eran las combinaciones de variables que permiten explicar las diferencias entre el conjunto de datos de cada especie.

Por otro lado, se realizaron análisis básicos de la modulación de la frecuencia principal por nota de los dos repertorios mencionados y además de una muestra sucinta de los repertorios de Chucao y Diucón (10~15 notas por vocalización tipo

cada uno) a través de la exploración del promedio de *Delta Frequency* (**DeltaF**) (Tabla 2, 3 y 4). Se analizaron distintas porciones del repertorio como: por vocalización tipo, repertorio completo, sólo vocalización tipo con mayor DeltaF, entre otras. Asimismo, se evaluaron las correlaciones entre: el número de vocalizaciones del repertorio de las 5 aves estudiadas con 2 variables obtenidas desde la anatomía: *Nº de Neuronas estimadas del XII* y *Nº de Axones Tqtv Contados*, y la correlación entre el DeltaF promedio por nota con las mismas 2 variables anatómicas, respectivamente.

3. RESULTADOS

3.1.- Anatomía de la Siringe.

Se comparó las siringes completas de las 5 aves en estudio (Chucao 3, Diucón 1 y Fíofío 16 y 17, Turca 2 y ZF 3). En la Figura 3.i se presentan un caso de cada tipo de siringe en una vista ventral. El órgano se dispone de este mismo modo en el cuerpo del animal, con esta vista apuntando hacia el vientre (ventral) y la parte de arriba de la tráquea apuntando hacia el cuello y cabeza (anterior o rostral).

En general, en todas las imágenes de siringe, presentan flechas y líneas punteadas que siguen el siguiente código de color: musculatura intrínseca (SIM) – tanto Vocalis Dorsalis (VD), Obliquus Ventralis (OV) y Obliquus Lateralis (OL), en **rojo**; músculos extrínsecos (SEM) – Tracheolateralis (TL) en **naranja**, Sternotrachealis en **verde oscuro**; elemento cartilaginoso Processus Vocalis (PV) en **azul**; membranas y labios vibratorios – BLI, BLm y TM en **calipso**; nervio Ts, terminales nerviosos puntuales y cartílago A1 en **blanco**; inervación pared interna tráquea en **morado**.

Siringes de Rinocriptidos -

Es posible observar una gran similitud de forma entre las siringes de ambos rinocriptidos en estudio, la Turca y el Chucao. Esto se refleja en la presencia de los mismos macro componentes (**Fig. 3.i A y B**). Destaca PV, elemento cartilaginoso que se ancla en el anillo traqueal A1 en la parte posterior y asciende hacia anterior hasta contactar con el único músculo intrínseco (SIM) llamado Vocalis Dorsalis

(VD), y con el músculo extrínseco Sternotrachealis (ST), el cual surge por debajo de VD. Destaca la forma de tambor del centro de la siringe, estructura llamada tímpano, en la cual los anillos ventrales de la tráquea no están completamente cubiertos por músculo ni cartílago.

En imágenes de mayor aumento (**Fig. 3.ii A-D**), se aprecia con mayor claridad la envergadura del músculo intrínseco VD, como un ensanchamiento de la musculatura justo arriba de ST. También se puede ver la leve diferencia de coloración del elemento cartilaginoso PV con respecto a la musculatura. Es posible ver la inserción de PV sobre el anillo traqueal A1 (**Fig. 3.ii B**). Para la siringe de Chucao, en una vista dorsolateral se aprecia como VD se extiende hacia la cara dorsal de la siringe cubriéndola en parte y alejándose de ST (**Fig. 3.ii C**), notándose de forma más evidente la diferencia de coloración entre PV y la musculatura. Además, se observa una anastomosis del nervio Ts, (unión de dos elementos tubulares) bifurcándose hacia la SIM, aproximadamente 2 mm sobre la siringe, en la cara ventral de la tráquea (**Fig. 3.ii D**).

La morfología de la SIM fue estudiada en cortes longitudinales de distintos niveles dorsoventrales, teñidos con Hematoxilina y Miosina (He y Myo, **Fig. 3.iii**). En cortes ventrales de la siringe de Turca se observó como su único par SIM, VD, se extiende por más de 1,5 mm desde su inserción caudal en la parte superior de PV, entre ST por abajo y TL por arriba (**Fig. 3.iii A**), lo cual es apreciable a mayor aumento en cortes intermedios (**Fig. 3.iii B**), que permite además ver cómo TL por rostral y el nervio Ts por lateral se desplazan envolviendo a VD, llegando hasta el músculo extrínseco ST. En cortes de niveles más dorsales PV sigue presente y VD llega a su final (**Fig. 3.iii C**). Además, en este nivel se observan ambos labios bronquiales (BL). Una de las dos BL, la medial (BLm), es distinguible bajo la estructura que se forma en la unión de ambos bronquios, y ambas BL laterales (BLl) se distinguen en el borde interior del extremo caudal de PV (**Fig. 3.iii A**).

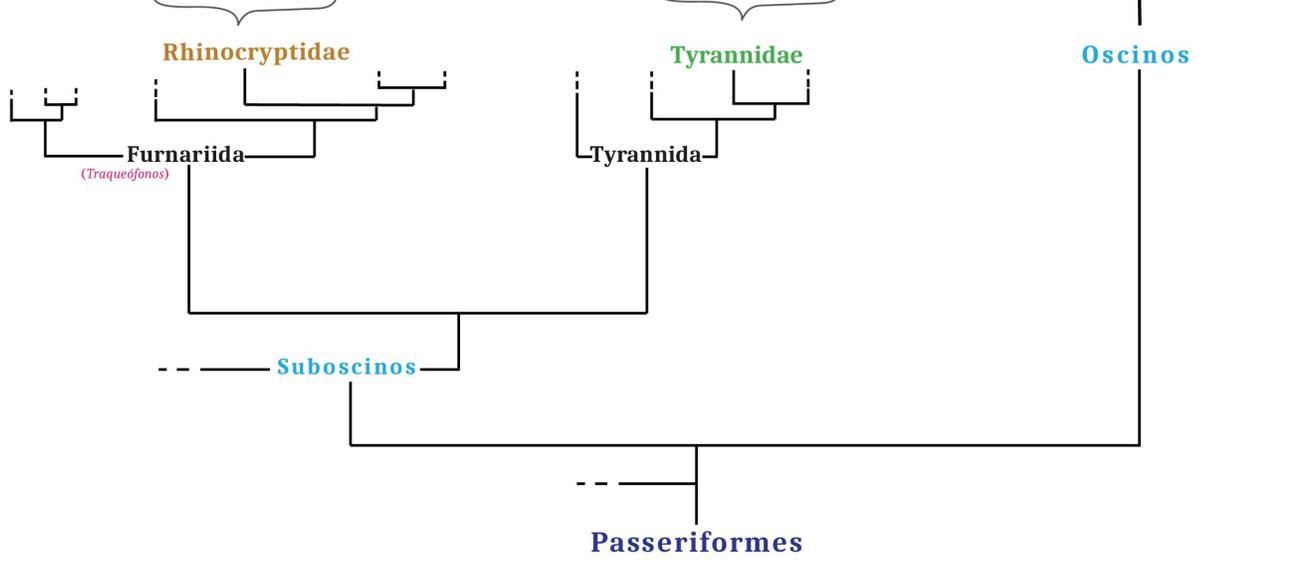
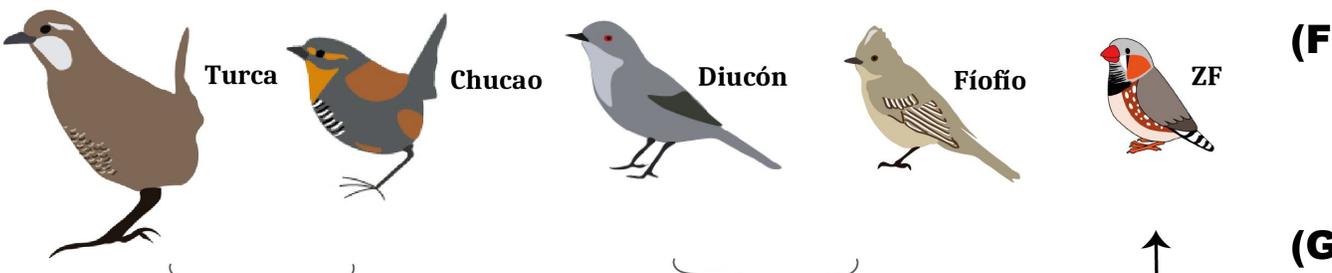
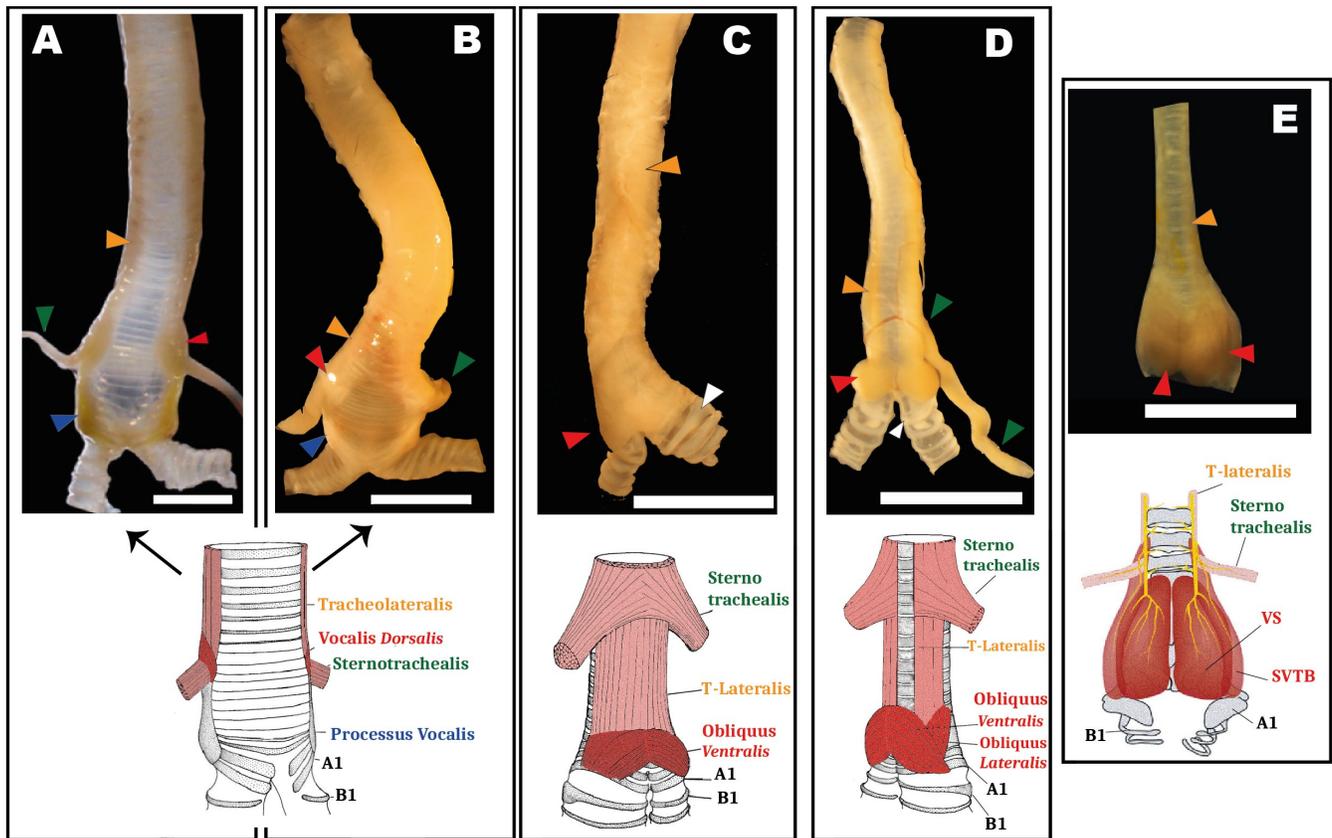


Figura 3.i. Seringes de las cinco especies en estudio. Las fotos y esquemas están en vista ventral. Esquemas modificados de Ames (1971), excepto para ZF, modificado de Faunes y col., (2017). En rojo oscuro se destaca la SIM de cada siringe, y en rosado la SEM. ST está ausente en fotos de Diucón y ZF pues fue removido durante la preparación. **A. y B.** Fotos de seringas de Turca (macho) y Chucao (hembra), respectivamente, representadas por el mismo esquema de una siringe de *Pteroptochos tarnii* (Huedhued del sur). **C.** Foto de siringe de Diucón (hembra), representada por el esquema de una siringe de *Xolmis irupero* (monjita blanca), ave que ya no comparte género con el Diucón, pero mantiene estrecha cercanía filogenética y una gran similitud en su siringe. **D.** Foto de siringe de Fiofio (macho), representada por esquema de siringe de *Myiopagis viridicata* (Fiofio verdoso, ex *Elaenia viridicata*), modificado para representar la siringe del Fiofio chileno. **E.** Foto de siringe de ZF representada por un esquema que incluye la inervación del nervio Ts a SIM y a ST en amarillo. Los anillos superiores de la tráquea están sin tejido sólo esquemáticamente. **F.** Caricaturas de cada ave, aproximadamente a escala entre sí, bajo su siringe respectiva, diseñadas en programa Photoshop (Adobe), excepto ZF, disponible en la página www.redbubble.com/people/lifewithbirds/shop **G.** Filogenia resumida de Passeriformes (versión simplificada de filogenia de Fig. 1.iii, tal que las líneas punteadas indican los clados omitidos). Barras de escala: A-E: 4 mm.

Además, se puede ver la posición aproximada de la membrana traqueal ventral (TMv, doble línea punteada calipso), entre medio de ambos PV. Ésta es difícil de conservar en la preparación debido a su leve grosor y fácil ruptura al manipularla (Mindlin & Laje, 2005). Para el Chucao, la estructura de su siringe es muy similar, se muestran solamente dos cortes intermedios equivalentes de siringe completa teñida con He (Fig. 3.iii.D) y Myo (Fig. 3.iii.E). En estos cortes se delinea VD en negro, TL y ST. En la tinción de He también se indican las posiciones del par de BLM y el par de BLL, y la ubicación putativa de TM (doble línea punteada calipso). Además, la tinción de Myo evidencia la distinción entre musculatura y cartílago, permitiendo ver cómo VD y ST se insertan en la porción superior del cartílago PV.

La **inervación** de la siringe fue explorada a través de tinciones inmunohistoquímicas para Myo, CHAT y NF-SV2, en 3 tipos de cortes: transversales a la tráquea, para visualizar el nervio Ts y el músculo TL (*cortes Tqtv*); cortes longitudinales a la tráquea (*cortes Tqlg*); y cortes longitudinales a la siringe (*cortes Sirlg*), para observar la inervación en la musculatura intrínseca (SIM) y extrínseca (SEM).

En general, los terminales sensoriales presentan terminaciones finas con varicosidades, mientras que los terminales motores envuelven fibras musculares con ramificaciones cuyos puntos terminales son más gruesos (Faunes y col., 2017). Las fibras sensoriales y sus terminales se marcaron con inmunohistoquímica de NF y SV2, y los terminales motores con CHAT y NF (Fig. 3.iv D y E). Así, se confirma la cualidad sensorial de las fibras nerviosas ya que estas no se marcaron contra CHAT (Fig. 3.vi C).

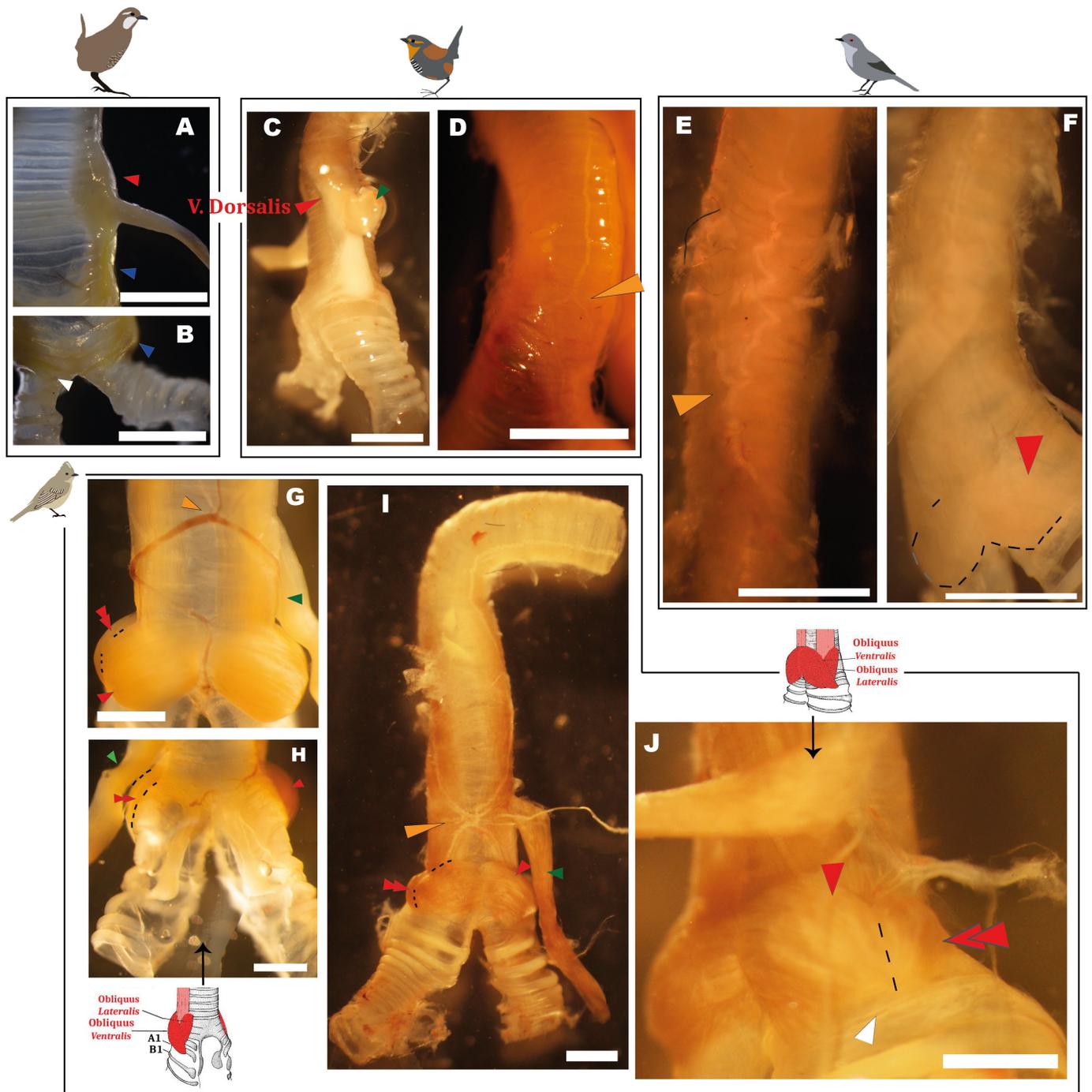


Figura 3.ii. Detalle de la siringe de los 4 suboscinos. Anastomosis fueron indicadas con flechas anaranjadas pues se sitúan en proximidad a TL. **A. y B.** Turca macho. Acercamiento a la porción superior (A) e inferior (B) de la siringe, en ventral. **C. y D.** Chucao hembra. (C) Vista dorsolateral de la siringe y (D) acercamiento a anastomosis en la traquea a 2 mm sobre la siringe en ventral. **E y F.** Diucón hembra. Acercamiento a anastomosis a 3 mm sobre siringe (E) y acercamiento a SIM -

delineada- (F), vistas ventrales. **G y H.** Fíofio macho. (G) Acercamiento a anastomosis a 1 mm sobre siringe y SIM en ventral y (H) vista dorsal de la siringe, apoyada de esquema de siringe de *Elaenia* en dorsal. **I y J.** Fíofio hembra. (I) Vista de siringe completa en ventral, (J) y vista ventrolateral de siringe, apoyada de esquema de siringe en ventral de *Elaenia*. Barra de escala en A y B: 4 mm; en C: 2 mm; D, E, y F: 1,8 mm; G, H, I y J: 1 mm.

En cortes Tqtv de Chucao es posible ver marca de Myo en ambos TL, dejando un hueco elíptico sin marca (flecha blanca), correspondiente a la ubicación del nervio Ts (**Fig. 3.iv A-B**). En un corte equivalente pero teñido con CHAT, se marca el nervio Ts además de algunos terminales motores en TL (flecha naranja) y fibras CHAT-positivas en el anillo interno de la tráquea (flecha morada, Fig. 3.iv C). Una tinción de NF-SV2 en los mismos cortes muestra el Ts intensamente marcado (Fig. 3.iv D y E), viéndose como fibras nerviosas sensoriales abundantes en TL (Fig. 3.iv D). Por último, en un corte Tqlg marcado con NF-SV2, se pudo observar que a lo largo del eje anteroposterior de la tráquea persisten las fibras sensoriales abundantemente en el anillo interno en toda su extensión, viajando en paralelo a Ts (Fig. 3.iv F).

En los cortes longitudinales (Sirlg) de siringe de Turca se puede observar la inervación de VD en un corte reaccionado para visualizar NF-SV2. En PV se observan fibras nerviosas en mayor abundancia que en SIM (**Fig. 3.v A y B**). Además, se observa la inserción de VD, TL y ST en la parte anterior, medial e inferior de la parte más anterior del cartílago PV, respectivamente. Es posible observar el detalle de estas inserciones, en un corte intermedio, destacando la forma en que TL se une a la trayectoria de ST hacia el esternón (Fig. 3.v C), sin quedar claro si se fusionan o se mantienen separados. A su vez, se observa leve marca de fibras nerviosas en estos dos últimos músculos extrínsecos. Por último, se observan fibras nerviosas en la pared de la tráquea en un corte que incluye una porción de tráquea sobre la siringe (Fig 3.v D), situación equivalente a lo descrito para el Chucao.

En el Chucao, los cortes Sirlg reaccionados para NF-SV2, se observa una inervación muy abundante de las fibras musculares de VD, hasta su borde de inserción con PV (Fig. 3.v D y E). En estos cortes, también se exhibe marca sensorial al interior de la pared traqueal o anillo interno de la tráquea (Fig. 3.v E). Se observa un continuo de fibras sensoriales desde la pared interior de la tráquea que desciende en un continuo que incluye el borde interno de PV en un corte más ventral (Fig. 3.v G). Además, en un corte que incluye un tramo levemente más anterior a la siringe se puede observar la abundante marca de terminales sensoriales en la pared interna de la tráquea (Fig. 3.v H) y numerosos terminales nerviosos en TL.

