

UCH-FC
MAG-EBE
R173
C.1



Análisis del efecto de las transiciones dietarias sobre la capacidad hidrolítica de disacaridasas (maltasa y sacarasa) y aminopeptidasa-N en aves

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

Magíster en Ciencias Biológicas
con Mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad De Ciencias

Por



Natalia Nicole Ramírez Otárola

Marzo, 2010

Director de Tesis

Dr. Pablo Sabat Kirkwood

**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 la candidata

Natalia Nicole Ramírez Otárola

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de enero 2010.

Director de Tesis

Dr. Pablo Sabat

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Mauricio Canals

Dr. Fernando Novoa





Dedicada a mi familia

AGRADECIMIENTOS



Quisiera agradecer a Pablo Sabat por recibirme en el Laboratorio, por la confianza y por el apoyo entregado para poder realizar esta tesis. A los profesores de la Comisión de tesis Mauricio Canals y Fernando Novoa, por sus comentarios y correcciones.

A los integrantes del laboratorio, en especial a Sandra González, quien me ayudó (aun me sigue ayudando) en el inicio de esta etapa. A Grisel Cavieres, Karin Maldonado y María José Pérez que se convirtieron en buenas consejeras y amigas, me escucharon y motivaron con sus comentarios. A Hugo Torres y Claudio Veloso, por sus comentarios y estímulos y sobre todo por los buenos momentos compartidos en el almuerzo. Agradezco de manera muy especial a Andres Sazo, Jonathan Salinas y Gonzalo Barceló, por su colaboración en la captura de las aves. Por último a Cristobál Narváez por su gran ayuda en una etapa muy importante del desarrollo de esta tesis.

Agradezco a mis queridos amigos que siempre estuvieron presentes (aquí o a la distancia): Mónica Moraga, Verónica Muñoz, Daniela Thomas, Patricia Rivas, Matías Frugone, Daniel Aguilera, Javier Sartori, Pamela Santelices y Nicole Halcategoray.

A mi familia, por su apoyo y comprensión incondicional, por todas las veces que me escucharon hablar de las enzimas e isótopos, sin entender ni una sola palabra de lo que decía. A Coni R Mermelada por su consejo gráfico. A Ariel Lara, por su infinito apoyo y amor, en los buenos y sobre todo en los malos momentos.

Agradezco a todos los que me hicieron sentir su apoyo.
Esta tesis fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1080077.

INDICE DE MATERIAS



LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCION	1
Dieta y capacidad de hidrólisis de nutrientes	1
Análisis isotópico: posición en la trama trófica y composición de la dieta	4
HIPOTESIS	6
OBJETIVOS.....	7
MATERIALES Y METODOS.....	8
Captura de aves	8
Análisis de dieta	8
Determinaciones enzimáticas	9
Análisis isotópico	10
Posición relativa en la trama trófica	11
Análisis estadístico	11
Relaciones filogenéticas	13
RESULTADOS.....	16
1. Actividad enzimática, hábitos dietarios y composición isotópica.....	16
1.1 Actividad enzimática y morfología intestinal	16

1.2. Categorización dietaria.....	27
1.3. Análisis dietario y composición isotópica	30
1.4. Análisis de Componentes Principales	39
2. Posición trófica.....	43
DISCUSION	46
Actividad enzimática y hábitos dietarios.....	46
Posición trófica y el rol de $\delta^{15}\text{N}$ en estudios dietarios	53
CONCLUSION	58
REFERENCIAS	59



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de varianza anidado jerarquizado con tres factores aleatorios. El primer factor agrupó a las especies dentro de familias, el segundo agrupó especies dentro de hábitos dietarios y el tercero reflejó una categoría para cada especie.	28
Tabla 2. Masa corporal, morfología intestinal y actividades de enzimas intestinales de las especies usadas en este estudio.	29
Tabla 3. Porcentaje de semillas e insectos, $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de la dieta además del porcentaje de nitrógeno y carbono de las 16 especies	37
Tabla 4. Composición isotópica de músculo e hígado además de la posición trófica estimada de la composición isotópica de nitrógeno de músculo e hígado.	38
Tabla 5. Ejes del análisis de componentes principales derivados del análisis de caracteres fisiológicos y morfológicos de las aves de este estudio.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hipótesis filogenética de las aves utilizadas.....	15
Figura 2. Relación entre la masa intestinal y el contenido de proteínas totales.....	18
Figura 3. Actividad enzimática total de aminopeptidasa-N en función de la masa corporal.....	19
Figura 4. Actividad enzimática total de maltasa en función de la masa corporal.....	20
Figura 5. Actividad enzimática total de sacarasa en función de la masa corporal.....	21
Figura 6. Relación entre la actividad de aminopeptidasa-N total y la masa corporal después de remover los efectos de la filogenia.....	22
Figura 7. Relación entre la actividad de maltasa total y la masa corporal después de remover los efectos filogenéticos.....	23
Figura 8. Relación entre la actividad de sacarasa total y la masa corporal después de remover los efectos de la filogenia.....	24
Figura 9. Relación entre las actividades de las enzimas intestinales.....	25
Figura 10. Relación entre las actividades enzimáticas después de remover el efecto filogenético.....	26

Figura 11. Relación entre los la actividad total de maltasa, la proporción de semillas y la proporción de insectos encontrados en el tracto gastrointestinal.	34
Figura 12. Relación entre la razón aminopeptidasa-N/maltasa y la proporción de semillas encontradas en el tracto gastrointestinal mediante analisis tradicional y con efecto de la filogenia removido.	35
Figura 13. Relación entre la actividad de maltasa y el nitrógeno de la dieta mediante analisis tradicional y con efecto de la filogenia removido.	36
Figura 14. Resultados del análisis de componentes principales (ACP) incluyendo las variables morfológicas y fisiológicas.....	40
Figura 15. Relación entre el segundo eje del análisis de componentes principales y el porcentaje de nitrógeno de la dieta.....	41
Figura 16. Representación isotópica de la comunidad de aves muestreada en la zona central de Chile, obtenida del análisis isotopico de músculo e hígado	45

RESUMEN

La elección de un determinado ítem trófico por un individuo depende tanto de su capacidad de adquisición como de su capacidad de digerirlo. Así, la diversidad de alimentos ha permitido la existencia de diferentes estrategias digestivas, ya sea a través de adaptaciones conductuales, morfológicas o fisiológicas. Desde esta perspectiva, el estudio de la capacidad hidrolítica de las enzimas digestivas localizadas en la chapa estriada de los enterocitos ha sido de gran utilidad para establecer algunos aspectos de las estrategias digestivas en vertebrados. Diversos estudios han reportado una aparente correlación entre las características de la dieta y la fisiología digestiva en vertebrados, demostrando una gran variabilidad en la actividad enzimática. Sin embargo, los niveles de actividad de enzimas digestivas constitutivas de la membrana de los enterocitos, no han sido correlacionados con los niveles o concentraciones de nutrientes a una escala evolutiva (i.e., a través de un análisis comparativo inter-específico). El objetivo de esta tesis fue estudiar el ajuste de las características fisiológicas relacionadas con la adquisición de nutrientes, a las modificaciones de la dieta en distintas especies de aves paseriformes de Chile Central. Se utilizó una aproximación estadística que incorpora al origen filogenético de las especies y variables relacionadas con las características de la dieta como fuente de variación sobre las variables digestivas (i.e., isótopos estables de nitrógeno $\delta^{15}\text{N}$, proporción de nitrógeno y carbono y proporción de insectos en la dieta). Las actividades enzimáticas mostraron una gran variación interespecífica, sin embargo la categoría dietaria no mostró efectos sobre las tasas de hidrólisis. Sin embargo, la

actividad de maltasa se relaciona con el porcentaje de nitrógeno de la dieta. Adicionalmente la razón aminopeptidasa-N/maltasa se correlaciona de manera negativa con la proporción de semillas encontradas en el tracto gastrointestinal.

La composición isotópica de nitrógeno de músculo pectoral e hígado reveló que los omnívoros presentarían los mayores niveles tróficos. Debido a que la diferencia en los niveles de actividad enzimática entre especies fue en general mayor a la reportada para la variación intraespecífica (i.e., debida a flexibilidad fisiológica), nuestros resultados sugieren que esta variación tendría una base genética. Además, la carencia de asociación entre la categoría dietaria y la fisiología digestiva sugieren que la categorización no siempre refleja la composición química del alimento ingerido. Por último, la posición trófica de las distintas especies calculada a partir de los análisis de la composición isotópica de nitrógeno en los tejidos, no fue concordante con las categorías dietarias descritas para las especies modelo. Probablemente esta situación se deba a la presencia de gran heterogeneidad isotópica en la base de la trama trófica, lo que fue corroborado por los análisis de $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas presentes en los sitios de estudio.

ABSTRACT

The choice of a particular diet by an individual depends on its ability to obtain it as well as their ability to digest it. Thus, the diversity of foods has allowed the existence of different digestive strategies, either through behavioral, morphological or physiological adaptations. From this perspective, the study of the hydrolytic capacity of digestive enzymes located at the brush border of the enterocytes has been very useful to establish some aspects of digestive strategies in vertebrates. Several studies have reported an apparent correlation between the dietary characteristics and digestive physiology in vertebrates, showing also a large variability in digestive enzyme activities. However, the levels of digestive enzyme activities of the enterocytes, has been no correlated with the levels or concentrations of nutrients at an evolutionary scale (i.e., inter-specific comparative analysis). The objective of this thesis was to study the adjustment of the physiological traits related to the acquisition of nutrients, to dietary transitions in different species of passerine birds in central Chile. We used a statistical approach that incorporates the phylogenetic origin of species and variables related to the characteristics of the diet as a source of variation on the digestive variables (i.e., stable isotopes of nitrogen $\delta^{15}\text{N}$, nitrogen ratio and proportion of insects in the diet). The enzyme activities exhibited a large interspecific variation, but the dietary category showed no effect on hydrolysis rates. However, it was found that maltase activity is related to the percentage of nitrogen in the diet. Additionally, the ratio aminopeptidase-N/maltase was negatively correlated with the proportion of seeds found in the

gastrointestinal tract. The nitrogen isotopic composition of pectoralis muscle and liver revealed that omnivorous species exhibits higher trophic levels. Because the difference in enzyme activity levels between species was generally greater than that reported for intraspecific variation (i.e., due to physiological flexibility), our results suggest that this variation would have a genetic basis. Moreover, the lack of association between dietary category and digestive physiology suggest that categorization does not always reflect the chemical composition of the food. Finally, the trophic position of the different species calculated from the analysis of the isotopic composition of nitrogen in the tissues was not consistent with dietary categories described for the model species. Probably, this is due to the presence of isotopic heterogeneity at the base of the food web, which was corroborated by the analysis of $\delta^{15}\text{N}$ of the plants of the study sites.

INTRODUCCION

Tradicionalmente se ha postulado que la elección de un determinado ítem trófico dependería de su abundancia y disponibilidad. Sin embargo, la selección del alimento por un individuo no solo presentaría una correspondencia con su capacidad de adquisición si no también con la capacidad de digerirlo (Martínez del Río & Stevens 1989). Esto se traduce en que la elección de un determinado ítem trófico se encuentra en una correspondencia con la capacidad digestiva, ya sea por las tasas de hidrólisis y absorción de nutrientes particulares y/o de la tasa de asimilación de energía (Sibly & Calow 1986). Así, la naturaleza química de los nutrientes que son digeridos y luego metabolizados, pueden afectar de gran manera la conducta de forrajeo de un organismo (Martínez del Río & Stevens 1989). De esta manera, el estudio de los procesos digestivos ha permitido establecer un puente mecanístico entre los procesos de digestión que tienen lugar en el tracto digestivo y la ecología trófica y nutricional de las especies (Martínez del Río & Karasov 2007).

Dieta y capacidad de hidrólisis de nutrientes

La diversidad de alimentos ha permitido la existencia de diferentes estrategias digestivas en vertebrados (véase Klasing 1998). En este sentido, y debido a que las moléculas grandes y complejas como carbohidratos y proteínas, necesitan ser degradadas a sus formas más simples para poder ser absorbidas (Chang & Karasov 2004, Martínez del

Río & Karasov 2007), la actividad de enzimas digestivas localizadas en la chapa estriada de los enterocitos, además de ser crucial para la nutrición adecuada de los animales, es un buen predictor de la estrategia digestiva utilizada por un organismo. Entre estas enzimas se encuentran las disacaridasas: sacarasa-isomaltasa, maltasa-glucoamilasa y trehalasa, responsables de catalizar el paso final de la digestión de carbohidratos; y la exopeptidasa aminopeptidasa-N que degrada oligopeptidos a aminoácidos. (Martínez del Río 1990, Martínez del Río et al., 1995). Diversos estudios han demostrado la existencia de variabilidad en la actividad de las enzimas digestivas tanto a nivel intra- como inter-específico (Martínez del Río & Stevens 1989, Afik 1995, Sabat 2000, Meynard et al. 1999, Sabat & González 2003, Schondube & Martínez del Río, 2004). Por ejemplo, en aves, algunos miembros del linaje Sturnidae-Muscicapidae no expresan sacarasa intestinal, por lo que evitan consumir alimentos ricos en sacarosa (Martínez del Río et al. 1995, Gatica et al. 2006); y en el género *Cinclodes*, la ausencia de la enzima sacarasa probablemente se debe a la especialización a una dieta carnívora (Sabat 2000). La presencia de sacarasa, entonces, estaría relacionado con el consumo regular de alimentos ricos en azúcares (Witmer & Martínez del Río 2001). Así, la capacidad de digestión afectaría las preferencias de selección del alimento (véase también Martínez del Río et al. 1995) En este sentido, la presencia y/o ausencia de algunas de estas enzimas puede ser determinante en la elección de determinados ítems tróficos. Paralelamente se ha documentado que la actividad enzimática de disacaridasas varía a lo largo del intestino de aves lo que se relacionaría con la presencia diferencial de sustratos en el lumen (Sabat & González 2003, Shondube & Martínez del Río 2004, Witmer & Martínez del Río 2001). Además, en aves herbívoras se ha reportado que la expresión de la enzima

aminopeptidasa- N incrementa en la porción mas distal del intestino delgado, siendo probablemente una estrategia de ajuste a una dieta rica en fibra (Meynard et al. 1999, McWilliams 1999).

Así, los estudios disponibles a la fecha han demostrado una gran variabilidad en la actividad enzimática tanto a nivel inter- como intra-específico, lo que daría cuenta de la variación natural de los niveles de sustrato específicos del lumen intestinal entre especies y a lo largo del tracto digestivo (Sabat 2000, Sabat & González 2003, Meynard et al. 1999, Schondube & Martínez del Río 2004). Mas aun, la presencia de una enzima particular (e.g., sacarasa), la respuesta de esa enzima a aclimatación a dietas de distinta composición de nutrientes y los niveles de actividad enzimática parecieran depender del origen filogenético de las especies (Karasov & Levey 1990, Caviedes-Vidal et al. 1994, Martínez del Río 1990; Levey et al. 1999, Schondube and Martínez del Río 2004). De esta manera, aun cuando esta hipótesis ha sido abordada de manera tangencial y cualitativa (e.g., Meynard et al. 1999, Martínez del Río & Stevens 1989, Martínez del Río 1990, Sabat 2000, Sabat & González 2003) pareciera ser que la expresión de algunas de las enzimas digestivas en aves son el resultado de las transiciones dietarias y el reflejo de la presencia habitual y concentración de nutrientes en la dieta. Sin embargo, aun cuando los niveles de actividad de enzimas digestivas constitutivas de la membrana de los enterocitos (tales como las disacaridasas y aminopeptidasas) parecen responder intra-individualmente (i.e., presentan flexibilidad fisiológica), éstos no han sido correlacionados con los niveles o concentraciones de nutrientes a una escala evolutiva (i.e., análisis comparativo especie-específico).

Análisis isotópico: posición en la trama trófica y composición de la dieta

Tradicionalmente los estudios de análisis de dieta de aves incluyen procedimientos como análisis del contenido estomacal, fecas y egagrópilas (López-Calleja 1995, Novoa et al.1996) Estos tipos de análisis entregan información certera acerca de los tipos de alimentos consumidos (López-Calleja 1995). Sin embargo, estas metodologías solo muestran los ítems consumidos en un corto período de tiempo (Gannes et al. 1998, Inger & Berhop 2008). Una metodología alternativa y complementaria para estimar la dieta natural de especies y poblaciones naturales, es a través del análisis de isótopos estables. El uso de isótopos estables en ecología animal ha sido de gran utilidad, ya que además de la fácil obtención y análisis de los datos isotópicos, estos reflejan una mayor ventana temporal de los hábitos dietarios (Gannes et al. 1998, Karasov & Martínez del Rio 2006, Inger & Bearhop 2008).

Usualmente, la composición isotópica de diferentes tejidos reflejan los hábitos alimentarios de un animal, ya que estos son incorporados directamente de la dieta (Kelly 2000). Además, las señales entregadas por los isótopos de los distintos tejidos (e.g., músculo, plumas, hígado) contienen información de la dieta correspondiente al período en el cual estos tejidos fueron sintetizados (Karasov & Martínez del Rio 2006, Inger & Bearhop 2008). Así, los distintos tejidos reflejan la incorporación de la dieta a diferentes escalas temporales (Kelly 2000).

El análisis de isótopos estables se ha utilizado como una variable *proxy* de las características de la dieta (Pearson et al. 2003, Hobson & Clark 1992, Angerbjörn et al.

1994, Wolf et al. 2000, Sabat & Martínez del Río 2002, Post 2002) y como covariable en estudios de fisiología de vertebrados (Shondube et al. 2001). Por ejemplo, el enriquecimiento con isótopos de nitrógeno aumenta de entre 3 y 4 ‰ a medida que se sube en la trama trófica (Post 2002, Gannes et al. 1998), permitiendo inferir la posición de cada individuo en la cadena trófica (Post 2002, Gannes et al. 1998, Hobson 1994). Por último, la determinación de la posición en la trama trófica será un indicador del consumo de proteínas del animal (Shondube et al. 2001, Sabat et al. 2009).

El principal objetivo de esta tesis fue explorar el efecto de los hábitos dietarios sobre la capacidad hidrolítica de las enzimas digestivas sacarasa, maltasa y aminopeptidasa-N en dieciséis especies de aves pertenecientes al orden Paseriformes. Usamos este orden debido a que es un grupo con una gran diversidad de especies con hábitos dietarios diferentes, los cuales incluyen especies que se alimentan de insectos, semillas, frutos o una mezcla de ellos (Lopez-Calleja 1995, Estades 1997, Jaksic 2001). Esta variación en los hábitos dietarios provee una oportunidad única de estudiar los efectos de las transiciones en la dieta sobre la actividad de las enzimas intestinales. Basados en la filogenia construida por Sibley y Ahlquist (1990), evaluamos los efectos de los hábitos dietarios sobre la actividad de las enzimas intestinales, en un contexto filogenético explícito. Para esto utilizamos tres aproximaciones: (i) la primera basada en el análisis morfológico y bioquímico del tracto digestivo, (ii) la segunda a través del análisis del ítem alimentario contenido en el estómago y (iii) la tercera mediante el análisis isotópico de distintos tejidos del animal y del contenido del tracto digestivo.

HIPOTESIS

Debido a que la tasa de adquisición de energía es afectada por las características químicas y físicas de la dieta, se hipotetiza que la actividad hidrolítica de las enzimas de la chapa estriada de los enterocitos (disacaridasas y aminopeptidasa-N) ha sido modulada a través de la historia evolutiva, ajustándose a la composición química de la dieta natural.

De esta hipótesis, se desprenden las siguientes predicciones:

- 1.- Para cada componente dietario (e.g., material vegetal o animal), habrá una relación positiva entre su proporción en la dieta natural (porcentaje volumétrico encontrada en el tracto gastrointestinal) y la actividad enzimática específica.
- 2.- Se espera que las actividades de disacaridasas (maltasa y sacarasa) se correlacionen de manera negativa con la proporción del isótopo de nitrógeno ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) de los distintos tejidos y la dieta, y por lo tanto, con la posición estimada en la trama trófica.
- 3.- La actividad de aminopeptidasa-N se correlacionará de manera positiva con la composición isotópica de nitrógeno (de músculo, hígado y dieta) y de esta manera con la posición estimada en la trama trófica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la actividad de enzimas de la membrana intestinal encargadas de la hidrólisis de carbohidratos y proteína en función de la categorización dietaria y de la posición relativa en la trama trófica en 16 especies del orden Paseriformes en un contexto filogenéticamente explícito.

Objetivos específicos

- Estimar la actividad enzimática de las disacaridasas (maltasa y sacarasa) y de una oligopeptidasa (aminopeptidasa-N) de la membrana del intestino delgado en aves paseriformes con diferentes hábitos dietarios en Chile Central.
- Estimar la posición relativa en la trama trófica de las especies de aves mediante el análisis de isótopos estables de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) de tejidos y dieta.
- Evaluar la utilidad de isótopos estables como una herramienta predictiva de la dieta.

MATERIALES Y METODOS

Captura de aves

Las determinaciones fisiológicas, morfológicas y dietarias se realizaron con animales recién capturados en terreno. Se capturaron entre 6 y 8 individuos de 16 especies de passeriformes, durante las primeras horas del día, en los meses de verano en 2008 y 2009. Las capturas se realizaron con redes de niebla en tres localidades de la zona central de Chile: San Carlos de Apoquindo (33°23'S, 70°30'W), Quebrada de la Plata (33°30' S, 70°54' W) y Farellones (33°19'S, 70°19'W).

Los animales capturados fueron sacrificados mediante compresión torácica antes de treinta minutos luego de su captura. El intestino de cada individuo sacrificado fue inmediatamente removido y lavado con solución de NaCl (0,9%). Luego cada intestino fue medido (cm) y pesado ($\pm 0,0001$ g) para posteriormente ser congelados a -50°C para las posteriores determinaciones enzimáticas. El contenido del tracto digestivo fue extraído y preservado en frío.

Análisis de dieta

En el laboratorio, una submuestra de los individuos colectados fue utilizada para el análisis de dieta. El contenido del tracto digestivo fue descongelado y cada ítem dietario animal o vegetal fue separado mediante observación directa a través de una lupa binocular (4x) y luego pesado ($\pm 0,0001$ g) según método utilizado por López-Calleja (1995). Con el peso de cada ítem animal y vegetal se estimó el porcentaje volumétrico

de insectos y semillas encontrados en el tracto gastrointestinal de cada ave analizada. El porcentaje volumétrico de semillas e insectos fue transformado al arcoseno de la raíz cuadrada, para satisfacer el supuesto de normalidad de los test estadísticos paramétricos. Luego las muestras fueron secadas y molidas para el posterior análisis isotópico.

Determinaciones enzimáticas

Previo al análisis enzimático, los tejidos fueron descongelados y homogenizados en 20 volúmenes de NaCl en un homogenizador Ultraturrax T25 a velocidad máxima.

Se determinó la actividad enzimática de las disacaridasas sacarasa (EC.3.4.11.2) y maltasa (EC.3.2.1.20, Vonk & Western 1984) mediante el método utilizado por Martínez del Río (1990). Brevemente, 100 μ l de los tejidos homogenizados fueron incubados a 40°C con 100 μ l de solución de azúcar (maltosa o sacarosa según corresponda, solución disacárido 56mM en 0.1M maleato/NaOH). Pasados 10 minutos de incubación, se detuvo la reacción agregando 3 ml de solución de revelado Glucosa-Trinder (reactivo enzimático Glucosa LS (Valtek) más Tris/HCl 0.1mol L⁻¹, pH 7). Después de 18 minutos de detenida la reacción, se midió la absorbancia a 505nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700. En base a la absorbancia y a una curva construida en base a estándares de glucosa, se calculó la actividad hidrolítica.

Para estimar la actividad de la aminopeptidasa-N (EC.3.4.11.2, Vonk & Western 1984) se utilizó L-alanina-p-nitroanilida como sustrato (2.04 mmol L⁻¹ de alanina-p-nitroanilida en 0.2mol L⁻¹ NaHPO₄, pH 7). 50 μ l de homogenizado fueron mezclados con 1ml de mezcla de ensayo. La reacción se incubó a 40°C por 10 minutos, pasado ese tiempo la reacción fue detenida agregando 3ml de ácido acético frío 2N. Luego de

detenida la reacción se midió la absorbancia a 384nm. En base a la absorbancia y a una curva construida en base a ρ -nitroanilida, se calculó la actividad hidrolítica. Además, como un análogo de la trayectoria observada en la variación en la relación entre la absorción de glucosa y aminoácidos por el intestino de los vertebrados (Buddington et al. 1987, Karasov & Levey 1990), se utilizó la razón aminopeptidasa-N/maltasa y aminopeptidasa-N/sacarasa como predictor de las diferentes proporciones de proteínas y carbohidratos en la dieta de aves (Sabat 2000).

Con el propósito de poder realizar comparaciones con otros estudios, determinamos el contenido de proteínas como una función de la masa intestinal. Para la estimación de la concentración de proteínas en las muestras se utilizó Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce). La absorbancia fue leída a 595 nm y en base a una curva estándar construida con Suero Albumina Bovina se calculó la concentración de proteínas en la muestra. Sin embargo, debido a que la proteína total se encontró positivamente correlacionada con la masa del intestino y como una forma de evitar la subestimación de la actividad enzimática, los datos se presentan como actividad hidrolítica total ($\mu\text{mol min}^{-1}$) y como actividad por gramo de tejido fresco ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ tejido fresco). Martínez del Río et al. (1995) provee de una justificación para nuestra elección de estandarización.

Análisis isotópico

Para caracterizar la dieta de los individuos, se obtuvieron muestras de distintos tejidos (músculo pectoral, hígado y contenido estomacal). Estos fueron secados hasta peso constante en una estufa a 60 °C, molidos, desgrasados y cargados en cápsulas para el

análisis isotópico. Las razones de isótopos de carbono y nitrógeno fueron determinadas en un espectrofotómetro de masas para isótopos estables (VG Isotech, Optima), en la Universidad de Wyoming. Las muestras fueron combustionadas mediante Carlo Erba NA 1500 analizador elemental y la razón de isótopos estables fueron expresados usando la notación delta (δ) en partes por mil (‰) de la forma: $\delta^{15}\text{X} = (\text{R}_{\text{muestra}} / \text{R}_{\text{standard}} - 1) \times 1000$, donde $\text{R}_{\text{muestra}}$ y $\text{R}_{\text{standard}}$ son las proporciones molares de los isótopos más pesados respecto al más liviano de la muestra y la referencia, respectivamente.

Posición relativa en la trama trófica

Para estimar la posición relativa en la trama trófica de las 16 especies de aves capturadas, se utilizó el modelo simple:

$$\text{PT} = \lambda + (\delta^{15}\text{N}_{\text{consumidor}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{productor}}) / \Delta_n \quad \text{Ecuación 1 (Post 2002),}$$

donde λ es la posición trófica del organismo usado para estimar $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ (e.g., $\lambda=1$ para productores primarios), $\delta^{15}\text{N}_{\text{consumidor}}$ ($\delta^{15}\text{N}_c$, o un consumidor ubicado más arriba en la trama) es medido directamente del músculo e hígado, $\delta^{15}\text{N}_{\text{productor}}$ se obtuvo de muestras de plantas recolectadas de las localidades donde las aves fueron capturadas. Δ_n es el enriquecimiento relativo en $\delta^{15}\text{N}$ por nivel trófico. En este estudio se utilizó el valor promedio 3.4‰ (Elrhinger 1986, Peterson & Fry 1987, Post 2002).

Análisis estadístico

Se realizaron análisis convencionales y filogenéticamente independientes. Para estos últimos análisis, se utilizó el valor promedio por especie como variable respuesta.

Se realizaron una serie de análisis de regresiones entre las variables fisiológicas y morfológicas contra el tamaño corporal y entre las actividades enzimáticas, usando el valor promedio para cada especie. Para estimar la relación entre la actividad hidrolítica de las enzimas intestinales y las características de la dieta, se realizaron análisis de correlaciones usando los residuos respectivos de la regresión lineal entre la actividad enzimática y la masa corporal. Además, se realizaron correlaciones entre la composición isotópica de nitrógeno y el porcentaje de nitrógeno de la dieta, entre la composición isotópica de nitrógeno y el porcentaje volumétrico de semillas e insectos encontrados en el contenido estomacal y entre el porcentaje de nitrógeno de la dieta y el porcentaje volumétrico de semillas e insectos encontrados en el contenido estomacal. Adicionalmente se realizaron correlaciones entre la actividad enzimática y la composición isotópica de nitrógeno de músculo e hígado.

Para evaluar la actividad enzimática como función de la afiliación taxonómica (i.e. proximidad filogenética), hábitos dietarios y especies, se realizó un análisis de covarianza anidado con tres variables aleatorias siendo la masa corporal la covariable (ver Sabat et al., 2004). El primer factor agrupó a las especies en distintas categorías de acuerdo a la familia a la que cada especie pertenecía (Sibley & Ahlquist 1990). El segundo factor, anidado en el primero, agrupó a las especies en diferentes categorías de acuerdo al hábito dietario al que cada especie pertenecía (insectívoros, granívoros y omnívoros; Lopez-Calleja 1995, Estades 1997, Jaksic 2001). El tercer factor, anidado en la segunda variable, tuvo una categoría para cada especie. Así, cualquier efecto dado por la proximidad filogenética aparecerá como efecto significativo en el primer factor (ver Harvey & Pagel 1991, Gittleman & Luh 1992). De la misma manera, cualquier efecto

dado por los hábitos dietarios, será un efecto significativo en el segundo factor. Para obtener las diferencias específicas se realizó un test *a posteriori* de Tukey

Se evaluó la composición isotópica de las plantas usadas como base en función de la localidad de procedencia mediante un análisis de varianza (ANOVA). Además, para evaluar la variación interespecífico en la composición isotópica de nitrógeno, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), usando a las especies como factor aleatorio. Para obtener las diferencias específicas se realizó un test *a posteriori* de Tukey.

Dado que las variables analizadas están correlacionadas y de manera de reducir el número de variables, se utilizó un análisis de componentes principales (PAC), incluyendo todas las variables fisiológicas y morfológicas analizadas al modelo, usando el valor promedio por especie y sin efectos filogenéticos.

Los contrastes filogenéticamente independientes (Felsenstein 1985, Garland & Adolph 1994) se calcularon usando el programa PA (Phylogenetic Autoregression; Cheverud et al. 1985, Rohlf 2001). Este análisis usa una matriz de distancia filogenética para calcular el valor de la variable analizada según la filogenia. Luego contrasta el valor observado contra el valor predicho filogenéticamente (Cheverud et al. 1985, Rohlf 2001). Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa Statistica 7® (1997) para Windows.

Relaciones filogenéticas

Los estudios comparativos muchas veces se basan en los cambios que ocurren entre una variable dependiente (i.e. rasgo fisiológico) producidos por una variable independiente evolutiva (i.e. dieta; Felsenstein 1985, Garland et al. 1992, Garland & Adolph 1994)

Estas comparaciones interespecíficas contienen un efecto filogenético, debido a que especies que se encuentran cercanamente emparentadas podrían compartir un rasgo por el simple hecho de provenir de un ancestro común (Harvey & Page1 1991, Garland & Carter, 1994). Por lo tanto, los datos obtenidos de estas especies no pueden ser considerados como muestras independientes (Rezende & Garland 2003). Para poder realizar comparaciones entre especies, es necesario considerar la relación jerárquica que existe entre ellas. Para ello, se obtuvo un árbol filogenético (Fig.1) de las aves capturadas basado en la hipótesis de Sibley y Alhquist (1990). Debido a algunas especies no se encontraban en la hipótesis mencionada, se usó otra especie dentro del mismo género como equivalente para determinar la longitud del largo de las ramas en la filogenia construida. La distancia filogenética entre *Asthenes humicola* y *Leptasthenura aegithaloides* fue estimada de Gonzales & Wink (2008), mientras que la filogenia de la familia *Tyrannidae* fue obtenida de Ohlson et al. (2007). Por último, la distancia filogenética entre *Curaeus curaeus* y *Sturnella loyca* fue obtenida de Lanyon & Omland (1999).

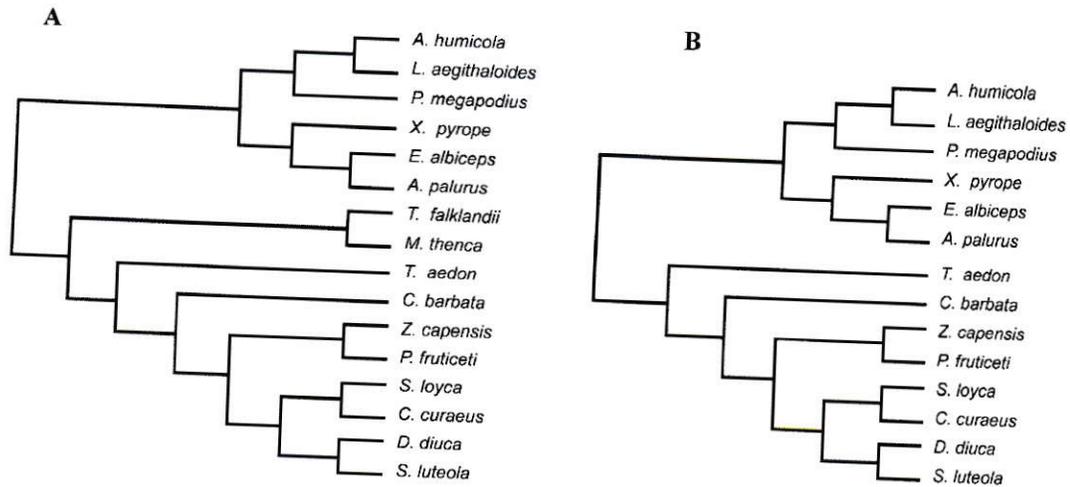


Figura 1. Hipótesis filogenética de las aves utilizadas, basado en la hipótesis de Sibley & Ahlquist (1990), filogenia (A) usada para análisis filogenéticos de características morfológicas y fisiológicas; (B) debido a que las especies *T.falklandii* y *M.thenca* no presentan actividad de sacarasa, estas no fueron incluidas en análisis que involucraran a esta enzima por lo tanto se uso un árbol filogenético reducido para realizar los análisis filogenéticos sobre las características fisiológicas y morfológicas.

RESULTADOS

1. Actividad enzimática, hábitos dietarios y composición isotópica.

1.1 Actividad enzimática y morfología intestinal

El contenido de proteínas del homogenizado no presentó diferencias significativas entre las especies (ANOVA: $F_{15,114}=1,49$ $p=0,12$; promedio $1,77 \pm 0,07$ mg proteína/g tejido fresco). Además, el contenido de proteínas se encontró altamente relacionado con la masa del intestino delgado ($r^2=0,92$ $F_{1,136}=1468,17$ $p<0,001$; Fig. 2). Así, cualquier cambio observado en la actividad enzimática específica (i.e., UI o UI/g tejido fresco) indica un cambio en la actividad enzimática más que cambios en el contenido de agua del tejido y/o el contenido de proteína.

Las actividades totales ($\mu\text{mol}/\text{min}$) de las tres enzimas se relacionaron de manera significativa con la masa corporal. Las ecuaciones alométricas para la actividad total de aminopeptidasa-N, sacarasa y maltasa fueron: aminopeptidasa-N= $0,13m_b^{0,95\pm 0,13}$ ($r^2=0,79$ $F_{1,14}=53,1$ $p<0,001$, $n=16$; Fig. 3), maltasa= $1,34m_b^{0,98\pm 0,18}$ ($r^2=0,69$ $F_{1,14}=30,86$ $p<0,001$; $n=16$; Fig. 4), sacarasa= $0,04m_b^{1,07\pm 0,27}$ ($r^2=0,56$ $F_{1,12}=15,38$ $p<0,002$; $n=14$; Fig. 5). El análisis filogenético fue concordante con los resultados alométricos obtenidos de las regresiones convencionales (Figs. 6 a 8). Las curvas alométricas corregidas filogenéticamente para las actividades de aminopeptidasa-N ($\mu\text{mol}/\text{min}$) y maltasa ($\mu\text{mol}/\text{min}$) mostraron pendientes más bajas (0,88 para ambas enzimas) comparadas con las obtenidas con el análisis convencional. Para la actividad de sacarasa la pendiente alométrica (1,04) de la curva con efecto de la filogenia removido, también fue menor.