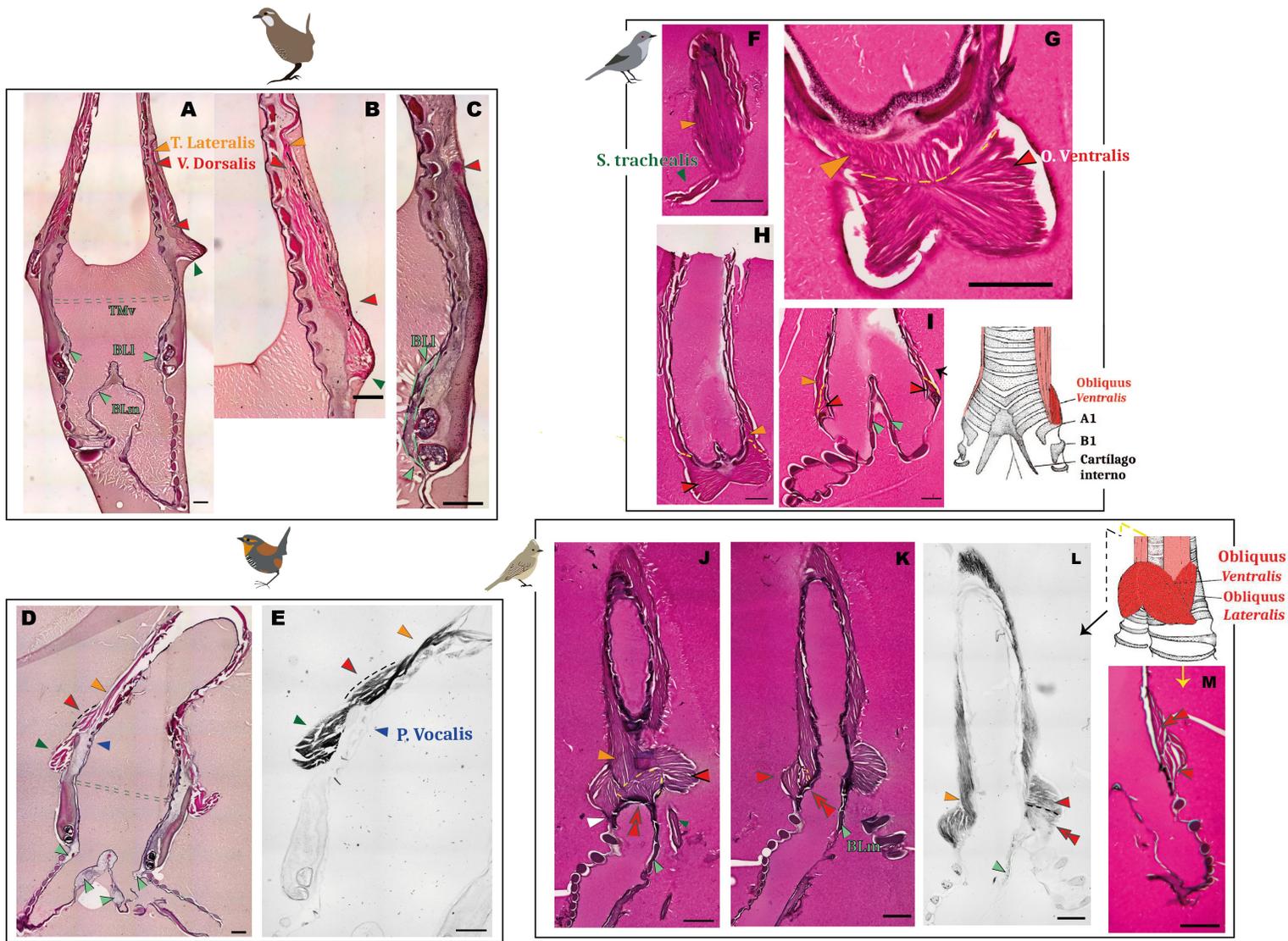


Figura 3.iii. Extensión de SIM de los 4 suboscinos en el eje dorsoventral, en cortes de siringe completa teñidos con He y Myo. Todos los cortes son montajes de varias fotos en 4X. **A-C.** He de Turca. (A) He en ventral, indicada la extensión de VD con flechas rojas. (B) He, acercamiento a VD, indicada y delineada su extensión, corte medial. (C) He, último tramo de VD, corte dorsal. **D y E.** Chucao. Cortes mediales, indicada y delineada la extensión de VD en una He (D) y una Myo (E). **F-I.** Diucón. (F) He, gran tamaño de TL, cortes más ventrales. (G) Acercamiento a SIM, junta entre TL y OV por flechas y delineado amarillo, corte ventral. (H) He, corte medial, levemente más dorsal a G, OV en su mayor envergadura. (I) He en corte dorsal, fin de OV hacia dorsal, apoyado por esquema dorsal de la siringe de Diucón. **J-M.** Fíofío (hembra). (J) He de corte ventral, se ubica porción más ventral de OL con doble flecha roja y delineado amarillo, y también OV, por fuera del anterior. (K) He, corte levemente más dorsal que K, OV y OL por lado izquierdo. (L) Myo, corte medial, un poco más dorsal a L, aparece OL por el lado derecho de SIM, delimitado su borde con OV. (M) Acercamiento a He de corte dorsal, porción más dorsal de OL por sobre OV. Se representa el plano de corte de M y N

en esquema ventral de siringe de Fíofío, en negro para M y amarillo para N. Barras de escala: 500 μm .

Por otro lado, la marca de CHAT, para los mismos niveles de cortes mostrados antes, dan cuenta de terminales motores en VD y TL (Fig. 3.v. I), aunque menos numerosos que aquellos NF-SV2-positivos. Llama la atención, la presencia -aunque leve- de marca CHAT positiva en la pared interna de la tráquea, como se ve en el panel I. Al comparar con un corte equivalente teñido para Myo (Fig 3.v. J) se ve la ausencia total de marca en dicha pared interna, indicando la ausencia de musculatura. Por último, se reitera que la siringe de Turca no fue tratada con el protocolo completo de inmunohistoquímica a siringes de suboscinos, con doble liberación de epítotope, lo cual puede explicar la menor marca mostrada en esta especie con respecto a Chucao. Asimismo, cabe reiterar, que no se examinaron cortes traqueales en general para Turca.

Se ha descrito para terminales sensoriales que su distribución en la musculatura de aves sigue un patrón homogéneo (Fig 3.iv F, Fig 3.v. D), mientras que los terminales motores siguen un patrón saltatorio (Fig. 3.iv C, Fig 3.v I) (Maier, 1992.).

Siringes de Tiránidos -

Las siringes de los tiránidos Fíofío y Diucón también presentan similitudes estructurales importantes entre sí (**Fig 3.i C y D**). En la parte superior del músculo extrínseco Tracheolateralis (TL) es visible el axón de TS en el Diucón, además, destaca la presencia de un solo par SIM, Obliquus Ventralis (OV) (detalle en Fig. 3.ii F). En el Fíofío se observan dos pares de SIM, el par OV y el par Obliquus Lateralis (OL), el último observable en mayor aumento y vistas laterales o dorsales (Fig. 3.ii G-J). Destaca el grosor que adquiere el par extrínseco TL en el Diucón, cubriendo todo el frente ventral de la siringe (Fig. 3.iii F), mientras que, en el Fíofío se observa una discontinuidad entre ambos TL. En la Figura 3.i D de Fíofío se observa un ST en un solo lado del órgano pues no fue removido durante la preparación. En ambas imágenes de tiránidos se indica con una flecha blanca la posición del anillo bronquial B1, debajo del anillo traqueal A1. Este último, elemento en el que se insertan ambos SIM, OV en el Diucón y OV tanto como OL en Fíofío, cubriendo casi por completo a A1 en la imagen.

Estos rasgos de la estructura general de la siringe del Fíofío son muy similares al reporte en la especie más cercana (*Elaenia albiceps*, Ames 1971), las cuales hasta hace poco eran consideradas la misma especie (Rheindt y col., 2009).

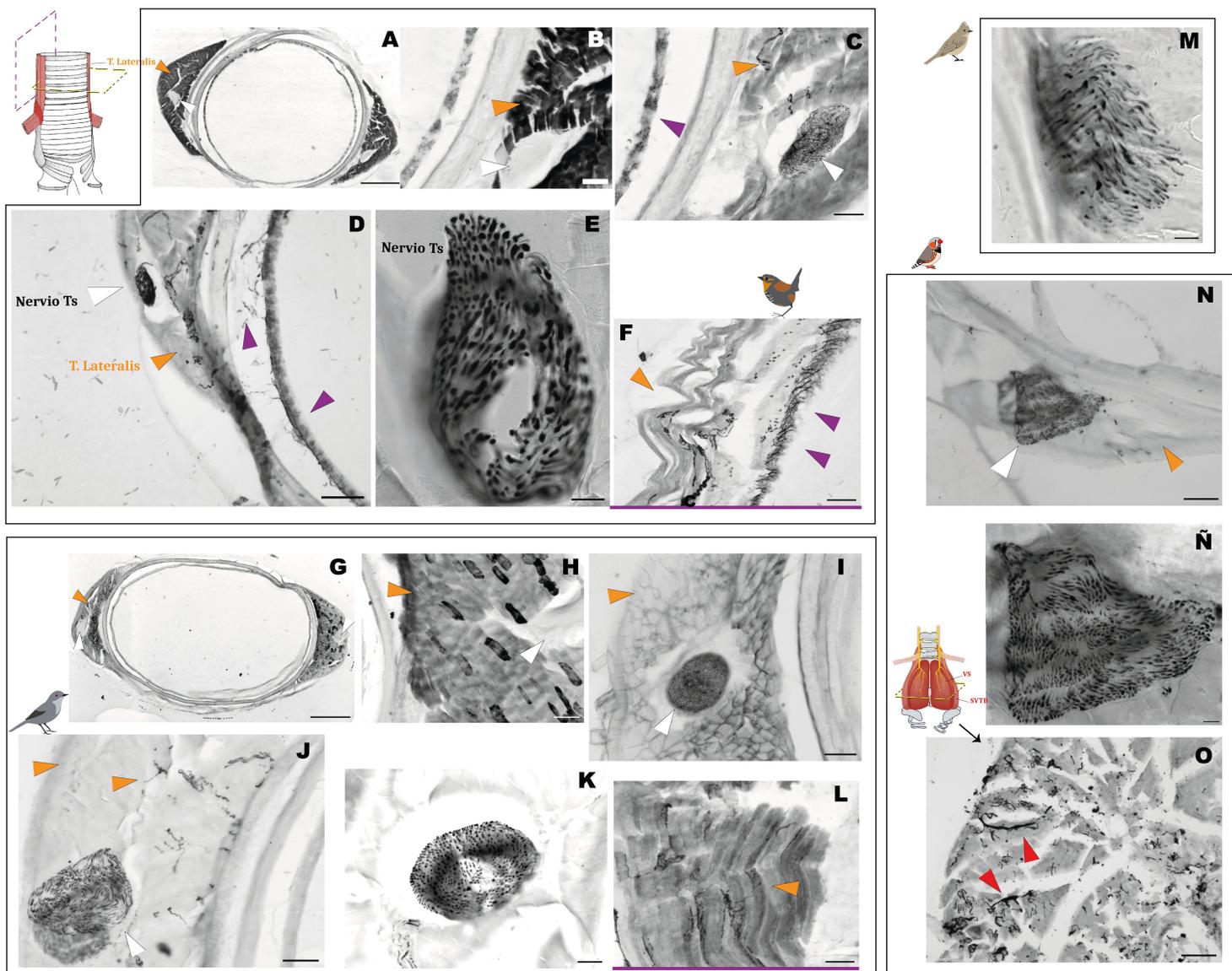


Figura 3.iv. Inervación de TL y pared traqueal interna por Ts, con inmunohistoquímica en cortes Tqtv y Tqlg de Chucao, Diucón, Fiofío y ZF. Un esquema de siringe de rinocriptido ejemplifica los planos de corte en amarillo (Tqtv) y morado (Tqlg). Se resaltó en morado el borde de las imágenes de cortes Tqlg. Único músculo presente en los cortes es TL. Ts se indicó con flechas blancas, y los fibras nerviosas en el anillo interno de la tráquea se indicaron con flechas moradas. **A-F.** Chucao. (A) Myo de corte Tqtv 4X, TL en negro envolviendo a sitio no marcado de ambos Ts. (B) Myo de corte Tqtv en 20X, marca hueco de Ts (C) CHAT de corte Tqtv similar en 20X similar a B, Ts marcado. (D) NF-SV2 de corte Tqtv en 10X, Ts marcado, terminales motores en TL y fibras sensoriales en el anillo interno de la tráquea. (E) NF-SV2 de corte Tqtv en 100X enfocando a Ts, corte utilizado para cuantificar número de axones. (F) NF-SV2 en corte Tqlg en 10X, con terminales en TL y abundantes fibras sensoriales en el anillo interno de la tráquea. **G-L.** Diucón. (G) Myo de corte Tqtv en 4X, con ambos TL en oscuro y ambos huecos de Ts indicados. (H) Myo de corte Tqtv en 20X, detalle de la

forma característica de músculo esquelético marcado. (I) CHAT de corte Tqtv en 20X, con Ts marcado y marca reticular en TL. (J) NF-SV2 de corte Tqtv en 20X, dos planos de Ts y terminales en TL. (K) NF-SV2 de corte Tqtv en 40X, corte utilizado para conteos de axones. (L) CHAT de corte Tqlg en 20X, detalle de terminales motores. **M.** Fíofío (hembra). NF-SV2 de corte Tqtv de tráquea en 100X, corte usado para conteo de axones. **N-O.** ZF. (N) NF de corte Tqtv en 20X, corte utilizado para conteo de axones. (O) Mismo caso de N pero en 100X (Ñ). NF de corte Tqtv de SIM, abundantes terminaciones nerviosas en parches de musculatura. Barras de escala: 500 μm en 4X; 100 μm en 10X; 50 μm en 20X; 20 μm en 40X y 10 μm en 100X.

En las imágenes de mayor aumento de la siringe de Diucón se observa una anastomosis del Ts, en la cual ambos Ts convergen en un manojo de axones hacia OV, a unos 3 mm sobre la siringe en vista ventral (**Fig. 3.ii E**). También, es posible ubicar OV, y delinear parcialmente ambas porciones bilaterales de este (Fig. 3.ii F). Para el Fíofío macho, se observa una anastomosis de Ts a 1 mm sobre la siringe en ventral. Aquí ambas ramas del Ts convergen y en el mismo punto vuelven a bifurcar (Fig. 3.ii G). Además, tras el borde delimitado de la porción izquierda de OV, se observa OL (doble flecha roja). Por otro lado, en una imagen dorsal (Fig. 3.ii H), se ve OL pudiéndose identificar su contacto e inserción en los elementos cartilaginosos, observándose también la silueta de OV desde la otra cara de la siringe. La ubicación de OL en dorsal está representada en el esquema dorsal de Siringe (Fig. 3.ii H). A su vez, la siringe del ejemplar de Fíofío hembra (Fig. 3.ii I y J) es prácticamente idéntica a la del macho.

En los cortes longitudinales de siringe de Diucón teñidos con He es posible ver en niveles ventrales cómo TL cubre toda la tráquea (**Fig. 3.iii F**), y como en niveles más dorsales éste va cediendo espacio a OV (Fig. 3.iii G, división TL-OV delimitada en naranja), el cual alcanza su mayor envergadura en niveles intermedios (Fig. 3.iii H). En un corte de nivel más dorsal teñido con He se muestra el final de OV (flecha roja), delimitado en naranja su borde con el músculo extrínseco TL (Fig. 3.iii I). Se observa la inserción de OV en A1, representado en el esquema de siringe dorsal de Diucón, adjunto a la derecha de la imagen. También, se ubican con flechas calipso cada par de Blm.

Por último, para el Fíofío, se observa la progresión ventrodorsal de sus dos SIM, tal que en un corte ventral teñido con He, se observa que OL (doble flecha roja y delimitado en amarillo) está en medio de ambos OV, y se inserta en un elemento cartilaginoso sobre A1 (A3, según Ames, 1971), también se observa la inserción de OV en A1 en el corte ventral (Fig. 3.iii J). En este nivel también se identifica un BLm. En un corte más dorsal se delimitan OL y OV por la izquierda (Fig. 3.iii K). En un corte más dorsal aún, teñido con Myo, se ve como ya no hay OL por la izquierda, pero aparece por debajo de OV por la derecha (Fig. 3.iii L). Por último, esta disposición se enroca en un corte dorsal (Fig. 3.iii M), situándose OL por sobre OV, y se observa la inserción de este último en A1, A2 y A3.

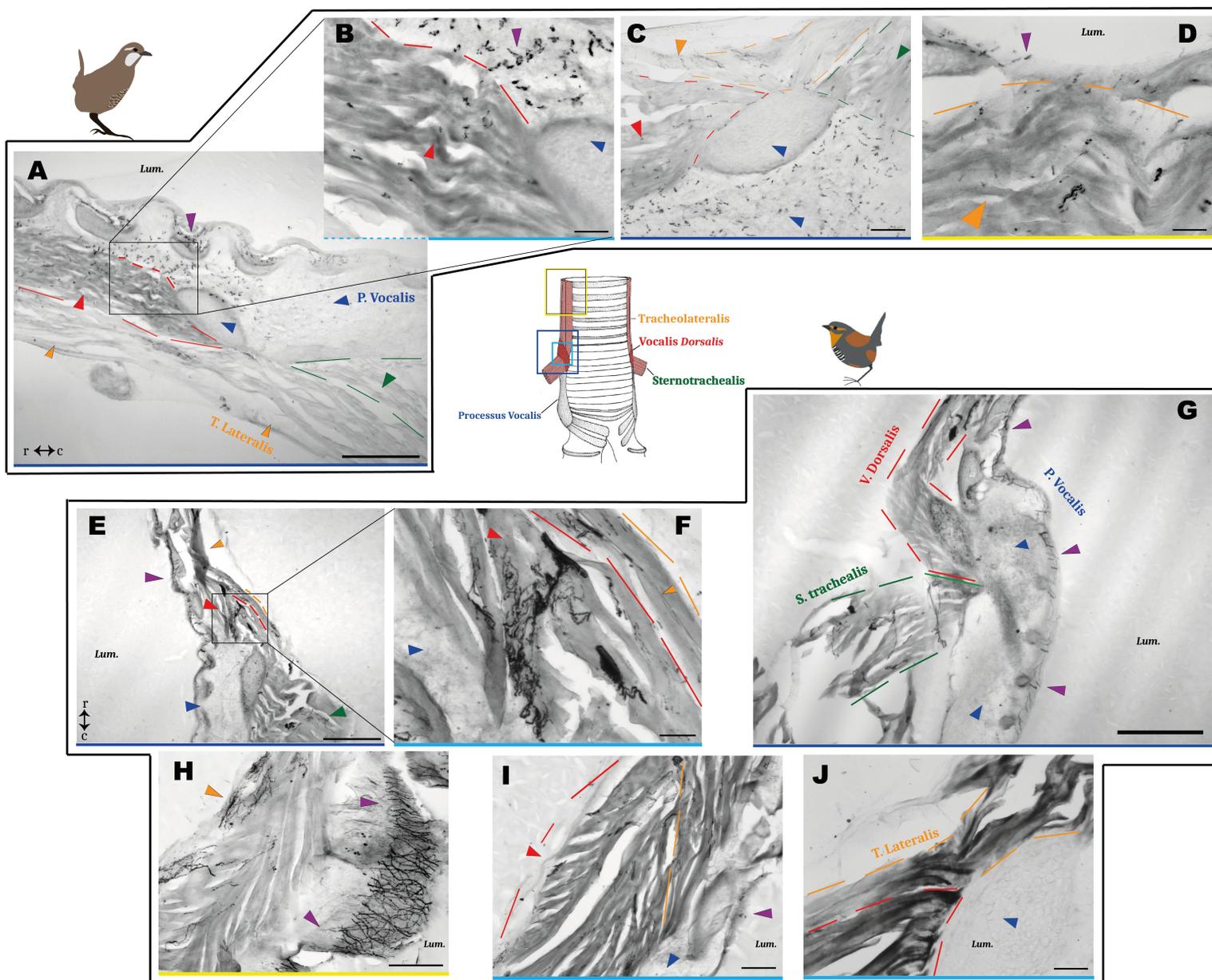


Figura 3.v. Inervación de SIM, SEM, PV y pared traqueal interna, con inmunohistoquímica en cortes Sirlg de los dos rinocriptidos. Un esquema de siringe de rinocriptido representa los sectores de la siringe que están fotografiados, con marcos cuyo color se usó para resaltar el borde de cada imagen según ubicación respectiva. Todos los cortes mostrados son intermedios según el eje dorsoventral. **A-D.** Turca. Todos los cortes con rostral a la izquierda y caudal a la derecha. (A) NF en 4X. VD delineado en rojo, ST delineado en verde y TL bordeando a ambos, además de inserción de estos tres en parte rostral de PV, y fibras nerviosas dentro de este último. (B) Aumento de A, 20X. Acercamiento a VD y fibras nerviosas de PV. (C) NF en 10X, detalle de la inserción de VD, TL y ST en parte rostral o apical de PV. (D) NF en 20X, detalle de fibras en TL y fibras en la pared interna de la tráquea. **E-J.** Chucao. Todos los cortes con rostral hacia arriba y caudal hacia abajo. (E) NF-SV2 en 4X,

ubicación del único SIM y los dos SEM con respecto a parte apical de PV en un corte ventral. Delimitado borde VD-TL en rojo, y una porción en el borde exterior del último en naranja. (F) Aumento de E, 20X. Acercamiento a VD, abundantes terminales nerviosos. (G) NF-SV2 en 4X, corte ventral, destaca cómo VD rodea a PV, y fibras nerviosas en el borde interno de este último. (H) NF-SV2 en 4X, corte sobre la siringe, abundantes fibras nerviosas en la pared interna de la tráquea e inervación en TL (flecha naranja). (I) CHAT en 20X, con VD y TL parcialmente delimitados. Muestra detalle de terminales motores en VD (J) Myo en 20X, detalle de la inserción de VD y TL en la parte superior de PV. **Lum.:** Lumen siringe-tráquea. Barras de escala: 500 μm en 4X; 100 μm en 10X; 50 μm en 20X; 20 μm en 40X y 10 μm en 100X.

En los cortes Tqtv de Diucón teñidos para Myo, se observa marca oscura en el músculo TL dejando un hueco donde está ubicado el nervio Ts (**Fig. 3.iv G y H**). Ts también se marcó con CHAT en los mismos cortes, mostrando una marca reticular tenue en TL sin indicios de marca CHAT-positiva en el anillo interno de la tráquea (**Fig. 3.iv I**). La tinción de NF-SV2 nuevamente marcó abundantes ramificaciones nerviosas en TL además de marcar el nervio Ts, el cual se ve separado en dos planos como efecto de la fijación con PFA, que suele provocar un encrespamiento de los nervios (**Fig. 3.iv J y K**). Notablemente, en la misma imagen, es visible la ausencia de fibras sensoriales en el anillo interno de la tráquea.

Además, una tinción de CHAT de cortes Tqlg muestra el detalle de fibras motoras abundantes en TL (**Fig. 3.iv L**).

Por otro lado, para ambos Fíofío procesados en este trabajo, dado que no hubo perfusión (sólo se les fijó por inmersión), los cortes Tqtv fueron los más perjudicados. Ts y sus axones se mostraron ladeados en casi todos los cortes de ambos animales. Uno de los pocos cortes de nervio examinados que presentó en menor grado esa morfología, marcado con NF-SV2 (Fíofío 17 hembra), fue utilizado para contar axones de Ts (**Fig 3.iv M**).

Por último, cabe reiterar, que no se examinaron cortes Tqlg para Fíofío.

En cortes Sirlg, partiendo por el Diucón, se ve la inervación de OV por Ts, quien desciende por TL, por el lado derecho de SIM, visible por tinciones de CHAT (**Fig 3.vi A**) y algunas fibras motoras extendiéndose por la musculatura. En cortes un poco más ventrales a los mostrados en el panel A, se ve el lado izquierdo de la SIM marcadas para Myo. Es posible ver cómo se disponen perpendicularmente entre sí los haces de músculo esquelético de TL y aquellos de OV (**Fig. 3.vi B**), cuando TL ya ha cedido casi toda el área basal de la siringe a OV.

Para el Fíofío, se aprecian abundantes terminales nerviosos en su SIM (**Fig 3.vi. D**). Se pueden distinguir terminales axónicos envolviendo diversos haces de músculos, y terminales motores con su morfología característica en puntos (flechas blancas). También se ve, en un corte medial, a 2.5 mm sobre la siringe (**Fig. 3.vi.E**), numerosas fibras nerviosas en toda el área de TL, bajando por este, o bien dejando fibras en el camino.