Las actividades estandarizadas por gramos de tejido fresco de maltasa y sacarasa, estuvieron altamente correlacionadas entre las especies ($r=0,60$ $p=0,025$; $n=14$; Fig. 9). Contrariamente, la actividad por gramos de tejido fresco de aminopeptidasa-N no se correlacionó de manera significativa con la actividad de sacarasa ($r=-0,29$ $p=0,32$; $n=14$; Fig. 9). Concordantemente, los residuos filogenéticos de la actividad de sacarasa se correlacionó de manera positiva y significativa con los residuos filogenéticos de la actividad de maltasa ($r=0,77$ $p<0,001$; $n=14$; Fig. 10). De manera similar a los resultados obtenidos del análisis convencional, los residuos filogenéticos de las actividades de sacarasa y aminopeptidasa-N no se correlacionaron significativamente ($r=-0,15$ $p=0,61$ $n=14$; Fig. 10).

La morfología intestinal se encontró altamente relacionada con la masa corporal. La ecuación alométrica de la masa intestinal fue: $m_{id}=0,02m_b^{1,05\pm 0,08}$ ($r^2=0,92$ $F_{1,14}=166,38$ $p<0,001$). De manera similar, la longitud del intestino delgado presentó la siguiente ecuación alométrica: $l_{id}=4,6m_b^{0,37\pm 0,06}$ ($r^2=0,74$ $F_{1,14}=40,82$ $p<0,001$). El análisis filogenético reveló que las curvas alométricas tanto de la masa como de la longitud del intestino delgado mostraron pendientes mas bajas (1,04 y 0,36 respectivamente) comparadas con las obtenidas mediante el análisis tradicional. Así, la masa del intestino delgado mostró una relación positiva con la masa corporal ($r^2=0,94$ $F_{1,14}=227,10$ $p<0,01$; $n=16$) al igual que la longitud intestinal ($r^2=0,72$ $F_{1,14}=35,57$ $p<0,01$; $n=16$), después de remover el efecto filogenético.

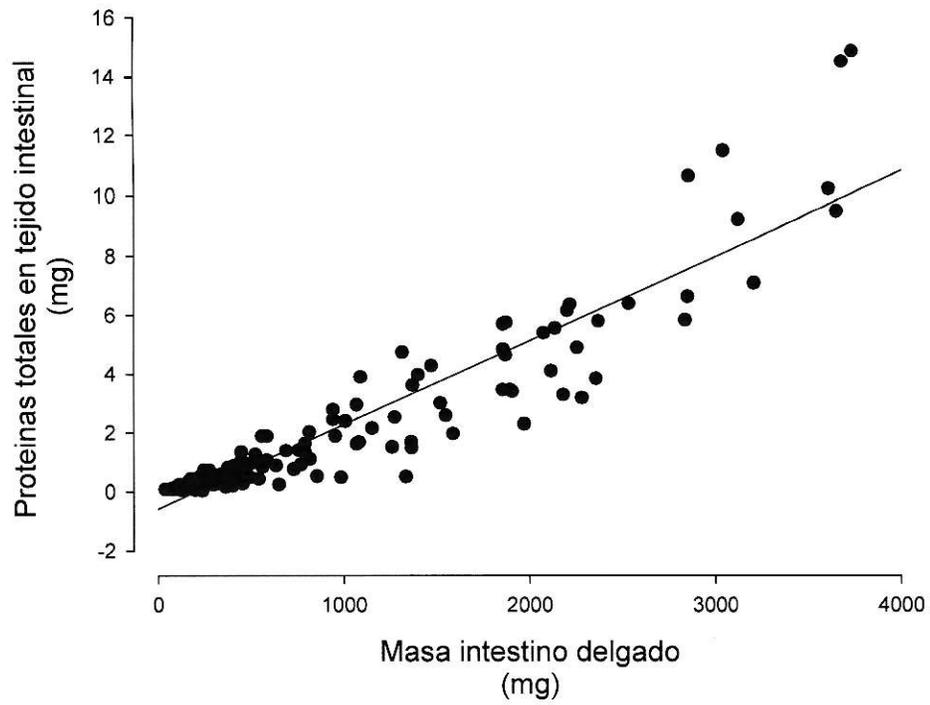


Figura 2. Relación entre la masa intestinal y el contenido de proteínas totales. La relación estimada es: $\text{mg proteína en tejido} = -0,58 \pm 0,12 + 0,003 \pm 0,0001 \cdot \text{masa intestinal}$.

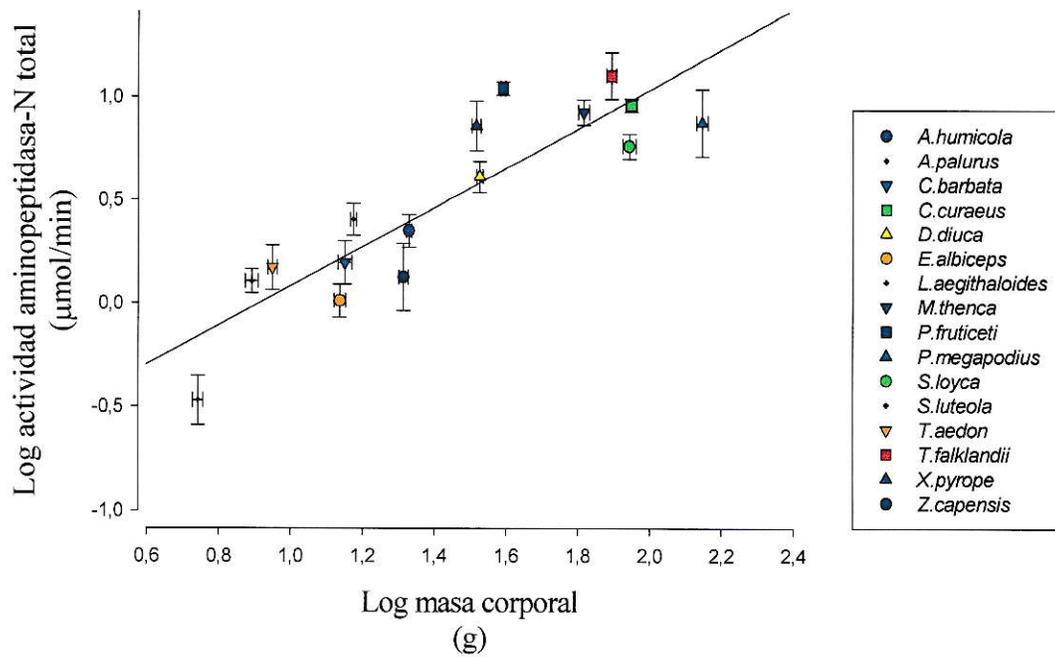


Figura 3. Actividad enzimática total de aminopeptidasa-N en función de la masa corporal. Los valores corresponden al promedio \pm el error estándar para cada especie.

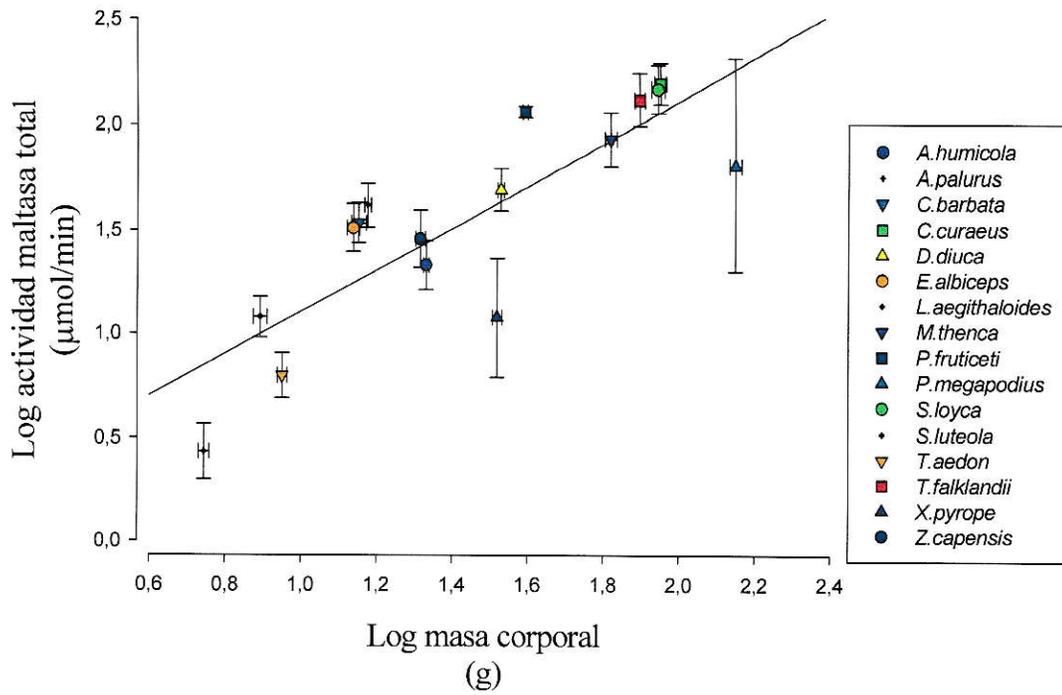


Figura 4. Actividad enzimática total de maltasa en función de la masa corporal. Los valores corresponden al promedio \pm el error estándar para cada especie.

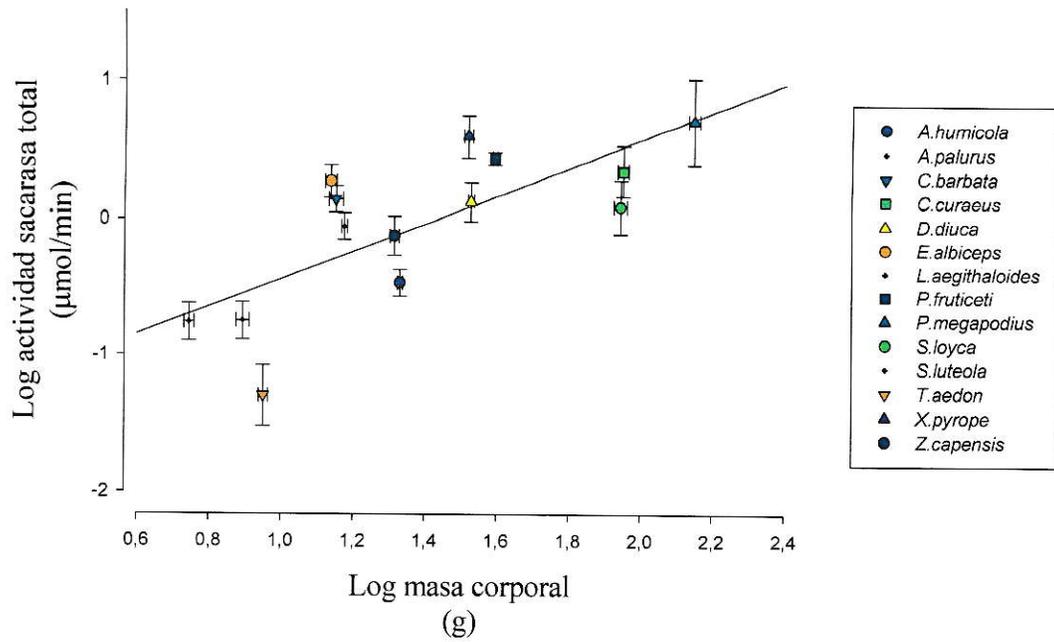


Figura 5. Actividad enzimática total de sacarasa en función de la masa corporal. Los valores corresponden al promedio \pm el error estándar para cada especie.

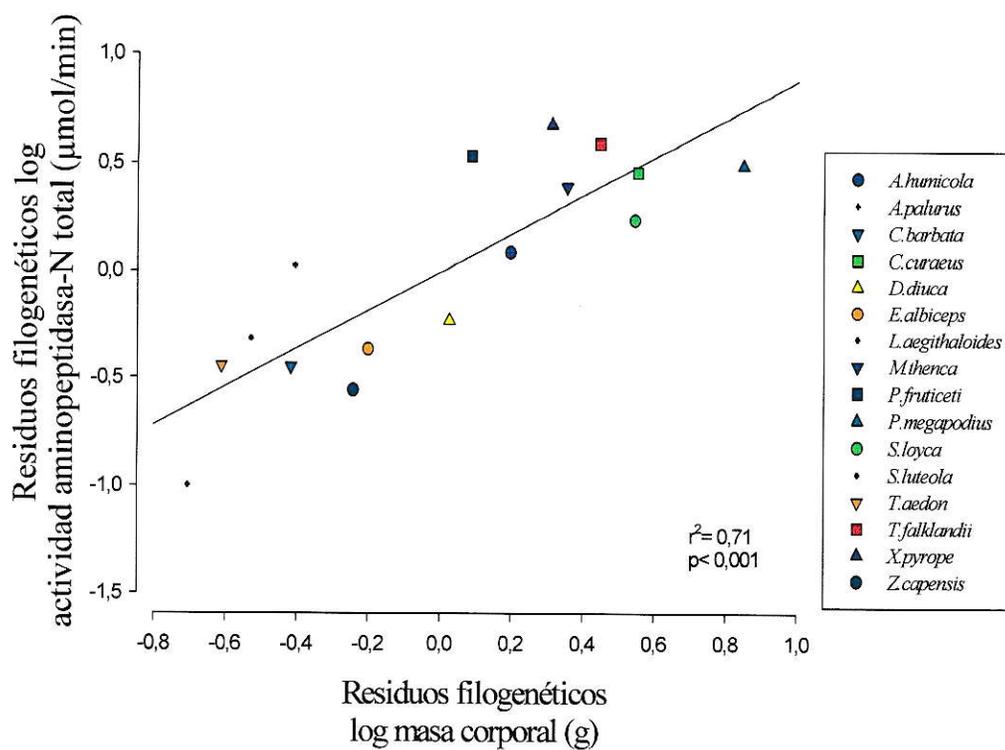


Figura 6. Relación entre la actividad de aminopeptidasa-N total y la masa corporal después de remover los efectos de la filogenia. Los residuos filogenéticos fueron calculados en mediante análisis de autoregresión.

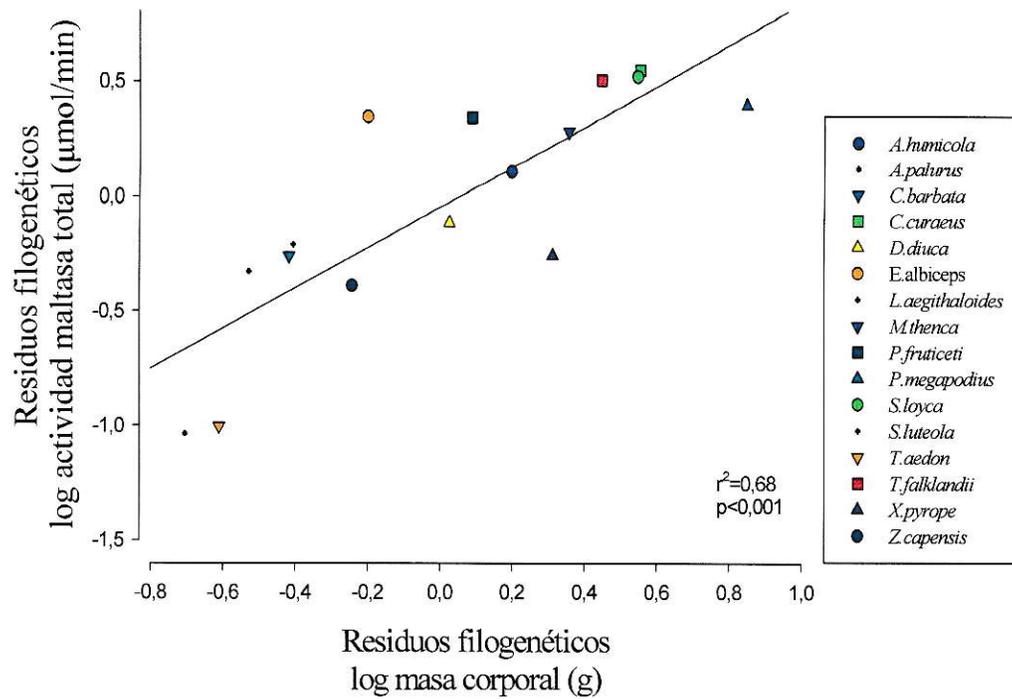


Figura 7. Relación entre la actividad de maltasa total y la masa corporal después de remover los efectos filogenéticos. Los residuos filogenéticos fueron calculados mediante análisis de autoregresión.

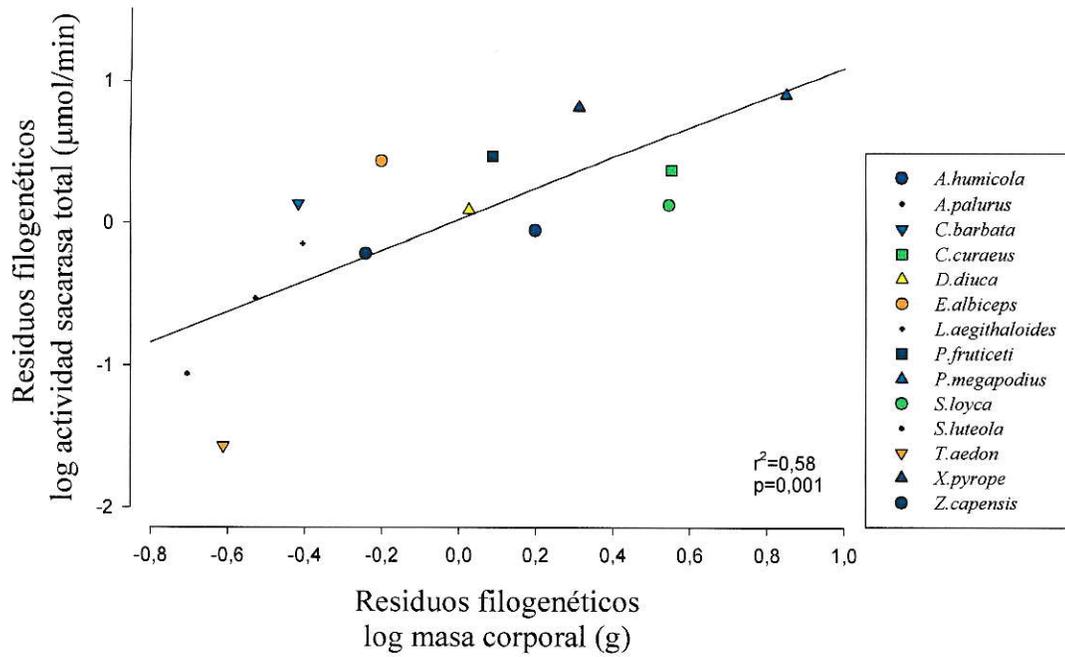


Figura 8. Relación entre la actividad de sacarasa total y la masa corporal después de remover los efectos de la filogenia. Los residuos filogenéticos fueron calculados en mediante análisis de autoregresión.

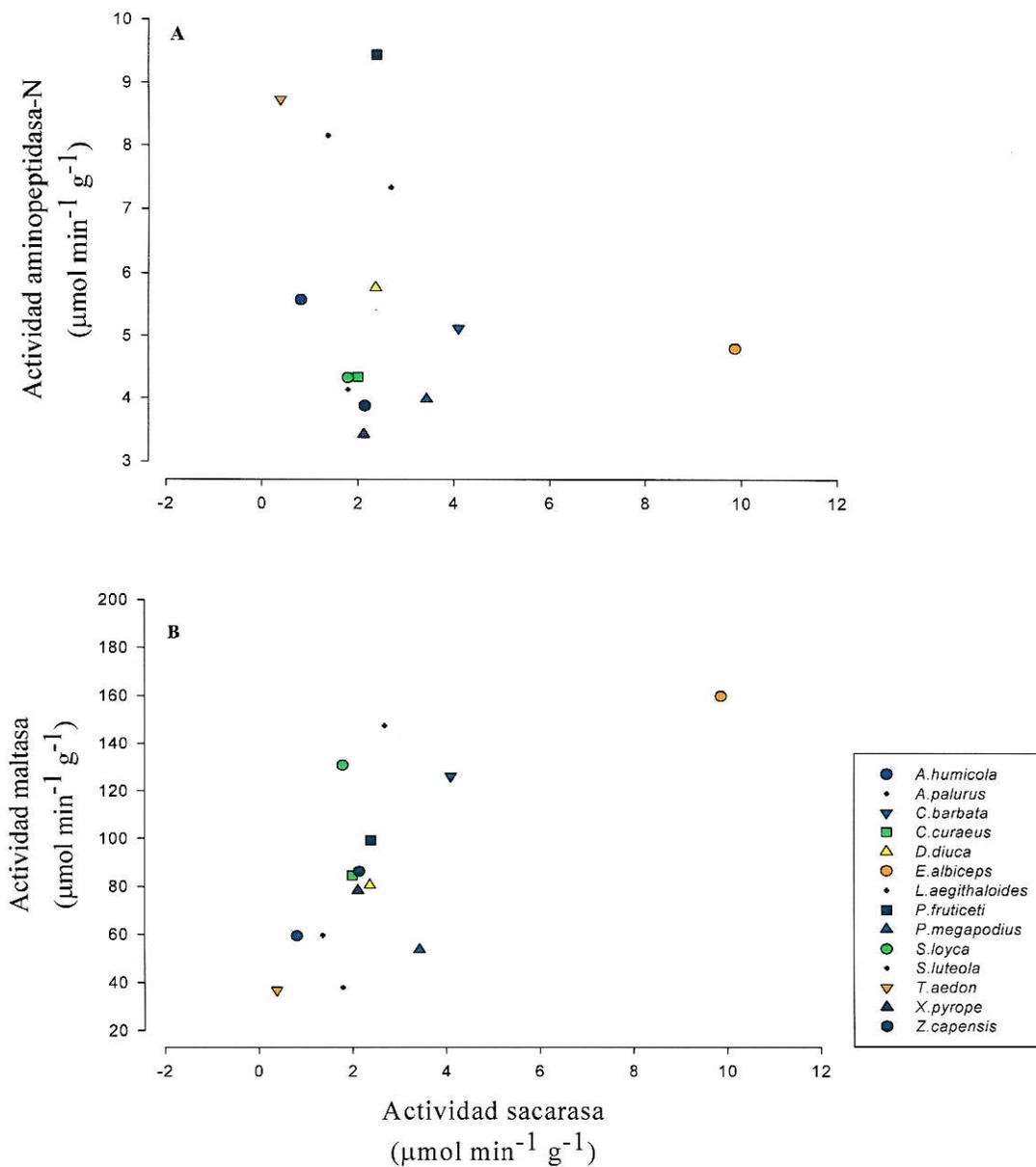


Figura 9. Relación entre las actividades de las enzimas intestinales. (A) Correlación entre las actividades de aminopeptidasa-N y sacarasa, (B) Correlación entre las actividades de maltasa y sacarasa. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar.

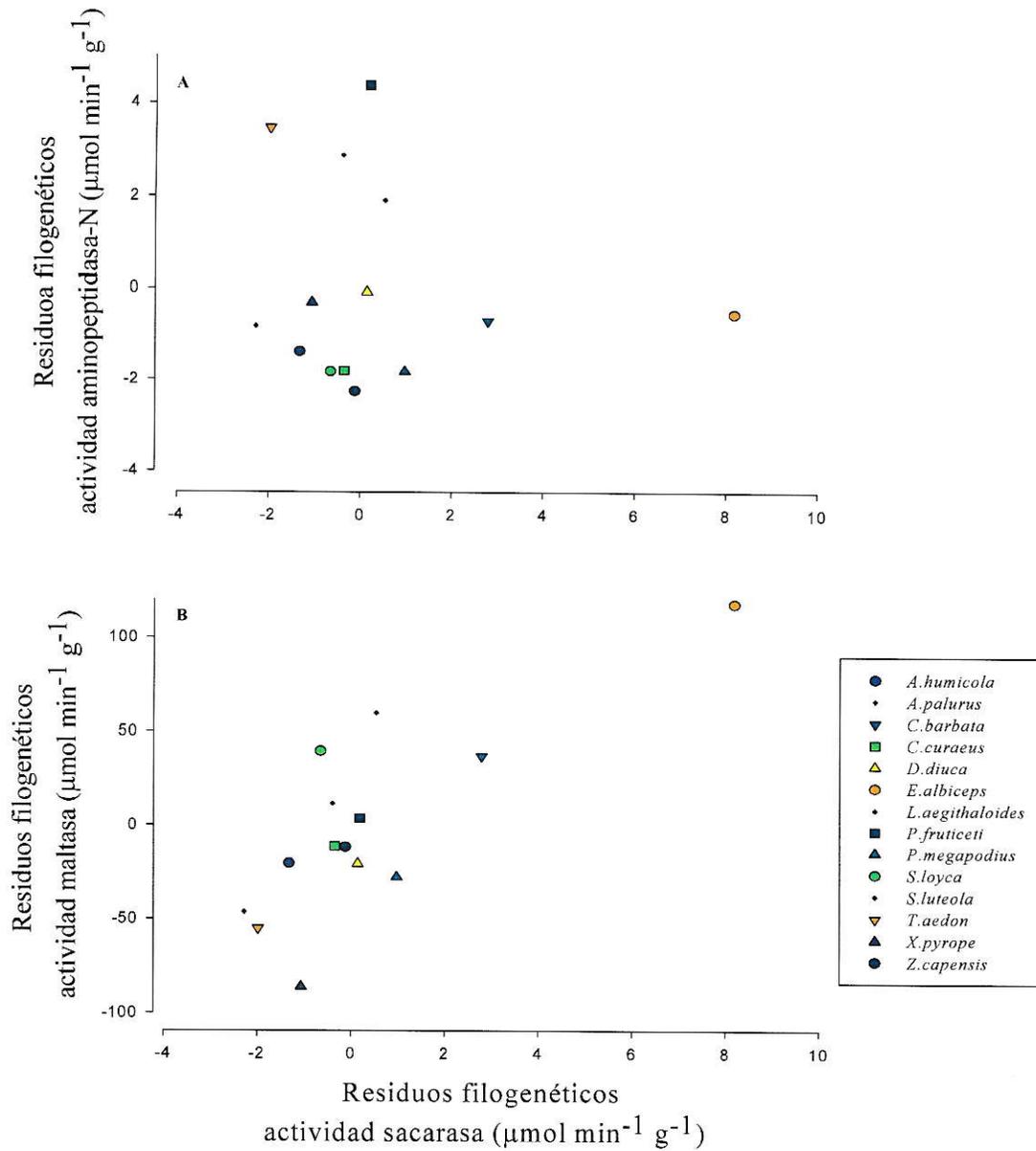


Figura 10. Relación entre las actividades enzimáticas después de remover el efecto filogenético. A) Correlación entre las actividades de aminopeptidasa-N y sacarasa, (B) Correlación entre las actividades de maltasa y sacarasa. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar.

1.2. Categorización dietaria

El análisis anidado jerarquizado reveló que la filogenia y los hábitos dietarios no tuvieron efectos significativos sobre la actividad enzimática (Tabla 1). Este análisis, sin embargo, reveló que las actividades de maltasa, sacarasa y aminopeptidasa-N fueron significativamente diferentes entre las especies (Tabla 1). La tabla 2 muestra la actividad enzimática total estandarizada por el exponente alométrico. Para obtener las diferencias específicas entre las especies, se realizó un test *a posteriori* de Tukey. Este test reveló que las especies *Troglodytes aedon* y *Phrygilus fruticeti* presentaron las mayores actividades de aminopeptidasa-N (Tabla 2). Por otro lado, la especie *Elaenia albiceps* mostró la mayor actividad de sacarasa (Tabla 2). Por último, *Anairetes palurus*, mostró la menor actividad de maltasa (Tabla2).

La tabla 2 muestra los valores promedio de la masa y el largo del intestino delgado. La morfología del intestino delgado no fue afectada por la afiliación taxonómica (tabla 1). El análisis jerarquizado reveló que la masa del intestino delgado fue distinta entre las especies mientras que el largo intestinal presentó diferencias entre las distintas categorías dietarias (Tabla 1). Las mayores masas intestinales se encontraron en *Turdus falklandii*, *Curaeus curaeus* y *Pteroptochos megapodius* (Tabla 2). De manera contraria, el largo del intestino solo fue afectado por la categoría dietaria siendo la dieta insectívora la que presentó el intestino delgado más corto.

Tabla 1. Análisis de varianza anidado jerarquizado con tres factores aleatorios. El primer factor agrupó a las especies dentro de familias, el segundo agrupó especies dentro de hábitos dietarios y el tercero reflejó una categoría para cada especie.

	Primer factor (Familia)		Segundo Factor (Hábito dietario)		Tercer factor (Especie)	
	F	p	F	p	F	p
Actividad aminopeptidasa-N total ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	1,13	0,48	1,11	0,41	2,22	0,04
Actividad maltasa total ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	0,43	0,84	1,42	0,33	3,13	0,01
Actividad sacarasa total ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	1,62	0,37	1,93	0,24	3,42	0,003
Longitud del intestino delgado (cm)	8,57	0,09	14,24	0,04	0,91	0,49
Masa intestino delgado (g)	1,93	< 0,05	0,48	0,64	3,03	0,01

Tabla 2. Masa corporal, morfología intestinal y actividades de enzimas intestinales de las especies usadas en este estudio. Los valores de las actividades enzimáticas fueron corregidos por la masa corporal elevada al exponente alométrico de las ecuaciones: aminopeptidasa-N=0,14m_b^{0,95}; Maltase=1,26m_b^{0,98}; Sucrase = 0,04m_b^{1,07}. G = granívoro, O = omnívoro, F = frugívoro, I = insectívoro. Letras distintas indican diferencias significativas entre los promedios.

ESPECIE	n	Hábitos	Masa corporal	Masa intestino	Longitud intestino	Maltasa	Sacarasa	Aminopeptidasa-N
		Dietarios	(g)	delgado (g)	delgado (cm)	(UI/g ^{0,98})	(UI/g ^{1,07})	(UI/g ^{0,95})
<i>Phrygilus fruticeti</i>	3	G	39,11 ± 0,62	1,18 ± 0,1 ^a	18,3 ± 0,42a	3,18 ± 0,15a	0,06 ± 0,01a	0,34 ± 0,02b
<i>Carduelis barbata</i>	9	G	14,3 ± 0,74	0,35 ± 0,04 ^a	24,09 ± 0,99	3,11 ± 0,71a	0,09 ± 0,02a	0,16 ± 0,03a
<i>Diuca diuca</i>	11	G	33,74 ± 0,66	0,78 ± 0,07 ^a	18,03 ± 0,43	2,02 ± 0,52a	0,05 ± 0,01a	0,16 ± 0,02a
<i>Sicalis luteola</i>	10	G	15,47 ± 0,32	0,38 ± 0,03 ^a	13,74 ± 0,35	3,61 ± 0,8a	0,06 ± 0,01a	0,21 ± 0,03a
<i>Zonotrichia capensis</i>	9	G/I	20,73 ± 0,59	0,16 ± 0,02 ^a	11,14 ± 1,49	2,0 ± 0,52a	0,04 ± 0,01a	0,1 ± 0,02a
<i>Turdus falklandii</i>	11	G/I/F	78,8 ± 2,43	5,05 ± 2,36b	23,66 ± 0,77	3,23 ± 1,63a	0a	0,17 ± 0,06a
<i>Mimus thenca</i>	10	G/I/F	65,86 ± 2,28	2,06 ± 0,28 ^a	20,35 ± 0,84	1,88 ± 0,4a	0a	0,17 ± 0,02a
<i>Curaeus curaeus</i>	10	G/I	89,65 ± 3,25	2,22 ± 0,13b	21,38 ± 0,92	2,22 ± 0,34a	0,04 ± 0,02a	0,13 ± 0,009a
<i>Sturnella loyca</i>	10	G/I	88,53 ± 3,64	1,43 ± 0,09 ^a	23,31 ± 0,89	2,25 ± 0,37a	0,02 ± 0,01a	0,09 ± 0,009a
<i>Pteroptochos megapodius</i>	2	G/I	140,6 ± 5,2	1,99 ± 0,13b	34,95 ± 0,75	0,86 ± 0,69a	0,06 ± 0,04a	0,07 ± 0,02a
<i>Elaenia albiceps</i>	12	I/F	13,56 ± 0,48	0,25 ± 0,03 ^a	8,83 ± 0,36	3,36 ± 0,66a	0,17 ± 0,04b	0,10 ± 0,02a
<i>Xolmis pyrope</i>	5	I	32,71 ± 0,94	0,017 ± 0,002a	16,12 ± 0,41	2,76 ± 1,71a	0,11 ± 0,04a	0,14 ± 0,04a
<i>Asthenes humicola</i>	8	I	21,42 ± 0,34	0,45 ± 0,03 ^a	13,03 ± 0,4	1,38 ± 0,4a	0,02 ± 0,004a	0,14 ± 0,03a
<i>Anairetes palurus</i>	10	I	5,57 ± 0,17	0,1 ± 0,009 ^a	7,94 ± 0,51	0,65 ± 0,13a,b	0,03 ± 0,006a	0,08 ± 0,02a
<i>Troglodytes aeron</i>	12	I	8,96 ± 0,26	0,21 ± 0,02 ^a	8,8 ± 0,39	1,01 ± 0,24a,c	0,009 ± 0,004a	0,26 ± 0,06b
<i>Leptasthenura aegithaloides</i>	5	I	7,8 ± 0,32	0,16 ± 0,02 ^a	9,94 ± 0,45	1,73 ± 0,32a	0,03 ± 0,007a	0,19 ± 0,02a

1.3. Análisis dietario y composición isotópica

Debido a que no se encontró efecto de la categoría dietaria sobre la actividad hidrolítica, se analizó el contenido de la molleja, el porcentaje de nitrógeno y carbono de la dieta y la composición isotópica de la dieta, del músculo pectoral y del hígado (tablas 3 y 4). En general, se encontró que el contenido de la molleja de las especies catalogadas como granívoras contenía principalmente semillas, en un rango que variaba entre 98,45 y 100% de semillas, mientras que en las especies catalogadas como insectívoras se observó la situación contraria, donde el contenido de la molleja estaba constituido principalmente por insectos, con un rango que varió entre un 79,9 y 100%. Las especies omnívoras fueron más variables pudiéndose distinguir dos grupos: aquellas que presentaron un mayor porcentaje de semillas y otro grupo en donde el porcentaje de semillas y de insectos presentaron valores similares (tabla 3).

El análisis del contenido del tracto gastrointestinal reveló que la inexistencia de asociaciones significativas entre los residuos de las actividades de sacarasa y aminopeptidasa-N (UI/g tejido fresco) y el porcentaje de semillas ($r=0,03$ $p=0,89$; $r=0,26$ $p=0,33$; respectivamente) o el porcentaje de insectos de la dieta ($r=-0,06$ $p=0,82$; $r=-0,26$ $p=0,34$; respectivamente). Sin embargo, se encontró una correlación positiva entre la actividad de maltasa (UI/g tejido fresco) y el porcentaje de semillas ($r=0,72$ $p=0,002$; Fig. 11) y negativa con el porcentaje de insectos ($r=-0,74$ $p<0,001$; Fig. 11). El análisis filogenético fue concordante con algunos de los resultados obtenidos con los análisis tradicionales. Los residuos de las actividades de aminopeptidasa-N y sacarasa no

correlacionaron con la proporción de semillas ($r=-0,003$ $p=0,99$; $r=0,29$ $p=0,27$; respectivamente) o con la proporción de insectos ($r=0,04$ $p=0,89$; $r=-0,20$ $p=0,47$; respectivamente) después de remover el efecto de la filogenia. Contrario a los resultados obtenidos con el análisis convencional, los residuos de la actividad de maltasa con efecto de la filogenia removido, solo se correlacionaron de manera marginalmente significativa con la proporción de semillas ($r=0,5$ $p=0,060$) y con la proporción de insectos ($r=-0,48$ $p=0,057$).