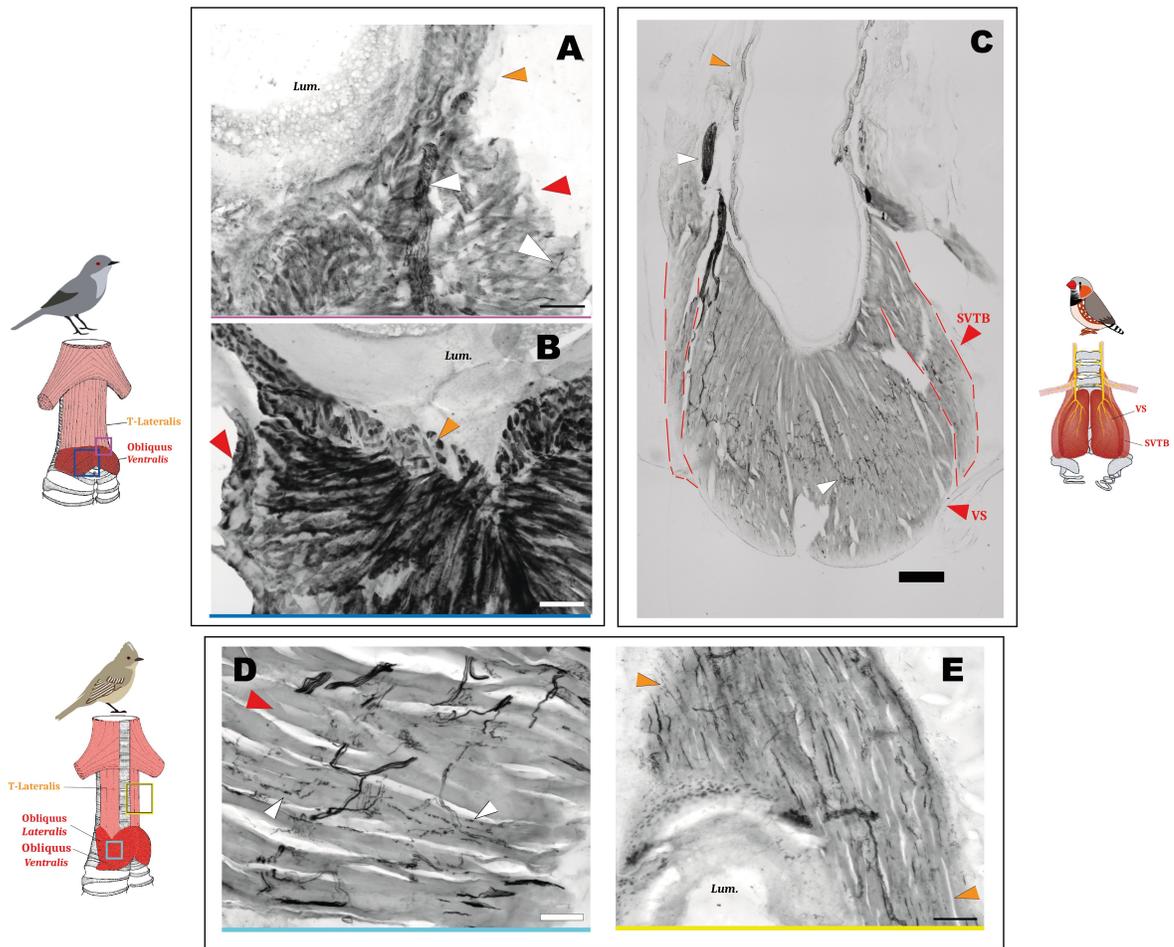


Figura 3.vi. Inervación de SIM y SEM, con inmunohistoquímica en cortes Sirlg de los dos tiránidos y ZF. En general, cortes mediales según el eje dorsoventral de la siringe. Planos enfocados se indican en esquemas de siringes cuyo color se repite en los bordes de los cortes correspondientes. **A-B.** Diucón. (A) CHAT en 10X, Ts bajando hacia OV. (B) Myo en 10X, perpendicularidad entre fibras de TL y OV. (B) **C.** ZF. NF siringe completa a 4X. **D-E.** Fiofio (hembra). (D) NF-SV2 en 20X, detalle de abundantes terminales axónicas. (E) NF-SV2 en 10X, donde se ven numerosas fibras nerviosas a lo largo de todo TL. **Lum.:** Lumen siringe-tráquea. Barras de escala: 500 μm en 4X; 100 μm en 10X; 50 μm en 20X.

Siringe de Oscinos -

La siringe del Diamante o Zebra Finch (ZF) destaca por su enorme SIM en comparación a los Suboscinos (**Fig 3.i E**). La prominente SIM se encuentra por debajo del par extrínseco ST, cubriendo todo el tramo entre dicho músculo y los últimos elementos cartilagosos traqueales, llegando hasta A1 donde se insertan (Fig 3.i). Siguiendo la nomenclatura de Düring y col., (2012) para la SIM del ZF, se identifican en la figura las subdivisiones VS (del inglés *Ventral syringeal muscle*) y

SVTB (del inglés *superficial ventral tracheobranchial muscle*), 2 de las 11 subdivisiones que dicho trabajo describe, con técnicas de microtomografía computarizada.

En el caso de ZF, únicamente se realizó una tinción de Neurofilamento (NF) a su siringe cortada transversalmente. En el nivel de cortes Tqtv se obtuvo una marca muy nítida en Ts, pero prácticamente nula marca de fibras nerviosas en TL (**Fig 3.iv** N y Ñ). Se observa abundante marca de fibras y terminales nerviosos de axones a lo largo del grosor de la SIM de ZF (Fig. 3.iv O).

Por último, se muestra un corte de nivel intermedio teñido para NF (**Fig 3.vi** C), que muestra dos de sus SIM, VS y SVTB (este último, delineado en rojo) siendo inervados por Ts, que baja por el costado izquierdo de la imagen (flecha blanca) desde TL, para inervar a lo largo de ambos SIM, particularmente VS.

3.2.- Anatomía de nXII.

La anatomía del núcleo XII (nXII) fue explorada mediante tinciones de Nissl e inmunohistoquímica de CHAT. En cortes coronales de cerebro teñidos con Nissl, se muestra la extensión de nXII a lo largo del eje anteroposterior (**Fig 3.vii** A-C; **Fig 3.viii** R-T)). La inmunohistoquímica de CHAT se utilizó para localizar el nXII en el bulbo raquídeo, para posteriormente identificar este núcleo en el Nissl y contar sus motoneuronas. También hubo otros núcleos marcados con CHAT, que dado su morfología distintiva y su posición respecto al nXII fue posible identificar en el Nissl y usar como hitos para ubicar al nXII. Desde los cortes de niveles intermedios hasta los anteriores aparece el núcleo vagal (nX) dispuesto dorsalmente al nXII mostrando neuronas de menor tamaño (**Fig 3.vii** D-H y K; **Fig 3.viii** C e I). El nX se supera en tamaño al nXII desde los niveles intermedios hacia anterior en el eje rostrocaudal. Paralelamente, surge el Núcleo Supraespinal (SSp), ubicado ventral al nXII en todos los niveles, haciéndose de mayor tamaño que el nXII en la medida en que se progresa hacia posterior (**Fig 3.vii** H, K y L; **Fig 3.viii**. D, J y O). A su vez, adyacente a la línea media se ubica el Fascículo Longitudinal Medial (FLM) acompañando por medial al nXII a lo largo de toda su extensión (**Fig 3.vii** J, K y L; **Fig. 3.viii** E, G y N). En rinocriptidos y tiránidos la envergadura de nXII es mayor en los niveles intermedios.

Por otro lado, se identificaron dos subdivisiones: una dorsomedial (Dm) y otra ventrolateral (VI) (**Fig. 3.vii**, línea discontinua roja y azul, respectivamente).

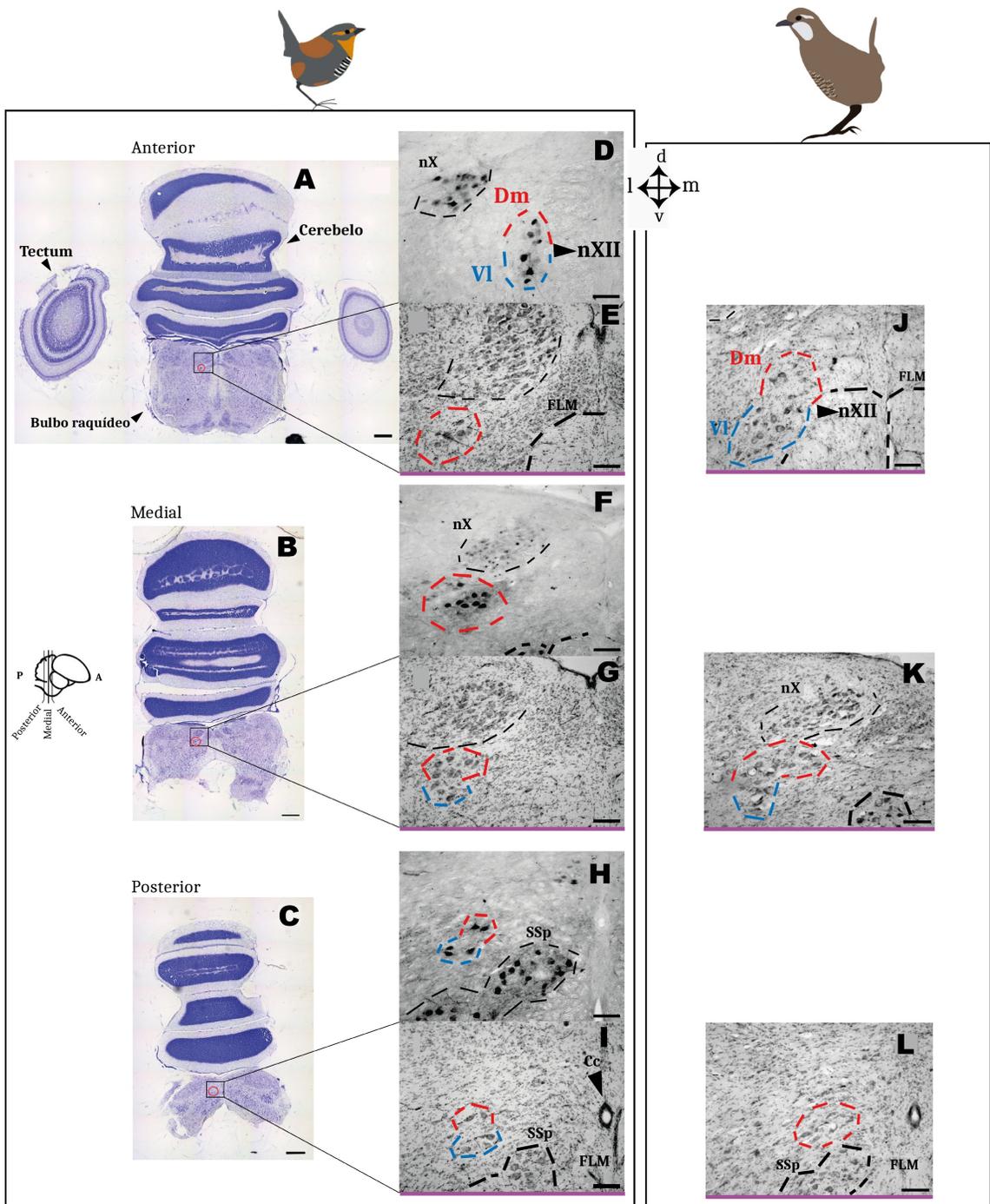


Figura 3.vii. Cortes coronales de cerebro tratados con Nissl y CHAT de los dos rinocriptidos. Las imágenes en la parte superior muestran la porción anterior de nXII, las situadas en la mitad, la porción medial de nXII, y las de la parte inferior, la porción posterior de nXII. Los niveles anteroposteriores retratados están esquematizados por un dibujo de cerebro al lado izquierdo de 'B'. Las fotos de tinciones de Nissl llevan una línea morada en su base, para distinguir de las de CHAT.

Todas las fotos de NISSL y CHAT enfocan el par izquierdo del nXII, por lo que el eje a seguir, es Dorsal arriba, Ventral abajo, medial a la derecha, lateral a la izquierda. Excepto Dm (delineado rojo) y VI (delineado azul) de nXII, algunas estructuras no fueron rotuladas (nomenclatura de Faunes y col 2017). **A-C.** Sección completa de Nissl en 4X de Chucao, corte anterior (A), medial (B) y posterior (C). **D-I.** Acercamientos a nXII de Chucao en 10X, de CHAT, corte anterior (D), Nissl corte anterior (E), CHAT, corte medial (F), Nissl corte medial (G), CHAT corte posterior (H), Nissl corte posterior (I). **J-L.** Acercamiento a nXII de Turca en Nissl a 10X, un corte anterior (J), medial (K) y posterior (L) respectivamente. Cc: canal central. Dm: porción dorsomedial de nXII. FLM: fasciculus longitudinalis medi-alis. nX: núcleo diez del nervio vagal. nXII: núcleo doce del nervio hipogloso traqueosiríngeo. SSp: nucleus suprasspinalis. VI: porción ventrolateral de nXII. Barras de escala: 500 μm en 4X y 100 μm en 10X.

3.3.- conteo motoneuronas de nXII y axones de Ts.

Conteo motoneuronas de nXII -

Las motoneuronas del nXII fueron contadas en el tejido de 2 Turcas (macho), 1 Chucao (hembra), 1 Diucón (hembra), 2 Fíofíos (una hembra y un macho) y 2 ZF (macho) (Tabla 1). Los números resultantes de estos conteos fueron normalizados por el peso del cerebro, exceptuando el caso del Fíofío macho pues no se contó con ese dato.

Los números de motoneuronas estimadas del nXII (**Tabla 1 y Fig. 3.ix**) en rinocriptidos fue: 595 y 643 para las Turcas, y 824 para el Chucao. En el caso de los tiránidos el resultado fue: 787, Fíofío hembra; 858, Fíofío macho, y 945 para el Diucón. En el caso del Oscino modelo, ZF, el resultado fue: 2169 y 2261. Notablemente, el número relativo de motoneuronas del nXII para los rinocriptidos disminuyeron tras normalizar por el peso de sus cerebros (Tabla 1 y Fig 3.ix). Esta disminución fue mayor en el caso de las Turcas ya que sus cerebros fueron los de mayor tamaño de todas las especies estudiadas. El único Suboscino que aumentó su número relativo de motoneuronas tras normalización fue el Fíofío hembra, que quedó como el Suboscino con el valor más alto. Por otro lado, el Diucón, permaneció prácticamente con el mismo número de motoneuronas tras la normalización, debido a tener un peso de cerebro de casi exactamente 1 gramo. Por otro lado, los números de motoneuronas del nXII para ambos ZF aumentó tras normalizar, debido a ser el cerebro más liviano de las especies estudiadas (Tabla 1 y Fig 3.ix.). Sin embargo, en tanto las motoneuronas constituyen unidades funcionales que no necesariamente escalen con la masa macroscópica del animal, los números normalizados por el peso del cerebro, no necesariamente indiquen un valor significativo fuera de contextualizar los números con el tamaño del cerebro de cada animal.

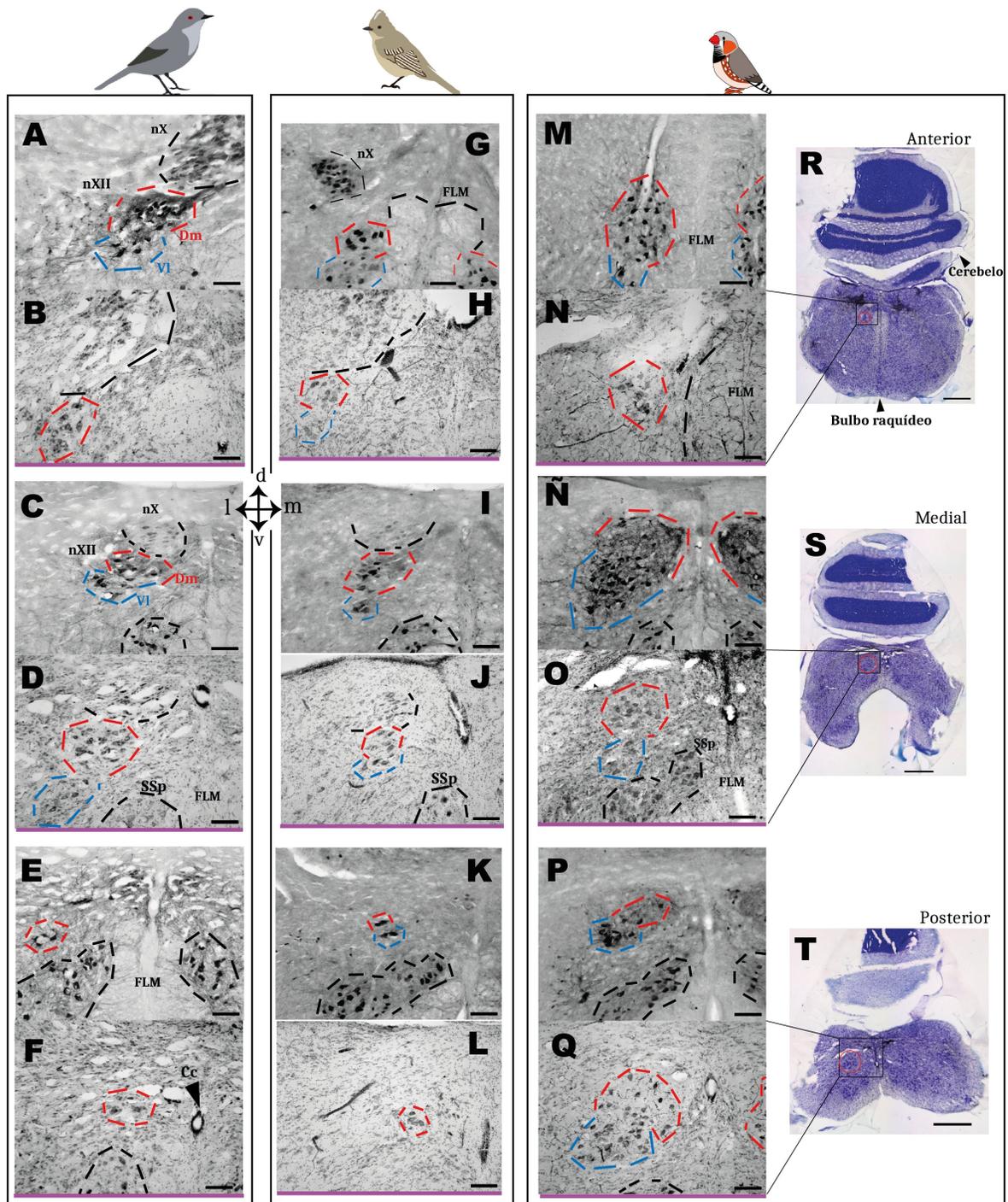


Figura 3.viii. Cortes coronales de cerebro tratados con Nissl y CHAT de los dos tiránidos y ZF. Se reiteran los mismos códigos de posición, códigos de color y rótulos que en la figura anterior. **A-F.** Acercamientos en 10X a nXII de Diucón, con (A) CHAT, corte anterior (B), NISSL corte anterior (C),

CHAT, corte medial (D) Nissl, corte medial, (E) CHAT, corte posterior; (F) Nissl, corte posterior **G-L**. Acercamientos en 10X a nXII de Fíofío, con (G) CHAT, corte anterior; (H) Nissl, corte anterior. (I) CHAT, corte medial, (J) Nissl, corte medial, (K) CHAT, corte posterior, (L) Nissl, corte posterior. **M-Q**. Acercamientos en 10X a nXII de ZF, con (M) CHAT, corte anterior, (N) Nissl, corte anterior, (Ñ) CHAT, corte medial, (O) Nissl, corte medial, (P) CHAT, corte posterior, (Q) Nissl, corte posterior. **R-T**. Cortes de cerebro completo con Nissl a 4X, siendo (R) anterior, (S) medial y (T) posterior, respectivamente. Cc: canal central. Dm: porción dorsomedial de nXII. FLM: fasciculus longitudinalis medi-alis. nX: núcleo diez del nervio vagal. nXII: núcleo doce del nervio hipogloso traqueosiríngeo. SSp: nucleus supraspinalis. VI: porción ventrolateral de nXII. Barras de escala: 500 μ m en 4X y 100 μ m en 10X.

Conteo axones Ts -

Se contó el número de axones del nervio Ts, en cortes transversales de tráquea procesados con inmunohistoquímica de NF obtenidos aproximadamente a 1 cm sobre la siringe. Esto se llevó a cabo en 4 aves, 1 Chucao hembra, 1 Diucón hembra, 1 Fíofío hembra y un ZF macho. Los números resultantes de estos conteos fueron divididos por el número de motoneuronas estimadas del nXII para obtener una proporción de la cantidad de células que inervan la SIM de la siringe (*ax/mn*), considerando la posible tributación de axones a otros destinos.

Los números de axones Ts contados fueron 247 para el Chucao (proporción del 0,3 ax/mn), 318 para el Fíofío (0,404 ax/mn), 529 para el Diucón (0,56 ax/mn), y 742 axones para el ZF (0,335 ax/mn) (Tabla 1). Es notable la importante cantidad de axones que posiblemente inervan otras estructuras antes de este nivel de corte en la tráquea antes de alcanzar la siringe.

	N.º Axones Ts contados	N.º Motoneuronas estimadas del nXII	N.º Motoneuronas normalizado por peso cerebro (1/g)	Peso cerebro (g)	Proporción Axones Ts- Motoneuronas nXII	Volumen estimado nXII (mm ³)	Error de Gundersen (m=1)
Turca 1 (♂)	/	595	185,22	3,0504	/	/	0,12
Turca 2 (♂)	/	643	216,207	2,974	/	0,0133	0,10
Chucao 3 (♀)	247	824	503,667	1,636	0,3	0,0572	0,09
Diucón 1 (♀)	529	945	935,643	1,01	0,56	0,0503	0,10
Fíofío 17 (♀)	318	787	1390,46	0,566	0,404	0,0336	0,09
Fíofío 16 (♂)	/	858	/	/	/	0,0477	0,09
ZF 0 (♂)	742	/	/	/	0,335	/	/
ZF 3 (♂)	/	2169	3943,636	0,55	/	0,0321	0,06
ZF ka17 (♂)	/	2261	4110,909	0,55	/	/	0,05

Tabla 1. Resumen de los números de anatomía obtenidos para los 9 ejemplares examinados de las 5 especies de aves. Los conteos de axones del nervio Ts no fueron realizados en Turcas debido a que no se contó con el corte transversal usado para estos conteos. Análogamente para los 3 ZF, sólo la siringe de ZF 0 fue procesada, mientras que el tejido de cerebro de ZF 3 y ZF ka17 fue analizado a partir de material previamente procesado en el laboratorio. Los volúmenes estimados de Turca 1 y ZF ka17 tuvieron errores metodológicos por lo que se les descartó. Un error de Gundersen inferior a 0,1 es considerado óptimo según Glaser & Wilson (1998) al estimar poblaciones de células utilizando el método del fraccionador óptico.

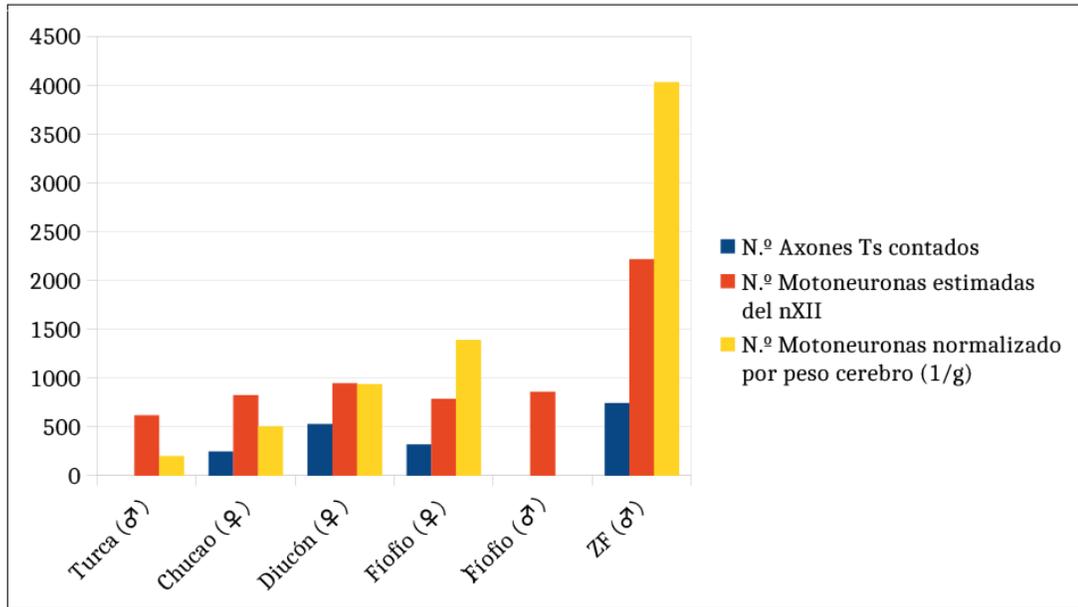


Figura 3.ix. Comparación de los resultados obtenidos para conteos de axones de Ts, motoneuronas de nXII y normalización por peso de cerebro del n.º de motoneuronas de nXII, por especie. El número de motoneuronas estimadas de nXII para Turca es el promedio entre dicho dato para Turca 1 y Turca 2, que fue el número que a su vez se normalizó. El número de motoneuronas estimadas de nXII para ZF es el promedio entre dicho dato para ZF 3 y ZF ka17, y el número de axones contados de Ts para ZF corresponde a ZF 0.