Se encontró una correlación negativa entre la razón aminopeptidasa-N/maltasa y la proporción de semillas encontradas en la molleja ($r=-0,53$ $p=0,032$; Fig. 12). La correlación entre los residuos filogenéticos de la razón aminopeptidasa-N/maltasa y la proporción de semillas, mostró una disminución del valor del coeficiente de correlación, sin embargo la relación se mantuvo significativa ($r=-0,50$ $p=0,047$; Fig. 12).

Al analizar el contenido específico de nutrientes en la dieta se encontró que los residuos de la actividad de maltasa se correlacionaron de manera negativa con el porcentaje de nitrógeno ($r=-0,79$ $p<0,001$; Fig. 13). El análisis filogenético reveló una disminución del coeficiente de correlación entre los residuos de la actividad de maltasa después de remover los efectos filogenéticos y el porcentaje de nitrógeno de la dieta ($r=-0,65$ $p<0,007$; Fig. 13).

Los residuos de la actividad de aminopeptidasa-N no se relacionaron significativamente con el $\delta^{15}\text{N}$ del contenido del tracto digestivo ($r=0,28$ $p=0,29$), del músculo ($r=-0,14$ $p=0,6$) y del hígado ($r=-0,32$ $r=0,23$). El análisis filogenético fue

concordante con los resultados antes mencionados. Esto es, los residuos de la actividad de aminopeptidasa-N con efecto filogenético removido, no se relacionaron de manera significativa con el $\delta^{15}\text{N}$ del contenido del tracto digestivo ($r=-0,18$ $p=0,51$), del músculo ($r=-0,12$ $p=0,65$) y del hígado ($r=-0,05$ $r=0,84$).

Las actividades de sacarasa y maltasa (UI/g tejido fresco) no se correlacionaron de manera significativa con el $\delta^{15}\text{N}$ dieta ($r=0,33$ $p=0,21$; $r=-0,14$, $p=0,61$; respectivamente), del músculo ($r=0,27$ $p=0,31$; $r=0,11$ $p=0,69$; respectivamente) y del hígado ($r=0,19$ $p=0,48$; $r=-0,09$ $p=0,73$; respectivamente). Sorprendentemente, las especies que tuvieron el mayor porcentaje de insectos (*Anairetes palurus*, *Troglodytes aedon*, *Asthenes humicola* y *Leptasthenura aegithaloides*) no fueron las que presentaron los mayores valores de $\delta^{15}\text{N}$ (tabla 5). El análisis filogenético de los residuos de las actividades de sacarasa y maltasa no se correlacionaron de manera significativa con el $\delta^{15}\text{N}$ dieta ($r=0,37$ $p=0,16$; $r=-0,18$, $p=0,51$; respectivamente), del músculo ($r=0,26$ $p=0,32$; $r=0,001$ $p=0,98$; respectivamente) y del hígado ($r=0,18$ $p=0,51$; $r=-0,17$ $p=0,54$; respectivamente).

Se evaluó la correspondencia entre el carbono y nitrógeno de la dieta y el porcentaje de semillas e insectos encontrados en la molleja. El $\delta^{15}\text{N}$ del músculo no se relacionó con el porcentaje de semillas ($r=0,11$ $p=0,68$) o con el porcentaje de insectos ($r=-0,11$ $p=0,68$). De manera similar, el $\delta^{15}\text{N}$ del hígado mostró una relación no significativa con el porcentaje de semillas ($r=0,21$ $p=0,43$) o con el porcentaje de insectos ($r=-0,21$ $p=0,43$). Sin embargo, se encontró que la proporción de semillas se

relacionó de manera negativa con el porcentaje de nitrógeno de la dieta ($r=-0,92$ $p<0,001$), mientras que la proporción de insectos se relacionó de manera positiva ($r=0,92$ $r<0,001$). Por otro lado, el $\delta^{15}\text{N}$ de la dieta no se correlacionó de manera significativa con el porcentaje de semillas ($r=0,2$ $p=0,47$) o con el porcentaje de insectos ($r=-0,16$ $p=0,54$).

Por último, la posición trófica calculada a partir composición isotópica de nitrógeno del músculo, no presentó correlaciones significativas con el porcentaje de semillas ($r=-0,24$ $p=0,37$), con el porcentaje de insectos ($r=0,1$ $p=0,71$), con el porcentaje de nitrógeno de la dieta ($r=0,04$ $p=0,88$) o con el porcentaje de carbono de la dieta ($r=0,20$ $p=0,47$). De manera similar, la posición trófica obtenida de la composición isotópica de nitrógeno del hígado no se correlacionó de manera significativa con el porcentaje de semillas ($r=-0,4$ $p=0,13$), con el porcentaje de insectos ($r=0,31$ $p=0,25$), con el porcentaje de nitrógeno dietario ($r=0,17$ $p=0,52$) o con el porcentaje de carbono de la dieta ($r=0,23$ $p=0,4$).

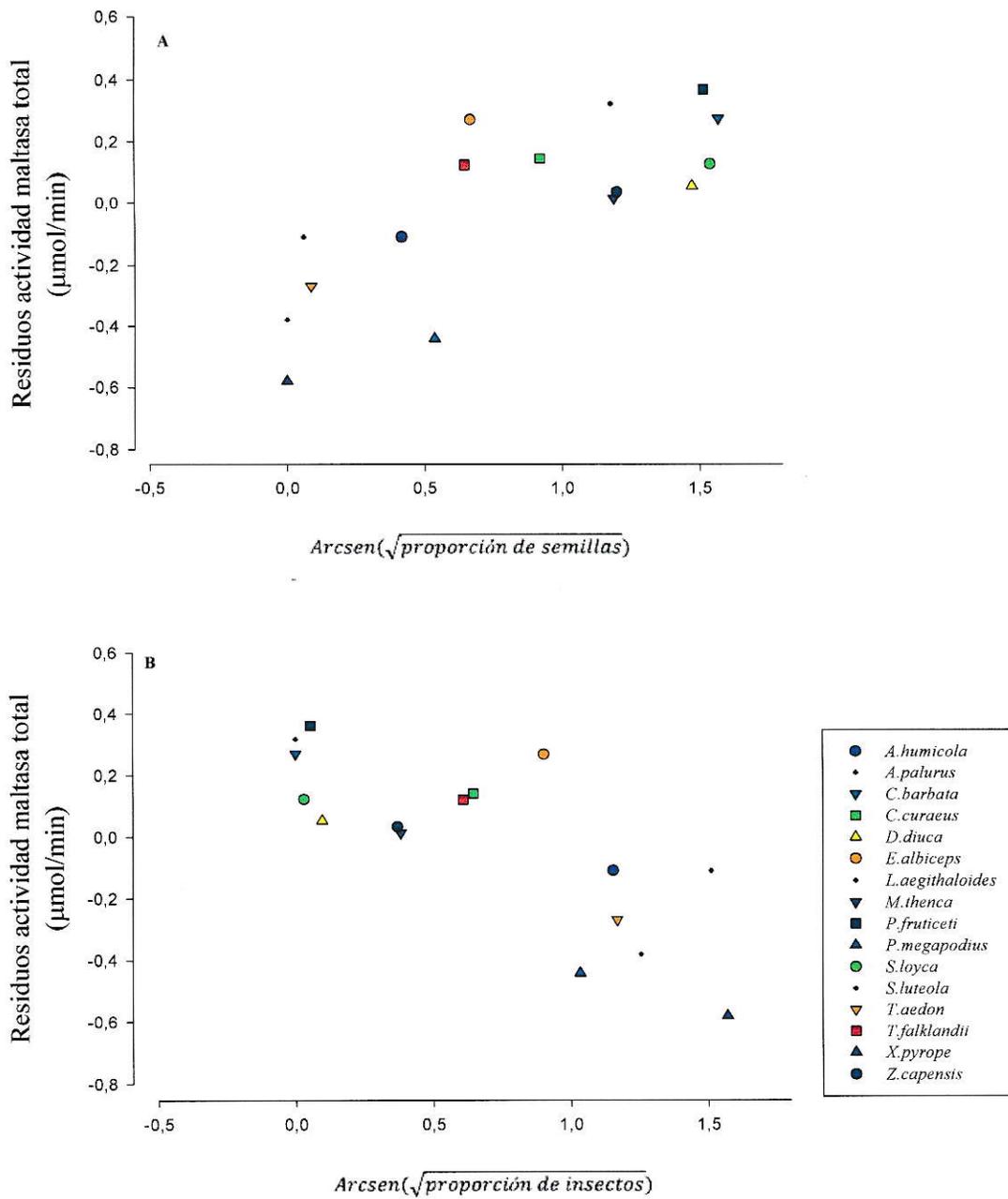


Figura 11. Relación entre los la actividad total de maltasa y (A) la proporción de semillas y (B) la proporción de insectos encontrados en el tracto gastrointestinal usando residuos obtenidos de la regresión con la masa corporal.

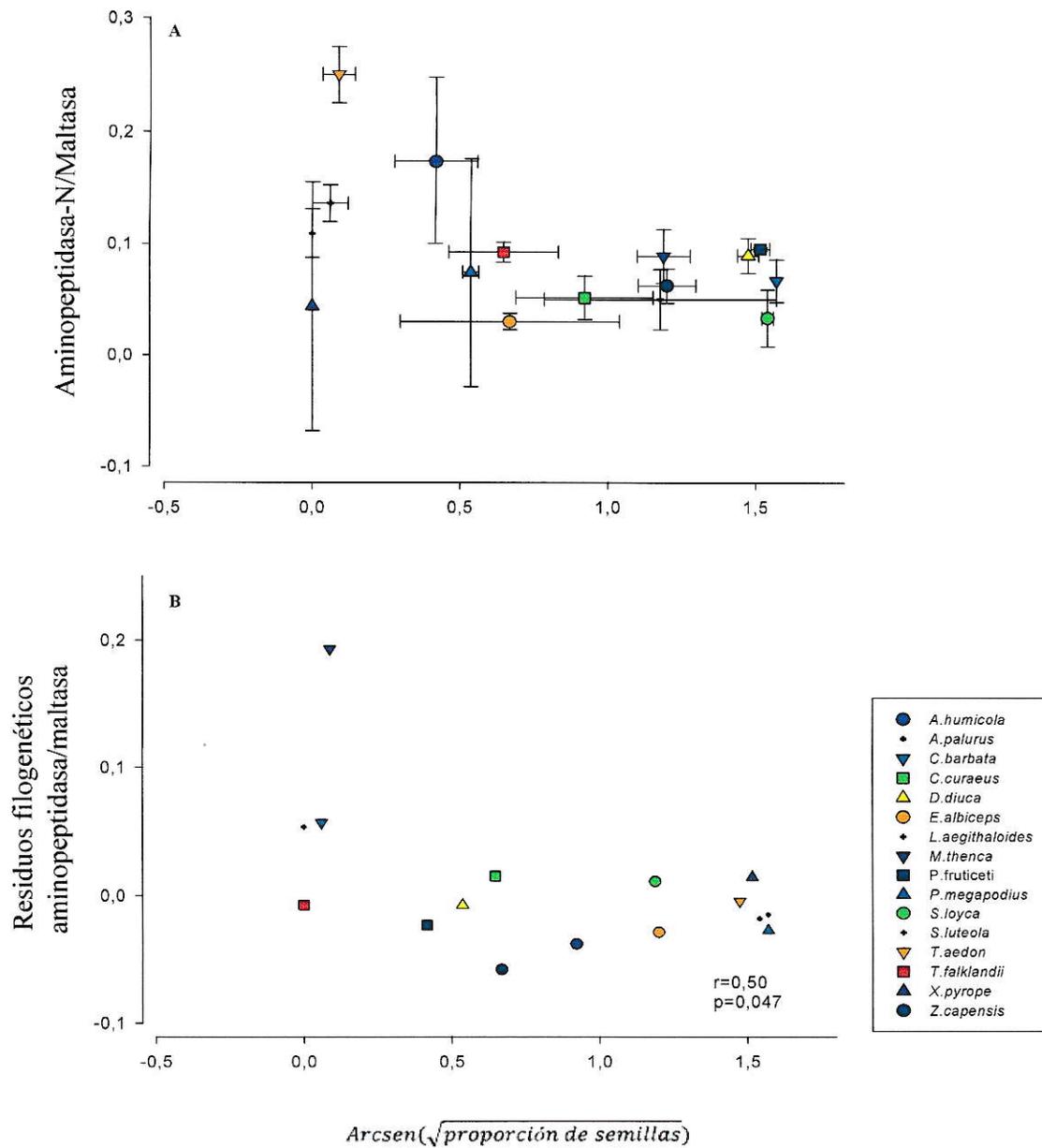


Figura 12. (A) Relación entre la razón aminopeptidasa-N/maltasa y la proporción de semillas encontradas en el tracto gastrointestinal, los puntos corresponde al promedio \pm error estándar. (B) La relación se mantuvo después de remover los efectos filogenéticos.

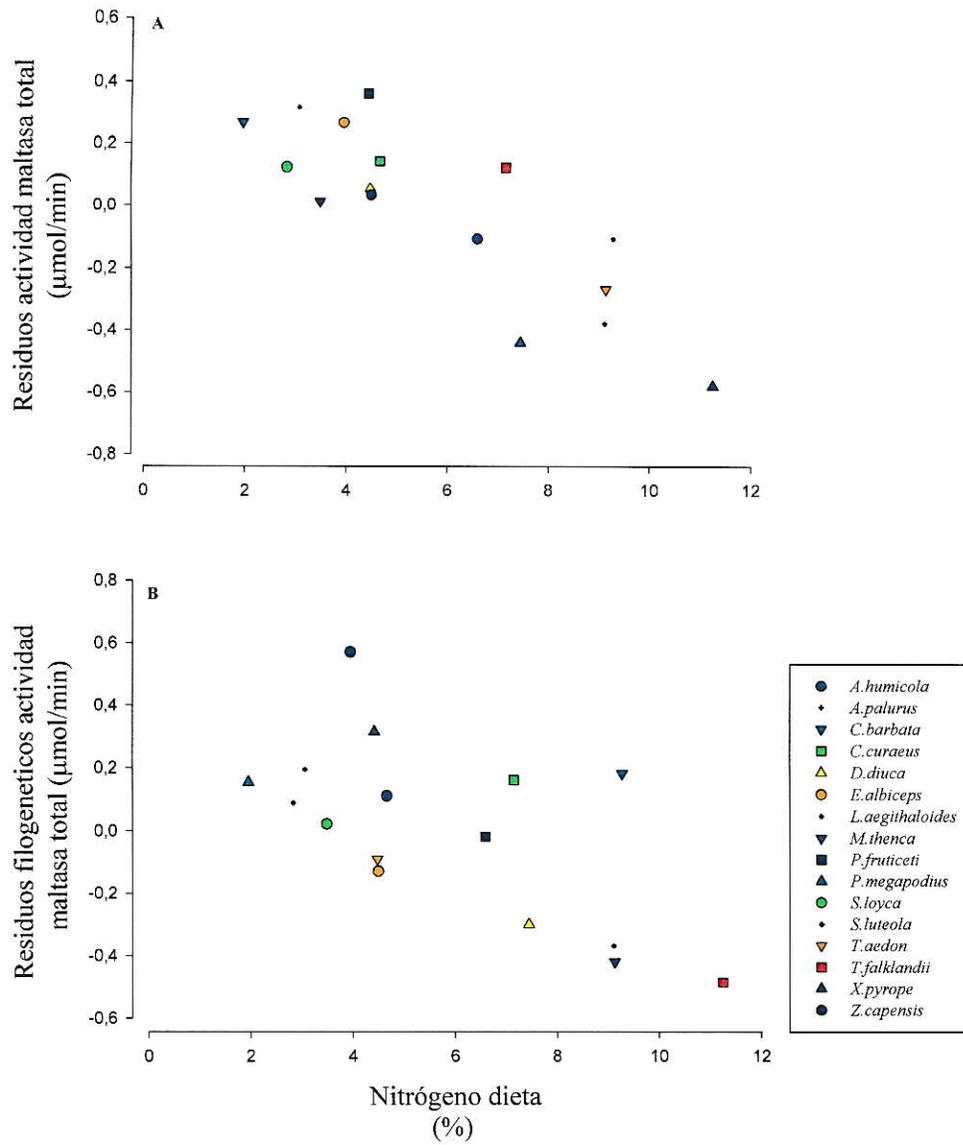


Figura 13. Relación entre la actividad de maltasa y el nitrógeno de la dieta. (A) Relación entre la actividad de maltasa total y el porcentaje de nitrógeno de la dieta y (B) relación entre la actividad de maltasa y el nitrógeno de la dieta usando los residuos obtenidos de la regresión con la masa corporal y después de remover los efectos de la filogenia.

Tabla 3. Porcentaje de semillas e insectos encontrados en el tracto gastrointestinal de las especies de aves de este estudio. Se muestra el valor de los isotopos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de la dieta además del porcentaje de nitrógeno y carbono. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar

ESPECIE	n	Semillas (%)	Insectos (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	C (%)	N (%)
				Dieta		Dieta	
<i>Phrygilus fruticeti</i>	3	99,49 \pm 0,38	0,51 \pm 0,39	2,03 \pm 1,15	-28,48 \pm 0,02	48,30 \pm 0,31	4,43 \pm 0,06
<i>Carduelis barbata</i>	3	100	0,00	7,49 \pm 0,63	-24,64 \pm 0,02	47,77 \pm 2,54	1,97 \pm 0,73
<i>Diuca diuca</i>	6	98,45 \pm 0,72	1,55 \pm 0,73	3,22 \pm 0,64	-27,75 \pm 0,27	44,71 \pm 1,69	4,49 \pm 0,62
<i>Sicalis luteola</i>	4	100	0,00	3,43 \pm 0,05	-27,32 \pm 0,19	41,57 \pm 0,27	3,1 \pm 0,61
<i>Zonotrichia capensis</i>	7	83,72 \pm 7,86	16,24 \pm 7,87	1,26 \pm 0,97	-26,42 \pm 0,54	42,09 \pm 1,33	4,5 \pm 0,43
<i>Turdus falklandii</i>	5	51,05 \pm 16,54	48,95 \pm 16,54	1,13 \pm 2,54	-27,22 \pm 0,87	47,11 \pm 1,41	7,16 \pm 1,53
<i>Mimus thenca</i>	5	83,93 \pm 6,47	16,07 \pm 6,48	6,11 \pm 0,98	-24,24 \pm 0,58	47,82 \pm 0,59	3,49 \pm 0,53
<i>Curaeus curaeus</i>	5	58,67 \pm 17,87	41,33 \pm 17,88	0,28 \pm 1,02	-25,81 \pm 0,42	43,59 \pm 0,51	4,67 \pm 0,9
<i>Sturnella loyca</i>	4	98,77 \pm 0,17	0,21 \pm 0,17	3,34 \pm 1,61	-26,67 \pm 0,14	38,60 \pm 1,81	2,84 \pm 0,64
<i>Pteroptochos megapodius</i>	2	26,12 \pm 2,4	73,88 \pm 2,5	5,16 \pm 0,11	-26,77 \pm 0,93	45,03 \pm 1,81	7,45 \pm 0,56
<i>Elaenia albiceps</i>	5	40,78 \pm 24,18	59,22 \pm 24,19	0,95 \pm 0,75	-24,28 \pm 0,44	46,74 \pm 0,85	3,95 \pm 1,97
<i>Xolmis pyrope</i>	1	0	100	7,87	-25,17	46,33	11,25
<i>Asthenes humicola</i>	4	20,90 \pm 7,21	79,1 \pm 7,21	-0,08 \pm 0,58	-24,14 \pm 0,43	43,43 \pm 1,81	6,6 \pm 0,99
<i>Anairetes palurus</i>	5	0	100	2,04 \pm 0,37	-23,82 \pm 0,12	46,58 \pm 2,54	9,11 \pm 0,36
<i>Troglodytes aeron</i>	5	4,38 \pm 1,52	97,62 \pm 1,53	2,64 \pm 1,93	-25,64 \pm 0,66	47,04 \pm 0,39	9,13 \pm 0,31
<i>Leptasthenura aegithaloides</i>	3	1,06 \pm 1	98,94 \pm 1	2,23 \pm 1,85	-24,73 \pm 0,74	47,07 \pm 0,4	9,28 \pm 0,32

Tabla 4. Promedio (\pm ES) de la composición isotópica de músculo e hígado. El nivel trófico (promedio \pm ES) se obtuvo de la ecuación 1 (véase materiales y métodos).

ESPECIE	n	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Nivel trófico	Nivel trófico
		Músculo	Músculo	Hígado	Hígado	Músculo	Hígado
<i>Phrygilus fruticeti</i>	3	4,97 \pm 0,97	-23,61 \pm 6	4,52 \pm 0,26	-23,49 \pm 0,2	1,64 \pm 0,23	1,62 \pm 0,08
<i>Carduelis barbata</i>	9	9,13 \pm 0,33	-22,64 \pm 0,22	10,8 \pm 0,47	-22,08 \pm 0,35	2,6 \pm 0,1	3,1 \pm 0,14
<i>Diuca diuca</i>	11	6,84 \pm 0,43	-24,02 \pm 0,23	7,56 \pm 0,39	-24,12 \pm 0,25	2,06 \pm 0,15	2,3 \pm 0,15
<i>Sicalis luteola</i>	10	6,71 \pm 0,34	-24,14 \pm 0,21	7,47 \pm 0,24	-23,99 \pm 0,14	1,9 \pm 0,1	2,12 \pm 0,07
<i>Zonotrichia capensis</i>	9	6,16 \pm 0,68	-23,73 \pm 0,32	6,74 \pm 0,58	-23,45 \pm 0,34	2,73 \pm 0,2	3,0 \pm 0,21
<i>Turdus falklandii</i>	11	6,96 \pm 0,82	-24,07 \pm 0,28	7,41 \pm 0,59	-23,90 \pm 0,52	3,38 \pm 0,18	3,51 \pm 0,17
<i>Mimus thenca</i>	10	7,84 \pm 0,87	-23,38 \pm 0,28	9,88 \pm 0,69	-23,06 \pm 0,22	2,2 \pm 0,23	2,96 \pm 0,18
<i>Curaeus curaeus</i>	10	4,68 \pm 0,25	-23,22 \pm 0,32	5,75 \pm 0,43	-22,88 \pm 0,85	2,57 \pm 0,15	3,02 \pm 0,13
<i>Sturnella loyca</i>	10	6,34 \pm 0,71	-23,64 \pm 0,44	7,80 \pm 0,6	-23,88 \pm 0,42	1,95 \pm 0,23	2,38 \pm 0,2
<i>Pteroptochos megapodius</i>	2	7,59 \pm 2,38	-23,07 \pm 0,93	7,46 \pm 0,17	-24,7 \pm 0,48	2,16 \pm 0,7	2,11 \pm 0,05
<i>Elaenia albiceps</i>	12	5,4 \pm 0,21	-23,09 \pm 0,21	6,38 \pm 0,34	-22,63 \pm 0,28	2,75 \pm 0,13	3,04 \pm 0,19
<i>Xolmis pyrope</i>	5	7,19 \pm 1,01	-23,59 \pm 0,24	9,61 \pm 1,04	-23,38 \pm 0,23	2,04 \pm 0,3	2,75 \pm 0,31
<i>Asthenes humicola</i>	8	4,69 \pm 1,02	-22,21 \pm 0,26	5,17 \pm 0,26	-22,18 \pm 0,12	2,16 \pm 0,2	2,83 \pm 0,09
<i>Anairetes palurus</i>	10	4,97 \pm 0,24	-22,56 \pm 0,24	6,6 \pm 0,96	-22,17 \pm 0,23	2,45 \pm 0,13	2,78 \pm 0,1
<i>Troglodytes aeron</i>	12	5,72 \pm 0,29	-23,78 \pm 0,25	6,47 \pm 0,34	-23,17 \pm 0,23	2,62 \pm 0,13	3,12 \pm 0,15
<i>Leptasthenura aegithaloides</i>	5	3,81 \pm 0,34	-22,24 \pm 0,29	5,94 \pm 0,67	-22,42 \pm 0,32	2,0 \pm 0,26	2,8 \pm 0,16

1.4. Análisis de Componentes Principales

Para reducir el número de variables correlacionadas aun número menor de variables, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) incluyendo todas las variables estudiadas. De las cinco variables incorporadas al análisis, el modelo las redujo a 2 factores que explican el 80 % de la variación (Tabla 5). El primer componente (ACP 1) está positivamente correlacionado con la masa y la longitud del intestino delgado. El segundo eje (ACP 2) está correlacionado de manera positiva con la actividad de sacarasa (UI/g tejido fresco; Tabla 5). El eje 1 puede ser interpretado como la variable que da cuenta del tiempo de digestión del alimento, mientras que el eje 2 como la variable relacionada con la capacidad de hidrolizar azúcares.

Basado en el análisis de *factor scores* y cuando se grafica en el espacio de ordenación, se encontró que existe una aparente separación entre los hábitos dietarios de insectívoros y granívoros siendo los omnívoros grupo intermedio. Así, se distinguen tres grupos dietarios (Fig. 14).

La figura 15 muestra una correlación negativa entre el componente principal 2 y el nitrógeno de la dieta ($r=-0,58$ $p=0,018$).

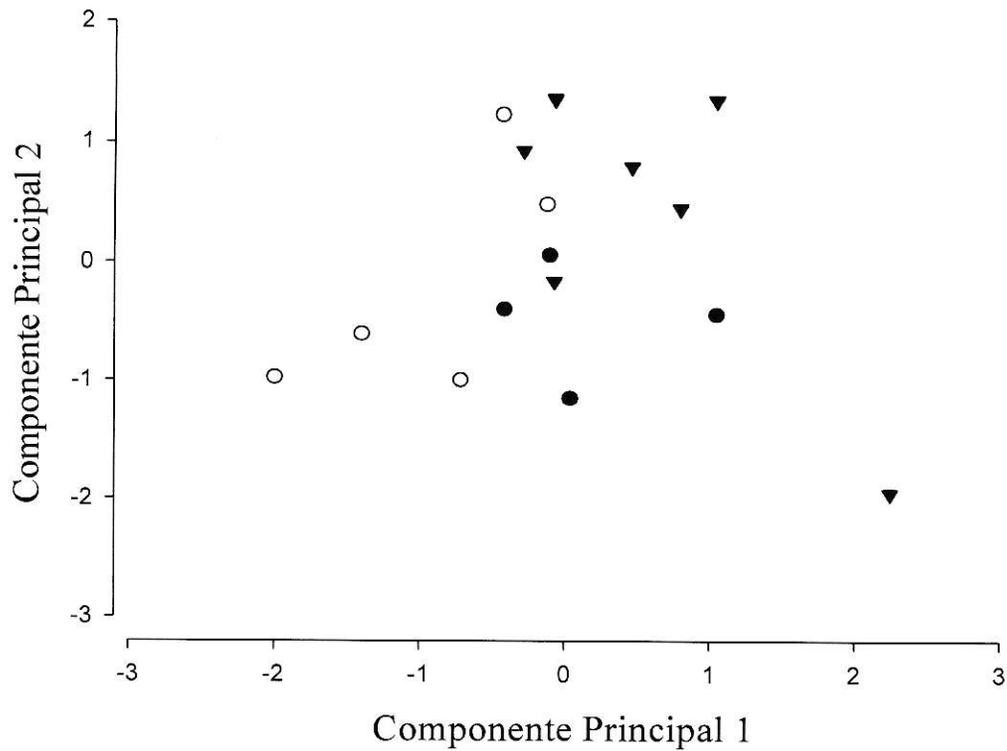


Figura 14. Resultados del análisis de componentes principales (ACP) incluyendo las variables morfológicas y fisiológicas. El eje 1 puede ser interpretado en función de la morfología intestinal y el eje 2 en función de la hidrólisis de sacarosa. Los círculos blancos son aves insectívoras, triángulos son aves omnívoras y círculos negros son especies granívoras.

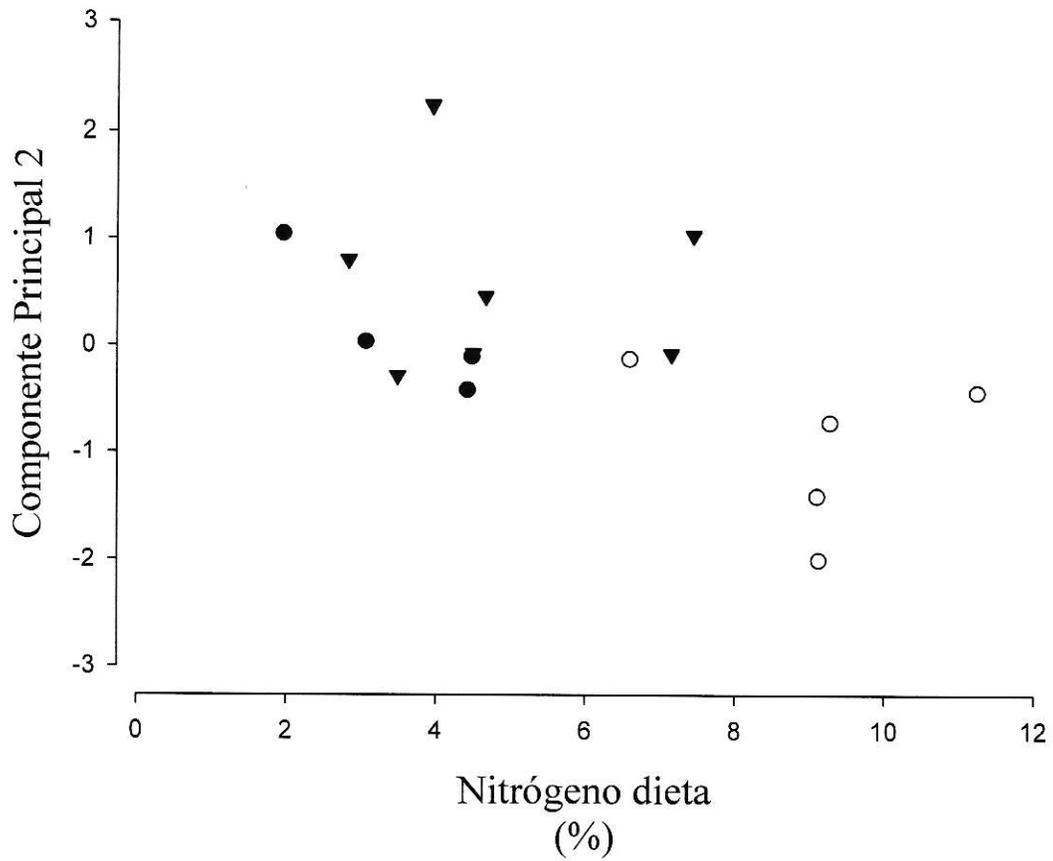


Figura 15. Relación entre el segundo eje del análisis de componentes principales y el porcentaje de nitrógeno de la dieta. Los círculos blancos son aves insectívoras, triángulos son aves omnívoras y círculos negros son especies granívoras.

Tabla 5. Ejes del ACP derivados del análisis de caracteres fisiológicos y morfológicos de las aves de este estudio. En negrilla las variables que presentan una carga > 0,7

Variables	ACP eje	
	1	2
Masa Intestino	0,86	0,29
Largo Intestino	0,80	0,45
Aminopectidasa-N	-0,55	-0,47
Maltasa	-0,65	0,7
Sacarasa	-0,53	0,79
Varianza explicada (%)	47,93	32,14
Varianza explicada acumulativa (%)	47,93	80,07

2. Posición trófica

La composición isotópica de carbono y nitrógeno de los tejidos de las aves presentó una importante variación. Así, se encontró diferencias significativas en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ del músculo (ANOVA: $F_{15,114}=4,29$ $p<0,001$; rango -24,17 a -22,21‰) e hígado (ANOVA: $F_{15,115}=4,98$ $p<0,001$; rango -24,69 a -22,17‰) y del $\delta^{15}\text{N}$ del músculo (ANOVA: $F_{15,114}=5,21$ $p<0,001$; rango 3,82 a 9,13‰) e hígado (ANOVA: $F_{15,115}=7,5$ $p<0,001$; rango 4,52 a 10,8‰). Estos valores indicarían una alta variación de la marca isotópica de los productores primarios, como también del nivel trófico relativo de las distintas especies (tabla 4).

El análisis de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas usadas como base para calcular el nivel trófico, mostró la existencia de diferencias significativas entre las localidades (ANOVA: $F_{2,21}=10,89$ $p<0,01$). Las plantas provenientes de Quebrada de la Plata presentaron los valores más bajos de $\delta^{15}\text{N}$. Como el $\delta^{15}\text{N}$ de los productores primarios varió entre las localidades, se analizó el nivel trófico (a partir de los valores del músculo e hígado) de cada especie de acuerdo a la localidad en la cual fueron capturadas. El análisis reveló la existencia de diferencias significativas entre las localidades en el nivel trófico calculado a partir de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ del músculo pectoral (ANOVA: $F_{2,129}=39,45$ $p<0,001$). De la misma manera el nivel trófico obtenido a partir de los valores del $\delta^{15}\text{N}$ del hígado mostró diferencias significativas entre las localidades (ANOVA: $F_{2,118}=39,85$ $p<0,001$).

El rango de $\delta^{15}\text{N}$ de las especies granívoras se encontró entre los valores 5,2 – 8,8 ‰, lo que determina que los valores del nivel trófico fueron entre 1,6 y 2,5 (Fig. 16). Las especies omnívoras, definidas como aquellas que consumen una mezcla de semillas y/o frutos e insectos, presentaron valores de $\delta^{15}\text{N}$ que variaron entre 4,7-7,6‰ y sus valores de nivel trófico variaron entre 2,6 y 3,4 (Fig. 16). Las especies insectívoras, definidas como aquellas en que su fuente principal de proteína provenía de insectos pequeños, presentaron valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre 5,7-7,9‰. Los valores para su posición trófica variaron entre 2,0 a 2,7 (Fig.16).

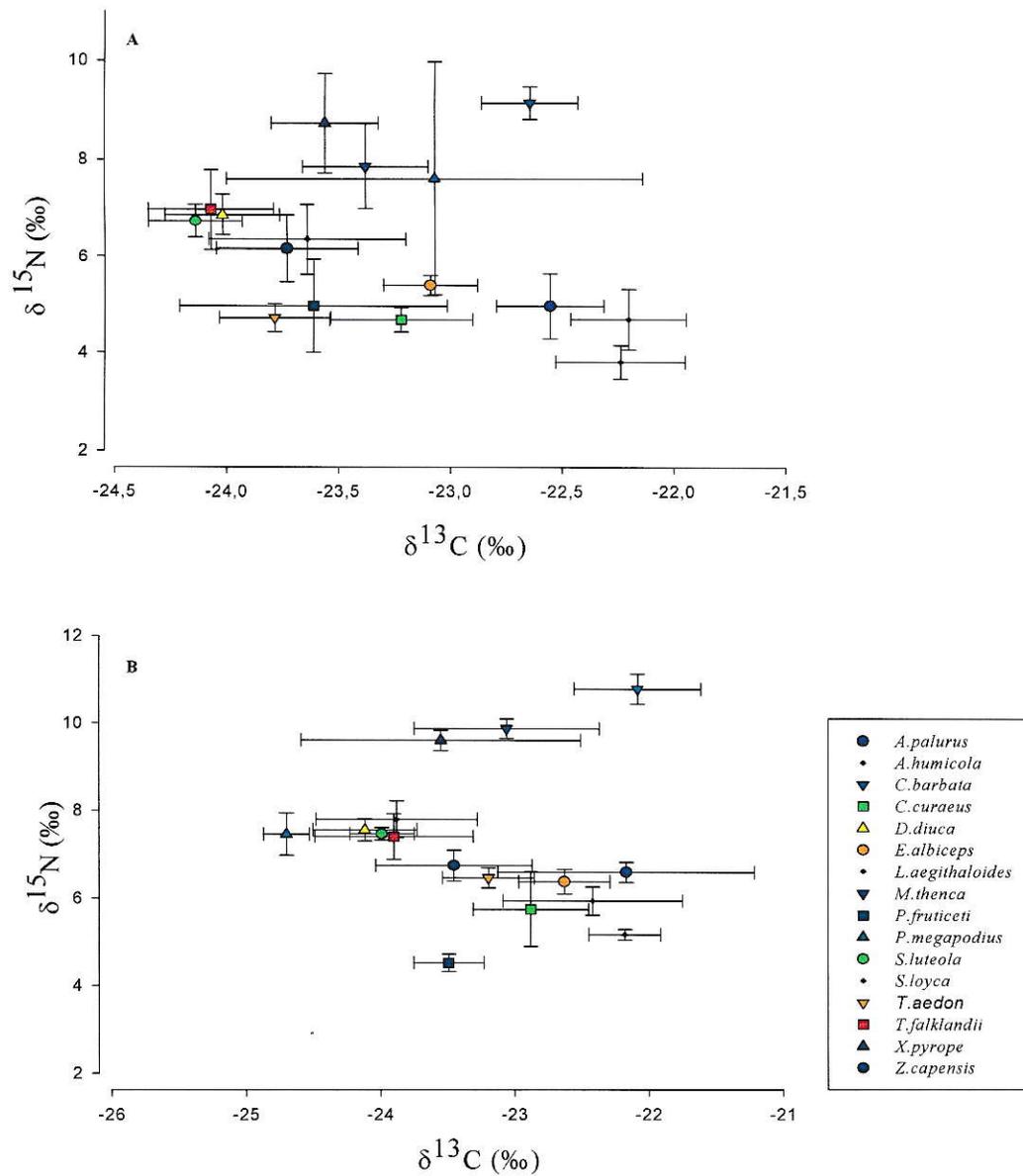


Figura 16. Representación isotópica de la comunidad de aves muestreada en la zona central de Chile. Los valores corresponden al promedio (\pm ES). El panel superior (A) es la representación isotópica obtenida del análisis del músculo pectoral; el panel inferior (B) es la obtenida del análisis isotópica del hígado.