3.4.- Repertorios Vocales.

Se construyó el repertorio vocal de los cuatro suboscinos del estudio (Fig. 3.x para rinocriptidos y Fig. 3.x para tiránidos) utilizando cuatro criterios:

- (1) Similitud auditiva y espectral entre las vocalizaciones encontradas, verificado visualmente mediante espectrogramas;
- (2) Producción de las vocalizaciones tipo por más de un ave y en más de una de las comunidades estudiadas;
- (3) Presencia de un contexto conductual-ecológico asociado a cada vocalización;
- (4) Capacidad de un mismo individuo de producir todas las vocalizaciones tipo identificadas en el repertorio para su especie.

Tanto las vocalizaciones tipo encontradas como sus subtipos o variaciones se categorizaron en 3 clases distintas según su modo de producción en el tiempo: Notas, Cantos y Dinámicas. La clase *Notas* refiere a llamadas emitidas como notas aisladas. La clase *Cantos* refiere a llamadas compuestas de varias notas emitidas en una secuencia estereotipada. La clase *Dinámicas* refiere a vocalizaciones emitidas

ya sea como notas aisladas, agrupadas en series de pocas notas o como cantos, que se repiten entre intervalos de algunos segundos en secuencias que pueden durar varios minutos, y que suelen estar asociados a un despliegue conductual particular del ave (por ejemplo: despliegues territoriales o de alarma). Por último, cabe mencionar que dentro de la clase *Cantos* pueden encontrarse *Canciones*, es decir, cantos asociados a un contexto conductual territorial y reproductivo. En Oscinos estos despliegues son producidos principalmente por machos, sujetos a alzas hormonales y cambios de estacionalidad y son principal objeto del proceso de aprendizaje vocal en la ontogenia temprana.

A continuación, se detallarán las características espectrales, el modo de producción más común, el contexto conductual y los demás subtipos de las vocalizaciones de cada repertorio:

Vocalizaciones rinocriptidos -

Para la **Turca** se encontraron 9 vocalizaciones tipo (**Fig. 3.x. A**) que cumplieron los cuatro criterios mencionados, habiendo un ave donde se logró registrar las 9 vocalizaciones, un individuo anillado verde izquierdo, en QP, anillada en Octubre de 2021 y grabada continuamente hasta Agosto de 2022. Ninguna otra Turca anillada se siguió por tanto tiempo en el mismo sector, y las que sí se continuaron observando, no se les pudo grabar todas las 9 vocalizaciones tipo, aunque sí varias de ellas.

1. La vocalización **Agua** presenta notas con el segundo mayor rango de modulación de frecuencia del repertorio, entre 575 y 1530 Hz (Fig. 3.x A-1; Tabla 2). Su forma más común es una secuencia de 30 notas en promedio. Esta forma de producción se llamó 'Agua canto', la cual muestra variaciones con respecto a la velocidad en que se emiten las notas ('Agua rápida' y 'Agua lenta'). Normalmente es usada como alarma ante humanos, bicicletas o autos pasando por los caminos aledaño a los sitios de muestreo, pero también ante la presencia de algún predador como tiuques o águilas (Tabla 2). Además, se observó una cantidad de otros subtipos considerable, en forma de nota aislada (Subtipo 'Agua suelta'), como dinámicas de contacto con notas sueltas o agrupadas en series de pocas notas (2-4) (Subtipo 'Agua dinámica'). También fueron observadas variaciones en el espectro de frecuencia de las notas, en el cual los componentes intermedios (diagonal que une un círculo superior e inferior, cuya forma asemeja una semicorchea) desaparecen, dándole una sonoridad particular (subtipo 'Agua pato').

2. La vocalización **Chiripiorca** consiste en un canto de varias notas individualmente poco moduladas en frecuencia cada una (483,505 Hz DeltaF promedio, Tabla 2), pero que van descendiendo en frecuencia una tras otra de forma escalonada ('Chiripiorca común', Fig. 3.x A-2). Se identificó como llamada territorial y de contacto, siendo esta una de las vocalizaciones en las cuales las Turcas se enlazan en duetos o tríos vocales sincronizados (coros). En otros casos, la

vocalización Chiripiorca también fue vista como alarma ante predadores, aunque menos frecuentemente que otras vocalizaciones. Además, se observaron subtipos con respecto al largo de la vocalización ('Chiripiorca corta' y 'Chiripiorca fin sirenita' -más larga-), y a cambios en la frecuencia de las notas como 'Chiripiorca desafinada' (notas partidas y con armónicos) o 'Chiripiorca plana' (notas que repiten sólo unos pocos sitios de la 'escala' característica usada por cada individuo).

3. La vocalización **Tuit** consiste en notas que presentan una modulación entre 1190 y 1818 Hz promedio (Tabla 2), con una sonoridad y espectro de frecuencia similar a las notas de Chiripiorca, salvo por la mayor modulación y presencia frecuente de armónicos ('Tuit común', Fig. 3.x A-3). Su modo de producción más habitual es el de dinámicas de contacto de rango largo, las cuales pueden llegar a durar varios minutos con Turcas involucradas desde sectores alejados entre sí por más de 200 metros. Ocasionalmente también se observó su uso como alarma ante humanos o vehículos aproximándose desde lejos avistados u oídos por el ave. Presenta subtipos asociados a cambios en la frecuencia de las notas como 'Tuit plano agudo', cuyas notas ubicadas a los 2,5 kHz no muestran casi modulación ni armónicos.

4. La vocalización **Desafinado** presenta notas con la mayor modulación de frecuencia promedio del repertorio (1407 Hz, Tabla 2; Fig. 3.x A-4). Sus notas se forman de múltiples elementos escalonados pero continuos de distinta frecuencia fundamental. Su modo de producción usual es de dinámicas, de forma casi idéntica a *Tuit* (subtipo 'Desafinado común'), con la diferencia notable que fue asociada exclusivamente a contextos de alarma, siendo la vocalización empleada hacia la mayor diversidad de predadores. Ante humanos a pie, bicicletas, vehículos o en particular ante tiuques, suele ser la primera vocalización emitida por la Turca acechada y/o Turcas en proximidad, tras lo cual suelen oírse alarmas sucesivas como *Agua* o *Chiripiorca*. Particularmente, se observó en varias ocasiones (invierno 2022) a parejas de zorros merodeando sectores abundantes en Turcas, ante lo cual Turcas fueron vistas emitir esta vocalización y escapar a pocos metros de los zorros. Esta probable predación de Turcas no ha sido documentada en la escasa literatura al respecto (Montecinos y col., 2017). Por otro lado, el subtipo 'Desafinado íntimo', se ha identificado como una alarma de rango menor realizado entre parejas de Turca forrajeando o llamándose en contacto de comida.

5. La vocalización **Sirenita** consiste en un canto cuyas notas presentan la menor modulación de frecuencia del repertorio (390 Hz de DeltaF, desde 442 a 832 Hz, Tabla 2). Su modo de producción más habitual fue un canto que reitera una nota 15,8 veces en promedio, en ocasiones cambiando la frecuencia de las notas levemente a lo largo de la emisión (Fig. 3.x A-5). Se vio asociada a contextos territoriales y tuvo una marcada estacionalidad, por lo que se consideró la *canción* de la Turca (ver apartado '*Canción*' al final de la presente sección).

6. La vocalización **Poseidón** consiste en un canto cuyas notas se encuentran dentro del rango bajo (437 a 976 Hz, Tabla 2). Su modo de producción más usual

fue un canto con un promedio de 5,66 notas ('Poseidón canto', Fig. 3.x A-6), identificada en contextos de agresividad y despliegues filiativos con matices de agresividad. En algunas de estas ocasiones las Turcas se aproximaron entre sí y se situaron una frente a otra para vocalizar sacudiendo las alas e hinchando el tronco inclinadas hacia adelante. Este mismo despliegue se vio desde una Turca hacia una Codorniz que chocó con la primera al aterrizar de un vuelo. Se identificaron subtipos asociados a distintos modos de producción en el tiempo. Estos son 'Poseidón dinámica' y 'Poseidón nota suelta'.

7. La vocalización **Distress** consiste en notas que se encuentran en la banda espectral más baja de la Turca pero con una de las mayores modulaciones de frecuencia del repertorio (887 Hz, entre 303 y 1191 Hz, Tabla 2). Su modo de producción habitual fue de notas aisladas, emitidas durante la manipulación de individuos para anillamiento o toma de sangre luego de su captura (Fig. 3.x A-7). Fue más bien homogénea en los casos en que se grabó ('Distress común'), pero se encontró una variación inusual, 'Distress hued', en un individuo. A su vez, notablemente, esta vocalización tipo fue emitida por una Turca al grabarse y verse embestirse con una Iguana chilena (quien se observó podría potencialmente ser predador de nidos de Turca).

8. La vocalización **Rarillo** fue una de las vocalizaciones crípticas estudiadas. Sus notas se encuentran en el rango más bajo de la Turca (357 a 912 Hz, Tabla 2). Su modo de producción común fue un canto de 6,19 notas promedio, con notas muy breves y con muy poca modulación continua ('Rarillo común', 300 Hz de DeltaF particulares a este subtipo; Fig. 3.x A-8) a excepción de ciertos casos de considerable modulación por nota ('Rarillo variación'). Fue identificada en contextos de agresividad y despliegues filiativos con matices de agresividad, similar al *Poseidón*, a menudo producido de forma intercalada con esta última vocalización.

9. Por último, la vocalización **Íntimo**, fue la segunda vocalización críptica estudiada. Consiste en notas presentes en el rango de frecuencia medio (834 a 1362 Hz, Tabla 2). Su modo de producción habitual fue de notas aisladas (Fig. 3.x A-9) emitidas muy despacio. Se asoció a un contexto conductual filiativo, pues se observó como contacto de rango corto en parejas de Turcas forrajeando. No se hallaron otros subtipos.

Finalmente, se observaron múltiples instancias de variabilidad en que la Turca transitó de una vocalización tipo a otra, dentro del modo de producción más común de la vocalización inicial. Ejemplo de esto es la variación 'Tuit a Chiripiorca', ocurrida usualmente al responderse dos Turcas con dinámicas de 'Tuit común', ante lo cual ambas cambian a un coro de *Chiripiorca*. A su vez, el subtipo 'Tuitagua' se identificó como nota transicional usada frecuentemente para transitar de *Agua* a *Tuit* o *Agua* a *Chiripiorca*, durante despliegues vocales intensos.

Para el **Chucao** se encontraron 9 vocalizaciones tipo (**Fig. 3.x B**), con un posible décimo tipo. Para esta especie, se cumplieron los 3 primeros criterios, y si bien hubo 3 aves anilladas para intentar cumplir el cuarto criterio, esto fue imposible debido al menor tiempo invertido en terreno estudiando esta ave. Por estas razones este repertorio se considera como una propuesta que aún debe ser completada.

1. La vocalización **Territorial I** consiste en un canto cuyas notas se hallan en el rango medio del repertorio (803 y 1924 Hz, Tabla 2). Su modo de producción usual es un canto sonoro de 5-6 notas, emitido en contextos territoriales y con una marcada estacionalidad ('Territorial I común', Fig. 3.x B-1), por lo que se consideró la *Canción* del Chucao (ver apartado '*Canción*' al final de la presente sección). Asociado a cambios en la estructura acústica de la vocalización, se identificó el subtipo Territorial I agudo, que no posee la nota baja introductoria de 'Territorial I común', y se halla en un rango de frecuencia levemente más alto.

2. La vocalización **Territorial II** consiste en un canto cuyas notas se hallan en el rango de frecuencia intermedio del repertorio (729 y 1755 Hz, Tabla 2). Presenta armónicos con igual o más energía que la frecuencia fundamental ('Territorial II común', Fig. 3.x B-2), lo que le otorga una sonoridad mucho más aguda que *Territorial I*. Su modo de producción usual es un canto sonoro de 4 notas, observado en contextos de alarma ante la aproximación de humanos. Asociado a modulación en la frecuencia de las notas, posee el subtipo intermedio entre vocalizaciones tipo 'Territorial II trinado'.

3. La vocalización **Trino** consiste en un canto cuyas notas presentan la segunda menor modulación de frecuencia promedio del repertorio ('Trino común', DeltaF: 453 Hz, Tabla 2). Su modo de producción común fue en la forma de una dinámica, tal que se repitieron series de 'Trino común' por varios minutos (Fig. 3.x B-3), posterior a algún evento gatillante. Se asoció a contextos de alarma (de rango corto, entre 2 Chucaos), por ejemplo, posterior al acecho por parte de un gato, o ante la aproximación de humanos.

4. La vocalización **Perrito** presenta notas que se hallan en el rango medio del repertorio (786 a 1714 Hz, Tabla 2). Su modo de producción común fue como una nota aislada muy sonora ('Perrito sonoro', Fig. 3.x B-4), previo a la búsqueda y sucesivo encuentro entre dos individuos, es decir, como Contacto. Se encontró una variación de intensidad en la emisión denominada 'Perrito despacio'.

5. La vocalización **Gatito** consiste en notas que presentan la menor modulación de frecuencia promedio del repertorio ('DeltaF: 428 Hz, Tabla 2; Fig. 3.x B-5). Su modo de producción usual fue una dinámica compuesta de notas aisladas y emitidas despacio mientras una o dos aves forrajea ('Gatito común'). El contexto conductual asociado fue un contacto de rango corto, pero que en ocasiones aumentó progresivamente de volumen, volviéndose más agudo, en cuyo pasa a ser un contacto de rango medio ('Gatito clamación').

6. La vocalización **Michael** consiste en notas que presentan la tercera mayor modulación de frecuencia del repertorio (DeltaF: 1006 Hz, Tabla 2). Su modo de

producción usual fue como notas aisladas (Fig. 3.x B-6), emitida tras intercambios vocales intensos de aves forrajeando (contexto de contacto) o como alarma ante estímulos de *playback* (contexto de alarma). No se hallaron subtipos vocales.

7. La vocalización **Rapaz**, fue una de las vocalizaciones crípticas encontradas. Presenta las notas con mayor modulación de frecuencia del repertorio (DeltaF: 1291,5 Hz, Tabla 2; Fig. 3.x B-7) en el rango más alto de este (1323 a 2614 Hz, Tabla 2). Se grabó a partir de instancias de *playback* (con la vocalización *Trino*) que evocaron que un Chucao vocalizara *Rapaz* mientras corría bruscamente al rededor del parlante de *playback* camuflado, por lo que se identificó como una vocalización de contexto de alarma y posiblemente de agresión. No se hallaron subtipos vocales

8. La vocalización **Íntimo** fue otra de las vocalizaciones crípticas estudiadas. Consiste en notas halladas en el rango más bajo del repertorio (295 a 841 Hz, Tabla 2). El modo de producción observado fue como nota aislada (Fig. 3.x B-8) entre individuos de una familia de 4 Chucaos que se acicalaba. Se identificó como contacto de rango corto. No se hallaron subtipos vocales.

9. La vocalización **Distress** consiste en notas halladas en el rango bajo del repertorio (386 a 1317 Hz, Tabla 2). Su modo de producción común es de notas aisladas (Fig. 3.x B-9), emitidas ante la manipulación de los individuos capturados para anillamiento o toma de sangre (cuatro), por lo que su contexto es de alarma por agresión. No se hallaron subtipos.

10*. Se describió una posible décima vocalización, denominada **Agua** por su sonoridad similar a la llamada *Agua* de Turca (Fig. 3.x B-10*). Presenta notas cuya modulación de frecuencia (DeltaF: 1172 Hz, Tabla 2) se asemejan a dicha llamada en la Turca.

Finalmente, se observaron múltiples instancias de variabilidad en que el Chucao transitó de una vocalización tipo a otra. Por ejemplo, el ya mencionado 'Territorial II trinado' (transición de *Territorial II* a *Trino*) o la transición documentada entre *Gatito* y *Michael* en respuesta a la vocalización *Gatito*, reproducida en *playback* acompañado de un despliegue exploratorio intenso en torno al parlante de *playback*.



A



B

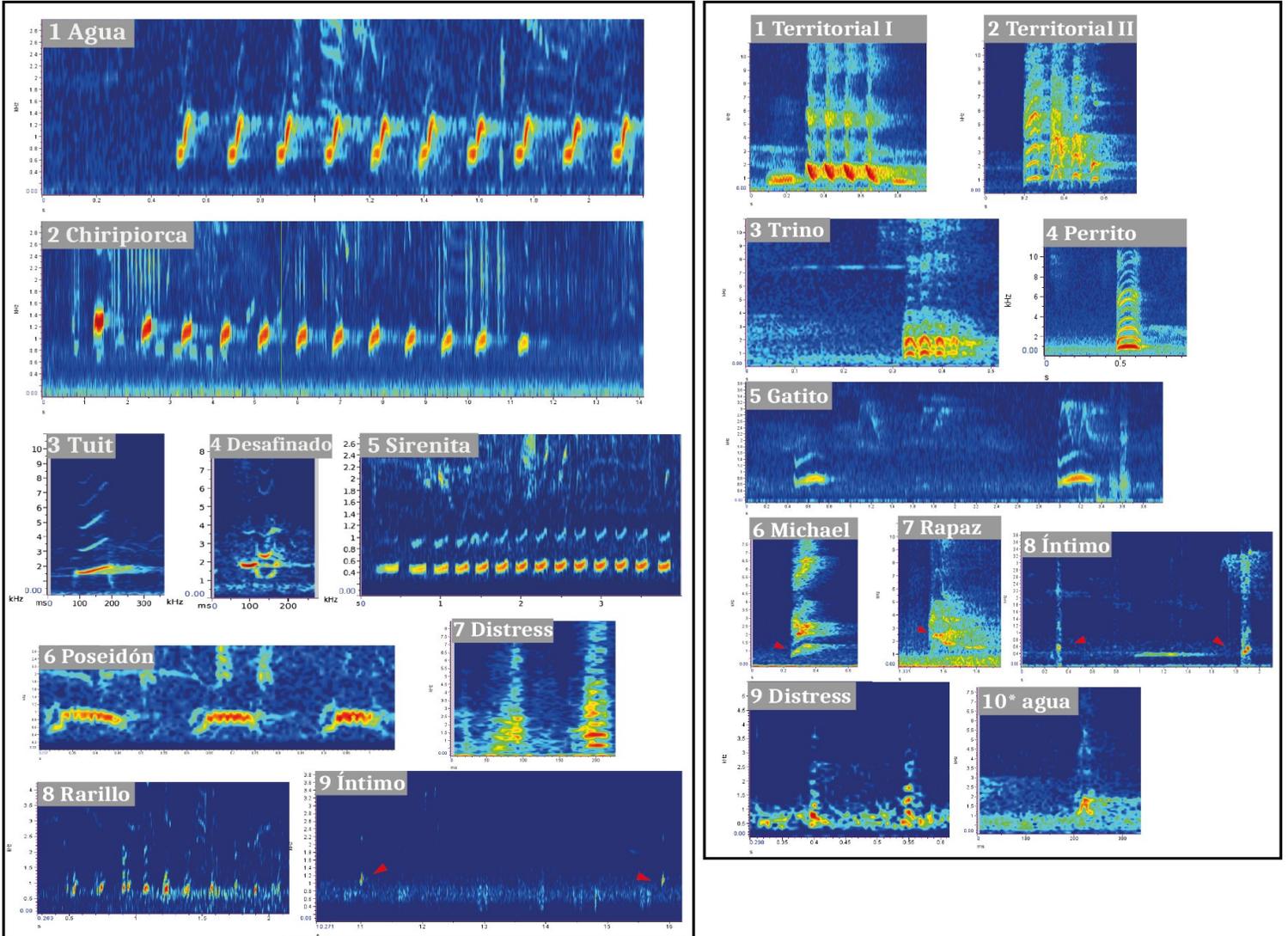


Figura 3.x. Vocalizaciones tipo que componen el repertorio vocal de ambos rinocriptidos, la Turca y el Chucao. Sonogramas de los principales tipos vocales de los 2 rinocriptidos. Flechas rojas apuntan a los aspectos espectrales que constituyen las vocalizaciones en casos no del todo evidentes. Los ejes de cada espectrograma corresponden a frecuencia (Hz), eje y, y tiempo (s), el eje x. Los audios correspondientes a los sonogramas de la figura se pueden escuchar en el siguiente hipervínculo <https://soundcloud.com/tomassalasorchar> **A.** Se encontraron 9 vocalizaciones tipo para la Turca. **B.** Se encontraron 9 vocalizaciones tipo para el Chucao (repertorio preliminar), si bien se reporta una posible décima.

<u>Turca</u>				<u>Chuca</u>			
N.º	1	2	3	1 (#)	2 (#)	3 (#)	
Tipo	Agua	Chiripiorca	Tuit	Territorial I	Territorial II	Trino	
DeltaF (Hz)	954,894	483,505	628,609	1120,99	1026,03	453,421	
LowF (Hz)	575,274	805,584	1190,105	803,171	729,445	752,363	
HighF (Hz)	1530,168	1289,089	1818,715	1924,166	1755,48	1205,78	
Contexto	Alarma/contacto	Contacto/alarma	Contacto/alarma rango largo	Territorial	Alarma/contacto	Alarma	
Subtipos	Agua suelta	Chiripiorca común	Tuit común	Territorial I común	Territorial II común	Territorial II trinado	
	Agua canto	Chiripiorca corta	Tuit plano agudo	Territorial I Agudo	Territorial II trinado	Trino común	
	Agua dinámica	Chiripiorca plana	Tuit a chiripiorca				
	Agua lenta	Chiripiorca desafinada					
	Agua rápida	Chiripiorca fin sirenita					
	Agua pato						
	Tuitagua						
N.º	4	5	6	4 (#)	5 (#)	6 (#)	
Tipo	Desafinado	Sirenita	Poseidón	Perrito	Gatito	Michael	
DeltaF (Hz)	1407,914	390,036	538,996	928,197	428,371	1006,138	
LowF (Hz)	875,884	442,452	437,415	786,487	513,544	488,9	
HighF (Hz)	2283,798	832,487	976,411	1714,685	941,915	1495	
Contexto	Alarma	Territorial	Agresión/Interacción	Contacto	Contacto de rango corto	Alarma/contacto	
Subtipos	Desafinado común	Sirenita armónico	Poseidón nota suelta	Perrito sonoro	Gatito común	-	
	Desafinado íntimo	Sirenita plana	Poseidón canto	Perrito despacio	Gatito clamación		
	Chiripiorca desafinada	Sirenita subeybaja	Poseidón dinámica				
N.º	7 (#)	8	9 (#)	7 (#)	8 (#)	9 (#)	10 (#) (*)
Tipo	Distress	Rarillo	Íntimo	Rapaz	Íntimo	Distress	Agua
DeltaF (Hz)	887,619	555,631	527,868	1291,5	546,11	931,74	1172,384
LowF (Hz)	303,64	357,075	834,315	1323	295,601	386,158	861,752
HighF (Hz)	1191,26	912,706	1362,182	2614,5	841,711	1317,898	2034,136
Contexto	Alarma por agresión	Agresión/Interacción	Afiliativo	Agresión/alarma	Afiliativo	Alarma por agresión	(?)
Subtipos	Distress común	Rarillo común	-	-	-	-	-
	Distress hued	Rarillo variación					

Tabla 2. Resumen de características espectrales de frecuencia (gris), contexto conductual (verde) y subtipos (beige) de las vocalizaciones tipo del repertorio de los dos rinocriptidos. Se muestran los promedios de Delta frecuencia (DeltaF), Frecuencia baja (LowF) y Frecuencia alta (HighF) por nota (su frecuencia fundamental) de las vocalizaciones de la base de datos construida para la Turca, y de un muestreo menor a 10~15 notas para el Chucao. La numeración de cada vocalización se acompaña de un símbolo '(#)' en caso de haberse obtenido los promedios de 10~15 notas, y '(*)' en caso de ser una vocalización muestrada menos de 5 veces. Para *Contexto*, los símbolos '/' indican 'o', es decir, dos modalidades conductuales observadas, siendo la primera la predominante; y el signo '(?)' indica falta de muestreo para saber el contexto asociado. Para *Subtipos* el símbolo '-' está presente en vocalizaciones sin subtipos hallados.

Vocalizaciones tiránidos-

Para el **Fíofo** se encontraron 10 vocalizaciones tipo (**Fig. 3.xi A**), cumpliéndose los 3 primeros criterios mencionados. El cuarto criterio se cumplió parcialmente, logrando identificar 6 de 10 de las vocalizaciones del repertorio en un mismo ave

(Fíofo anillado izquierda rojo, y Fíofo anillado derecha blanca-azul, ambos en QP). Esto se debe en parte a la dificultad con la que resulta identificar a los Fíofo anillados en lo alto del dosel de los árboles donde usualmente transitan, tanto en los lugares de QP y SD donde se grabaron. Esto, sumado a ser una especie bastante agresiva entre conespecíficos, con varias vocalizaciones agresivas descritas, a menudo emitidas durante escaramuzas aéreas de varias aves, donde fue imposible asignar las vocalizaciones grabadas a un individuo o a otro en la mayoría de los casos.

1. La vocalización **Fío** consiste en notas del rango medio del repertorio (1689 a 3199 Hz, Tabla 3.). Su modo de producción usual fue como dinámicas compuestas de notas aisladas (Fig. 3.xi A-1) que se extendieron desde algunos segundos hasta varios minutos. Se identificó como una llamada principalmente de contacto, al ser la vocalización en que más comúnmente se halla a los Fíofo responderse entre sí. Se encontró el subtipo 'Fío alarma', con notas más agudas que el 'Fío contacto' (sobrepasando los 4 kHz), y menor intervalo de tiempo entre notas. Se vio gatillado ante la irrupción de personas, vehículos o predadores como Chunchos o Águilas.

2. La vocalización **Main Song** consiste en un canto cuyas notas se ubican en el rango medio del repertorio (1773 a 3356 Hz, Tabla 3). Su modo de producción usual es un canto de 2,94 notas promedio (Fig. 3.xi A-2) emitido en despliegues territoriales y en forma de dinámicas de varios minutos de duración. Se consideró la *canción* del Fíofo (ver apartado '*Canción*' al final de la presente sección). Además, se identificaron subtipos según su variabilidad de notas ('Main Song 1 nota', 'Main Song 2-6 notas') observándose cierta preferencia por un número de notas determinado en cada individuo.

3. La vocalización **Interaccional** consiste en un canto cuyas notas se encuentran en el rango medio del repertorio (1770 a 3389 Hz, Tabla 3). Sus notas son similares a las de *Fío*, pero presentan abundantes armónicos y menor modulación de frecuencia continua en cada nota. Su modo de producción usual varió entre cantos de 14,8 notas promedio ('Interaccional común'), notas sueltas o dinámicas de 30,53 notas promedio, determinado por el despliegue conductual de escaramuzas agresivas de las cuales normalmente va acompañada. Siendo la vocalización más variable que se estudió, presenta combinatorias a partir de la incorporación de otras vocalizaciones dentro de ella. Destacan 'Interaccional chiqui' (Fig. 3.xi A-3, múltiples elementos distintos), Interaccional Bufido y Ráfaga (llamadas agresivas) e 'Interaccional Distress', emitida por aves capturadas durante manipulación.

4. La vocalización **Trino** consiste en notas que presentan el segundo menor delta de frecuencia (1224 Hz, Tabla 3). Su modo de producción es muy similar a *Fío*, es decir, dinámicas compuestas de notas aisladas (subtipo 'Trino común', Fig. 3.xi A-4) que duran varios minutos, con la diferencia que fue asociado a contextos inmediatamente posteriores a eventos de agresión o interacción vocal intensa. Se hallaron 2 subtipos más asociados a variaciones en la modulación de frecuencia de las notas: 'Trino Agudo' y 'Trino plano'.

5. La vocalización **Dawn Song** consiste en un canto cuyas notas presentan un delta de frecuencia considerable en el rango medio del repertorio (1905 a 3904 Hz, Tabla 3). Su modo de producción habitual fue un canto de 2 notas (Fig. 3.xi A-5) emitido en dinámicas de aproximadamente 40 minutos a partir del amanecer por parte de individuos alrededor de su árbol principal. Se asoció a contextos de territorialidad y ocasionalmente se observó la ocurrencia de Dawn Song fuera del amanecer (subtipo 'Not Dawn Song') el que a su vez se vio combinado con *Bufido* ('Not-Dawn Song con bufido') y de combinatorias con *Main Song* ('Main song con not-dawn song').

6. La vocalización **Ráfaga** consiste en un canto cuyas notas presentan el menor promedio de delta frecuencia del repertorio (1108 Hz, Tabla 3). Su modo de producción usual fue un canto de 12,76 notas en promedio (Fig. 3.xi A-6) emitido en contextos de agresión. En dichos contextos se vio tanto como canto aislado ('Ráfaga común') o como parte de *Interaccional* ('Ráfaga en interaccional').

7. La vocalización **Bufido** consiste en notas que presentan el mayor delta de frecuencia del repertorio (2537 Hz, Tabla 3). Su modo de producción usual fue de una o dos notas aisladas ('Bufido nota suelta', Fig. 3.xi A-7) o dinámicas de pocos segundos compuestas de notas aisladas ('Bufido dinámica'), cuya duración está estrechamente asociada a contextos de agresión. Fue común verla incorporada en combinatorias ('Bufido en interaccional', 'Not-Dawn Song con bufido').

8. La vocalización **Chiqui** consiste en notas ubicadas en el rango más alto del repertorio (2003 a 4042 Hz, Tabla 3). Sus modos de producción usuales fueron ya sea de dinámicas de corta duración ('Chiqui dinámica', Fig. 3.xi A-8), de dinámicas compuestas de notas de otras vocalizaciones tipo como *Fío* (subtipo 'Chiqui Fío') o como notas incluidas dentro de *Interaccional* (subtipo 'Interaccional Chiqui').

9. La vocalización **Inmadura** consistió en un conjunto de notas con el segundo delta de frecuencia más grande del repertorio (2102 Hz, Tabla 3). Su modo de producción común fue una dinámica de múltiples notas en stacatto (Fig. 3.xi A-9), algunas de ellas similares a *Bufido* y otras a *Wayu*, que fue emitida por individuos juveniles, en ocasiones mientras eran alimentados por sus parentales.

10. La vocalización **Wayu** fue una de las vocalizaciones crípticas estudiadas. Consiste en notas ubicadas en el rango medio del repertorio (1437 a 3066, Tabla 3). Se observó como notas aisladas ('Wayu nota suelta', Fig. 3.xi A-10), o como parte de la vocalización *Inmadura* emitida por juveniles ('Wayu en inmadura').

Finalmente, se observaron múltiples instancias de variabilidad en que el Fíofío transitó de una vocalización tipo a otra. Ejemplo de esto es la gran cantidad de combinatorias posibles dentro de la vocalización *Interaccional*, así como la asociación de la vocalización *Chiqui* con *Fío*, de *Wayu* con *Inmadura* y la particular asociación entre la *canción Main Song* y el canto de amanecer *Dawn Song* en contextos post matutinos. A su vez, la transición de todos los subtipos de *Trino* por parte de una misma ave, hasta pasar a 'Main song 1 nota'.

Notablemente, 4 de 7 aves anilladas el 2021 en QP, volvieron de su migración al mismo árbol y sector al que estaba asociado su territorio en el comienzo de la temporada reproductiva de 2022, corroborándose las observaciones de Espinosa y Egli (1997), lo cual permite en principio, grabar Fiofíos anillados por más de una temporada.



Fiofío



Diucón

A

B

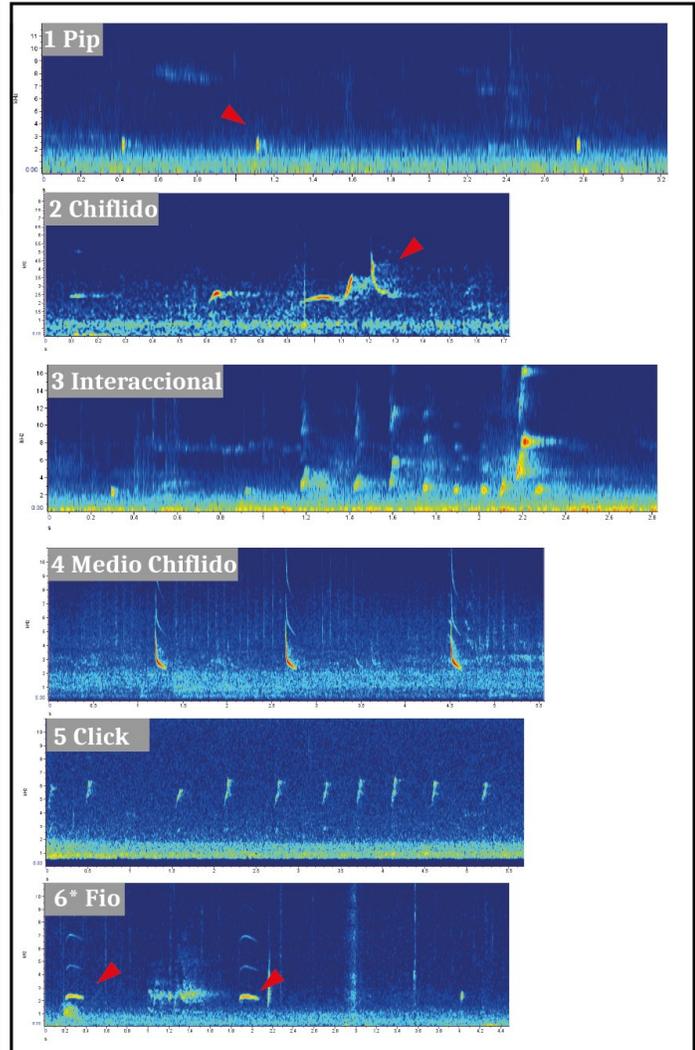
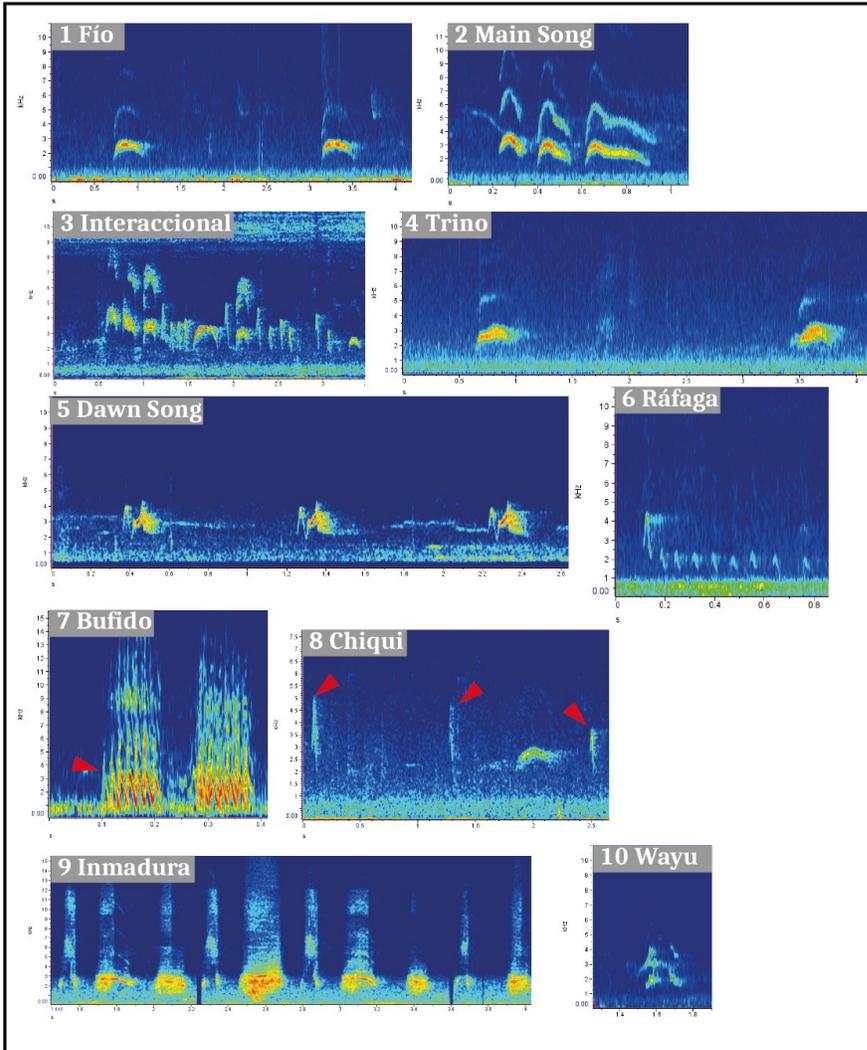


Figura 3.xi. Vocalizaciones tipo que componen el repertorio vocal de ambos tiránidos, el Fiofío y el Diucón. Sonogramas de los tipos vocales de los 2 tiránidos. Los ejes de cada espectrograma corresponden a frecuencia (Hz), eje y, y tiempo (s), el eje x. Audios disponibles en el mismo hipervínculo: <https://soundcloud.com/tomassalasorchard> **A.** Se encontraron 10 vocalizaciones tipo para el Fiofío. **B.** Se encontraron 5 vocalizaciones tipo para el Diucón (repertorio preliminar) y una

posible sexta. Ciertas vocalizaciones presentadas se tomaron desde el sitio de bioacústica www.xeno-canto.org, cuyo código es XC450232 (4ta, Diucón), por Peter Boesman, la 5ta: XC617676 (5ta, Diucón), por Ignacio Escobar, y la 6ta: XC508107 (6ta, Diucón) por Etienne Léroy.

Fíofo				Diucón		
N.º	1	2	3	1 (#)	2 (#)	3 (#)
Tipo	Fío	Main Song	Interaccional	Pip	Chiflido	Interaccional
DeltaF (Hz)	1488,75	1582,45	1619,36	683,804	2827,76	1151,393
LowF (Hz)	1689,05	1773,67	1770,2	1922,87	1902,31	2449,52
HighF (Hz)	3177,8	3356,12	3389,56	2606,68	4730,07	3600,91
Contexto	Contexto/alarma	Territorial	Interacción/agresión	Contacto/alarma	Contacto/Territorial	Interacción/agresión
Subtipos	Fío contacto	Main song 1 nota	Interaccional común	Pip común	Chiflido común	Interaccional
	Fío alarma	Main song 2-6 notas	Interaccional chiqui	Fuip	Chiflido en combinatoria	Interaccional combinatoria
		Main song con not-dawn song	Interaccional con bufidos			
			Interaccional con ráfaga			
			Interaccional distress			
N.º	4	5	6	4 (#)	5 (#)	6 (#) (*)
Tipo	Trino	Dawn Song	Ráfaga	Medio Chiflido	Click	Fío
DeltaF (Hz)	1224,23	1999,39	1108,33	3096,1	2044,15	639,634
LowF (Hz)	1697,95	1905,04	1587,45	2170,98	4451,9	2010,75
HighF (Hz)	2922,18	3904,42	2695,79	5295,211	6496,06	2650,38
Contexto	Post interacción/agresión	Territorial	Agresión	Cortejo	(?)	Post interacción/agresión
Subtipos	Trino común	Dawn song común	Ráfaga común	-	-	Fío en interaccional
	Trino agudo	Not-dawn song con bufido	Ráfaga en interaccional			Fío post interaccional
	Trino plano					
N.º	7	8	9 (#)			
Tipo	Bufido	Chiqui	Inmadura			
DeltaF (Hz)	2537,07	2039,36	2102,6			
LowF (Hz)	1164,58	2003,01	1065,5			
HighF (Hz)	3701,65	4042,37	3168,108			
Contexto	Agresión	Post interacción/agresión	Súplica de comida			
Subtipos	Bufido nota suelta	Chiqui-fío	-			
	Bufido dinámica	Chiqui dinámica				
	Bufido en interaccional	Interaccional chiqui				
N.º	10 (#) (*)					
Tipo	Wayu					
DeltaF (Hz)	1628,31					
LowF (Hz)	1437,93					
HighF (Hz)	3066,25					
Contexto	Contacto/Súplica de comida (?)					
Subtipos	Wayu nota suelta					
	Wayu en Inmadura					

Tabla 3. Resumen de características espectrales de frecuencia (gris), contexto conductual (verde) y subtipos (beige) de las vocalizaciones tipo del repertorio de los dos tiránidos. Se muestran los promedios de Delta frecuencia (DeltaF), Frecuencia baja (LowF) y Frecuencia alta (HighF) por nota (frecuencia fundamental) de las vocalizaciones de la base de datos construida para el Fíofo, y de un muestreo menor a 10~15 notas para el Diucón. La numeración de cada vocalización se acompaña de un símbolo '(#)' en caso de haberse obtenido los promedios de 10~15 notas, y '(*)' en caso de ser una vocalización mostrada menos de 5 veces. Para *Contexto*, los símbolos '/' indican 'o', es decir, dos modalidades conductuales observadas, siendo la primera la predominante; y el signo '?' indica falta de muestreo para saber el contexto asociado. Para *Subtipos* el símbolo '-' está presente en vocalizaciones sin subtipos hallados.

Para el **Diucón**, se encontraron 5 vocalizaciones tipo (**Fig. 3.xi B**), tres de las cuales fueron efectivamente caracterizadas en terreno, y dos de las cuales fueron identificadas en internet (la 4ta: 'Medio Chiflido' y la 5ta: 'Click') a través de los sitios de bioacústica aficionada www.xeno-canto.org y www.ebird.org. Estas dos vocalizaciones se encontraron múltiples veces en internet, asociadas a contextos conductuales consistentes entre distintos grabadores, por lo que se decidió

incorporarlas en este repertorio. Además, se muestra un posible sexto tipo de vocalización (*fio*), hasta el momento muy poco muestreada.

1. La vocalización **Pip** consiste en notas ubicadas en el rango de frecuencia bajo del repertorio (1922 a 2606 Hz, Tabla 3) y con el segundo menor promedio de delta de frecuencia (683 Hz). Su modo de producción común fue una dinámica compuesta de notas aisladas ('Pip común', Fig. 3.xi B-1) emitida por individuos perchados y ocasionalmente respondida por otros individuos. También fue observada como alarma ante humanos, con una emisión un poco más aguda, fuerte y rápida. Se identificó el subtipo 'Fuip', más modulado en frecuencia que 'Pip común'.

2. La vocalización **Chiflido** consiste en notas que presentan el segundo mayor delta de frecuencia del repertorio (2827 Hz, Tabla 3). Su modo de producción habitual fue de dinámicas compuestas de notas aisladas (Fig. 3.xi B-2) comúnmente respondidas entre individuos ('Chiflido contacto'). También se vio asociado a despliegues conductuales de persecución ('Chiflido' en combinatoria-interaccional). Es posible que *Chiflido* sea la vocalización territorial de la especie, pero no se grabó suficiente para constatarlo.

3. La vocalización **Interaccional** consiste en cantos cuyas notas se ubican en el rango medio del repertorio (2449 a 3600 Hz, Tabla 3). No obstante, en ocasiones sus notas mostraron la mayor modulación de frecuencia continua vista en los suboscinos del estudio (5500 Hz, Fig. 3.xi B-3 penúltima nota). Su modo de producción normal varía de un canto, nota aislada o dinámica cuya duración está determinada por las de escaramuzas aéreas a los que se vio asociada frecuentemente. Sumado a lo anterior, el ritmo de las notas emitidas fue muy parecido al *Interaccional* del Fíofío (y también en Cachudito, *Anairetes parulus*, otro suboscino tiránido presente en los lugares estudiados). En ocasiones se halló en combinación con vocalizaciones como *Chiflido* o *Fío* ('Interaccional combinatoria').

4. La vocalización **Medio Chiflido** consiste en notas que presentan el mayor delta de frecuencia del repertorio (3096 Hz, Tabla 3). Su modo de producción es una dinámica compuesta de notas aisladas (Fig. 3.xi B-4) asociadas a un despliegue de aleteo (audible en las grabaciones) asociado a cortejo de parejas en reproducción. No se identificaron subtipos.

5. La vocalización **Click** presenta en notas ubicadas en el rango de frecuencia más alto del repertorio (4451 a 6496 Hz, Tabla 3). Consiste en una dinámica compuesta de notas aisladas emitidas a lo largo de varios segundos (Fig. 3.xi B-5). No se encontró contextos o subtipos asociados a esta vocalización.

6. La vocalización **Fío** consiste en notas que presentan el menor delta de frecuencia del repertorio (639 Hz Tabla 3; Fig. 3.xi B-6*). Su modo de producción observado fue como dinámica compuesta de notas aisladas ('Fío post interaccional') inmediatamente posterior a instancias de interacción bruscas o agresivas, similar a *Trino* en el Fíofío; y también como parte de las notas combinatorias de *Interaccional* ('Fío en interaccional').

Llamada de Súplica -

Cabe mencionar que no fue encontrada una vocalización juvenil de súplica de comida (*Begging call*, en inglés) para ninguna especie, debido a la inaccesibilidad de los nidos estudiados. Está la posible excepción de *Inmadura* en el Fíofío, pero no fue suficientemente estudiada para saberlo con certeza.

Canción -

En cuanto a la *Canción*, según lo conocido para el suborden Oscinos, se describió una vocalización para la Turca (*Sirenita*), una para el Chucao (*Territorial I*) y una para el Fíofío (*Main Song*) que cumplen con las características de *canción* mencionadas al inicio de esta sección. Primero, observamos que dichas vocalizaciones solo fueron producidas por algunos individuos, y no por otros. Luego, análisis de PCR a muestras de sangre de aves anilladas, realizados paralelamente a esta tesis, indicaron que solo individuos macho producían estas vocalizaciones. En segundo lugar, se constató que en las tres especies este canto se presenta de manera territorial y estacional, dejando de ser escuchada durante algún momento del año. Específicamente para el caso de la Turca esta se escuchó entre Diciembre de 2021 y Mayo de 2022, después de la primera lluvia del año, y se escuchó hasta Diciembre del 2022 (donde nuevamente dejó de oírse).

Además, se observó para las tres especies que estas vocalizaciones eran producidas en un modo similar a la clase *Dinámica* pero con la diferencia de que la llamada es emitida una y otra vez durante varios minutos, entre intervalos de algunos segundos, en modo de canto y no en notas aisladas.

3.5.- Análisis de PCA repertorios Turca y Fíofío.

Se realizaron análisis estadísticos de componentes principales (PCA) a los repertorios vocales de Turca y Fíofío, considerando sólo selecciones nota por nota (Fig. 3.xii y Fig. 3.xiii). Se armó una base de datos a partir de las selecciones de 44 instancias representativas de 7 de las 9 vocalizaciones tipo identificadas para la Turca (no considerando “Distress” ni “Íntimo” por bajo número de grabaciones) y 45 instancias representativas de 8 de las 10 vocalizaciones tipo identificadas para el Fíofío (igual que antes no considerando “Begging” ni “Wayu”). Para la base de datos se usaron 13 variables cuantitativas y 10 cualitativas (Materiales y Métodos). Para el Chucao y el Diucón este procedimiento fue descartado debido a que no contábamos con una cantidad de grabaciones comparables.