DISCUSION

Actividad enzimática y hábitos dietarios

Las comparaciones interespecíficas son usualmente usadas para identificar modificaciones fisiológicas o bioquímicas que han acompañado al proceso evolutivo y con alguna frecuencia son usadas para inferir cambios genéticos en respuesta a la selección natural (Harvey & Page1 1991, Garland & Carter 1994). Sin embargo, debido que a las especies usualmente no son estadísticamente puntos independientes, el uso de métodos estadísticos tradicionales, como ANOVA O ANCOVA, serían inapropiados (Felsenstein, 1985; Garland et al. 1993, Garland 1994). No obstante, McNab (2009) discute dos grandes problemas con los análisis filogenéticos. El primero relacionado con el concepto de independencia de los datos. McNab (2009) mencionó que si solo se considera la evolución de un rasgo, entonces las especies no son independientes; pero si se consideran las tasas fisiológicas, entonces lo que importa es que el rasgo fisiológico se encuentra en correspondencia con las condiciones ambientales que permiten la supervivencia, independiente de que se haya alcanzado por ancestría o por convergencia. El segundo gran problema destacado por McNab (2009) se relaciona con la carencia de cladogramas completos o de consenso. Este es un problema mayor, ya que los análisis filogenéticos asumen una filogenia bien conocida (e.g. se conoce la topología y el largo de las ramas) y en muchos casos son desconocidas o son objeto de controversia. Para controlar por posibles efectos filogenéticos, en este estudio se evaluaron las tasas de actividad enzimática y la morfología del intestino delgado mediante un análisis de

componentes de varianza anidado (ver Sabat et al. 2004) y mediante análisis filogenéticos explícitos. El principal resultado revelado por el análisis de componentes de varianza fue, que tanto las características morfológicas como bioquímicas del intestino delgado difieren entre las especies estudiadas, pero que ni la masa del intestino ni las actividades de las enzimas digestivas fueron afectadas por la afiliación taxonómica o los hábitos dietarios. A excepción de la longitud del intestino, que fue afectado por la categoría dietaria, en donde las especies insectívoras presentan el intestino delgado más corto. Además, la masa del intestino delgado fue diferente entre las especies, siendo *Anairetes palurus* y *Leptasthenura aegithaloides* las que presentaron las menores masas intestinales. El análisis filogenético corroboró los resultados obtenidos mediante el análisis tradicional, incluso en algunos casos las relaciones obtenidas mediante el análisis convencional mejoraron (figura 8-9). Estos resultados reflejarían que las relaciones entre las variables estudiadas en este análisis se deben principalmente a los efectos de la masa corporal o lo hábitos dietarios, mas que a efectos producidos por compartir una historia evolutiva común

Los resultados muestran que el exponente alométrico de la relación entre la actividad hidrolítica y la masa corporal fue de 0,95 para la actividad de aminopeptidasa-N y 0,94 para la actividad de sacarasa. El exponente alométrico de maltasa fue 0,98. Estos exponentes son mayores a los reportados para otros paseriformes (Shondube & Martínez del Rio 2004). Probablemente la alta representación de aves pequeñas en nuestro estudio podría haber llevado a los resultados a una sobreestimación del exponente alométrico. Sin embargo, el exponente alométrico de la longitud del intestino

delgado (0,37) fue muy similar al reportado previamente para passeriformes (0,34, Ricklefs 1996). Además, se encontró una correlación positiva y significativa entre la actividades masa-específicas de sacarasa y maltasa, correlación que ha sido previamente reportada para otras especies de aves (e.g., Martínez del Río 1990, Biviano et al. 1993, Sabat et al. 1998, Meynard et al. 1999, Schondube & Martínez del Río 2004). En muchas especies de aves, la actividad de maltasa es el resultado de la acción de las enzimas sacarasa-isomaltasa y maltasa-glucoamilasa. Así, un incremento en la expresión de sacarasa-isomaltasa se traduce en un incremento de la actividad de maltasa (Martínez de Río 1990, Afik et al. 1995). Adicionalmente, no se encontró una correlación entre las actividades de sacarasa y aminopeptidasa-N entre las especies. Diamond (1991) propone que mantener la maquinaria molecular para asimilar los nutrientes puede ser costoso y las proteínas de la membrana intestinal ocuparían espacio y energía. Así, se esperaría un compromiso en la eficiencia tanto en dietas insectívoras ricas en proteínas como en dietas granívoras ricas en carbohidratos. Desde este punto de vista, la ausencia de una correlación positiva entre las disacaridasas y la aminopeptidasas podría ser un apoyo a la existencia de compromisos. Sin embargo, estos resultados contrastan con aquellos encontrados por Sabat et al. (1998), quienes reportaron una correlación positiva y significativa entre las tres enzimas en *Z. capensis* y *Diuca diuca* (ver también Naya et al. 2005 para un estudio en un vertebrado ectotermo). No obstante, los estudios mencionados anteriormente fueron realizados a un nivel intraespecífico, mientras que los resultados de este estudio provienen de comparaciones interespecíficas. La discrepancia podría revelar una diferencia entre las aproximaciones inter e intraespecíficas.

Desafortunadamente, no existen estudios adicionales en aves que reporten la correlación entre las disacaridasas y aminopeptidasas a un nivel interespecífico, lo que impide hacer una conclusión más general sobre la existencia de tal compromiso.

A pesar de que las actividades hidrolíticas no fueron significativamente afectadas por la categoría dietaria, nuestros resultados sugieren que la actividad de las enzimas podría estar afectada por la concentración probable de los sustratos específicos. En este sentido, los niveles de actividad enzimática observada en algunas especies parecieran apoyar la hipótesis de la existencia de un ajuste funcional entre las tasas de actividad enzimática y los sustratos presentes en la dieta natural. Por ejemplo, se encontró que la especie *Troglodytes aedon*, descrita como insectívora mostró la actividad más alta de aminopeptidasa-N comparado con las otras especies (Tabla 2); además presentó un bajo porcentaje de semillas en su dieta. Esta especie presentó una actividad 3,5 veces mayores que la Turca (*Pteroptochos megapodius*) catalogada como omnívora. Además, encontramos que la especie descrita como omnívora *Elaenia albiceps* mostró la actividad mas alta para sacarasa, comparado con las otras especies. Coincidentemente, se ha reportado que esta especie a menudo consume el néctar de flores de arboles como *Embothrium coccineum*. Estas flores tienen concentraciones de sacarosa cercanas al 40% del total de azúcares del néctar, representando una cantidad significativa de la energía consumida por aves (Smith-Ramirez & Armesto 1998). Adicionalmente, se ha reportado que *E. albiceps* es un consumidor ocasional de frutos (Rozzi et al. 1996). De acuerdo a esto, la actividad de sacarasa de *E. albiceps* fue 24 veces mayor que la actividad de *Troglodytes aedon* descrita como insectívora.

actividades de las enzimas intestinales siguen un patrón similar. Si embargo, a pesar de que no contamos con datos sobre el tiempo de retención del alimento para nuestras especies, se propone una asociación negativa entre el tiempo de retención del alimento de nuestras especies y la actividad enzimática específica (UI/ g tejido fresco).

¿Qué podría explicar la carencia de asociación entre los niveles de actividad de las enzimas digestivas y los hábitos dietarios en paseriformes? Como fue mencionado por muchos autores (McNab 1992, Cruz-Neto et al. 2001, Cruz-Neto & Bozinovic 2004) el uso de la categorización dietaria en los estudios comparativos es problemático, ya que en algunos casos existe una asignación errónea entre la especie y la categoría dietaria a la cual es designada. Se sugiere que probablemente el análisis pudiese estar sesgado por la asignación errónea de la categoría dietaria para algunas de las especies del modelo estadístico. Es más, en algunos casos los hábitos dietarios para algunas especies son poco conocidos o son erróneos por la subestimación de las diferencias estacionales o geográficas en el uso de recursos alimentarios (Klasing 1998, Karasov & Martínez del Río 2007, Sabat et al. 2009). Por otra parte, las categorías dietarias no necesariamente reflejan la composición química de la dieta. Por ejemplo, las especies definidas como consumidores especialistas de semillas, pueden presentar un gran rango de variabilidad en el contenido de proteína y en el tipo de azúcares contenidos en las diferentes semillas. Consecuentemente, diferentes especies granívoras pueden exhibir distintos niveles y tipos de sustratos específicos.

A pesar de que no encontramos una asociación aparente entre la categoría dietaria y la bioquímica del tracto intestinal, se observaron diferencias interespecíficas claras tanto en la fisiología como en la morfología del intestino delgado. Estudios en aves han documentado que las variaciones inter e intraespecíficas en los rasgos fisiológicos son adaptativas y reflejan ajustes generados por la selección natural, plasticidad fenotípica o una combinación de estas dos fuentes de variación fenotípica. Así, la actividad hidrolítica de las enzimas intestinales puede ser usualmente modulada por la presencia de sus sustratos específicos (Martínez del Río & Stevens 1989, Martínez del Río et al. 1992, Sabat et al. 1995). Sin embargo, la magnitud del cambio en la actividad enzimática en aves paseriformes como producto de aclimatación (en el laboratorio) o aclimatización (en terreno) parece ser inferior a la magnitud de las diferencias que se encontró entre las especies de este estudio. Por ejemplo, la magnitud de la modulación de maltasa entre dietas con altas y bajas actividades es 2.6 en adultos de la Ciguita del pinar (*Dendroica pinus*; Levey et al. 1999), 1.5 en *Diuca diuca* y *Zonotrichia capensis* (Sabat et al. 1998) y 1.4 en el estornino (*Sturnus vulgaris*), mientras que la variación en la actividad de aminopeptidasa-N entre diferentes dietas va desde rangos de 1.2 (Ciguita del pinar; Levey et al. 1999) a 1,7 en *Z. capensis*, *Diuca diuca*, la Reinita coronada y estorninos (Afik et al. 1995, Martínez del Río et al. 1995, Sabat et al. 1998). La magnitud de la variación entre la actividad mas alta y la mas baja en este estudio fue cercano a 5 veces para maltasa, 24 veces para sacarasa y 3 veces para aminopeptidasa-N. Así, la magnitud mas alta de las diferencias entre las actividades de las proteasas y las disacaridasas entre especies de paseriformes probablemente indiquen

que las actividades observadas podrían ser el resultado de cambio evolutivo (Afik et al. 1995, Shondube et al. 2001). Sin embargo, recientemente, Brzek (2009) documentó que la actividad de maltasa específica puede ser modulada durante el desarrollo en polluelos de gorriones (*Passer domesticus*), pero no en adultos (Cavides-Vidal et al. 2000), sugiriendo que la magnitud de la modulación en las actividades enzimáticas pueden ser subestimadas cuando se utilizan animales adultos como sujeto de experimentación. Desafortunadamente, pocos estudios en la diversidad fisiológica de aves han particionado la variación fenotípica (Biviano et al. 1993, Brzek et al. 2009), y por lo tanto cuánto de la variabilidad intraespecífica en la actividad enzimática tiene base genética o es atribuible a plasticidad fenotípica sigue siendo desconocido.

Posición trófica y el rol de $\delta^{15}\text{N}$ en estudios dietarios

La composición isotópica de los distintos tejidos ha sido usada como una variable cuantitativa en estudios comparativos, permitiendo diferenciar entre especies con diferentes hábitos dietarios (Kelly 2000, Kwak & Zender 1997, Shondube et al. 2001). Los resultados de este estudio apoyan hasta cierto punto la utilidad de los isótopos estables como herramienta para complementar los estudios de hábitos dietarios. Nuestros resultados revelaron una ausencia de relación entre las actividades hidrolíticas y el $\delta^{15}\text{N}$ de los tejidos. Aunque los valores de composición isotópicas de nitrógeno y carbono no constituyen un diagnóstico inequívoco de la dieta natural de las especies, encontramos una gran variación interespecífica en $\delta^{15}\text{N}$ tanto del músculo pectoral como del hígado. Paralelamente, la relación entre el eje 2, obtenido del análisis de componentes

principales, y el porcentaje de nitrógeno de la dieta dividió a las especies en tres grupos: insectívoros con bajos valores de ACP 2 y gran porcentaje de nitrógeno en la dieta, un grupo omnívoro con valores intermedios y un grupo con especies granívoras caracterizadas con elevados valores de ACP2 y bajo porcentaje de nitrógeno en la dieta. De esta manera, especies con un bajo porcentaje de nitrógeno dietario, pareciera estar relacionado a un bajo consumo de proteínas y a una elevada capacidad para asimilar azúcares. De manera contrastante, especies que presentan un elevado porcentaje de nitrógeno en la dieta presentarían niveles de consumo de azúcares menores.

A pesar de lo anterior, las relaciones tróficas obtenidas de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ no siguieron nuestras predicciones. Aun cuando las especies granívoras e insectívoras presentaron valores diferentes de $\delta^{15}\text{N}$, los valores fueron mayores en omnívoros, lo que en principio es un resultado contra intuitivo, puesto que la incorporación de mayor material vegetal en los omnívoros debiera disminuir el valor de $\delta^{15}\text{N}$ en los tejidos de estas aves.

De manera similar, Van der Zanden et al. (1997) comparó la posición trófica estimada de la dieta contra la estimada con $\delta^{15}\text{N}$, encontrando que los métodos convencionales son complementarios a los análisis isotópicos. Nuestros resultados, mostraron que el porcentaje de semillas o insectos no se relacionaron el $\delta^{15}\text{N}$ de los tejidos y por lo tanto, tampoco con la posición en la trama trófica. Sin embargo los estudios que han demostrado un enriquecimiento en $\delta^{15}\text{N}$ desde los productores primarios hasta los carnívoros tope (Hobson 1994, Van der Zanden et al. 1997, Yi et al.

2006), se han realizado en ecosistemas marinos o en mamíferos terrestres, en donde las cadenas tróficas son típicamente más largas (Shoener & DeNiro 1984).

¿Por qué existiría un “desacople” entre los hábitos dietarios y los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los tejidos y el nivel trófico? Se esperaba una relación positiva entre el nivel trófico y el porcentaje de semillas o insectos, sin embargo tal relación no se produjo, debido a que las especies que presentaron los mayores porcentajes de insectos, y por lo tanto mayor porcentaje de proteína ingerida, no fueron las que se encontraban en los niveles tróficos superiores. Esto es, pájaros de distintos niveles tróficos pueden consumir el mismo porcentaje de proteínas. Además, especies que presenten una posición trófica similar podrían presentar grandes diferencias en la marca isotópica de carbono y nitrógeno en sus tejidos, si ambas especies consumen presas que se sustentan en productores primarios con distinta marca isotópica. Esto podría ser resultado de la variación espacial y temporal en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en la base de la trama trófica.

En este sentido, la composición isotópica de nitrógeno de las plantas usadas como base mostró una variación significativa, a pesar del origen geográfico común. Se ha reportado que el valor de $\delta^{15}\text{N}$ varía entre plantas con distintas formas de crecimiento radicular y el tipo de bacterias fijadoras de nitrógeno con la cual hacen asociaciones. Por ejemplo, las gramíneas, licopodios y herbáceas tienen mayores valores de $\delta^{15}\text{N}$ que musgos, líquenes, árboles y arbustos (Koch 2007). Esto significa que existirían diferencias de $\delta^{15}\text{N}$ entre las distintas especies de productores primarios debido a diferencias en: (i) la tasa de captación de nitrógeno, (ii) el grado de utilización de los

nitratos o de desnitrificación, (iii) el tipo de fitoplancton y/o bacterias fijadoras de nitrógeno (Koch 2007). Así, y como se ha reportado en ambientes marinos, la composición isotópica de los productores primarios sería altamente variable entre (Kling et al. 1992, Cabana & Rasmussen 1996) y dentro de los sistemas a través de tiempo (Toda & Wada 1990, Gu et al. 1994, Cabana & Rasmussen 1996). Por lo tanto, la posición trófica de un organismo sería el reflejo del $\delta^{15}\text{N}$, pero solo del sistema bajo estudio (ver Hobson and Welsh 1992; Wainright et al. 1993), provocando que la utilidad del $\delta^{15}\text{N}$ como una medida absoluta de la posición trófica para estudios comparativos sea limitada, debido a que la composición isotópica de los organismos utilizados como base generalmente presenta grandes variaciones. Así, a pesar de que encontramos mayoritariamente insectos en la dieta de especies insectívoras, esto no se reflejó en el análisis isotópico, mostrando valores de $\delta^{15}\text{N}$ más bajos de lo esperado según su categoría de consumidores secundarios, debido probablemente a que la base de su trama trófica presentó bajos valores de $\delta^{15}\text{N}$. Desafortunadamente, no contamos con información específica sobre las relaciones tróficas para nuestras especies, por lo que es difícil generalizar esta conclusión a las aves utilizadas en este estudio. Sin embargo, la ausencia de correlación entre el porcentaje de insecto y el nivel trófico, indicaría que distintos niveles tróficos, por ejemplo secundarios y terciarios tendrán niveles similares de ingesta de proteína probablemente.