El propósito de estos análisis consistió por un lado en reducir el número de variables usadas en la construcción de la base de datos mencionada, y encontrar las

variables más importantes que explicaran la variabilidad del conjunto de datos. Por otro lado, secundariamente, se buscó ordenar las poblaciones de datos (vocalizaciones tipo) según las nuevas variables (componentes principales) obtenidos (Canals, 2018).

En los análisis de PCA para las vocalizaciones de Turca, encontramos que las variables obtenidas no presentan normalidad, por lo cual se escalaron antes de llevar a cabo el análisis (**Fig. 3.xii**). Al realizar el PCA se encontró que el componente principal uno (PC1) explica un 56.1% de la varianza de los datos, el componente principal dos (PC2) un 16.5% de la varianza y el componente principal tres (PC3) un 11%. Así, entre los tres componentes se explica un 83% de la varianza (Fig. 3.xii A), lo cual es un mínimo óptimo para este tipo de análisis. Los eigen value (valores con los que se construyen los vectores 'PC') de PC1, fueron Peak Frequency, Center Frequency, Frequency 95, Frequency 75 y Frequency 25; y los de PC2 fueron Begin Time y End Time; lo cual permite priorizar estas variables en un experimento de clusterización de los datos de vocalizaciones tipo obtenidos.

Por otro lado, se realizó un análisis discriminante lineal, en el cual se encontró evidencia que indica que la variable que permite explicar mejor las diferencias entre los distintos tipos de vocalizaciones es *Average Entropy* con un coeficiente discriminante lineal de -0.3.

Además, según la agrupación generada por los PCA para las dos categorías cualitativas presentadas, Tipo de Vocalización (Fig. 3.xii C) y Clase de vocalización (Fig. 3.xii D), se puede corroborar que las categorías escogidas para la Turca son considerablemente reproducidas por el análisis, permitiendo distinguirlas en el espacio generado por los componentes principales PC1 y PC2. No obstante, la gran cantidad de puntos usado confunde en parte la visualización del gráfico.

En los PCA de Fíofío, nuevamente ninguna de las variables tuvo distribución normal, por lo que se debieron escalar y corroborar que no estuvieran demasiado correlacionadas entre sí mediante una matriz de correlaciones. El PCA realizado indicó que el PC1 explica un 52% de la varianza, el PC2 un 15% y el PC3 un 13%, y que entre los tres componentes se explicaría acumulativamente un 81% de esta (Fig. 3.xiii A y B). Los eigen value del PC1, fueron Center Frequency, Frequency 75 y Frequency 95; y los de PC2 fueron Begin Time y End Time. Para la agrupación de datos se utilizaron las variables categóricas de Nombre de Vocalización, y Tipo de Vocalización para diferenciar el conjunto de datos ordenado según PC1 y PC2 (Fig. 3.xiii C y D). Mediante un análisis discriminante lineal, se encontró que la variable que permite explicar mejor las diferencias entre los distintos tipos de vocalizaciones es "Delta Frequency" con un coeficiente discriminante lineal de -7.99.

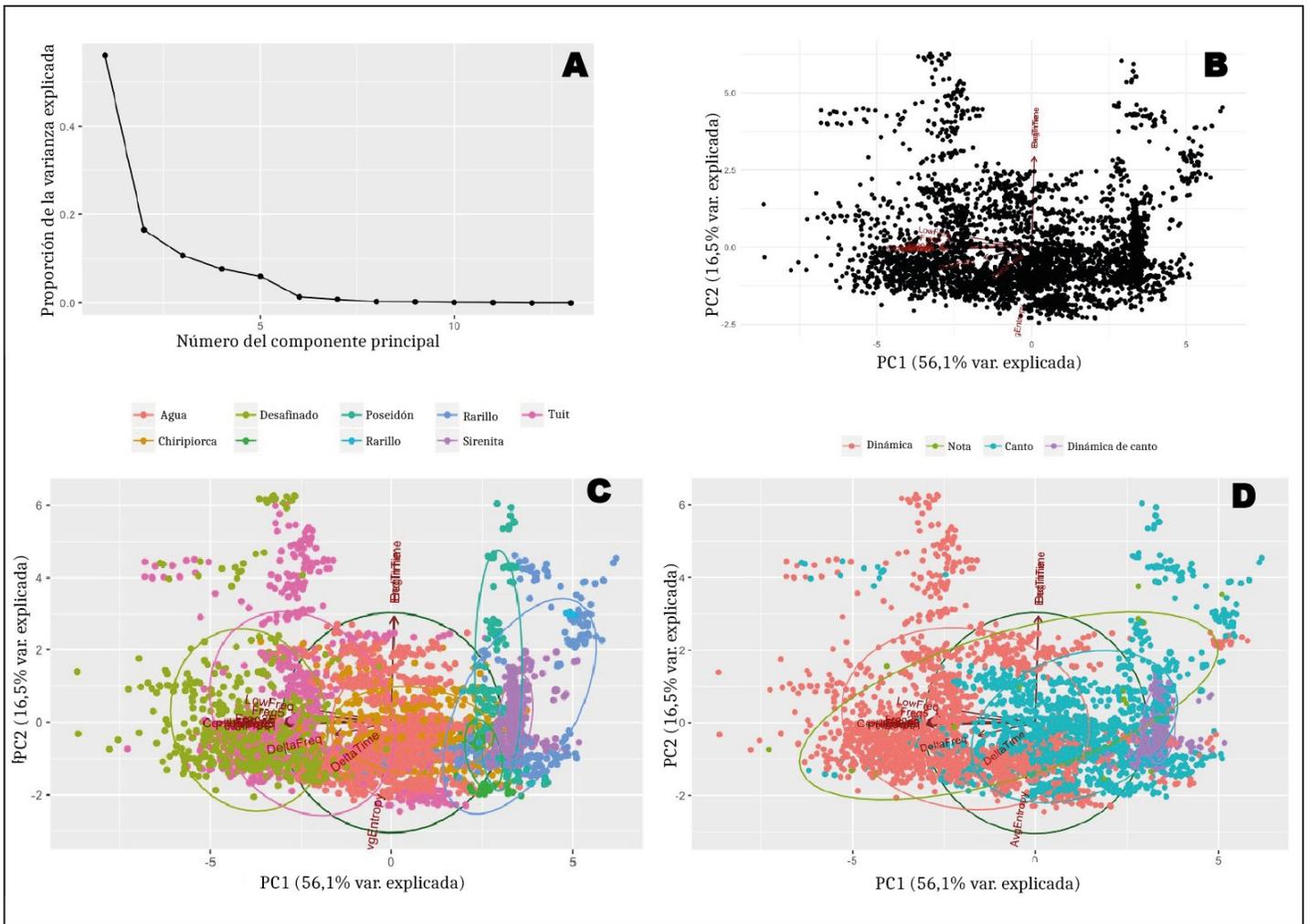


Figura 3.xii. Resultados de PCA para el repertorio de Turca seleccionado por notas, a partir de 44 instancias grabadas para 7 de sus 9 vocalizaciones tipo. **A.** Gráfico de sedimentación (*Scree plot*) de la varianza acumulada explicada (eje y) por los componentes principales del 1 al 13 (eje x). **B.** Análisis de PCA del repertorio de la Turca, sin variables categóricas identificadas. **C.** Mismo análisis de B, con los datos agrupados por la variable categórica *Song Name* (nombre de cada vocalización tipo analizada). Es posible descartar el color verde oscuro del gráfico, vocalizaciones que por error quedaron sin rótulo. **D.** PCA con los datos agrupados por la variable categórica *Song Class*, (con la clase de vocalización).

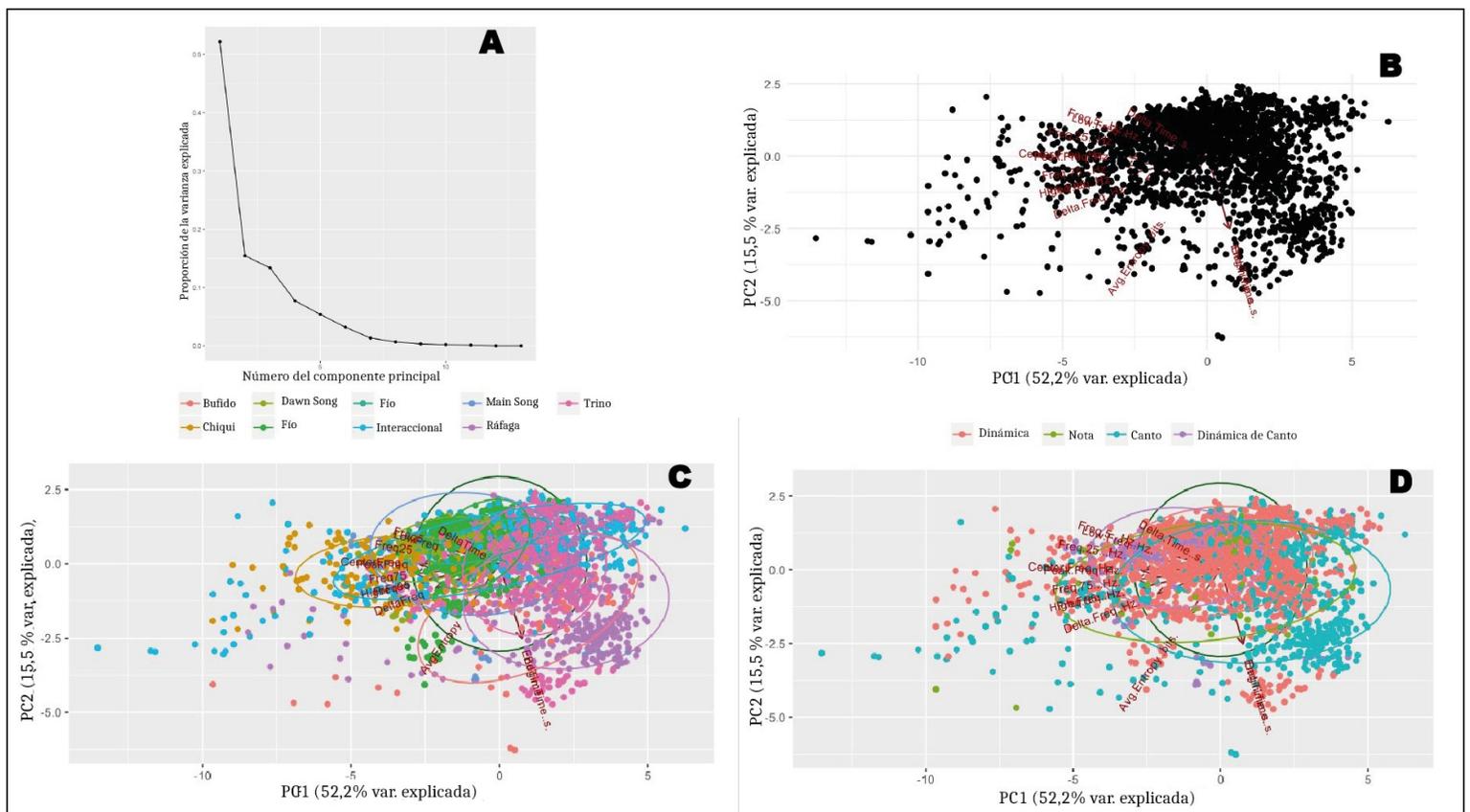


Figura 3.xiii. Resultados de PCA para el repertorio de Fiófio seleccionado por notas, a partir de 45 instancias para 8 de sus 10 vocalizaciones tipo. **A.** Gráfico de sedimentación (Scree plot) de la varianza acumulada explicada (eje y) por los componentes principales del 1 al 13 (eje x). **B.** Análisis de PCA del repertorio del Fiófio, sin variables categóricas identificadas **C.** Mismo análisis de B, con los datos diferenciados por la variable categórica *Song Name* (nombre de cada vocalización tipo analizada). **D.** PCA con los datos agrupados por la variable categórica *Song Class*, (con la clase de vocalización).

3.6.- Comparación repertorios y datos anatómicos.

A continuación, se describen correlaciones entre los repertorios construidos para cada uno de los suboscinos del estudio con relación a los datos anatómicos obtenidos y la estructura de cada siringe.

Comparación de repertorios a partir de promedios de DeltaF -

En general se encontró un mayor número de vocalizaciones en los rinocriptidos en conjunto (9 para Turca, 9 para Chucao) que en tiránidos (10 para Fiófio y 5 para Diucón), aunque el repertorio más grande fue el del Fiófio.

El rango de frecuencia incluyendo todas las vocalizaciones del repertorio de los dos rinocriptidos resultó ser muy similar, siendo levemente más bajo para la Turca, 145 a 2400 Hz, que para el Chucao, 295 a 2614 Hz (**Tabla 4**). Notablemente, en tiránidos, el rango de frecuencia de su repertorio fue bastante distinto entre ambas especies, siendo 762 a 4542 en Fíofío y 1900 Hz a 9000 Hz para el Diucón. A su vez, las notas del repertorio de los rinocriptidos presentan un DeltaF promedio considerablemente menor (772 Hz Turca, 1070 Hz Chucao) que los tiránidos (1488 Hz Fíofío, 1740 Hz Diucón). Al respecto es relevante considerar, que el grado de modulación continua de frecuencia promedio en tiránidos, y particularmente en el Fíofío, resulta subestimado con la medición de DeltaF usada, ya que la frecuencia suele subir y bajar durante la curvatura intrincada de sus notas.

Las vocalización más común grabada en los rinocriptidos tuvo un DeltaF por nota muy similar al promedio de DeltaF por nota de su repertorio completo (mayor en 180 Hz la Turca con *Agua*, y en 50 Hz el Chucao con *Territorial I*) mientras que en tiránidos se mantuvo igual en el Fíofío (llamada *Fío*), y disminuyó en el Diucón (en 1060 Hz, llamada *Pip*).

Sobre el DeltaF promedio de la *canción* de cada especie, se obtuvo que en Chucao y Fíofío se asemeja bastante al promedio del Repertorio (Tabla 4), mientras que en la *canción* de la Turca curiosamente presenta el menor DeltaF de su repertorio. Por último, las vocalizaciones con mayor DeltaF en el repertorio de todas las aves fue una vocalización de alarma o agresiva (*Desafinado* en Turca, *Rapaz* en Chucao, *Bufido* en Fíofío) salvo en el Diucón, de cortejo (*Medio Chiflido*).

	Turca	Chucao	Fíofío	Diucón
N° Vocalizaciones tipo	9	9 (10*)	10	5 (6*)
Rango total Repertorio completo (Hz)	2255 - 145 a 2400-	2319 - 295 a 2614-	3780 - 762 a 4542-	7100 - 1900 a 9000-
DeltaF Repertorio completo (Hz)	772,571	1070,12	1488,406	1740,47
DeltaF Vocalización más común (Hz)	954,894 - Agua -	1120,99 - Territorial I -	1488,75 - Fío -	683,804 - Pip -
DeltaF en Canción (Hz)	390,036 - Sirenita -	1120,99 - Territorial I -	1582,45 - Main Song -	-
Mayor DeltaF en una vocalización (Hz)	1407,914 - Desafinado -	1291,5 - Rapaz -	2537,07 - Bufido -	3096,1 - Medio Chiflido -
Menor DeltaF en una vocalización (Hz)	390,036 - Sirenita -	428,371 - Gatito -	1108,33 - Ráfaga -	683,804 - Pip -

Tabla 4. Promedios de Delta Frecuencia (DeltaF) de distintos aspectos del repertorio analizado para los 4 suboscinos del estudio. El valor del 'Rango total del Repertorio completo' se obtuvo buscando la frecuencia mínima y máxima de la frecuencia fundamental de las vocalizaciones registradas para cada especie. Los valores de DeltaF, al igual que en la Tabla 2. y 3., consisten en promedios por nota de la frecuencia fundamental de cada vocalización, a partir de la base de datos construida para Turca y Fíofío (44-45 instancias por vocalización), y de un muestreo menor (10~15 notas en total por vocalización) para Chucao y Diucón.

Correlación entre tamaño de repertorios y datos anatómicos -

Se llevaron a cabo correlaciones entre el tamaño del repertorio y el DeltaF promedio del repertorio de cada especie, con los datos anatómicos más relevantes obtenidos (**Fig. 3 xiv**). Aquí se puede ver cómo no hay una correlación clara entre el número de vocalizaciones del repertorio con el número de motoneuronas estimadas de nXII (Fig. 3.xiv A) ni con el número de axones contados de Ts (Fig. 3.xiv B). Si bien se observa una leve correlación de los datos conjuntos de suboscinos con ZF, esta correlación se pierde al considerar la gran dispersión que supone el Diucón en ambos casos.

Por otro lado, fue notable la correlación encontrada entre el DeltaF promedio del repertorio completo de cada especie, con ambos elementos anatómicos de importancia en el control motor, el número de motoneuronas estimadas del nXII (Fig. 3.xiv C) y con el número de axones contados de Ts (Fig. 3.xiv D).

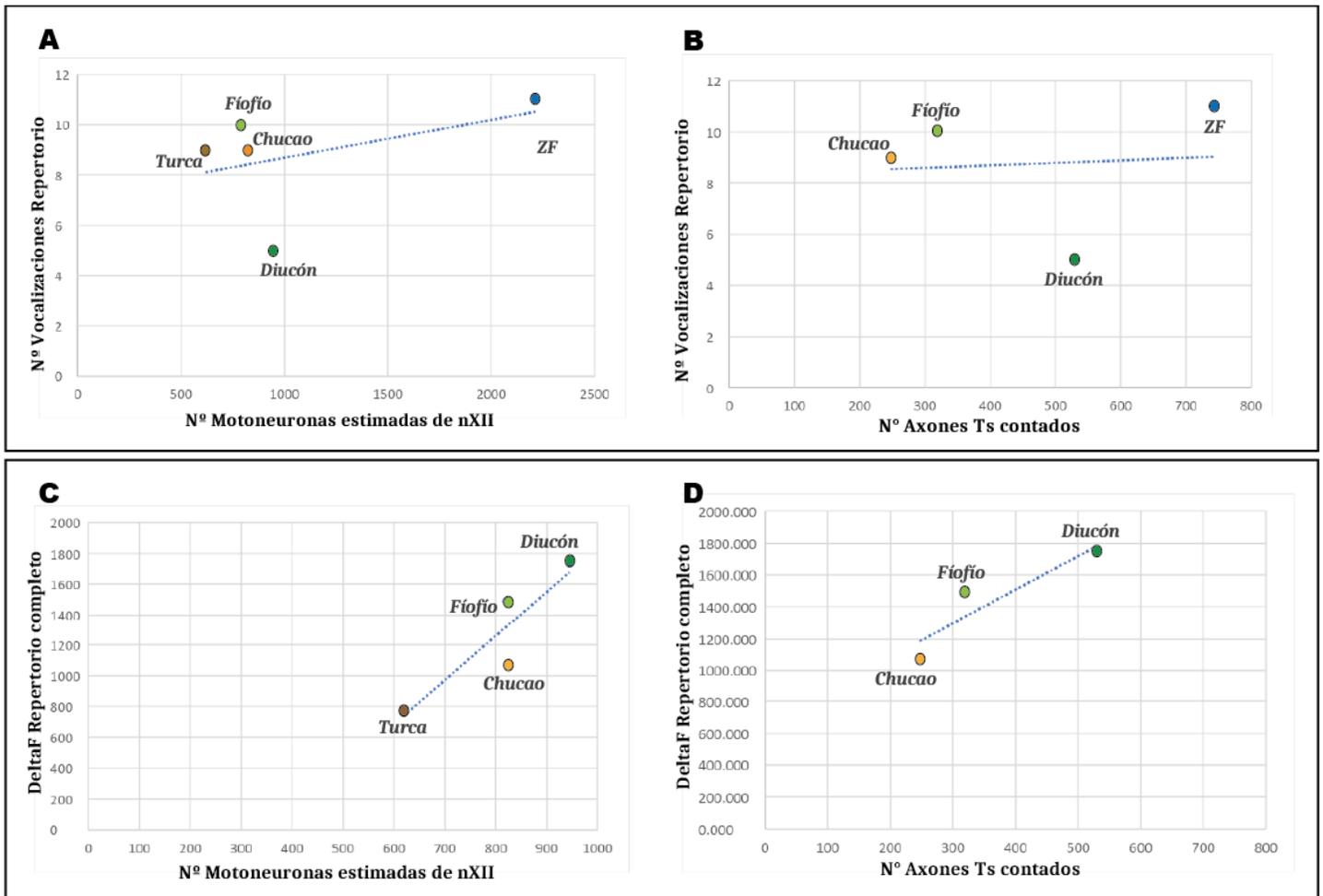


Figura 3.xiv. Correlaciones entre datos anatómicos, tamaño del repertorio y delta de frecuencia promedio del repertorio de las especies estudiadas. Todos los gráficos presentan una línea de tendencia. **A-B.** Correlación entre el número de vocalizaciones tipo del repertorio con el número de motoneuronas estimadas de nXII y con el número de axones Ts contados de las especies del estudio. El dato de 11 vocalizaciones totales en el repertorio del ZF proviene de Elie & Theunissen (2016). **C-D.** Correlación entre el delta de frecuencia (DeltaF) por nota del repertorio completo con el número de motoneuronas estimadas de nXII y con el número de axones Ts contados de los suboscinos estudiados.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la neuroanatomía del control muscular de la siringe y los repertorios vocales de 4 aves suboscinas chilenas (la Turca, el Chucao, el Fíofío y el Diucón), además de un oscino modelo (Zebra Finch). Se examinó la anatomía de la siringe (Fig. 3.i, Fig. 3.ii y Fig. 3.iii), la organización de su inervación (Fig. 3.iv, Fig. 3.v, Fig. 3.vi) y del núcleo motor XII desde donde provienen los axones eferentes (Fig. 3.vii y Fig. 3.viii). Además, se llevaron a cabo conteos del número de motoneuronas de dicho núcleo y de los axones de la rama que inerva la musculatura de la siringe (Tabla 1 y Fig. 3.ix). Por otro lado, se estudiaron los repertorios vocales de los 4 Suboscinos, describiendo vocalizaciones tipo (Fig. 3.x y Fig. 3.xi), subtipos y variaciones (Tabla 2 y Tabla 3). Mediante análisis de PCA se validó y redujo las variables cuantitativas usadas para el repertorio construido desde una base de datos amplia para la Turca y el Fíofío (Fig. 3.xiv y Fig. 3.xv).

Por último, se realizaron análisis cuantitativos de las características acústicas del repertorio de cada especie (Tabla 2-4), y se correlacionó el tamaño hallado para cada repertorio y el promedio de delta de frecuencia por nota (DeltaF) de estos con los datos anatómicos del sistema de producción vocal (Fig. 3.xiv). Se halló una baja correlación entre el tamaño de los repertorios con los datos anatómicos, y en cambio se halló una correlación positiva entre el promedio de DeltaF y los datos anatómicos.

A continuación, se discutirán los hallazgos más importantes del trabajo, según su relación con hipótesis y objetivos principales planteados.

4.1.- Anatomía y Repertorios Vocales.

Macromorfología de la siringe:

Al analizar la siringe de los suboscinos en estudio pudimos reconocer y distinguir con detalle las principales estructuras de interés en esta: los pares de musculatura extrínseca TL y ST; los pares de musculatura intrínseca (SIM): VD en

rinocriptidos, y OV y OL en tiránidos; los pares de membranas bronquiales (BLm y BLl); la membrana timpánica (TM) y el proceso vocal (PV) en rinocriptidos. Fue notable la diferencia en el desarrollo de la SIM en cada grupo. Ambos tiránidos presentaron mayor tamaño de esta musculatura que los rinocriptidos, con una organización mucho más parecida a la observada en Oscinos, aunque con menor desarrollo en cuanto a cantidad de pares.

Se hallaron diferencias muy leves entre las siringes de ambos rinocriptidos. Una de ellas fue que la Turca presentó una siringe de mayor tamaño que el Chucao, lo cual probablemente escala a su tamaño corporal. Otra fue la extensión de la SIM en el eje anteroposterior fue mayor en la Turca, mientras que en Chucao la SIM se halló más abultada en su anclaje a la parte anterior de PV (Fig 3.iii). Esta observación no necesariamente implica una diferencia en sus volúmenes de musculatura relativos .