Así, pareciera ser que la actividad hidrolítica del intestino delgado se encontraría más relacionado con las características bioquímicas de los diferentes sustratos encontrados en la dieta (proporción de semillas e insectos y % nitrógeno) y no con el

$\delta^{15}\text{N}$ o la trama trófica, a un nivel interespecífico Sin embargo, recientemente se ha encontrado que a un nivel intraespecífico (ver Sabat et al. 2009a, b) algunos rasgos fisiológicos (i.e. tasa metabólica basal y la función renal) varían con $\delta^{15}\text{N}$ y con la posición en la trama trófica. Por lo tanto, esta metodología sería mas apropiada para análisis a un nivel intraespecífico en que distintos grados de omnivoría pueden estar asociados a distintos niveles de $\delta^{15}\text{N}$ e ingesta proteica. En este sentido, nuevamente se destaca la diferencia entre los resultados de los análisis realizados a distintos niveles de organización jerárquica. Probablemente, a un nivel intraespecífico las características isotópicas de los productores primarios que sustentan la trama trófica de una población de aves sea mas homogénea que la marca isotópica de las bases tróficas que sustentas especies distintas.

CONCLUSION

En conclusión, nuestros resultados indican que las categorías dietarias basadas en los análisis tradicionales no permiten inferir una relación entre la dieta y la función digestiva en aves.

Debido a la magnitud de las diferencias interespecíficas en las capacidades bioquímicas entre las especies, éstas parecen ser el resultado de ajustes fisiológicos con una base genética a la dieta natural. No obstante, no se puede descartar el posible rol de la plasticidad del desarrollo en la generación de los patrones observados.

A pesar de que la composición isotópica de las dietas o de los tejidos no permite separar con claridad entre los distintos hábitos dietarios, no se puede descartar el uso de los isótopos estables como una herramienta para complementar los análisis de hábitos dietarios. Por último, la variación en la composición isotópica de las dietas y los tejidos no reflejan inequívocamente la composición química de la dieta (e.g., proteínas, azúcares) por lo que esta metodología debiera utilizarse con cautela en análisis comparativos inter-específicos o al ser utilizados como variable *proxy* en estudios ecofisiológicos.

Es probable que el análisis de isótopos estables para inferir la posición trófica de distintos organismos sea más certero en comparaciones intra-específicas o bien cuando la base de las cadenas y tramas tróficas presenten mayor homogeneidad.

REFERENCIAS

Afik, D., Vidal, E. C., Martínez del Río, C. y W. H. Karasov. 1995. Dietary modulation of intestinal hydrolytic activity in yellow-rumped warblers. *Am. J. Physiol. Regul. Integ. Comp. Physiol.* 269:413 – 420.

Angerbjörn, A., Hersteinsson, P., Lidén, K. y Nelson, E. 1994 .Dietary variation in arctic foxes (*Alopex lagopus*): an analysis of stable isotopes. *Oecol.* 99: 226 - 232.

Biviano, A.B., Martínez Del Río, C. y Phillips, D.L. 1993. Ontogenesis of intestine morphology and intestinal disaccharidases in chickens (*Gallus gallus*) fed contrasting purified diets. *J. Comp. Physiol.* 163B: 508 - 518.

Brzek, P., Kohl, K., Caviedes-Vidal, E. y Karasov, W.H. 2009. Developmental adjustments of house sparrow (*Passer domesticus*) nestlings to diet composition. *J. Exp. Biol.* 212: 1284 - 1293.

Buddington, R.K., Chen, J.W. y Diamond, J.M. 1987. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *J. Physiol.* 393: 261 - 281.

Cabana, G., y Rasmussen, J.B. 1996. Comparing aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:10844 - 10847.

Caviedes-Vidal, E., Afik, D., Martínez del Río, C. y Karasov, W.H. 1994. Omnivory and dietary plasticity are not necessarily correlated: Dietary modulation of intestinal enzymes in four bird species. *Physiol.* 37: A81.

Caviedes-Vidal, E., Afik, D., Martínez del Rio, C., Karasov, W.H. 2000. Dietary modulation of intestinal enzymes of the house sparrow (*Passer domesticus*): testing an adaptative hypothesis. *Comp. Biochem. and Physiol. A* 125:11 - 24.

Chang, M.H. y Karasov, W.H. 2004. How the house sparrow *Passer domesticus* absorbs glucose. *J. Exp. Biol.* 207: 3109 – 3121.

Cheverud, J.M., Dow, M.M. y Leutenegger, W. 1985. The quantitative assessment of phylogenetic constraints in comparative analysis: sexual dimorphism in body weight among primates. *Evol.* 39(6): 1335 – 1351.

Cruz-Neto, A.P., Garland, T.Jr. y Abe, A.S. 2001. Diet, phylogeny and basal metabolic rate in phyllostomid bats. *Zool.* 104: 49 - 58.

Cruz-Neto, A.P. y Bozinovic, F. 2004. The relationships between diet quality and basal metabolic rate in endotherms: insights from intraspecific analysis. *Physiol. Biochem. Zool.* 77: 877-889.

Ehleringer, J.M., Rundel P.W y Nagy, K.A. 1986. Stables isotopes in Physiological ecology and food web search. *TREE* 1(2): 42 – 45.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol.* 39:783 - 791.

Estades, C.F. 1997. Bird-habitat relationships in a vegetational gradient in the Andes of central Chile. *The Condor.* 99:719 - 727.

Gannes, L.Z., Martínez del Rio, C. y Koch, P. 1998. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp. Biochem. and Physiol.* 119A (3): 725 – 737.

Gatica, C.D.L, González, S.P, Vásquez, R.A. y Sabat, P. 2006. On the relationship between sugar digestion and diet preference in two Chilean avian species belonging to the Muscicapoidea superfamily. *Rev. Chi. Hist. Nat.* 79: 287 - 294.

Garland, T.Jr., Harvey, P.H. y Ives, A.R. 1992 Procedures for the analysis of comparative data using phylogenetically independent contrasts. *Syst. Biol.* 41: 18 – 32.

Garland, T.Jr., Dickerman, A.W., Janis, C.M. y Jones, J.A. 1993 Phylogenetic analysis of covariance by computer simulation. *Syst. Biol.* 42: 265 - 292.

Garland, T.Jr. 1994 Why not to no two-species comparative studies: limitations on inferring adaptation. *Physiol. Zool.* 67: 797 - 828.

Garland, T., Jr. y Adolph, S.C. 1994. Why not to do two-species comparative studies: limitations on inferring adaptation. *Physiol. Zool.* 67: 797 - 828.

Garland, T.Jr. y Carter, P.A. 1994. Evolutionary physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 579 – 621.

Glittleman, J.L., Luh, H.K. 1992. On comparing comparative methods. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 23: 383 - 404.

Gonzalez, J. y Wink, M. 2008. Phylogenetic position of the monotypic Des Murs' Wiretail

(*Sylviorthorhynchus desmursii*, Aves: Furnariidae) based on mitochondrial and nuclear DNA. *J Ornithol.* 149: 393 – 398.

Gu, B., Schell, D.M. y Alexander, V. 1994. Stable carbon and nitrogen isotopic analysis of the plankton food web in a subarctic lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 1338 - 1344.

Harvey, P.H. y Pagel, D.M. 1991. The comparative method in evolutionary biology. Oxford University Press, Oxford.

Hobson, K.A. y Clark, R.G. 1992. Assessing avian diets using isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. *The Condor* 94(1): 181 – 188.

Hobson, K.A. y Welsh, H.E. 1992. Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84: 9 - 18.

Hobson, K.A., Piatt, J.F. y Pitocchelli, J. 1994. Using stable isotopes to determine seabird trophic relationships *J. An. Ecol.* 63(4): 786 - 798.

Inger, R. y Bearhop, S. 2008. Applications of stable isotope analyses to avian ecology. *Ibis* 150: 447 – 461.

Jaksic, F. 2001. Spatiotemporal variation patterns of plants and animals in San Carlos de Apoquindo, central Chile. *Rev Chi His Nat* 74: 477-502.

Karasov, W.H. y Diamond, J.M. 1988. Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioSci.* 38: 602 – 611.

Karasov, W.H. 1996. Digestive plasticity in avian energetics and feeding ecology. En C. Carey (ed), *Avian energetics and nutritional ecology* pp: 61-84. Chapman and Hall, New York.

Karasov, W.H. y Levey, D.J. 1990. Digestive system trade-offs and adaptations of frugivorous passerine birds. *Physiol. Zool.* 63:1248 – 1270.

Karasov, W.H. y Martínez del Rio, C. 2007. *Physiological Ecology: How animals process energy, nutrients and toxins.* Princeton University Press.

Kelly, J.F. 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Can. J. Zool.* 78: 1 - 27.

Klasing, K.C. 1998. Comparative avian nutrition. CAB International.

Kling, G.W., Fry, B., y O'Brien, W.J. 1992. Stable isotopes and planktonic trophic structure in arctic lakes. *Ecol.* 73: 561 - 566.

Koch, P.L. 2007. Isotopic study of the biology of modern and fossil vertebrates. En R. Michener y K. Lajtha (eds.), *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Pp 99 – 139. Blackwell Publishing, USA.

Kwak, T.J. y Zedler J.B. 1997. Food web analysis of southern California coastal wetlands using multiple stable isotopes. *Oecol.* 110: 262 – 277.

Lanyon, S.M. y OMLAND, K.E. 1999. A molecular phylogeny of the blackbirds (*Icteridae*): Five lineages revealed by cytochrome-B sequence data. *The Auk* 116(3): 629 - 639.

Levey, D.J., Place, A.R., Rey, P.J., Martínez del Rio, C. 1999. An experimental test of dietary enzyme modulation in pine warblers *Dendroica pinus*. *Physiol. Biochem. Zool.* 72: 576 - 587.

López-Calleja, M.V. 1995. Dieta de *Zonotrichia capensis* (*Emberizidae*) and *Diuca diuca* (*Fringillidae*): efecto de la variación estacional de los recursos tróficos y la riqueza de aves granívoras de Chile central. *Rev. Chi. Hist. Nat.* 68: 321 – 331.

Martínez del Rio, C. y Stevens, B.R. 1989. Physiological constraint on feeding behavior: intestinal membrane disaccharidases of the starlings. *Sci.* 43(4892): 794 – 796.

Martínez del Rio, C. 1990. Dietary and phylogenetic correlates of intestinal sucrase and maltase activity in Birds. *Physiol Zool* 63: 987 - 1011.

Martínez del Rio, C., Baker, H.G. y Baker, I. 1992 Ecological and evolutionary implication of digestive processes: bird preferences and sugar constituents of floral nectar and fruit pulp. *Expe.* 48: 544 - 540.

Martínez del Rio, C., Brugger, K., Witmer, M., Rios, J. y Vergara, E. 1995. An experimental and comparative study of dietary modulation of intestinal enzymes in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Physiol. Zool.* 68: 490 – 511.

McNab, B.K. 2002. *The Physiological Ecology of Vertebrates: A view from energetic.* Cornell University Press.

McNab, B.K. 2009. Ecological factors affect the level and scaling of avian BMR. *Comp. Biochem. and Physiol. A* 152: 22 - 45.

McWilliams, S.R., Caviedes –Vidal, E. y Karasov, W.H. 1999. Digestive adjustments in cedar waxwings to high feeding rate. *J. Exp. Zool.* 283: 394 - 407.

Meynard, C., López-Calleja, M.V., Bozinovic, F. y Sabat, P. 1999. Digestive enzymes of a small herbivore, the rufous tailed plantcutter. *The Condor* 101: 904 - 907.

Naya, D.E., Farfán, G., Sabat, P., Méndez, M.A., Bozinovic, F. 2005. Digestive morphology and enzyme activity in the Andean toad *Bufo spinulosus*: hard-wired or flexible physiology? *Com. Biochem. and Physiol. A*: 165 – 170.

- Novoa, F.F., Veloso, C., López –Calleja, M.V. y Bozinovic. F. 1996. Seasonal changes in diet, digestive morphology and digestive efficiency in the rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*) in Central Chile. *The Condor* 98: 873 - 876.
- Ohlson, J., Fjeldsa, J. y. ERICSON, P. G. P. 2008. Tyrant flycatchers coming out in the open: phylogeny and ecological radiation of *Tyrannidae* (Aves, Passeriformes). *Zool. Scripta*: 315 – 335.
- Pearson, S.F., Levey, D.T., Greenberg, C.H. y Martínez del Rio, C. 2003. Effects of elemental compositions on the incorporation of the dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in a omnivorous songbird. *Oecol.* 135: 516 – 523.
- Peterson, B.J. y Fry, B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 293 – 320.
- Post, D.M. 2002. Using isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecol.* 83(3): 703 -.718.
- Rezende E.L. y T. Garland. 2003. Comparaciones interespecíficas y métodos estadísticos filogenéticos. En F. Bozinovic (ed), *Fisiología ecológica y evolutiva: teoría y casos de estudios*. pp 79-98. Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Ricklefs, R.E. 1996. Morphometry of the digestive tract of some passerine birds. *The Condor* 98: 279 - 292.
- Rohlf, F.J. 2001. Comparative methods for the analysis of continuous variables: geometric interpretations. *Evol.* 55(11): 2143 – 2160.
- Rozzi, R., Armesto, J.J., Correa, A., Torres-Mura, J.C. y SALABERRY, M. 1996. Avifauna of primary temperate forest of uninhabited islands of Chiloé archipelago, Chile. *Rev. Chi. His. Nat.* 69: 125 – 139.

Sabat, P., Bozinovic, F. y Zambrano, F. 1995. Role of dietary substrates on intestinal disaccharidases, digestibility and energetics in the insectivorous Mouse-Opossum (*Thylamys elegans*). J. Mammal. 76(2): 603 – 611.

Sabat, P., Novoa, F., Bozinovic, F. y Martínez del Rio, C. 1998. Dietary flexibility and intestinal plasticity in birds: a field and laboratory study. Physiol. Zool. 71(2): 226 – 236.

Sabat, P. 2000. Intestinal disaccharidases and aminopeptidase-N in two species of *Cinclodes* (Passerine: Furnariidae). Rev. Chi. Hist. Nat. 73: 345 – 350.

Sabat, P. y Martínez del Rio, C. 2002. Inter-and intraspecific variation in the use of marine food resources by three *Cinclodes* (Furnariidae, Aves) species: carbon isotopes and osmoregulatory physiology. Zool. 105: 247 – 256.

Sabat, P. y González, S.P. 2003. Digestive enzymes in two species of marine *Cinclodes* (Passeriformes: Furnariidae). The Condor 105: 830 – 833.

Sabat, P., Maldonado, K., Rivera-Hutinel, A. y Farfan G. 2004. Coping with salt without salt glands: osmoregulatory plasticity in three species of coastal songbird (ovenbirds) of the genus *Cinclodes* (Passeriformes: Furnariidae). J. Comp. Physiol. B 175: 415 - 420.

Sabat, P., González-Vejares, S. y Maldonado, K. 2009a. Diet and habitat aridity affect osmoregulatory physiology an intraspecific field study along environmental gradients in the rufous-collared sparrows. Comp. Biochem. and Physiol. A 152: 322- 326.

Sabat P., Cavieres, G., Velos, C., Canals, M. y Bozinovi, F. 2009b. Intraspecific basal metabolic rate varies with trophic level in rufous-collared sparrows. Comp. Biochem. and Physiol. A 154(4): 501 – 507.

Sibly, R.M. y Calow, P. 1986. *Physiological Ecology of Animals: An evolutionary Approach*. Blackwell, Oxford.

Sibley, C.G. y Ahlquist J.E. 1990. *Phylogeny and classification of birds*. Yale University Press, New Haven.

Shoeninger, M.J. y DeNiro, M.J. 1984. Nitrogen and carbon isotopic composition of bone collagen from marine and terrestrial animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48: 625 - 629.

Shondube, J.E., Herrera-M, L.G. y Martínez del Rio, C. 2001. Diet and the evolution of digestion and renal function in phyllostomid bats. *Zool* 104: 59 – 73.

Shondube, J.E. y Martínez del Rio, C. 2004. Sugar and protein digestion in flowerpiercers and hummingbirds: a comparative test of adaptative convergence. *J. Comp. Physiol. B* 174: 263 - 273.

Smith-Ramirez, C. y Armesto J.J. 1998. Nectarivoría y polinización por aves en *Embothium coccineum* (Protaceae) en el bosque templado de Chiloé. *Rev. Chi. His. Nat.* 71:51 - 63.

Toda, H. y Wada, E. 1990. Use of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios to evaluate the food source of the mysid, *Neomysis intermedia* Czerniawsky, in a eutrophic lake in Japan. *Hydrobiol.* 194: 85 - 90.

Vander Zanden, M.J., Cabana, G. y Rasmussen, J.B. 1997. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$) and literature dietary data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 1142 - 1158.

Vonk H.J. y Western, J.R. 1984. *Comparative Biochemistry and Physiology of Enzymatic Digestion*. London: Academic Press.

Wainright, S.C., Fogarty, M.J., Greenfield, R.C., & Fry, B. 1993. Long-term changes in the Georges Bank food web: trends in stable isotope compositions of fish scales. *Mar. Biol.* 115: 481 - 493.

Witmer, M.C. & Martinez del Rio, C. 2001. The membrane-bound intestinal enzymes of waxwings and thrushes: adaptive and functional implications of patterns of enzyme activity. *Physiol. Biochem. Zool.* 74(4): 584 – 593

Wolf, B.O. & Martinez del Rio, C. 2000. Use of Saguaro Fruit by White-Winged Doves: Isotopic Evidence of a Tight Ecological Association. *Oecol.* 124(4): 536 - 543.

Yi, X., Yang, Y. y Zhang, X. 2006. Modeling trophic positions of the alpine meadow ecosystem combining stable carbon and nitrogen isotope ratios. *Ecol. Model.* 193: 801 – 808.