Por otro lado, se hallaron diferencias evidentes entre las siringes de ambos tiránidos. Una de estas fue que, en el Diucón, TL cubre toda la cara ventral de la tráquea inmediatamente anterior a la siringe, mientras que en el Fíofío se halló un espacio continuo entre ambos pares de TL en la línea media de la cara ventral. La otra de ellas, es la presencia de dos SIM en el Fíofío (OV y OL) y sólo uno en el Diucón (OV) (Fig 3.ii y iii).

Un resultado llamativo sobre la estructura de la siringe fue el modo en que se encuentra anclada la SIM en relación a los elementos vibratorios en rinocriptidos (BLm, BLl, TM) y tiránidos (BLm, BLl). En rinocriptidos la SIM se ancla en los anillos traqueales superiores por un lado (A16 -Turca-, A13-A17 -Chucao-, Ames, 1971) y por el otro lado en la parte anterior de PV, un elemento cartilaginoso de gran tamaño presente en traqueófonos (Fig. 3.iii). Es notable que este elemento está anclado en su parte posterior a los anillos A1 y A2 y por lo tanto entra en contacto con los dos pares de BL. Esto sugiere que, en este arreglo estructural en cadena, la SIM a través de PV, podría participar indirectamente de la modulación de la frecuencia de las vocalizaciones de estas especies.

Por otro lado, en tiránidos su musculatura se ancla directamente a ambos elementos A1 (OV: entre A5 y A7 -Fíofío- o A3 y A5 -Diucón- por un extremo y A1 por el otro -ambos tiránidos-. Fíofío - OL: en A4 y A5 por un extremo y A1 por el otro. Ames, 1971), anillos que a su vez se encuentran en contacto con los dos pares de labios bronquiales (BL) (Fig 3.iii). De esta forma, la influencia de la SIM podría actuar sobre los elementos fonatorios directamente, similar a lo descrito para Oscinos (Mindlin & Laje, 2005; Elemans, 2014).

Además, en rinocriptidos, PV se encuentra en contacto directo con una tercera fuente de sonido de la siringe traqueófona: las membranas traqueales (TM), las cuales se ha demostrado están involucradas en la generación de atributos acústicos característicos, como modulación de amplitud del sonido y pulsatilidad, entre otros, aunque se cree no están sujetas a control neuromuscular (García y col. 2017).

Inervación SIM y pared interna tráquea-siringe:

Uno de los hallazgos novedosos de este trabajo corresponde a la descripción de abundante inervación de musculatura intrínseca (SIM) de la siringe en los 4 Suboscinos estudiados. Se describió un importante grado de inervación tanto en la SIM del grupo rinocriptido como en el grupo tiránido. En ambos grupos, el nervio Ts baja por TL dejando terminales nerviosos en su camino hasta inervar la SIM, observándose una inervación de TL mayor en el Chucao que en los tiránidos. A su vez, de modo general, en ambos grupos la mayor concentración de terminales nerviosos se ubicó en su SIM, indicando que el posible control neural de la siringe se centra en esta estructura. Si bien este rasgo no fue cuantificado, esta densidad de terminales no parece ser menor a ZF (Fig. 3.v y vi). Esto sugiere que la proporción de terminales por fibra muscular en los Suboscinos estudiados y en el ZF podría estar en un rango similar, implicando un grado de control neuromuscular equivalente, pero sobre estructuras con un nivel de desarrollo muscular diferente.

Un segundo hallazgo novedoso de este trabajo corresponde a la descripción de inervación de la pared interna de la tráquea en los dos rinocriptidos estudiados. Notablemente, se encontró marca de terminales nerviosos en la pared interna de la siringe y bordeando PV, lo cual se vio en el Chucao como un continuo de fibras sensoriales desde pared interna de la tráquea, en su límite con la siringe, continuándose por el borde interno de PV en toda la extensión de este. También en el Chucao, se identificó un continuo similar de una marca leve de terminales motores en la pared interna siringe, al nivel de la Vocalis Dorsalis (VD) y hasta la parte más anterior de PV. Si bien en la Turca la presencia de fibras nerviosas también fue descrita, su carácter sensorial o motor queda por confirmarse en inmunohistoquímicas más específicas (Fig. 3.v).

Por otro lado en tiránidos, llama la atención que en las dos especies estudiadas ninguna preparación resultó en marca de fibras nerviosas de ningún tipo en el anillo interno de la tráquea. En cuanto al Oscino modelo, si bien no se observó este tipo de marca se tiene antecedentes que esta existiría en forma abundante (Faunes y col., 2017).

De este modo, a partir de la evidencia de inervación sensorial y motora en PV, de su relación con la SIM y con los labios y membranas fonatorias, se sugiere que este elemento cartilaginoso presente en rinocriptidos pueda tener un rol en la modulación *activa* de la frecuencia de las vocalizaciones de estas especies.

Finalmente, ya que en todas nuestras preparaciones de siringe de Chucao encontramos marca de fibras motoras en el anillo interno de la tráquea y abundante marca de terminales sensoriales también, es posible pensar cierto control del acortamiento o estiramiento de la tráquea que pudiese modificar la estructura acústica de las vocalizaciones mediante propiedades de filtro (Daley y Goller, 2004). A partir de experimentos que evalúan el control de este cambio de longitud en la tráquea de ZF, Daley y Goller (2004), muestran que en este Oscino

estas no serían activas ya que no dependen de la innervación bilateral de Ts. Sin embargo, cabe mencionar que esta ave no presenta innervación motora en la tráquea sino sólo sensorial (Faunes y col., 2017). Puesto que en el Chucao encontramos innervación sensorial tanto como motora, es posible pensar en la presencia de un mecanismo de control activo de la tráquea o tracto vocal y sus vocalizaciones en el grupo de rinocriptidos.

Neuroanatomía del nXII y axones del Ts

Fue posible encontrar el nXII en el bulbo raquídeo de las cuatro especies de Suboscinos estudiados. A pesar del menor desarrollo del nXII en Suboscinos comparado con Oscinos, fue posible reconocer sus dos subunidades, la porción principal, dorsomedial (Dm), y la porción menor, ventrolateral (Vl). Basándonos en Roberts y col (2007), Dm correspondería a la porción traqueosiríngea propiamente tal, y la porción Vl correspondería a la porción lingual. Nuestros resultados indican que Dm se encuentra ubicado a lo largo de toda la extensión del eje anteroposterior de nXII, en las 5 aves examinadas. En el caso de la porción Vl, en ambos tiránidos, esta aparece desde los primeros cortes anteriores hasta cortes intermedios, mientras que tanto en ambos rinocriptidos como en ZF, Vl acompaña a Dm desde los cortes anteriores hasta los posteriores, un par de cortes antes de acabarse la extensión de nXII.

Al estimar el número de motoneuronas del nXII y axones del Ts en los 4 Suboscinos y ZF encontramos una menor cantidad de motoneuronas y axones en los 4 Suboscinos en comparación al ZF. Dentro de Suboscinos, se hallaron números mayores en tiránidos que en rinocriptidos (Tabla 1). Los números obtenidos para dos ZF macho, se asemejan al único reporte de estimación de motoneuronas de nXII encontrado en la literatura, de Roberts y col. (2007), que indica un número promedio de 3192 neuronas en tres machos, y 2992 en tres hembras. Esta diferencia encontrada probablemente se deba a la variabilidad introducida por el sesgo de conteo al método de estimación.

En cuanto a la proyección de las motoneuronas del nXII hacia la siringe es necesario mencionar que no es posible asegurar que todos los axones de estas neuronas vayan a inervar la SIM de la siringe. Esto debido principalmente a dos situaciones: 1) que estos inerven estructuras rostrales a la tráquea (lengua o laringe); 2) algunos axones dejan terminales en la musculatura extrínseca como ST o TL, dejando terminales en este último a lo largo de la tráquea, y como resultado no llegando a la SIM. Esta situación se vio reflejada en nuestros resultados de un menor número de motoneuronas en proporción a los axones del Ts (Tabla 1). Este resultado indica que menos de la mitad de las células del nXII van a dar a la SIM de todas las aves en estudio incluido el ZF, pudiendo ser por tanto un rasgo común a todo el orden passerino. De esta manera, es posible relacionar la *fuga* de axones

mencionada con la presencia de las subdivisiones ventrolateral (VI) y dorsomedial del nXII encontrada.

Resultados preliminares indican que el tamaño de esta subunidad VI consistiría en el 20% del tamaño total del nXII en los Suboscinos (números no reportados por problemas en la definición del núcleo en dos especies), lo que muestra que esta subdivisión corresponde a la de menor tamaño, es decir la porción lingual de nXII tal como reporta Roberts y col. (2007). Ya que este porcentaje no abarca todas las motoneuronas del nXII ausentes en los conteos de cortes de axones Ts, existiría una porción de estas que tienen otro destino además de la lengua. El más probable, observado en nuestras descripciones anatómicas, es la importante porción rostral de TL que va unida a la tráquea previo a llegar a la siringe. Por ejemplo, el Chucao fue la especie en que se vio una mayor inervación de TL y de la pared interna de la tráquea, y fue esta especie quien tuvo la menor proporción de axones Ts con respecto a motoneuronas nXII (0,3 Tabla 1). Análogamente, en el ZF, con una proporción casi igual de baja (0,33 Tabla 1) se ha reportado abundante inervación sensorial en la pared interna de la tráquea (Faunes y col., 2017). También, coincide que fuera en el Diucón donde se obtuvo el mayor valor para dicha proporción (0,56 Tabla 1) y no presentara inervación de la pared interna de la tráquea.

Por último, dado que la inmunohistoquímica usada para contar axones fue NF (que no distingue axones motores de sensoriales) una porción de los axones contados corresponden a axones de neuronas sensoriales (al menos en los rinocriptidos y ZF) que posiblemente tienen sus somas en el ganglio sensorial de los nervios hipogloso y glosofaríngeo, y no en nXII (Butler & Hodos, 2005).

Por lo tanto, es difícil saber con certeza cuáles axones proyectan a la SIM. Como propuesta para resolver esto pensamos que realizar experimentos de trazado neural a Ts, que llenen retrógradamente a nXII podría permitir identificar qué proporción de este núcleo efectivamente inerva la SIM y cuál a la lengua y laringe. Otra posibilidad es repetir las inmunohistoquímicas desarrolladas asegurándose de realizar los cortes transversales de tráquea en distintas alturas de Ts, en especial a la altura inmediatamente rostral a la SIM, para obtener un menor error en el número de axones contado, y localizar la *fuga* de axones mencionada.

Conducta vocal de Suboscinos

Los repertorios vocales encontrados para los 4 Suboscinos estudiados constituyen uno de los hallazgos principales de este trabajo. Se encontraron 9 vocalizaciones tipo para la Turca, 9 para el Chucao, 10 para el Fíofío y 5 para el Diucón (Fig. 3.x y Fig. 3.xi), y una abundante cantidad de variaciones o subtipos consistentes a lo largo de distintas comunidades grabadas (Tabla 2 y 3). A pesar de que el innatismo en las vocalizaciones de las especies estudiadas de Suboscinos no puede ser descartado, los resultados de repertorios vocales presentados

constituyen un cuerpo de evidencia que indica que su conducta vocal es altamente compleja.

Dentro de todos los modos de vocalización reconocidos se encontró un análogo para la *canción* oscina en la Turca, el Chucao y el Fíofío (*Sirenita*, *Territorial I* y *Main Song*, respectivamente). Si bien se ha demostrado que en el 70% de las especies Oscinas las hembras también canta la *canción* territorial (Odom y col., 2014), este no fue el caso en las aves estudiadas, donde mediante sexaje por PCR (necesario debido al nulo dimorfismo sexual en los Suboscinos estudiados) discriminamos que solo los machos realizaban este despliegue conductual. Además, se observó una estacionalidad marcada en la *canción* de la Turca (*Sirenita*) que desapareció casi por completo (si bien se han escuchado excepciones, lo cual no difiere de Oscinos) entre fines de Diciembre 2021 y comienzos de Mayo 2022 (y entre Diciembre 2022 y Abril 2023). Luego tras la primera lluvia de cada año, volvió a ser vocalizada abruptamente por distintos individuos de los 3 principales sectores investigados. Este cambio podría estar relacionado al efecto que produce la lluvia sobre procesos de cambio en la regulación hormonal de testosterona en paserinos macho (Quispe y col., 2018). En el caso del Chucao, se observó que la frecuencia de producción y conducta territorial asociado a la *canción Territorial I* también disminuyó notablemente en invierno, lo cual fue corroborado mediante experimentos de playback. Por último, para el Fíofío, se observó en Quebrada de la Plata (QP) tanto en 2021 como en 2022 y 2023, que al llegar de su migración en Septiembre, estos vocalizan poco al comienzo (lo cual puede estar asociado a la reposición de energías post migración, Weber & Piersma, 1996) pero sobretodo vocalizan la *canción* territorial, a pesar de lo costoso de producir la *canción* territorial en términos metabólicos (Hasselquist & Bensch, 2008), lo cual probablemente tiene que ver con el establecimiento de territorios (Capllonch y col., 2011).

Además desde los análisis de PCA para la Turca y Fíofío se obtuvo un valor superior al 80% con la suma de los tres primeros componentes principales, lo que indica un PCA robusto (Quinn & Keough, 2002). A partir de la reducción de variables obtenida con cada PCA, se identificaron como variables acústicas significativas las medidas de *Center Frequency*, *Frequency 95* y *Frequency 75* tanto en la Turca como en el Fíofío. Así, estos parámetros se establecen como prioritarios en eventuales análisis de clusterización más complejos que corroboren estadísticamente las categorías vocales construidas. Estos análisis no supervisados, basados en inteligencia artificial, como *UMAP* o *TSNE* (Sainburg & Gentner, 2021; Odom y col., 2021) han tomado relevancia en el campo de la bioacústica enfocada en la caracterización de vocalizaciones de distintas especies, tal que son capaces de agrupar los datos por diferencias espectrales finas.

Por otro lado, para mejorar el agrupamiento de los datos en poblaciones (función secundaria de los análisis de PCA)(Quinn & Keough, 2002; Canals, 2018)

es posible considerar el anidamiento o *embedding* de las notas como parte de un mismo canto. La base de datos del repertorio de la Turca y el Fíofío, contaban con información sobre su anidamiento, sin embargo el análisis realizado no la utilizó. Nuestros resultados de análisis estadísticos confirman de manera parcial las categorías de vocalización tipo. El solapamiento hallado puede ser explicado por distintos factores, como la gran cantidad de datos utilizadas en el análisis: 45 instancias vocales para 9 o 10 vocalizaciones tipo, cada instancia con un número variable entre 1 y 70 notas, es decir varios miles de puntos en el gráfico de PCA (4184 para la Turca y 2479 para el Fíofío), lo cual no es lo usual para este tipo de análisis. Es común en análisis de PCA de repertorios vocales hallar puntos en el gráfico en el orden de las centésimas (120 para la cotorra del cactus, Araujo & Barros de Araujo, 2020; 102 para el garrapatero aní, Grieves y col., 2015; 391 para el pingüino africano, Favaro y col., 2014). A su vez, el solapamiento pudo deberse a la baja cantidad de variables cuantitativas escogidas (13), dado que se sugiere aumentar el número de variables cuantitativas para obtener mejores agrupamientos, pues así se cuenta con un mayor número de formas de describir las diferencias espectrales de las vocalizaciones (Bernstein y col., 2016; Elie & Theunissen, 2016).

4.2.- Relevancia inervación de la SIM y estructura muscular de la siringe.

Comparación entre estructura acústica vocalizaciones y estructura de la siringe

Nuestros resultados demuestran que los números de motoneuronas de nXII, de axones de Ts y el desarrollo de la musculatura intrínseca no se correlacionan con el tamaño de los repertorios vocales encontrados, tanto para los 4 suboscinos del estudio como para ZF (Fig. 3.xiv. A y B). Esto indica que la inervación de la musculatura intrínseca, y por ende el control neuromotor de la estructura siríngea, no explicaría el tamaño de los repertorios vocales en los Suboscinos estudiados ni en ZF, por lo tanto, se refuta la hipótesis inicial de este trabajo.

En cambio, sí se encontró una correspondencia marcada entre la estructura acústica de las vocalizaciones del repertorio con la inervación y la estructura muscular de las siringes de rinocríptidos y tiránidos (Fig. 3.xiv. C y D; Fig. 4.i). Llamaremos *modulación estructural* a la modulación de la frecuencia fundamental que por defecto presentan las vocalizaciones tipo descritas.

Comparativamente, las vocalizaciones de los rinocríptidos consisten en llamadas con baja modulación de frecuencia por nota. Sus cantos a menudo se componen de una o dos notas diferentes repetidas múltiples veces. Durante los momentos del día en que ocurren los despliegues vocales de mayor intensidad, las variaciones más evidentes suelen introducirse en el dominio del tiempo, a partir de variaciones de

un conjunto limitado de notas. No obstante, en dichos despliegues se pueden observar notas transicionales entre vocalizaciones tipo, mostrando modulaciones plásticas de frecuencia entre notas (por ejemplo: en la Turca subtipo *Tuitagua*, *Tuit a chiripiorca*, *Chiripiorca desafinada*, etc.; en el Chucao, subtipo *Territorial II trinado*). Se sugiere fuertemente que la variabilidad transicional observada durante estos despliegues conductuales, consiste en una modulación *activa* o plástica de la frecuencia (probablemente controlada neuralmente). En dichos casos, las notas transicionales, no suelen ser muchas y las instancias suelen ser cortas. Aún así, cabe destacar como excepción ciertos despliegues vocales del Chucao (*Gatito común* a *Gatito clamado*) donde se observó múltiples notas moduladas y modificadas gradualmente varias veces a lo largo de un par de minutos.

Por otro lado, comparativamente las vocalizaciones de los tiránidos consisten en llamadas con bastante más modulación *estructural* de la frecuencia por nota. Las notas de sus cantos suelen presentar una frecuencia continua modulada importante (lo cual se observa en la curvatura de sus notas en el espectrograma), y además producen menos repeticiones de la mismas notas (Fig. 3.xiv. C-D), encontrándose en casos extremos, vocalizaciones donde la mayoría de las notas son diferentes entre sí (*Interaccional* Fig. 3.xi.: A-3, Fíofío; B-3, Diucón).

A su vez, durante los despliegues vocales en que se observan transiciones entre vocalizaciones tipo, se puede observar una modulación de frecuencia muy gradual nota a nota (En Fíofío: *Trino común* a *Trino agudo* a *Main song 1 nota*). Nuevamente, la variabilidad de estos despliegues correspondería al nivel *activo* de la modulación de frecuencia. Por otro lado, en las vocalizaciones de tiránidos también está presente una gran variabilidad temporal (sintáctica), tal que frecuentemente se integran notas de una vocalización tipo en otra, en combinatorias variables (subtipo *Main song con not dawn song*, *Not dawn song con bufido*, etc.).

A partir de la correlación entre los promedios de DeltaF del repertorio y los datos anatómicos (Fig. 3.xiv) fue posible establecer una relación directa entre los aspectos de modulación vocal descritos y la estructura de la siringe de rinocriptidos y tiránidos. Como ya se mencionó, en rinocriptidos, las siringes presentan escasa musculatura intrínseca (SIM) y extrínseca (SEM) anclada al elemento cartilaginosa PV, alcanzando indirectamente las estructuras vibratorias. De este modo es posible pensar que la modulación *estructural* de sus vocalizaciones sea limitada. En cambio, la modulación *activa* de estas, que podría estar presente en un grado variable en este grupo, no guardaría relación únicamente con el arreglo estructural mencionado, si no que además con aspectos cerebrales de otra naturaleza.

En tiránidos, en cambio, existe una SIM y SEM considerablemente más desarrolladas, en contacto directo con las estructuras vibratorias, lo que posibilitaría una modulación *estructural* de frecuencia mayor y más fina de sus vocalizaciones, lo que explicaría la mayor cantidad de elementos vocales diferentes en algunas de sus vocalizaciones. Similarmente, la modulación *activa* de estas, podría estar presente en un grado variable, lo que aún está por corroborarse.

Como corolario, es probable que en el resultado de correlación entre los números de innervación de la siringe y los promedios de DeltaF de cada repertorio (Fig. 3.xiv. C y D), los datos de innervación en realidad funcionen como un *proxy* de la musculatura intrínseca de la siringe (SIM). Esto ocurriría si la proporción entre la cantidad de motoneuronas que innervan la SIM y la cantidad de fibras motoras de dicha musculatura es homogénea entre las especies estudiadas.

En tal caso, la estructura de la siringe, y en particular el tamaño de la SIM -y no la innervación-, determinaría pasivamente el nivel de modulación **estructural** de la frecuencia de las vocalizaciones de los suboscinos estudiados. Para confirmarlo, sería conveniente medir el volumen de la SIM en cada especie, y realizar experimentos de fonación con delección de la musculatura siringea.

A partir de lo descrito hasta aquí surgen entonces dos preguntas:

(1) *¿Con qué estaría asociada la innervación de la siringe en los Suboscinos estudiados?*

En primer lugar, con respecto a los Suboscinos, es relevante la línea de evidencia de estudios biomecánicos que han mostrado que la denervación de Ts no impide la emisión de la vocalización principal en varias especies, aunque sí se observan cambios de frecuencia leves, composición armónica y variabilidad en la producción de notas (*Benteveo*, Amador y col., 2008; *Batará variable*, *Hormiguero negruzco*, *Hornero*, *Ticotico cejudo*, *Trepatroncos chico* y *Curutié colorado*, García y col., 2017). Si bien estos estudios no han sido acompañados de una revisión extensa de los repertorios vocales de estos Suboscinos, no preocupándose de corroborar que la denervación haya truncado vocalizaciones menos habituales o la variabilidad de algunas vocalizaciones, estos indican que la innervación de la siringe no determina mayormente la estructura general de las vocalizaciones en Suboscinos, o en otras palabras, no está involucrada en la modulación *estructural* de frecuencia (Amador y col., 2008; García y col., 2017). Así, la interacción del sistema respiratorio (por cierto, controlado neuralmente) con la maquinaria de la siringe actuando pasivamente, sería suficiente para producir la mayoría de los aspectos acústicos de las vocalizaciones principales de estas especies (Mindlin & Laje, 2005).

En Suboscinos, la modulación *activa* correspondería a un nivel más sutil de las vocalizaciones, el cual probablemente esté vinculado a los cambios leves en la frecuencia de las vocalizaciones observados post denervación, generalmente ignorados en los experimentos de laboratorio anteriores. Esta modulación podría estar operando en la producción de diferencias acústicas leves en las vocalizaciones entre individuos, las cuales se ha demostrado que son relevantes en el reconocimiento individual y de vecino-extraño en varias especies (Lovell & Lein 2004a, 2004b y 2005, Foote y col. 2013, Fitzsimmons y col., 2008). Por otra parte,

en nuestro estudio, en el nivel de los subtipos vocales, y particularmente en aquellos despliegues vocales en que se observaron llamadas transicionales entre vocalizaciones, se sugiere que podrían estar operando modulaciones *activas* de la frecuencia.

A partir de esta evidencia, sugerimos que la relevancia de la inervación en el control neuromuscular de la siringe en las especies estudiadas, sí debiese tener un rol -aunque restringido- en la modulación *activa* de la frecuencia de las vocalizaciones. Este tipo de modulación no sería evidente en las vocalizaciones tipo o principales del repertorio de estos Suboscinos, sino que en los subtipos vocales y en despliegues vocales específicos.

(2) ¿Es posible generalizar a Passeriformes el resultado obtenido a partir de la refutación de la hipótesis inicial de este trabajo?

En segundo lugar, en cuanto a extender al resto de Passeriformes el resultado de nula relación entre el desarrollo neuromuscular de la siringe con el tamaño de los repertorios vocales en las especies estudiadas, comentaremos literatura que evalúa la relevancia de la inervación de la siringe (sin cuantificarla) en distintas especies de Oscinos, y analizaremos su relación a los tamaños de los repertorios vocales de dichas especies.

Existe evidencia abundante que indica que la inervación jugaría un rol determinante en la estructura acústica de las vocalizaciones de distintos Oscinos (Nowicki & Capranica, 1986), lo cual estaría parcialmente asociado al tamaño de sus repertorios vocales. Esto ha sido sugerido en algunos casos como en el *canario*, el cual aumenta su repertorio vocal año a año (Nottebohm y col., 1978) y sufre cambios importantes en sus vocalizaciones tras la denervación de sus nervios Ts (Nottebohm & Nottebohm, 1976) inhibiendo así la ampliación de dicho repertorio (cuya canción puede presentar un repertorio de más de 300 sílabas). En otros, especies que mantienen sus repertorios constantes año a año como el *Pinzón vulgar* (1 a 6 canciones territoriales por individuo, 15 sílabas en su canción aprox., y un número sin identificar de llamadas; Slater, 1981) también truncan gran parte de su repertorio vocal post denervación (1-5 sílabas intactas en su canción).

Interesantemente, especies de Oscinos que sufren menor pérdida de la estructura acústica de sus vocalizaciones post denervación, como el ZF (Price, 1979) y el Carbonero cabecinegro (Nowicki & Capranica, 1986), son parte de la porción del clado con repertorios vocales más pequeños, los cuales presentan una sola *canción* estereotípica por especie (11 vocalizaciones incluida la *canción*: Elie & Theunissen; 2016; 13 vocalizaciones incluida la *canción*: Ficken y col., 1978, respectivamente). Esta situación es similar a Suboscinos, quienes no experimentan un cambio de frecuencia mayor en sus vocalizaciones post-denervación y quienes - en el caso de las especies estudiadas- presentan una *canción* territorial y alrededor de 10 vocalizaciones totales.

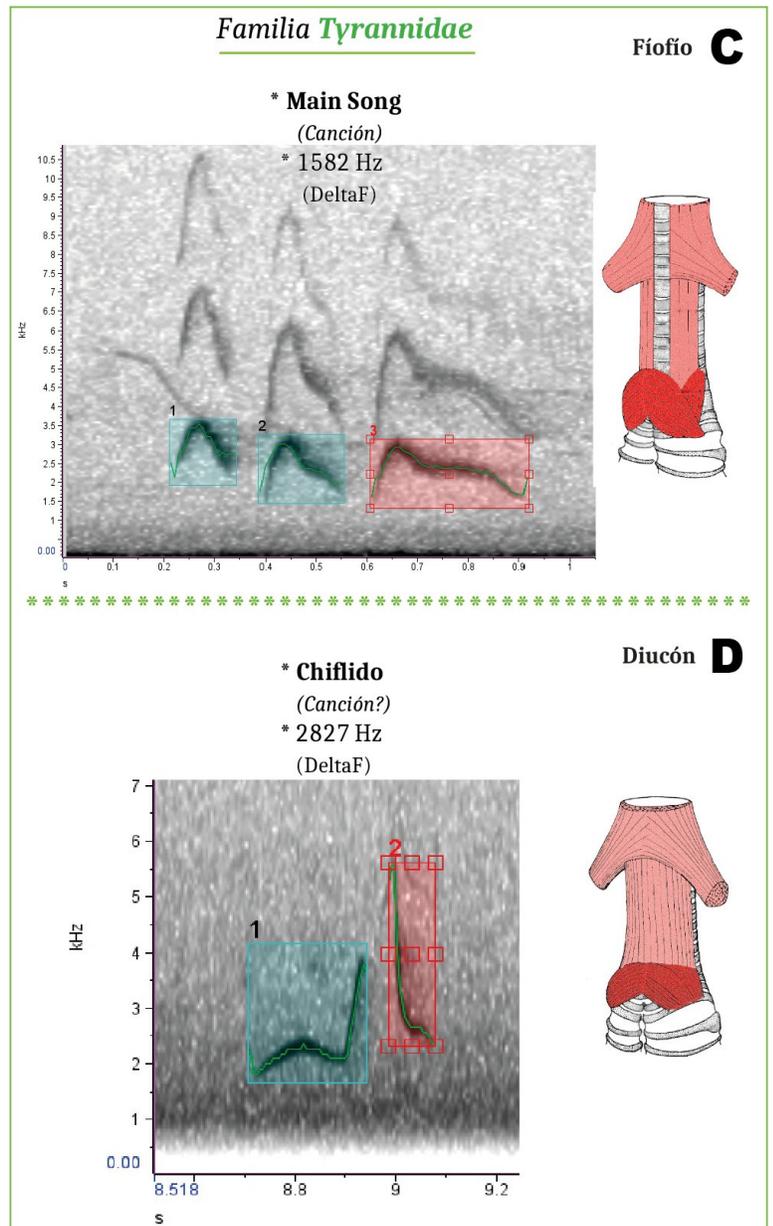
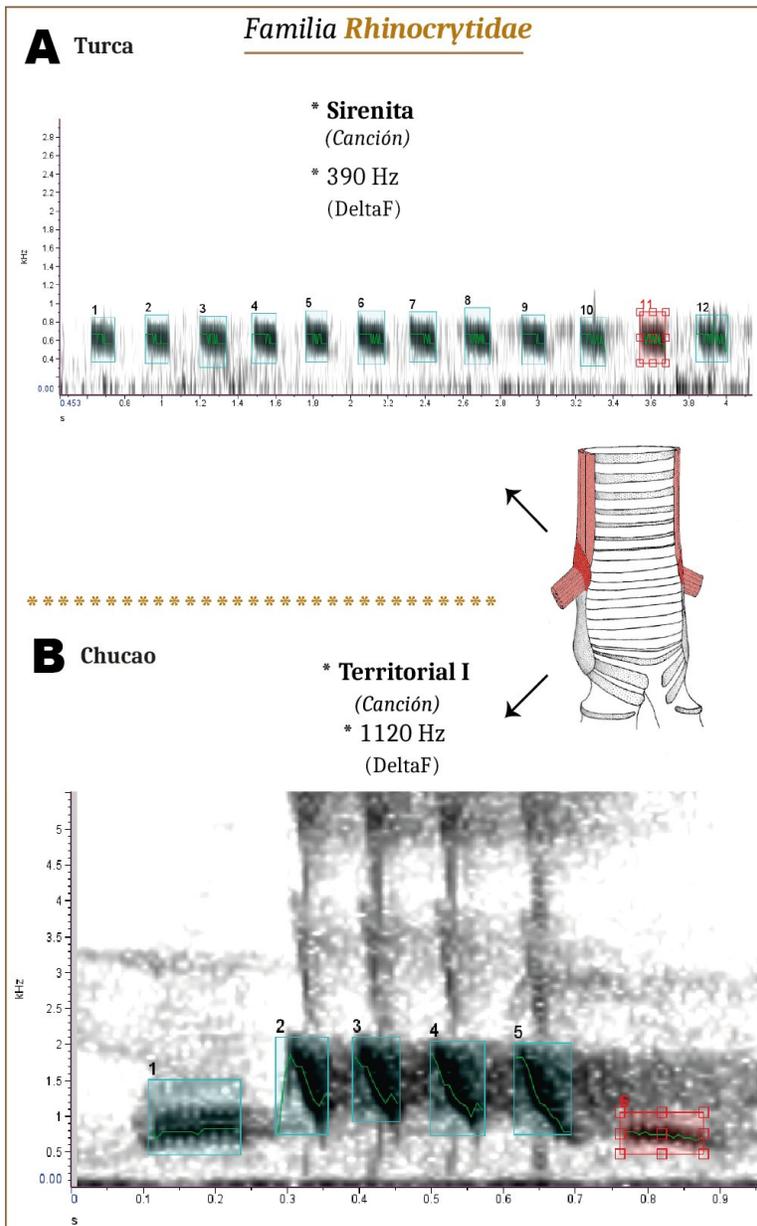


Figura 4.i. Comparación de la estructura acústica de la canción territorial de los 4 Suboscinos en el contexto de la estructura de sus siringes. Los sonogramas muestran la función *Peak Frequency Contour* de RavenPro que permite visualizar con una línea verde la modulación de frecuencia continua de la frecuencia fundamental de cada nota. Los datos de DeltaF promedio corresponden a lo informado en la Tabla 4. **A.** Vocalización *Sirenita*, de la Turca, Familia Rhinocryptidae. **B.** Vocalización *Territorial I* del Chucao, Familia Rhinocryptidae. **C.** Vocalización *Main Song*, del Fíofo, Familia Tyrannidae. **D.** Vocalización *Chiflido*, del Diucón, Familia Tyrannidae.

Según lo anterior, la relación cualitativa entre el desarrollo neuromuscular de la siringe y el tamaño de los repertorios vocales pareciera diferir según cual sea la

especie de Oscino examinada, y según que tan plástica es su canción territorial. Los enormes tamaños de repertorios vocales hallados en algunos Oscinos están dados por una *canción* con un enorme rango de variaciones, que al ser consideradas como vocalizaciones tipo al medir los repertorios, expanden estos en decenas, cientos e incluso miles de vocalizaciones en ciertos casos (Catchpole & Slater, 2008). Esto llega a niveles extremos, tal que en algunas especies una misma versión de la *canción* nunca volvería a ser repetida por el mismo individuo, en cuyo caso se habla de una capacidad desarrollada de improvisación, lo cual resalta su carácter activamente modulado (por ejemplo en el *carricerrín común*: Catchpole, 1976).

La *canción* es el objeto principal del aprendizaje vocal en el grupo Oscino, donde la modulación *activa* o plasticidad de la frecuencia de las vocalizaciones adquirió una relevancia evolutiva importante a través su anclaje a aspectos de reproducción y territorialidad, los cuales se ha propuesto que estarían sujetos a selección sexual (Kroodsma, 2004). Estos procesos estarían actuando fuertemente sobre especies de Oscinos con gran plasticidad vocal, fijándose la modulación *activa* de frecuencia en una porción importante de su repertorio vocal.

Considerando lo anterior, durante la evolución de Passeriformes, la modulación *activa* de la frecuencia o plasticidad vocal se habría fijado en el repertorio vocal de distintas maneras. En Suboscinos en general y Oscinos como el ZF donde no se habría producido una gran radiación de su canción, la modulación *activa* estaría presente en aspectos sutiles de su repertorio vocal, mientras que en Oscinos con gran plasticidad vocal de su *canción* como el canario o el carricerrín, determinaría una parte importante de su repertorio. Es posible que en estas especies de Oscinos sí se pudiera hallar una correlación entre los números de motoneuronas de nXII y de axones de Ts con el tamaño del repertorio vocal, lo cual sin embargo no ha sido explorado en ningún trabajo encontrado. Por lo tanto, los hallazgos sobre la relación entre inervación y tamaños de repertorios para las 4 especies suboscinas y ZF, aún debe explorarse cuantitativamente en otros Oscinos para extenderse a todos los Passeriformes.

5. BIBLIOGRAFÍA

Akutagawa, E. Konishi, M. 2010. New brain pathways found in the vocal control system of a songbird. *J Comp Neurol.* 518(15):3086–100.

Albert, Y. Daniel, M. 1996. Temporal hierarchical control of singing in birds. *273*(September):1871–5.

Amador, A. Goller, F.& Mindlin, G. B. 2008. Frequency modulation during song in a suboscine does not require vocal muscles. *Journal of Neurophysiology*, 99(5), 2383-2389.

- Ames, P.L. 1971. The Morphology of the Syrinx in Passerine Birds. Peabody Museum Bull. 37(March):241.
- Araujo, B. & Barros de Araujo, C. 2020. The vocal repertoire of the Cactus Conure *Eupsittula cactorum* (Aves; Psittaciformes). Ornithology Research. Sociedade Brasileira de Ornitología.
- Bernstein, S. K. Sheeran, L. K. Wagner, R. S. Li, J. H. & Koda, H. 2016. The vocal repertoire of Tibetan macaques (*Macaca thibetana*): A quantitative classification. American journal of primatology, 78(9), 937-949.
- Butler, A.B. & Hodos, W. 2005. Comparative Vertebrate Neuroanatomy. 2nd Edition. Chapter 2: Neurons and Sensory Receptors. Wiley-Interscience, Wiley & Sons Inc.
- Capllonch, P., Álvarez, M. E., Blendinger, P. G. 2011. Sobre la migración de *Elaenia albiceps chilensis* (Aves: Tyrannidae) en Argentina. Acta zoológica lilloana 55 (2): 229-246.
- Canals, M. 2018. Curso de Estadística Universitaria. Facultad de Ciencias Universidad de Chile. RPI N°:153541
- Catchpole, C. K. 1976. Temporal and sequential organisation of song in the sedge warbler (*Acrocephalus schoenobaenus*). Behaviour, 59, 226-46.
- Catchpole, C. K., Slater. P. J. B. 2008. Bird song: Biological themes and variations. 2nd Edition. Chapter 8: Themes and Variations. Cambridge University Press.
- Correa, A. & Mpodozis, J. 2015. Especiación en rinocriptidos chilenos Speciation of Chilean Rhinocryptidae. Revista Chilena de Historia Natural.
- Daley, M., & Goller, F. 2004. Tracheal length changes during zebra finch song and their possible role in upper vocal tract filtering. Journal of Neurobiology, 59(3), 319-330.
- Düring, D. N. Ziegler, A. Thompson, C. K. Ziegler, A. Faber, C. Müller, J. & Elemans, C. P. 2013. The songbird syrinx morphome: a three-dimensional, high-resolution, interactive morphological map of the zebra finch vocal organ. BMC biology, 11(1), 1-27.
- Düring, D. N. & Elemans, C., 2016. Embodied Motor Control of Avian Vocal Production. Vertebrate Sound Production and Acoustic Communication, Springer Handbook of Auditory Research 53. Chapter 5, 119-157.
- Elemans, C. P. 2014. The singer and the song: The neuromechanics of avian sound production. Current Opinion in Neurobiology, 28, 172-178. doi:10.1016/j.conb.2014.07.022

Elie, J. E. & Theunissen, F. E. 2016. The vocal repertoire of the domesticated zebra finch: a data-driven approach to decipher the information-bearing acoustic features of communication signals. *Animal cognition*, 19, 285-315.

Espinosa, L. & G. Egli. 1997. Nueva información biométrica y conductual del Fíofo (*Elaenia albiceps chilensis*). *Boletín Chileno de Ornitología* 4: 9-13.

Faunes, M., Botelho, J. F., & Wild, J. M. 2017. Innervation of the syrinx of the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Journal of Comparative Neurology*, 525(13), 2847-2860.

Ficken, M. S., Ficken, R. W., Witkin, S. R. 1978. Vocal Repertoire of the Black-Capped Chickadee. *The Auk*, Vol. 95, No. 1 (Jan., 1978), pp. 34-48.

Fitzsimmons, L.P. Barker, N.K. Mennill, D.J. 2008. Individual variation and lek-based vocal distinctiveness in songs of the Screaming Piha (*Lipaugus vociferans*), a suboscine songbird. *The Auk* 125: 908-914.

Foote, J.R. Palazzi, E. Mennill, D.J. 2013. Songs of the Eastern Phoebe, a suboscine songbird, are individually distinctive but do not vary geographically. *Bioacoustics*. 22(2):137-51.

Gahr, M. 2000. Neural song control system of hummingbirds: Comparison to swifts, vocal learning (songbirds) and nonlearning (suboscines) passerines, and vocal learning (budgerigars) and nonlearning (dove, owl, gull, quail, chicken) nonpasserines. *J Comp Neurol*. 426(2):182-96.

Garcia, S. M. Kopuchian, C. Mindlin, G. B. Fuxjager, M. J. Tubaro, P. L. & Goller, F. 2017. Evolution of vocal diversity through morphological adaptation without vocal learning or complex neural control. *Current Biology*, 27(17), 2677-2683.

Glaser, E. M. & Wilson, P. D. 1998. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. *Journal of Microscopy*, 192(2), 163-171.

Goller, F. 2022. The syrinx. *Current Biology*, 32(20), R1095-R1100.

Hasselquist, D., Bensch, S. 2008. Daily energy expenditure of singing great reed warblers *Acrocephalus arundinaceus*. *Avian Biology* 39(4):384-388.

Ippi, S., Vásquez R.A., Van Dongen, W.F.D., Lazzoni, I. 2011. Geographical variation in the vocalizations of the suboscine Thorn-tailed Rayadito *Aphrastura spinicauda*. *Ibis* 153: 789-805.

- Janik, V.M. Slater, P.J.B. 2000. The different roles of social learning in vocal communication. *Anim Behav.* 60(1):1–11.
- Keen, S. C. Odom, K. J. Webster, M. S. Kohn, G. M. Wright, T. F. & Araya-Salas, M. 2021. A machine learning approach for classifying and quantifying acoustic diversity. *Methods in ecology and evolution*, 12(7), 1213-1225.
- Kroodsma, D.E. 1984. Songs of the Alder Flycatcher (*Empidonax alnorum*) and Willow Flycatcher (*Empidonax traillii*) are innate. *The Auk* 101: 13-24.
- Kroodsma, D. E., Konishi, M. 1991. A suboscine bird (Eastern phoebe, *Saornis phoebe*) develops normal song without auditory feedback. *Anim. Behav.* 42,477–488.
- Kroodsma, D. 2004. The diversity and plasticity of birdsong. Ch. 4. *Nature's Music.* (pp.108-131). 1st Edition.
- Kroodsma, D. Hamilton, D. Sánchez, J.E. Byers, B.E. Fandiño-Mariño, H. Stemple, D.W. y col 2013. Behavioral Evidence for Song Learning in the Suboscine Bellbirds (*Procnias* spp.; Cotingidae). *Wilson J Ornithol.* 125(1):1–14.
- Kuhl, H. Frankl-Vilches, C. Bakker, A. Mayr, G. Nikolaus, G. Boerno, S.T. y col 2020. An unbiased molecular approach using 3'UTRs resolves the avian family-level tree of life. Battistuzzi FU, editor. *Mol Biol Evol.* 38(1), 108-127.
- Mindlin, G. B. & Laje, R. 2005. *The physics of birdsong.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Liu, W. C. Wada, K. Jarvis, E. D. & Nottebohm, F. 2013. Rudimentary substrates for vocal learning in a suboscine. *Nature communications*, 4(1), 2082.
- Lovell, S.F. Lein, M.R. 2004a. Neighbor-stranger discrimination by song in a suboscine bird, the alder flycatcher, *Empidonax alnorum*. *Behav Ecol.* 15(5):799–804.
- Lovell, S.F. Lein, M.R. 2004b. Song variation in a population of Alder Flycatchers. *J F Ornithol.* 75(2):146–51.
- Lovell, S.F. Lein, M.R. 2005. Individual recognition of neighbors by song in a suboscine bird, the alder flycatcher *Empidonax alnorum*. *Behav Ecol Sociobiol.* 57(6):623–30.
- Maat, A Ter. Trost, L. Sagunsky, H. Seltmann, S. Gahr, M. 2014. Zebra finch mates use their forebrain song system in unlearned call communication. *PLoS One.* 9(10).

Maier, A. 1992. Sensory and motor innervation of bird intrafusal muscle fibers. *Comparative Biochemistry and physiology. Comparative Physiology*, 103(4), 635-639.

Marler P. 2004. Bird calls: A cornucopia for communication. *Nature's Music Sci Birdsong*. 132-77.

Marx, M. y col. 2012. Improved Biocitin labeling and neuronal 3D reconstruction. *Nature protocols*. VOL.7 NO.2. 394-407

Montecinos, S. Medrano, F. Lefort, I. Vanerio, M. 2017. Ecología e historia natural de la turca (poster) Red de Observadores de Aves de Vida Silvestre; Instituto de Ecología y Biodiversidad. https://www.researchgate.net/publication/321586125_Ecologia_e_historia_natural_de_la_Turca_a_Pteroptochos_megapodius.

Norambuena, H. Victoriano, P. 2020. Variación individual e indicios de variación geográfica en el canto territorial del chucao (*Scelorchilus rubecula*) en el centro-sur de Chile. *Gayana*. vol. 84, No. 1, 16-24.

Nottebohm, F. 1971. Neural Lateralization of Vocal Control in a Passerine Bird. *J. EXP. ZOOL.*, 177: 229-262

Nottebohm, F., Nottebohm, M. 1976. Left Hypoglossal Dominance in the Control of Canary and White-crowned Sparrow Song. *J. comp. Physiol.* 108, 171 192.

Nottebohm, F. Nottebohm, M. 1978. Relationship between Song Repertoire and Age in the Canary, *Serinus canarius*. 2. *Tierpsychol.*, 46,298-305.

Nowicki, S., Capranica, R. R. 1986. Bilateral Syringeal Coupling During Phonation of a Songbird. 6(12): 3595-3610.

Odom, K. J. Araya-Salas, M. Morano, J. L. Ligon, R. A. Leighton, G. M. Taff, C. C. & Rice, A. N. 2021. Comparative bioacoustics: a roadmap for quantifying and comparing animal sounds across diverse taxa. *Biological Reviews*, 96(4), 1135-1159.

Odom, K. J. Hall, M. L. Riebel, K. Omland, K. E. & Langmore, N. E. 2014. Female song is widespread and ancestral in songbirds. *Nature communications*, 5(1), 3379.

Oliveros, C. H. Field, D. J. Ksepka, D. T. Barker, F. K. Aleixo, A. Andersen, M. J. & Faircloth, B. C. 2019. Earth history and the passerine superradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(16), 7916-7925.

Quinn, G. P. & Keough, M. J. 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Chapter 17.1. Principal component analysis. Cambridge University Press.

Quispe, R., Yohannes, E., & Gahr, M. 2018. Seasonality at the equator: isotope signatures and hormonal correlates of molt phenology in a non-migratory Amazonian songbird. *Frontiers in zoology*, 15(1), 1-11.

Price, P. H. 1979. Developmental Determinants of Structure in Zebra Finch Song *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93,(2), 260-277

Rheindt, F., Christidis, L., Norman, J. 2009. Genetic introgression, incomplete lineage sorting and faulty taxonomy create multiple cases of polyphyly in a montane clade of tyrant-flycatchers (Elaenia, Tyrannidae). *Zoologica Scripta* 38(2):143 – 153.

Roberts, T. F. Wild, J. M. Kubke, M. F. & Mooney, R. 2007. Homogeneity of intrinsic properties of sexually dimorphic vocal motoneurons in male and female zebra finches. *Journal of Comparative Neurology*, 502(1), 157-169.

Sainburg, T. & Gentner, T. Q. 2021. Toward a computational neuroethology of vocal communication: from bioacoustics to neurophysiology, emerging tools and future directions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15, 811737.

Sakata, J. T, Woolley S. C., Fay, R. R., Popper, A. N. 2020. *The Neuroethology of Birdsong*. Springer Handbook of Auditory Research, ISSN 0947-2657.

Slater, P. J. B. 1981. Chaffinch Song Repertoires: Observations, Experiments and a Discussion of their Significance. *Z. Tierpsychol.*, 56, 1-24.

Slater, P. J. B. 1989. Bird song learning: causes and consequences. *Ethology Ecology & Evolution* 1,19-46.

Suh, A. Paus, M. Kiefmann, M. Churakov, G. Franke, F. A. Brosius, J. & Schmitz, J. 2011. Mesozoic retroposons reveal parrots as the closest living relatives of passerine birds. *Nature communications*, 2(1), 443.

Ten Cate, C. 2021. Re-evaluating vocal production learning in non-oscine birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1836), 20200249.

Touchton, J.M., Seddon, N., Tobias, J.A. 2014. Captive rearing experiments confirm song development without learning in a tracheophone suboscine bird. *PLoS ONE* 9, e95746.

Trainer, J.M., McDonald, D.B., Learn, W.A.. 2002. The development of coordinated singing in cooperatively displaying long-tailed manakins. *Behav. Ecol.* 13,65–69.

Weber, T. P., Piersma, T. Basal metabolic rate and the mass of tissues differing in metabolic scope: migration-related covariation between individual Knots *Calidris canutus*. *Journal of Avian Biology.* 27: 215-224. Copenhagen.

West, M. J., Slomianka, L. H. J. G., & Gundersen, H. J. G. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*, 231(4):482-497.

Wiley, R.H. 2005. Individuality in songs of Acadian flycatchers and recognition of neighbour. *Anim Behav.* 70(1):237–47.